

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ПЕРСОНАЛИЗАЦИЯ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМНО-БИОЛОГИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

Ф.А. Балабин¹, Ю.-Д.Д. Коробкина¹, С.В. Галкина^{1,2}, М.А. Пантелеев^{1,2}, А.Н. Свешникова^{1,2}*

¹Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, 109029, Москва, ул. Средняя Калитниковская, 30; *эл. почта: a.sveshnikova@physics.msu.ru

²Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Д. Рогачева, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1

Безъядерные клетки крови — тромбоциты — являются основой для образования тромбов в сосудах человека, а антитромбоцитарная терапия относится к наиболее распространённым, так как применяется после ишемических событий и для их профилактики. Однако, в силу ограниченной эффективности и рисков кровотечений, существует потребность в её персонализации. Ранее мы разработали серию вычислительных моделей для описания внутриклеточной сигнализации тромбоцитов и систему экспериментальных методов, позволяющих охарактеризовать тромбоциты конкретного пациента. Также было проведено исследование по протеомике тромбоцитов. Целью настоящего исследования была персонализация центрального модуля внутриклеточной сигнализации тромбоцита, отвечающего за формирования осцилляций концентрации кальция в ответ на активацию. Модель представляет собой систему из 26 обыкновенных дифференциальных уравнений. Для персонализации модели используются данные протеомики и проводится подбор неизвестных параметров модели по экспериментальным данным о форме и частоте осцилляций кальция в одиночных тромбоцитах конкретного пациента. В результате исследования показано, что ключевыми персонализируемыми параметрами осцилляторного ответа тромбоцита являются степень асимметрии одиночного спайка кальция и максимальная частота осцилляций. В работе были рассмотрены три здоровых педиатрических донора разного возраста. На основе моделей были получены персональные кривые кальциевого ответа тромбоцитов на активацию. Анализ моделей показал, что в то время как наблюдается большая гетерогенность отдельных показателей внутриклеточной сигнализации, таких как активность кальциевых помп (SERCA) и рецепторов к инозитолтрифосфату (IP₃R), эти показатели компенсируют друг друга у каждого донора. Это наблюдение подтверждается анализом данных протеомики 15 здоровых доноров, согласно которым наблюдается корреляция суммарного количества SERCA и IP₃R. Таким образом, в настоящей работе показано несколько новых особенностей кальциевой сигнализации тромбоцитов человека и предложен алгоритм персонализации её модели.

Ключевые слова: тромбоциты; кальциевая сигнализация; рецептор к инозитол-3-фосфату; компьютерное моделирование

DOI: 10.18097/PBMC20247006394

ВВЕДЕНИЕ

Тромбоциты — это специализированные безъядерные дисковидные клетки крови диаметром около 2–4 мкм и толщиной около 0,5 мкм [1]. Особенности строения тромбоцитов является отсутствие ядра и наличие многочисленных впячиваний плазматической мембраны (открытая канальцевая система, ОКС), которые, как считается, дают запас поверхности для изменения формы и образования псевдоподий — первого ответа тромбоцита на активацию [2]. Внутри тромбоцита есть окружённый мембраной эндоплазматический ретикулум (плотная канальцевая система, DTS), несколько митохондрий и большое количество гранул, несущих различные вещества, при активации тромбоцита выплёскивающиеся во внеклеточное пространство [3].

Для выполнения своей основной функции, заключающейся в перекрывании повреждения в стенке сосуда, тромбоциты должны перейти в активное состояние (рис. 1а). Тромбоциты активируются как при контакте с компонентами межклеточного матрикса (при повреждении эндотелия), так и под действием растворимых активаторов

(ADP, адреналин, серотонин, тромбин и др.). Это запускает внутриклеточный каскад реакций, в первую очередь высвобождение кальция из внутриклеточных хранилищ [2]. Большинство активаторов тромбоцита действует на рецепторы, связанные с G-белками на поверхности тромбоцита, что ведёт к активации фосфолипазы C (PLC, в тромбоцитах человека преобладает фосфолипаза-C β [4]), которая гидролизует фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат до инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP₃) и 1,2-диацилглицерола [1, 5]. В тромбоцитах нет рианодиновых рецепторов, поэтому выход кальция из внутриклеточных хранилищ полностью определяется каналами-рецепторами к IP₃ (IP₃R), а снижение концентрации кальция в цитозоли поддерживается АТФазами SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase) [5]. Как показали исследования кальциевой сигнализации в одиночных клетках, повышение концентрации кальция при активации тромбоцита происходит не равномерно, а в виде негармонических осцилляций, так называемых импульсов-спайков [6, 7]. Кальциевая сигнализация запускает активацию интегринов, изменение формы, секрецию гранул [8, 9] и гибель тромбоцита по пути некроза [6].

