

08,10,11

## Роль гетерогенной нуклеации в активации клеток крови

© И.В. Приходько, Г.Т. Гурия<sup>¶</sup>

Национальный медицинский исследовательский центр гематологии  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Москва, Россия

<sup>¶</sup> E-mail: guria@blood.ru

Поступила в Редакцию 16 июля 2019 г.

В окончательной редакции 16 июля 2019 г.

Принята к публикации 25 июля 2019 г.

Рассматриваются процессы кластеризации рецепторов на поверхности клеток крови в рамках теории нуклеации. При отсутствии лигандов характерное время гомогенной нуклеации при кластеризации рецепторов полагалось много большим времени жизни клетки. Варьируя константы кинетики образования и разрыва связей при кластеризации рецепторов, удалось описать условия активации, экспериментально наблюдаемые для нескольких видов клеток крови. Показано, что характерное время гетерогенной нуклеации, ведущей к кластеризации рецепторов в присутствии экзогенных лигандов, может быть менее одной минуты. Построены параметрические диаграммы, отображающие воздействие ряда рассмотренных лигандов на рецепторную систему. Обсуждается возможное клиническое значение полученных результатов.

**Ключевые слова:** рецепторы, распознавание, нуклеация, фазовый переход, критический кластер.

DOI: 10.21883/FTT.2020.01.48725.46ks

### 1. Введение

Все типы клеток крови образуются в результате последовательных актов дифференцировки и пролиферации стволовых клеток [1]. Переходы от одного типа дифференциации к другому происходят в результате активации клеток и проявляются в резком изменении характера их поведения [2]. При этом для ряда клеток, в том числе лимфоцитов и тромбоцитов, показано, что в процессе активации существенную роль играют рецепторы, расположенные на поверхности клеток, которые пространственно сближаются, формируя кластеры [3–6]. У *T*-лимфоцитов формирование кластеров мембранных рецепторов инициирует запуск внутриклеточных автокаталитических процессов. При этом мембранные кластеры, по сути, выступают в роли затравочных каталитических подложек [7].

В настоящей работе процесс кластеризации рецепторов рассматривается с позиций теории нуклеации [8]. В центре рассмотрения находится вопрос о том, какие типы лигандов способны пороговым образом инициировать кластеризацию рецепторов. В ходе рассмотрения ставилась цель оценить величину вероятности формирования критического нуклеационного зародыша на поверхности клеток крови. При этом в рамках развиваемого подхода кластеризация рецепторов, сопровождающаяся активацией клеток, трактуется как одна из форм гетерогенной нуклеации [9,10].

Такой подход позволил спроецировать ряд понятий и подходов, полученных ранее в рамках общей теории гетерогенной нуклеации [10–12] на процессы формирования закритических мембранных кластеров. В частности, удалось получить аппроксимационное выражение для линий уровня потока закритических кластеров рецепто-

ров в зависимости от параметров взаимодействия рецептора и лиганда (см. выражение (1) разд. Результаты). С использованием этого выражения удалось объяснить механизм, посредством которого натуральные киллеры (вид клеток крови) способны распознавать ситуации с резко пониженным содержанием соответствующих им функциональных лигандов [13].

Построена параметрическая диаграмма для мультимерных лигандов, которая позволяет интерпретировать данные об активации тромбоцитов фактором фон Виллебранда [14]. Кроме того, в работе построена параметрическая диаграмма для случая побочных лигандов, отличающихся от основного константой диссоциации. В рамках предложенного подхода обсуждаются возможности трактовки ранних стадий иммунного ответа. В частности, были рассмотрены вопросы о чувствительности и специфичности *T*-лимфоцитов [15].

### 2. Кинетическая модель

Как известно, понятие о критическом зародыше лежит в основе теории фазовых переходов первого рода [16]. Вероятность флуктуационного образования нуклеационного зародыша во многих системах, собственно, и определяет время жизни метастабильной фазы [9,11,17]. Образование макромолекулярных кластеров на существенно двумерных объектах, в том числе на биологических мембранах, в современной биофизике рассматривается как фазовый переход первого рода [18].