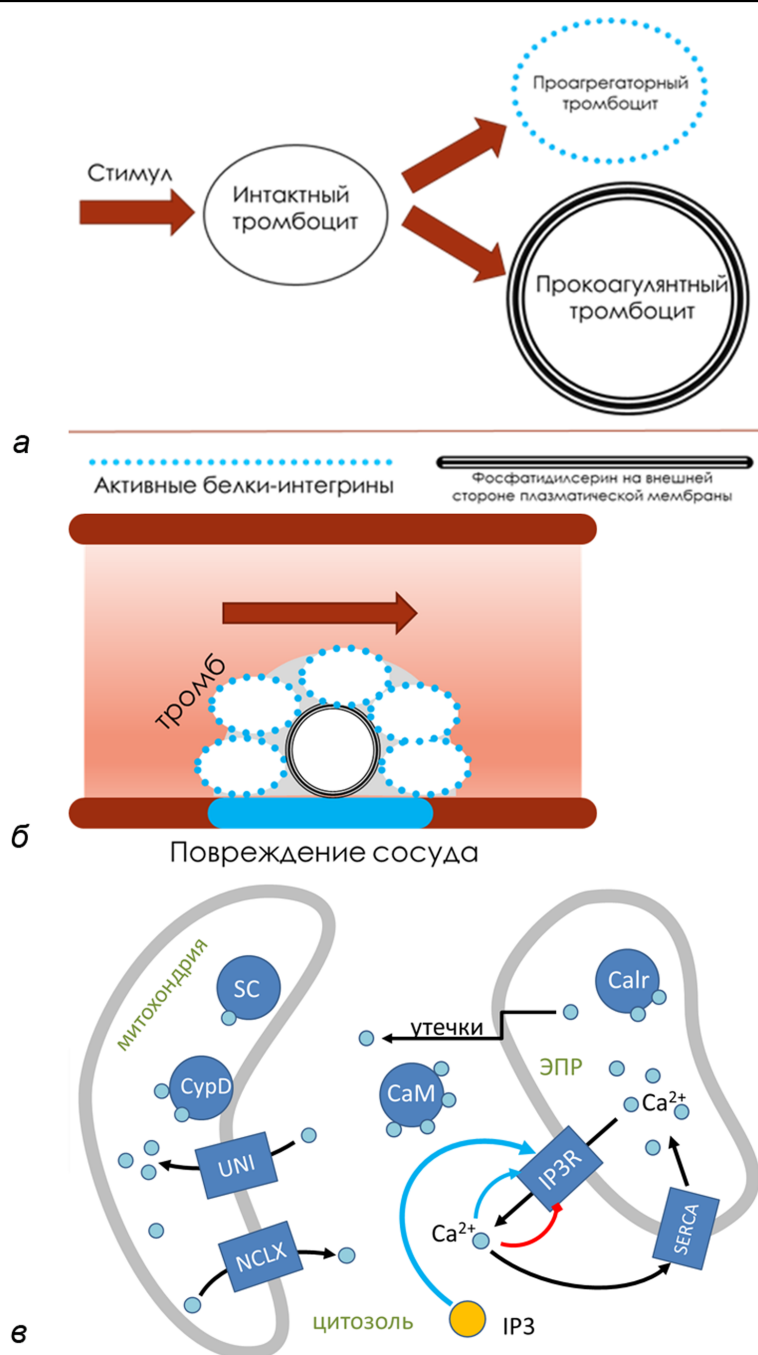


Рисунок 1. Схематичное представление активации тромбоцита. Повреждение сосуда приводит к контакту нескольких нерастворимых (коллаген, фибронектин) и растворимых (ADP) активаторов с интактными тромбоцитами. **(а)** Интактный тромбоцит при контакте с активатором (стимул) переходит либо в проагрегаторное состояние (за счёт активации белков-интегринов на его поверхности, позволяющих образовывать белковые мостики между клетками), либо в прокоагулянтное состояние (за счёт экспозиции относительно отрицательно заряженного фосфолипиды фосфотидилсерина на внешней стороне мембраны, что катализирует желирование плазмы крови – коагуляцию). **(б)** При контакте с местом повреждения проагрегаторные тромбоциты адгезируют к стенке сосуда и агрегируют друг с другом, прокоагулянтные тромбоциты вызывают желирование плазмы и “цементирование” тромбоцитарного агрегата (обозначено серым цветом). **(в)** Активация тромбоцита приводит к высвобождению инозитолтрифосфата (IP₃) в цитозоль. IP₃ связывается с его рецепторами (IP₃R) в мембране ЭПР, открывая каналы для выхода кальция, который обычно содержится в ЭПР из-за действия АТРАЗЫ-насоса – SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase). В ЭПР кальций может быть буферизован различными агентами, в том числе кальретикулином (Calr). В цитозоле роль буфера кальция играет кальмодулин (CaM). Повышение концентрации кальция в цитозоле приводит к открытию митохондриальных унипортеров (UNI) и входу кальция в митохондрии, где его буферизуют различные белки, в том числе циклофилин D (CypD) и кальций-связывающий белок ScaMC (SC). Выведение кальция из митохондрий производится натрий-кальциевым обменником (NCLX). Серые (цветные) стрелки указывают процессы активации/ингибирования, чёрные стрелки указывают потоки вещества. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи на сайте журнала.

Ранее мы разработали серию вычислительных моделей для описания внутриклеточной сигнализации тромбоцитов, охватывающих все ключевые процессы и составляющих в совокупности полноценный “виртуальный” тромбоцит [10]: центральную кальциевую сигнализацию от рецептора к тромбину до коллапса митохондрий [5], учёт гетерогенности здоровых доноров за счёт двух рецепторов к тромбину [11], активацию с участием ADP, cAMP-зависимую сигнализацию и её взаимодействие с кальциевой [12], тирозин-киназную сигнализацию [13, 14], роль множественных митохондрий и связь с метаболизмом [6, 15, 16], активацию интегринов [9]. Кроме того, был разработан набор экспериментальных подходов для характеристики кальциевой сигнализации в одиночных тромбоцитах [13, 17, 18] и в суспензии тромбоцитов [9, 19], а также белкового состава с помощью протеомики [20]. Во всех перечисленных работах при экспериментальной оценке параметров тромбоцитов и их функционального ответа у здоровых доноров были выявлены одни и те же закономерности. Согласно данным цитометрии [9, 19], размер тромбоцитов и уровень связывания фибриногена тромбоцитами одного и того же пациента может варьироваться на порядок, однако среднее значение размера варьирует между здоровыми донорами в 2–4 раза. При этом центральный управляющий параметр — мобилизация кальция в ответ на активацию — даже у пациентов отклоняется не более, чем на 20–30% от нормы [9, 16]. Ранее мы показали, что разброс функциональных ответов в популяции может быть связан с полиморфизмами тромбоцитарных рецепторов к тромбину [11] и коллагену [14]. Также для пациентов с синдромом Вискотта-Олдрича мы показали принципиальную роль соотношения объёмов внутриклеточных хранилищ кальция и цитозоли в активации тромбоцита [16]. Таким образом можно предположить, что персонализация ответа тромбоцита может быть осуществлена путём оценки количества белков, т.е. с использованием протеомики.

Целью настоящего исследования была разработка и валидация методического подхода к персонализации вычислительной модели кальциевой сигнализации тромбоцита человека с параметризацией на основе

экспериментальных наблюдений динамики кальциевой сигнализации в ответ на стимуляцию и данных протеомики.

МЕТОДИКА

Для описания кальциевой сигнализации были использованы модели, описанные нами ранее [5, 21] с добавлением буферизующих кальций белков — кальмодулина, кальретикулина и др. Модель описывает поведение 26 разных соединений с помощью обыкновенных дифференциальных уравнений. Система обыкновенных дифференциальных уравнений интегрируется с использованием метода LSODA [22], реализованного в программном обеспечении COPASI [23]. Подробное описание модели и метода интегрирования представлено в Дополнительных материалах (S1, табл. S1, S2). Подбор параметров осуществляли методом Evolutionary Strategy [24], реализованном в программном обеспечении COPASI [23]. Параметры метода выбирались по умолчанию, промежуточные результаты (значения целевой функции и отклонения от эксперимента) представлены в Дополнительных материалах (S2, табл. S3, S4).

Эксперименты по динамике кальциевой сигнализации в одиночных тромбоцитах проводили с помощью метода, описанного в предыдущих работах [13, 17, 18, 21]. Данные по протеомике находятся в открытом доступе в качестве дополнительных материалов к работе [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение формы одиночного кальциевого пика в тромбоците.

Типичный ответ одиночного тромбоцита на активацию ADP представлен на рисунке 2а. Особенности формы кальциевых пиков исследовали путём расчёта скоростей роста и спада для всех одиночных пиков. Для этого использовали методику, схожую с использованной в программном пакете CaSiAn, применённого для анализа динамики кальция в нейронах [25]. Во временных

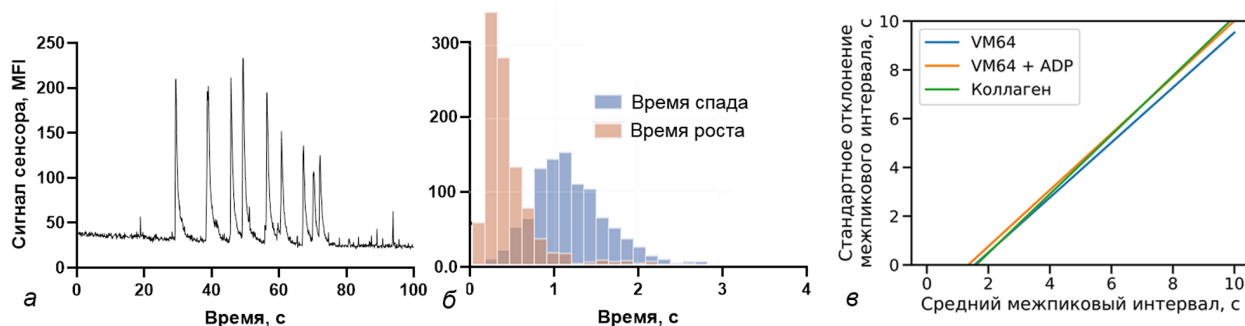


Рисунок 2. Свойства кальциевых осцилляций тромбоцита человека. (а) Типичный ответ иммобилизованного тромбоцита на активацию ADP (заимствован из нашей предыдущей работы) [21]. (б) Гистограмма скоростей роста и спада кальциевых пиков в тромбоцитах человека. (в) Зависимость стандартного отклонения межпиковых интервалов от среднего для межпиковых интервалов. Процесс возникновения кальциевых пиков — Пуассоновский с детерминированным минимальным расстоянием между пиками. Равенство углов наклонов линий говорит об общности механизмов возникновения кальциевых пиков в тромбоцитах, распластанных на антителах к CD31 (VM64), активированных 10 мкМ ADP (VM64+ADP) и активированных коллагеном.

рядах кальциевые пики находили как локальные максимумы, а их границы — как абсолютные минимумы между двумя соседними пиками. Далее при помощи линейной интерполяции находили точки, лежащие на двух десятых высоты пика относительно базового уровня. Ширину пика также рассчитывали на этой высоте. Скорости роста и спада рассчитывали как тангенциальные коэффициенты линий, проведённых через пик и одну из найденных точек. Поскольку амплитуды пиков менялись от донора к донору в два и более раз, времена роста и спада пиков были выбраны в качестве основных количественных характеристик. Их распределения приведены на рисунке 26. Среднее время роста кальциевого пика составило $0,51 \pm 0,65$ с, среднее время спада — $1,21 \pm 0,54$ с. Среднее отношение скорости роста к скорости спада составило $3,5 \pm 2,2$.

Так как осцилляции концентрации кальция в тромбоците представляют собой стохастический процесс [5, 6], определение их частоты не представляется возможным. Поэтому для получения характеристик пациента мы воспользовались подходом, предложенным Skupin и Falcke, которые рассматривают процесс возникновения кальциевых пиков как нестационарный пуассоновский [26]. Основная их идея состоит в том, что межпиковый интервал (ISI) в различных возбудимых клетках состоит из постоянной T и случайной ξ , при этом ξ является случайной величиной из некоторого распределения Пуассона [26, 27], а, следовательно, математическое ожидание случайной величины равно её стандартному отклонению. На рисунке 2в представлена зависимость стандартного отклонения от среднего межпикового интервала и показано, что эта зависимость является линейной. Это говорит о пуассоновской природе процесса появления кальциевых пиков в тромбоцитах: чем реже идут пики, тем более хаотично они возникают, а учащение кальциевых пиков вследствие активации

делает их более упорядоченными. Примечательно, что этот процесс не зависит от способа активации клетки, поскольку углы наклонов линий на графиках статистически неразличимы, а согласно работе [28] угол наклона на таких графиках отражает скорость перезагрузки хранилищ кальцием, и разные углы наклона говорили бы о фундаментально отличных механизмах генерации кальциевых осцилляций в тромбоцитах. Следовательно, механизм, вызывающий кальциевые осцилляции как при активации тромбоцитов по тирозин-киназному пути коллагеном, так и по G-белок-сопряжённому пути, един. По данному графику также можно определить минимальный межпиковый интервал $1,6 \pm 0,4$ с как соответствующий нулевому стандартному отклонению.

Персонализация кальциевого модуля модели внутриклеточной сигнализации тромбоцита

Для описания кальциевой сигнализации в тромбоците была использована предложенная ранее модель [5], описывающая выход кальция из внутриклеточных хранилищ под действием IP_3 через IP_3R второго типа и восполнение хранилищ помпами SERCA типов 2b и 3. Кроме того, ранее было показано [21], что асимметричность сигнала связана как с кластеризацией рецепторов, так и с буферизацией ионов кальция в цитозоле, внутриклеточных хранилищах и митохондриях. Поэтому в модель были добавлены белки-буферы кальция — кальмодулин [29], кальретикулин [30], эндоплазмин [31], GRP78 [32], и митохондриальные сенсоры [33, 34]. Схема процесса активации тромбоцита, отражающая основные принципы модели, представлена на рисунке 1в. Список белков представлен в таблице 1.