В настоящей работе мы будем исходить из того, что само по себе формирование любого кластера рецепторов является стохастическим процессом. В теории фазовых переходов первого рода принято говорить о

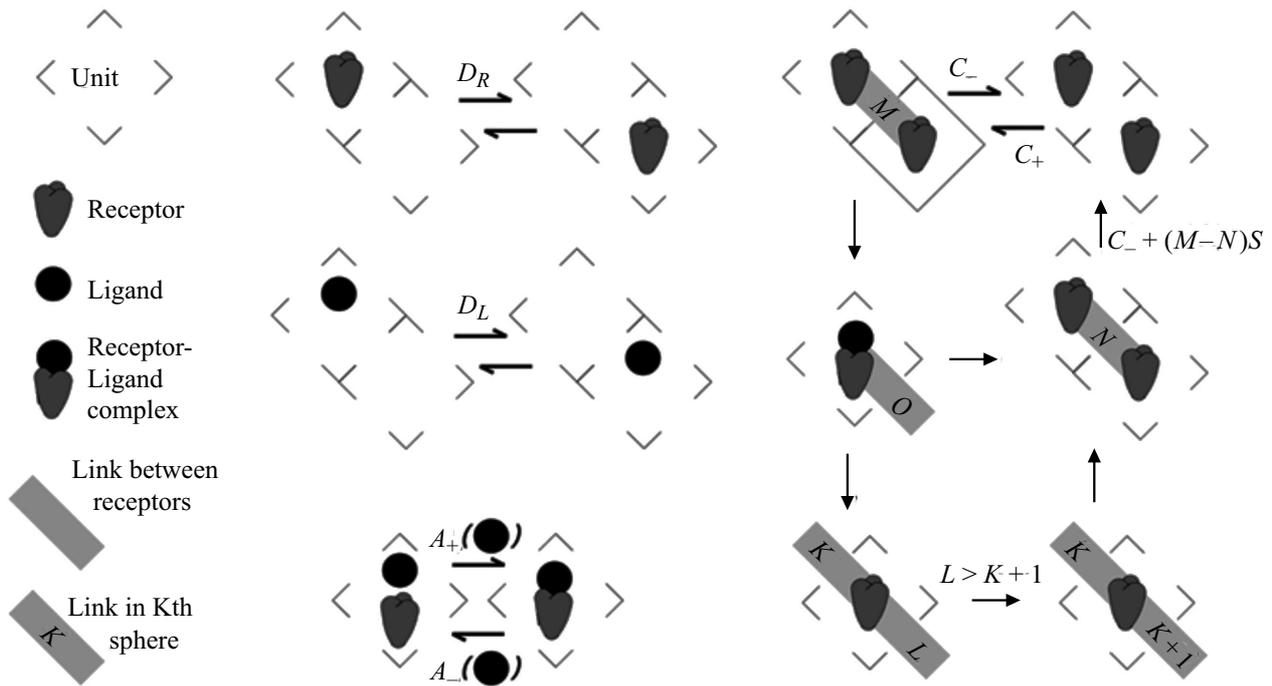


Рис. 1. Правила перехода в клеточном автомате, реализующем кластеризацию рецепторов.

вероятности формирования критических нуклеационных затравок [10]. В гомогенных системах в качестве такого рода затравок могут выступать локальные флуктуации плотности [11]. В гетерогенных системах роль затравок могут играть разнообразные „примеси“ [9].

Имея это в виду, полагалось, что функциональные лиганды, при определенных условиях, способны выступать в качестве примесных затравок, вызывающих кластеризацию рецепторов. По развиваемым представлениям, необходимым условием для формирования критического кластера является контакт одного из входящих в кластер рецепторов с лигандом. Последний при этом выступает в качестве гетерогенного („примесного“) центра нуклеации. Присоединение к данному центру других рецепторов полагалось статистически предпочтительным за счет локального увеличения времени жизни связей в кластере в некоторой области вокруг рецептора, ассоциированного с лигандом. Конкретно предполагалось, что энергия диссоциации отдельных связей между рецепторами в кластере уменьшается по мере удаления от нуклеационного центра [19].

Для несимметричных (не цилиндрических по форме) кластеров, состоящих из реальных рецепторов, в качестве индикатора нуклеации использовалось общее количество связей между входящими в кластер рецепторами. До образования критического зародыша, распределение отдельных рецепторных кластеров по количеству связей в них предполагалось близким к термодинамическому равновесию, а сумма размеров всех кластеров полагалась неизменной во времени. Появление хотя бы одного закритического зародыша влекло за собой рост количества связей [20]. Такой подход позволил