Для персонализации модели мы использовали следующий алгоритм. Сначала проводится оценка объёма цитозоли, внутриклеточных хранилищ и митохондрий, так как ранее было показано,

Таблица 1. Количества молекул ключевых белков кальциевой сигнализации в пересчёте на один тромбоцит исходя из данных протеомики

Белок/ген (комментарий)	Литературные данные*	Донор 1, 2 года	Донор 2, 14 лет	Донор 3, 16 лет
IP3R1/ITPR1_HUMAN	2400	4663	n/d	n/d
IP3R2/ITPR2_HUMAN	1700	2610	n/d	n/d
IP3R3/ITPR3_HUMAN	750	n/d	n/d	n/d
SERCA2b/AT2A2_HUMAN	9000	26569	12053	37876
SERCA3a/AT2A3_HUMAN	16300	51624	14707	49588
Кальмодулин/CALM_HUMAN (буферизация кальция в цитозоле)	15600	n/d	n/d	n/d
ERP29_HUMAN (оценка объёма DTS)	5900	21809	7753	33151
ERP44_HUMAN (оценка объёма DTS)	4400	24585	14000	33089
ATPD_HUMAN (оценка объёма митохондрий)	2800	11661	31069	73690
ATPA_HUMAN (оценка объёма митохондрий)	14700	52976	19870	58178
ACTN1_HUMAN (оценка объёма цитозоля)	92100	120259	57009	141311
TBA4A_HUMAN (оценка объёма цитозоля)	185000	100476	33220	116309
MCU_HUMAN/C109A_HUMAN	5900	19526	4677	26103
CALR_HUMAN (буферизация кальция в DTS)	20300	51684	26780	67005
ENPL_HUMAN (буферизация кальция в DTS)	14400	43555	19537	59864
BIP_HUMAN (буферизация кальция в DTS)	27900	64928	25630	76352
PPIF_HUMAN (буферизация кальция в матриксе митохондрий)	19100	33428	n/d	26404
SCMC1_HUMAN (буферизация кальция в матриксе митохондрий)	2200	n/d	n/d	n/d

Примечание. Экспериментальные данные взяты из работы [35].

что соотношение объёмов может быть управляющим в сигнализации [16]. Для оценки объёмов были использованы представленные в протеомике реперные белки (табл. 1). После этого количество белка устанавливается равным среднему количеству, полученному в протеомном анализе [20], либо, в случае отсутствия белка, референсному количеству [35]. В настоящей работе мы использовали данные трёх педиатрических здоровых доноров из работы [20]. Для каждого донора на основе полученных ранее [17] данных об осцилляциях кальция в одиночных тромбоцитах, был проведён анализ, описанный в первой части статьи. А именно, были получены средние скорости подъёма и спада, выведен характерный одиночный пик (рис. 3, слева) и определён минимальный межпиковый интервал, соответствующий нулевому стандартному отклонению (рис. 3, справа). После этого использовались методы оценки параметров для подбора неизвестных параметров моделей (концентрации кальция в хранилищах, пропускной способности SERCA и IP_3R , и параметров буферизации кальция) для описания экспериментальных данных — двух характерных пиков кальция, расположенных на минимальном расстоянии друг от друга (рис. 4а–в). Точность (RMS) подбора составляла 0,12–0,18 (Дополнительные материалы, табл. S3). Дополнительно проводилась валидация по способности предсказать одиночный пик

(рис. 3, Дополнительные материалы, рис. S1), точность описания одиночного пика составила 0,20–0,23 (Дополнительные материалы, табл. S4). Отклонение экспериментальных данных от модели составляли во всех случаях менее 1% от среднего значения. В результате были рассчитаны характерные для каждого донора кривые стимул-ответ (рис. 4г).

Анализ построенных моделей показал, что, хотя параметры кальциевой сигнализации здоровых доноров существенно отличаются друг от друга (табл. 1, рис. 3), характерные одиночные пики кальция и кривые стимул-ответ оказываются качественно похожи (рис. 4г). Данный результат можно объяснить возникновением внутренних компенсаторных механизмов при образовании тромбоцита. В то время как сами по себе значения концентраций конкретных белков в протеомике характеризуются высокой гетерогенностью (рис. 4д), между донорами наблюдается корреляция суммарного количества кальциевых помп SERCA и суммарного количества кальциевых каналов IP_3R (рис. 4е).

ОБСУЖДЕНИЕ

Хотя персонализация терапии имеет колоссальный потенциал для улучшения эффективности лечения при широком круге заболеваний, практические успехи в её внедрении ограничены. Учёт отдельных

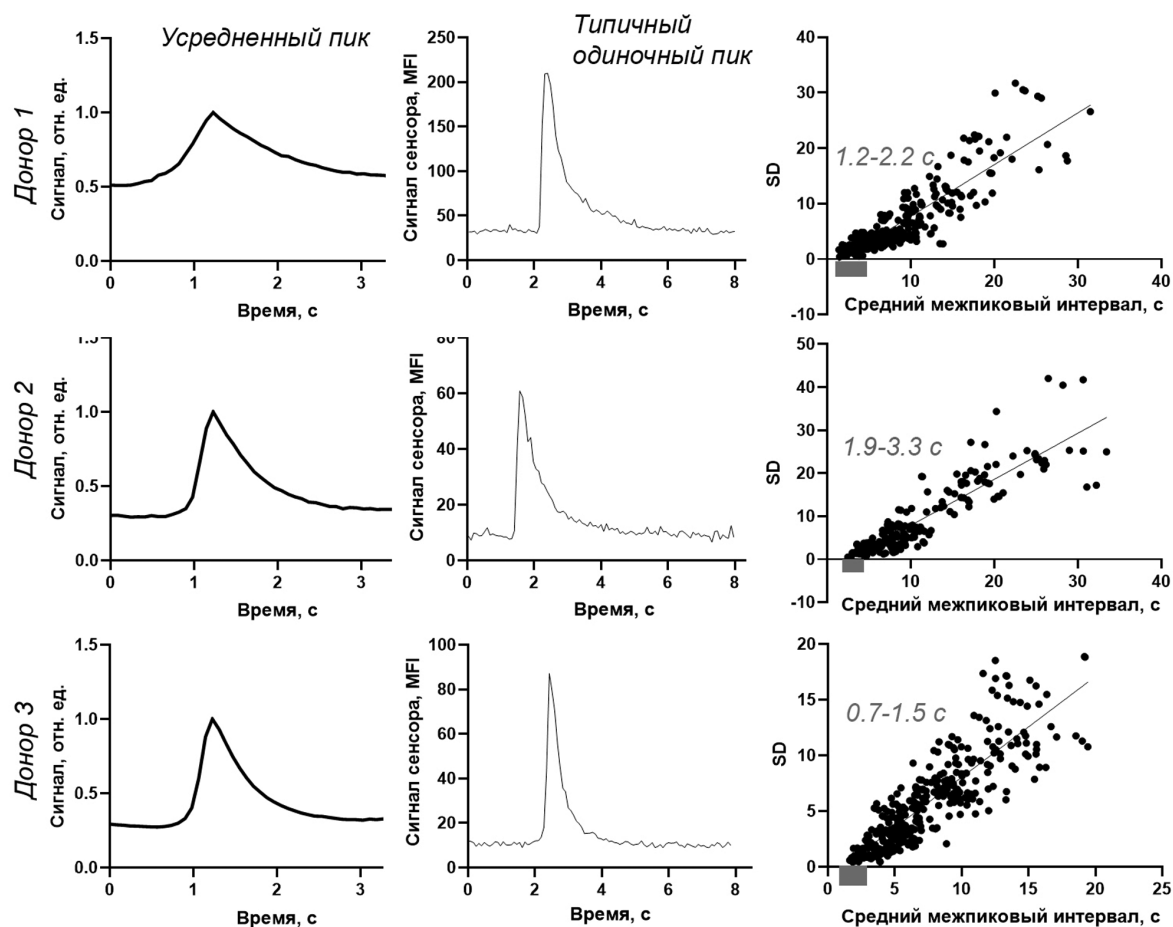


Рисунок 3. Свойства кальциевых осцилляций тромбоцитов трёх здоровых доноров. Каждый ряд панелей соответствует одному донору. Представлен средний пик кальция (слева), характерная форма одиночного пика (центр) и зависимость стандартного отклонения межпиковых интервалов от среднего для межпиковых интервалов (справа).

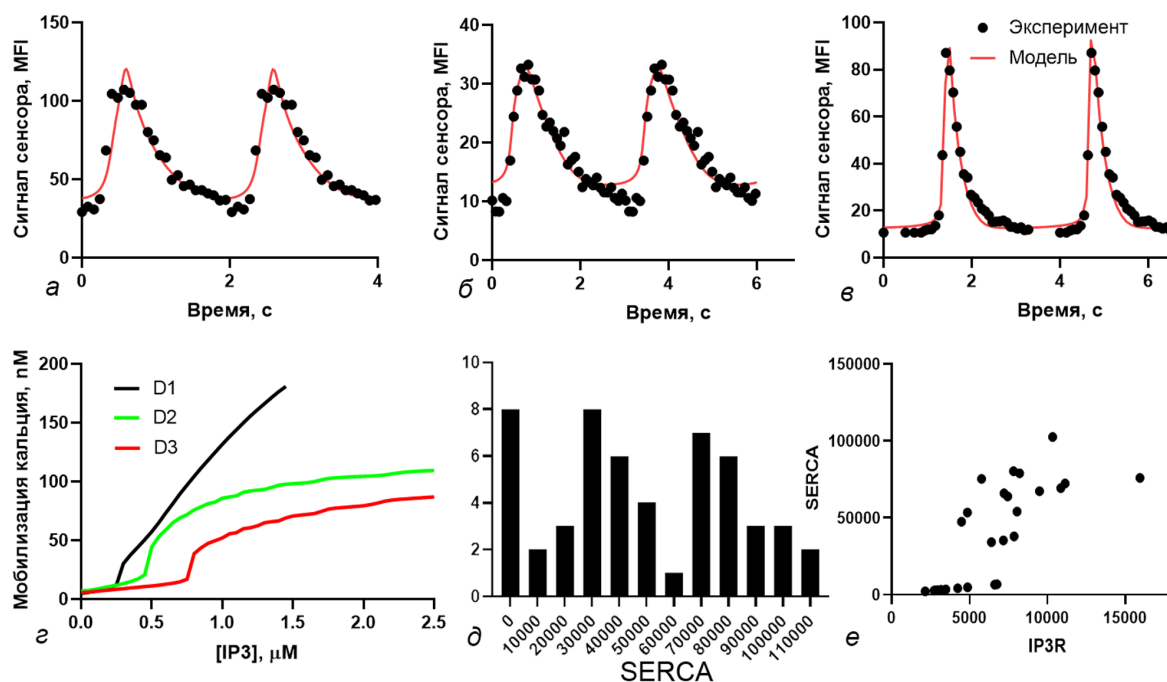


Рисунок 4. Параметры кальциевой сигнализации. (а–в) Аппроксимация экспериментальных данных для трёх здоровых доноров (табл. 1). (г) Зависимость сигнал-ответ для полученных персональных моделей, по оси ординат представлена интегральная концентрация кальция. (д) Гистограмма распределения SERCA2a в данных протеомики 15 здоровых доноров из работы [20]. (е) Зависимость суммарного количества SERCA от суммарного количества IP₃R [20].

особенностей пациента — чаще всего, каких-нибудь конкретных полиморфизмов в геноме, продукт которых чуть влияет на метаболизм лекарства или передачу сигнала, — не даёт такого результата, который оправдал бы вложенные усилия. Персонализированное моделирование физиологических систем пациента имеет потенциал переломить эту тенденцию.

Попытки персонализации ответа тромбоцитов ранее предпринимались в команде Diamond на основе нейронных сетей [36], которые затем интегрировались с моделью тромбообразования [37]. Однако нейронные сети не позволяют выявить механизмы проблем и предложить принципиально новые подходы к лечению. Механизменные модели в этом отношении представляются намного более перспективными, особенно по мере выяснения деталей устройства системы. Хотя для тромбоцитов такие модели отсутствуют, для свёртывания крови есть яркий пример исследований группы Brummel-Ziedins и соавт.: разработанный ими подход по персонализации динамики генерации тромбина на основе состава плазмы крови [38] успешно проявил себя в широком круге вопросов от проблем свёртывания при ревматоидном артрите [39] до прогнозирования тромбозов при тромбофилии [40].

В настоящей работе мы предприняли попытку сделать шаг в эту сторону для тромбоцитов, сосредоточившись на персонализации ключевого элемента в сигнализации тромбоцитов, — динамики кальциевых ответов. В силу высокой сложности системы сигнализации, мы использовали как функциональные тесты, так и данные протеомики для персонализации моделей. Помимо принципиального решения поставленной задачи, были выявлены ключевые особенности кальциевого

ответа тромбоцита и определяющие его параметры, а также установлена критическая важность баланса между активаторами и ингибиторами в сигнализации тромбоцита, позволяющая этим клеткам выдавать высоко стандартизированные ответы на стимуляцию.