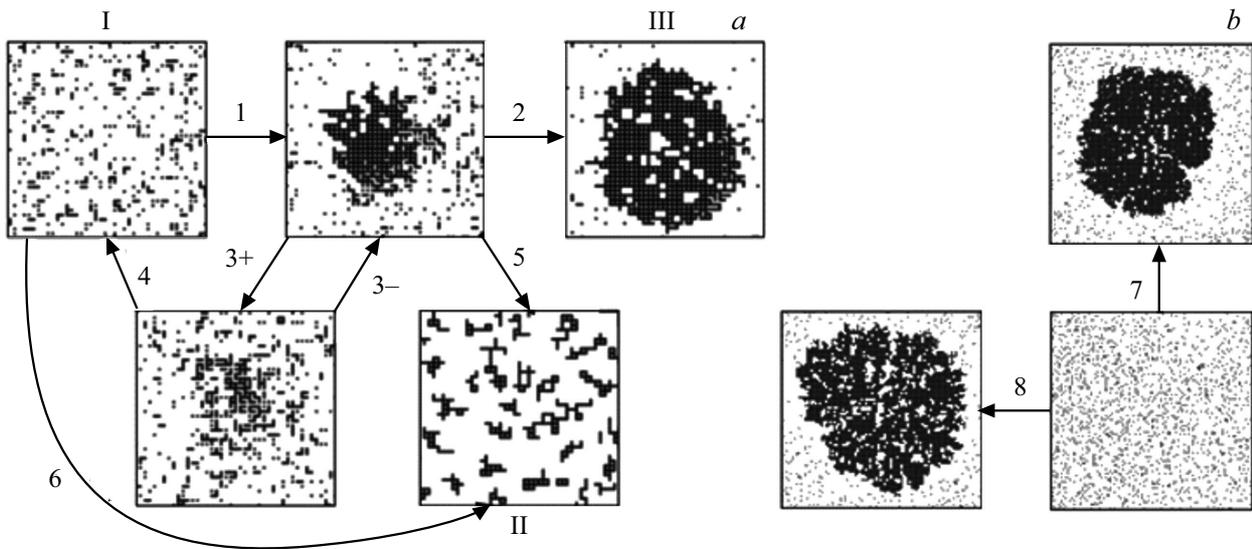
определять время нуклеации на основании кинетических кривых, отображающих изменение количества связей во времени.

В настоящей работе для моделирования пространственных эффектов была построена модель типа „ячейчатый автомат“ [21]. Имея в виду сопоставимость размера рецепторов и лигандов, поверхность клетки разбивалась на ячейки такого размера, что в каждой из них могло находиться не более одной лиганд-рецепторной пары.

Вероятность перехода свободных рецепторов между ячейками размера  $r$  за временной шаг  $\tau$  задавалась в виде  $P_d \propto \exp(-r^2/D_R\tau)$ , где в качестве параметра  $D_R$  выступал эффективный коэффициент диффузии. Рецепторы, ассоциированные с лигандом или связанные с другими рецепторами, полагались неподвижными. Аналогично для лигандов вводился коэффициент латеральной диффузии  $D_L$ . Общее количество рецепторов полагалось равным  $N_R$ , а лигандов —  $N_L$ . Кинетический расчет стартовал со случайного начального распределения рецепторов и лигандов по ячейкам.

Каждой паре рецептор-лиганд ставились в соответствие энергии ассоциации  $A_+k_B T$  и диссоциации  $A_-k_B T$ , где  $k_B$  — постоянная Больцмана, а  $T$  — абсолютная температура. Вероятность ассоциации за единицу времени в ячейке, содержащей одновременно и рецептор, и лиганд, задавалась выражением  $a_{A_+} \propto \exp(-A_+)$ . А диссоциации соответственно —  $a_{A_-} \propto \exp(-A_-)$ .

Энергия образования связи между рецепторами в соседних ячейках —  $C_+k_B T$  полагалась постоянной. Вероятность в единицу времени образования связи между такими рецепторами задавалась выражением  $a_{C_+} \propto \exp(-C_+)$ . В отсутствии лиганда энергия разрыва



**Рис. 2.** *a* — возможные переходы между различными состояниями системы рецепторов. Переход 1 — образование докритического кластера, 2 — образование гигантского кластера, 3 — обратимый коллапс связности кластера, 4 — полное разрушение докритического кластера, 5, 6 — падение перенасыщенности до образования гигантских кластеров. *b* — кластеры с разной скоростью роста, а значит различной термализованностью формы. Переход 7 — образование термализованного кластера, 8 — образование „игольчатого“ кластера.