В настоящей работе мы подтвердили полученные ранее [21] результаты о асимметричности кальциевого пика в одиночном тромбоците (рис. 3). При этом, в то время как усреднённый пик имеет линейную динамику подъёма и спада концентрации, характерный одиночный пик имеет резкий подъём и экспоненциальный спад. Для описания характерной скорости спада концентрации кальция в модель была введена буферизация ионов кальция, обусловленная тем, что каждый кальций-связывающий белок выводит ионы кальция из вещества, способного перемещаться между ЭПР и цитозолем [41]. Аналогичный подход был предложен в работе Wagner и Keizer [28]. Буферизация кальция позволяет увеличить ширину пика кальция, что подтверждается повышением кальциевого ответа на стимуляцию у первого донора (рис. 4г). Быстрый подъём концентрации кальция можно объяснить локальной взаимной активацией IP₃R, расположенных близко друг к другу в тромбоците [27, 42]. Так как у рассматриваемых доноров отличалось не только количество рецепторов, но и объём ЭПР, имеет смысл сравнить активности IP₃R: 51 мкМ/с, 35 мкМ/с и 20 мкМ/с для первого, второго и третьего донора соответственно. Таким образом, резкий подъём кальция в одиночных пиках коррелирует с активностью IP₃R.

Соотношение активностей IP₃R и SERCA будет влиять на частоту и амплитуду осцилляций, которые, в свою очередь, определяют ответы

тромбоцита. Например, ранее нами было показано, что митохондрии [5] и интегрины [9] являются “интеграторами” кальциевых осцилляций в тромбоците [18]: на каждый пик кальция происходит считывание сигнала, зависящее от его ширины, а в отсутствие пика происходит релаксация. Аналогичные механизмы были подробно разобраны для кальциевой сигнализации в других клетках [28]. Таким образом, для сбалансированного ответа должна поддерживаться не столько постоянная активность ферментов, сколько баланс “активаторов” и “ингибиторов”, что подтверждается проведённым анализом (рис. 4е).

Ограничением настоящей работы было то, что она рассматривает небольшую (хотя и центральную) часть сигнализации тромбоцита, без учёта вышестоящих сигнальных путей от мембранных рецепторов и нижестоящих путей, ведущих к функциональным ответам. Несмотря на то, что компьютерная модель данной работы является механизменной, её базовая схема включает ряд допущений и упрощений, связанных с механизмами работы отдельных реакций и молекул. Сама архитектура модели также включает в себя ряд принципиальных допущений: пренебрежение диффузией, отсутствие учёта гетерогенности тромбоцитов, детерминистические симуляции. Независимо от усовершенствования модели и алгоритмов её персонализации, их валидация на большом количестве образцов здоровых добровольцев, пациентов, а также исследование фармакологических эффектов должно быть важным следующим шагом, который позволит получить важную информацию о принципах регуляции сигнализации тромбоцитов и возможных подходах к её коррекции.

Дальнейшим стратегическим развитием этого направления должно стать расширение персонализируемой модели до всей совокупности сигнальных путей и функциональных ответов тромбоцита, введение в модель препаратов и персонализация ответов на препараты, и в конечной перспективе связь с тромбообразованием и клинически значимыми исходами. Несмотря на сложность и масштабы такой задачи, насущная необходимость требует её разрешения. Тромбозы и кровотечения в совокупности отвечают за львиную долю смертности в современном мире, и все существующие препараты против тромбозов вызывают кровотечения, и наоборот. Поскольку система гемостаза остаётся одна и та же для гемостаза и тромбоза, вероятность нахождения единой “волшебной пули” для лечения тромбоза без ущерба гемостаза крайне мала, и только персонализация терапии с помощью полноценной механизменной модели имеет шанс сдвинуть вероятности в благоприятную сторону для каждого конкретного пациента.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана грантами РНФ № 23-74-00057 (анализ данных протеомики, таблица 1) и №23-45-10039 (разработка модели активации тромбоцита, рисунок 3).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В настоящем исследовании проводится теоретическая обработка опубликованных ранее экспериментальных данных для здоровых педиатрических доноров [20].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Varga-Szabo D., Braun A., Nieswandt B. (2009) Calcium signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.*, **7**(7), 1057–1066. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03455.x
2. Sveshnikova A., Stepanyan M., Panteleev M. (2021) Platelet functional responses and signalling: The molecular relationship. Part 1: responses. *Syst. Biol. Physiol. Rep.*, **1**(1), 20. DOI: 10.52455/sbpr.01.202101014
3. Martyanov A., Panteleev M. (2021) Platelet functional responses and signalling: The molecular relationship. Part 2: receptors. *Syst. Biol. Physiol. Rep.*, **1**(3), 13–30. DOI: 10.52455/sbpr.01.202103013
4. Lian L., Wang Y., Draznin J., Eslin D., Bennett J.S., Poncz M., Wu D., Abrams C.S. (2005) The relative role of PLC and PI_3K in platelet activation. *Blood*, **106**(1), 110–117. DOI: 10.1182/blood-2004-05-2005
5. Sveshnikova A.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. (2015) Compartmentalized calcium signaling triggers subpopulation formation upon platelet activation through PAR1. *Mol. Biosyst.*, **11**(1), 1052–1060. DOI: 10.1039/c4mb00667d
6. Obyednyy S.I., Sveshnikova A.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. (2016) Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *J. Thromb. Haemost.*, **14**(9), 1867–1881. DOI: 10.1111/jth.13395
7. Heemskerk J.W.M., Hoyland J., Masont W.T., Sage S. (1992) Spiking in cytosolic calcium concentration in single fibrinogen-bound fura-2-loaded human platelets. *Biochem. J.*, **283**(2), 379–383. DOI: 10.1042/bj2830379
8. Scridon A. (2022) Platelets and their role in hemostasis and thrombosis — From physiology to pathophysiology and therapeutic implications. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(21), 12772. DOI: 10.3390/ijms232112772
9. Martyanov A.A., Morozova D.S., Sorokina M.A., Filkova A.A., Fedorova D.V., Uzueva S.S., Suntsova E.V., Novichkova G.A., Zharkov P.A., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N. (2020) Heterogeneity of integrin $\alpha IIb\beta 3$ function in pediatric immune thrombocytopenia revealed by continuous flow cytometry analysis. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(9), 3035. DOI: 10.3390/ijms21093035
10. Dunster J.L., Panteleev M.A., Gibbins J.M., Sveshnikova A.N. (2018) Mathematical techniques for understanding platelet regulation and the development of new pharmacological approaches. *Methods Mol. Biol.*, **1812**, 255–279. DOI: 10.1007/978-1-4939-8585-2_15
11. Sveshnikova A.N., Balatskiy A.V., Demianova A.S., Shepelyuk T.O., Shakhidzhanov S.S., Balatskaya M.N., Pichugin A.V., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. (2016)

- Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling. *J. Thromb. Haemost.*, **14**(10), 2045–2057. DOI: 10.1111/jth.13442
12. *Shakhidzhanov S.S., Shaturny V.I., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N.* (2015) Modulation and pre-amplification of PAR1 signaling by ADP acting via the P2Y12 receptor during platelet subpopulation formation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1850**(12), 2518–2529. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.09.013
13. *Martyanov A.A., Balabin F.A., Dunster J.L., Panteleev M.A., Gibbins J.M., Sveshnikova A.N.* (2020) Control of platelet CLEC-2-mediated activation by receptor clustering and tyrosine kinase signaling. *Biophys. J.*, **118**(11), 2641–2655. DOI: 10.1016/j.bpj.2020.04.023
14. *Степанян М.Г., Филькова А.А., Гарсон Дасгунта А.К., Мартьянов А.А., Свешикова А.Н.* (2020) Активация тромбоцитов через рецептор GPVI: вариабельность ответа. Биологические мембраны, **37**(6), 442–452. [*Stepanyan M.G., Filkova A.A., Garzon Dasgupta A.G., Martyanov A.A., Sveshnikova A.N.* (2021) Platelet activation through GPVI receptor: Variability of the response. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*, **15**(1), 73–81.] DOI: 10.1134/S1990747820050074
15. *Shepelyuk T.O., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N.* (2016) Computational modeling of quiescent platelet energy metabolism in the context of whole-body glucose turnover. *Math. Model. Nat. Phenom.*, **11**(6), 103–113. DOI: 10.1051/mmnp/201611606
16. *Obydenyi S.I., Artemenko E.O., Sveshnikova A.N., Ignatova A.A., Varlamova T.V., Gambaryan S., Lomakina G.Y., Ugarova N.N., Kireev I.I., Ataullakhanov F.I., Novichkova G.A., Maschan A.A., Shcherbina A., Panteleev M.* (2020) Mechanisms of increased mitochondria-dependent necrosis in Wiskott-Aldrich syndrome platelets. *Haematologica*, **105**(4), 1095–1106. DOI: 10.3324/haematol.2018.214460
17. *Balabin F., Galkina S., Zhizhaikina I., Panteleev M., Sveshnikova A.* (2021) Quantitative assessment of heterogeneity of single platelet calcium responses to activation. *Res. Pract. Thromb. Haemost.*, **5**(S2), PB1027. DOI: 10.1002/rth2.12589
18. *Шахиджанов С.С., Балабин Ф.А., Обыденный С.И., Атауллаханов Ф.И., Свешикова А.Н.* (2019) Кальциевые осцилляции в тромбоцитах крови и их возможная роль в “интерпретации” клеткой информации из внешнего мира. Успехи физических наук, **189**, 703–719. DOI: 10.3367/UFNr.2018.05.038335 [*Shakhidzhanov S.S., Balabin F.A., Obydenyi S.I., Ataullakhanov F.I., Sveshnikova A.N.* (2019) Calcium oscillations in blood platelets and their possible role in “interpreting” extracellular information by cells. *Physics-Uspekhi*, **62**(7), 660–674.] DOI: 10.3367/UFNe.2018.05.038335
19. *Martyanov A.A., Tesakov I.P., Khachatryan L.A., An O.I., Boldova A.E., Ignatova A.A., Koltsova E.M., Korobkin J.-J.D., Podoplelova N.A., Svidelskaya G.S., Yushkova E., Novichkova G.A., Eble J.A., Panteleev M.A., Kalinin D.V., Sveshnikova A.N.* (2023) Platelet functional abnormalities in pediatric patients with kaposiform hemangioendothelioma/Kasabach-Merritt phenomenon. *Blood Adv.*, **7**(17), 4936–4949. DOI: 10.1182/bloodadvances.2022009590
20. *Garzon Dasgupta A.K., Martyanov A.A., Ignatova A.A., Zgoda V.G., Novichkova G.A., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N.* (2024) Comparison of platelet proteomic profiles between children and adults reveals origins of functional differences. *Pediatr. Res.*, **95**(4), 966–973. DOI: 10.1038/s41390-023-02865-y
21. *Балабин Ф.А., Морозова Д.С., Майоров А.С., Мартьянов А.А., Пантелеев М.А., Свешикова А.Н.* (2018) Кластеризация рецепторов к инозитолтрифосфату определяет форму пика осцилляций кальция в цитозоле тромбоцита. Вестник Московского университета. Серия 3: Физика. Астрономия, **5**, 62–69. [*Balabin F.A., Morozova D.S., Mayorov A.S., Martyanov A.A., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N.* (2018) Clusterization of inositol trisphosphate receptors determines the shape of the calcium oscillation peak in platelet cytosol. *Moscow University Physics Bulletin*, **73**(12), 526–533.] DOI: 10.3103/S0027134918050041
22. *Brown P.N., Hindmarsh A.C., Petzold L.R.* (1998) Consistent initial condition calculation for differential-algebraic systems. *SIAM J. Sci. Comput.*, **19**(5), 1495–1512. DOI: 10.1137/S1064827595289996
23. *Hoops S., Sahle S., Gauges R., Lee C., Pahle J., Simus N., Singhal M., Xu L., Mendes P., Kummer U.* (2006) COPASI — a Complex Pathway Simulator. *Bioinformatics*, **22**(24), 3067–3074. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl485
24. *Bandodkar P., Shaikh R., Reeves G.T.* (2023) ISRES+: An improved evolutionary strategy for function minimization to estimate the free parameters of systems biology models. *Bioinformatics*, **39**(7), btad403. DOI: 10.1093/bioinformatics/btad403
25. *Moein M., Grzyb K., Goncalves Martins T., Komoto S., Peri F., Crawford A.D., Fouquier d'Herouel A., Skupin A.* (2018) CaSiAn: A calcium signaling analyzer tool. *Bioinformatics*, **34**(17), 3052–3054. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty281
26. *Skupin A., Falcke M.* (2009) From puffs to global Ca^{2+} signals: How molecular properties shape global signals. *Chaos Interdiscip. J. Nonlinear Sci.*, **19**(3), 037111. DOI: 10.1063/1.3184537
27. *Bezprozvanny L., Watras J., Ehrlich B.E.* (1991) Bell-shaped calcium-response curves of $Ins(1,4,5)P_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, **351**(6329), 751–754. DOI: 10.1038/351751a0
28. *Wagner J., Keizer J.* (1994) Effects of rapid buffers on Ca^{2+} diffusion and Ca^{2+} oscillations. *Biophys. J.*, **67**(1), 447–456. DOI: 10.1016/S0006-3495(94)80500-4
29. *Chin D., Means A.R.* (2000) Calmodulin: A prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.*, **10**(8), 322–328. DOI: 10.1016/S0962-8924(00)01800-6
30. *Nash P.D., Opas M., Michalak M.* (1994) Calreticulin: Not just another calcium-binding protein. *Mol. Cell Biochem.*, **135**(6), 71–78. DOI: 10.1007/BF00925962
31. *Biswas C., Ostrovsky O., Makarewich C.A., Wanderling S., Gidalevitz T., Argon Y.* (2007) The peptide-binding activity of GRP94 is regulated by calcium. *Biochem. J.*, **405**(2), 233–241. DOI: 10.1042/BJ20061867
32. *Schorr S., Klein M.-C., Gamayun I., Melnyk A., Jung M., Schäuble N., Wang Q., Hemmis B., Bochen F., Greiner M., Lampel P., Urban S.K., Hassdenteufel S., Dudek J., Chen X.-Z., Wagner R., Cavalié A., Zimmermann R.* (2015) Co-chaperone specificity in gating of the polypeptide conducting channel in the membrane of the human endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **290**(30), 18621–18635. DOI: 10.1074/jbc.M115.636639
33. *Hajnóczky G., Booth D., Csordás G., Debattisti V., Golenár T., Naghdi S., Niknejad N., Paillard M., Seifert E.L., Weaver D.* (2014) Reliance of ER-mitochondrial calcium signaling on mitochondrial EF-hand Ca^{2+} binding proteins: Miro, MICUs, LETM1 and solute carriers. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **29**(8), 133–141. DOI: 10.1016/j.ceb.2014.06.002

34. *Laker R.C., Taddeo E.P., Akhtar Y.N., Zhang M., Hoehn K.L., Yan Z.* (2016) The mitochondrial permeability transition pore regulator cyclophilin D exhibits tissue-specific control of metabolic homeostasis. *PLoS ONE*, **11**, e0167910. DOI: 10.1371/journal.pone.0167910
35. *Burkhardt J.M., Vaudel M., Gambaryan S., Radau S., Walter U., Martens L., Geiger J., Sickmann A., Zahedi R.P.* (2012) The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood*, **120**(15), e73–e82. DOI: 10.1182/blood-2012-04-416594
36. *Lee M.Y., Diamond S.L.* (2015) A human platelet calcium calculator trained by pairwise agonist scanning. *PLoS Comput. Biol.*, **11**(2), e1004118. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004118
37. *Shankar K.N., Zhang Y., Sinno T., Diamond S.L.* (2022) A three-dimensional multiscale model for the prediction of thrombus growth under flow with single-platelet resolution. *PLoS Comput. Biol.*, **18**(1), e1009850. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1009850
38. *Brummel-Ziedins K.E.* (2014) Developing individualized coagulation profiling of disease risk: Thrombin generation dynamic models of the pro and anticoagulant balance. *Thromb. Res.*, **133**(Suppl. 1), S9–S11. DOI: 10.1016/j.thromres.2014.03.004
39. *Undas A., Gissel M., Kwasny-Krochin B., Glusko P., Mann K., Brummel-Ziedins K.* (2010) Thrombin generation in rheumatoid arthritis: Dependence on plasma factor composition. *Thromb. Haemost.*, **104**(2), 224–230. DOI: 10.1160/TH10-02-0091
40. *Brummel-Ziedins K.E., Orfeo T., Callas P.W., Gissel M., Mann K.G., Bovill E.G.* (2012) The prothrombotic phenotypes in familial protein C deficiency are differentiated by computational modeling of thrombin generation. *PLoS ONE*, **7**(9), e44378. DOI: 10.1371/journal.pone.0044378
41. *Sage S.O., Pugh N., Mason M.J., Harper A.G.S.* (2011) Monitoring the intracellular store Ca^{2+} concentration in agonist-stimulated, intact human platelets by using Fluo-5N. *J. Thromb. Haemost.*, **9**(3), 540–551. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04159.x
42. *Mak D.-O.D., Foskett J.K.* (2015) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the endoplasmic reticulum: A single-channel point of view. *Cell Calcium*, **58**(1), 67–78. DOI: 10.1016/j.ceca.2014.12.008

Поступила в редакцию: 15. 10. 2024.
После доработки: 18. 11. 2024.
Принята к печати: 19. 11. 2024.

PERSONALIZATION OF A COMPUTATIONAL SYSTEMS BIOLOGY MODEL OF BLOOD PLATELET CALCIUM SIGNALING

F.A. Balabin¹, J.D.D. Korobkina¹, S.V. Galkina^{1,2}, M.A. Panteleev^{1,2}, A.N. Sveshnikova^{1,2,}*

¹Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, 30 Srednyaya Kalitntikovskaya str., Moscow, 109029 Russia; *e-mail: a.sveshnikova@physics.msu.ru

²Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, 1 Samoy Mashela str., Moscow, 117997 Russia

Anuclear blood cells, platelets, are the basis for the formation of blood clots in human vessels. While antiplatelet therapy is most often used after ischemic events, there is a need for its personalization due to the limited effectiveness and risks of bleeding. Previously, we developed a series of computational models to describe intracellular platelet signaling and a set of experimental methods to characterize the platelets of a given patient. To build a personalized model of platelet signaling, we also conducted research on platelet proteomics. The aim of this study was to personalize the central module of intracellular platelet signaling responsible for the formation of calcium oscillations in response to activation. The model consists of 26 ordinary differential equations. To personalize the model, proteomics data were used and unknown model parameters were selected based on experimental data on the shape and frequency of calcium oscillations in single platelets. As a result of the study, it has been shown that the key personalized parameters of the platelet oscillatory response are the degree of asymmetry of a single calcium spike and the maximum frequency of oscillations. Based on the listed experimentally determined parameters and proteomics data, an algorithm for personalization of the model has been proposed. Here we considered three healthy pediatric donors of different ages. Based on the models, personal curves of platelet calcium response to activation were obtained. The analysis of the models has shown that while there is a large heterogeneity of individual indicators of intracellular signaling, such as the activity of calcium pumps (SERCA) and inositoltriphosphate (IP₃) receptors (IP₃R), these indicators compensate each other in each donors. This observation is confirmed by the analysis of proteomics data from 15 healthy patients: this analysis demonstrates a correlation between the total amount of SERCA and IP₃R. Thus, several new features of human platelet calcium signaling are shown and an algorithm for personalizing its model is proposed.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: platelets; calcium signaling; inositol-3-phosphate receptor; computational modeling

Funding. The work was supported by Russian Science Foundation grants 23-74-00057 (analysis of proteomics data, Table 1) and 23-45-10039 (development of a platelet activation model, Figure 3).

Received: 15.10.2024; revised: 18.11.2024; accepted: 19.11.2024.