связи между рецепторами полагалась равной  $C_-k_B T$ . Соответственно вероятность в единицу времени разрыва связи между рецепторами в соседних ячейках вычислялась по формуле  $a_{C_-} \propto \exp(-C_-)$ .

Мы предполагали, что рецептор, ассоциируясь с лигандом, конформационно изменяется, за счет чего повышается энергия разрыва связи между ним и ближайшими из соседних рецепторов на величину  $MSk_B T$ , где  $M$  — целое число. Кроме того, энергия разрыва связей между рецепторами, расположенными в последовательных „координационных сферах“, полагалась линейно убывающей в зависимости от расстояния до центра. В  $K$ -й по счету сфере эта энергия полагалась равной  $(M - K)Sk_B T$ , где  $0 \leq K < M$ . Вероятность в единицу времени разрыва связей рецепторов, находящихся в  $K$ -й координационной сфере от ближайшего ассоциированного рецептора, задавалась выражением  $a_{SK-} \propto \exp(-C_- - (M - K)S)$ .

Вышеприведенные правила исчерпывающим образом задают как перечень возможных состояний в рассматриваемой рецепторной системе, так и набор „правил перехода“ между ними. С точки зрения теории игр, мы имеем дело с полностью определенной конечномерной динамической системой [22,23]. Вводимые в настоящей работе понятия о структуре объектов при кластеризации рецепторов и правила перехода в схематичной форме представлены на рис. 1.

### 3. Нуклеация

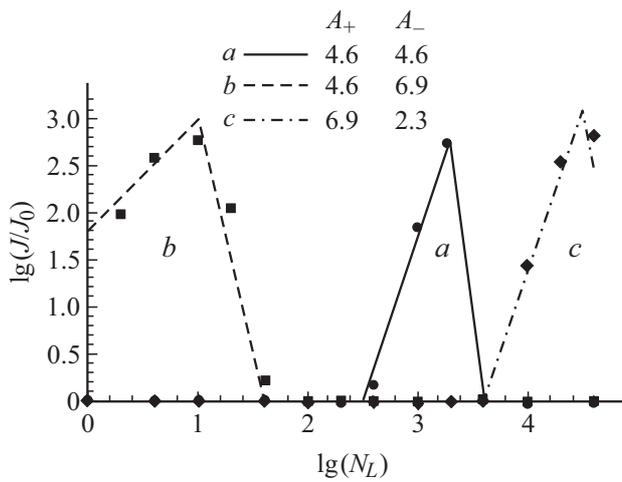
В результате проведения расчетов выяснилось, что для рецепторной системы характерны три состояния:

I — „газообразное“ состояние из уединенных рецепторов, II — стабильное состояние большого числа маленьких кластеров и III — метастабильное „газообразное“ состояние, приводящее к образованию „гигантских“ кластеров (рис. 2, *a*). При этом „гигантскими“ кластерами мы называли те, в которых сосредоточено количество рецепторов соизмеримое с их общим числом в системе  $N_R$ . В такого рода случаях некоторая область поверхности клетки имеет плотность рецепторовкратно превосходящую начальную. Полагалось, что данная область способна выступать в качестве затравочной каталитической подложки для процессов внутриклеточной активации [7].

В зависимости от параметров кластеризации ( $N_R, C_+, C_-$ ) рецепторы, не имеющие контактов с лигандами, могут образовывать как цилиндрические, так и более причудливые „игольчатые“ и „узорчатые“ кластеры (рис. 2, *b*). Наибольший интерес для распознавания лиганда представляют те значения параметров ( $N_R, C_+, C_-$ ), когда система находится в метастабильном состоянии.

Отвечающие формированию гигантских кластеров параметры взаимодействия лигандов и рецепторов ( $N_L, A_+, A_-$ ), показаны на рис. 3. На данном рисунке легко видеть три основных типа зависимостей потока закритических кластеров от количества лигандов  $N_L$  при разных значениях параметра  $A_-$  и  $A_+$ .

Видно, что при значениях параметров ( $A_+, A_-$ ), отвечающих случаю (*a*), кластеризация имеет место в строго ограниченных как сверху, так и снизу интервалах изменения величины  $N_L$  (сплошной график рис. 3). Для значений параметров взаимодействия лиганда и рецептора ( $A_+, A_-$ ), отвечающих случаю (*b*), кластери-



**Рис. 3.** Зависимость логарифма потока образования закритических кластеров рецепторов  $\lg(J/J_0)$  от логарифма количества лиганда с разными константами диссоциации и ассоциации лиганда и рецептора  $\lg(N_L)$ .

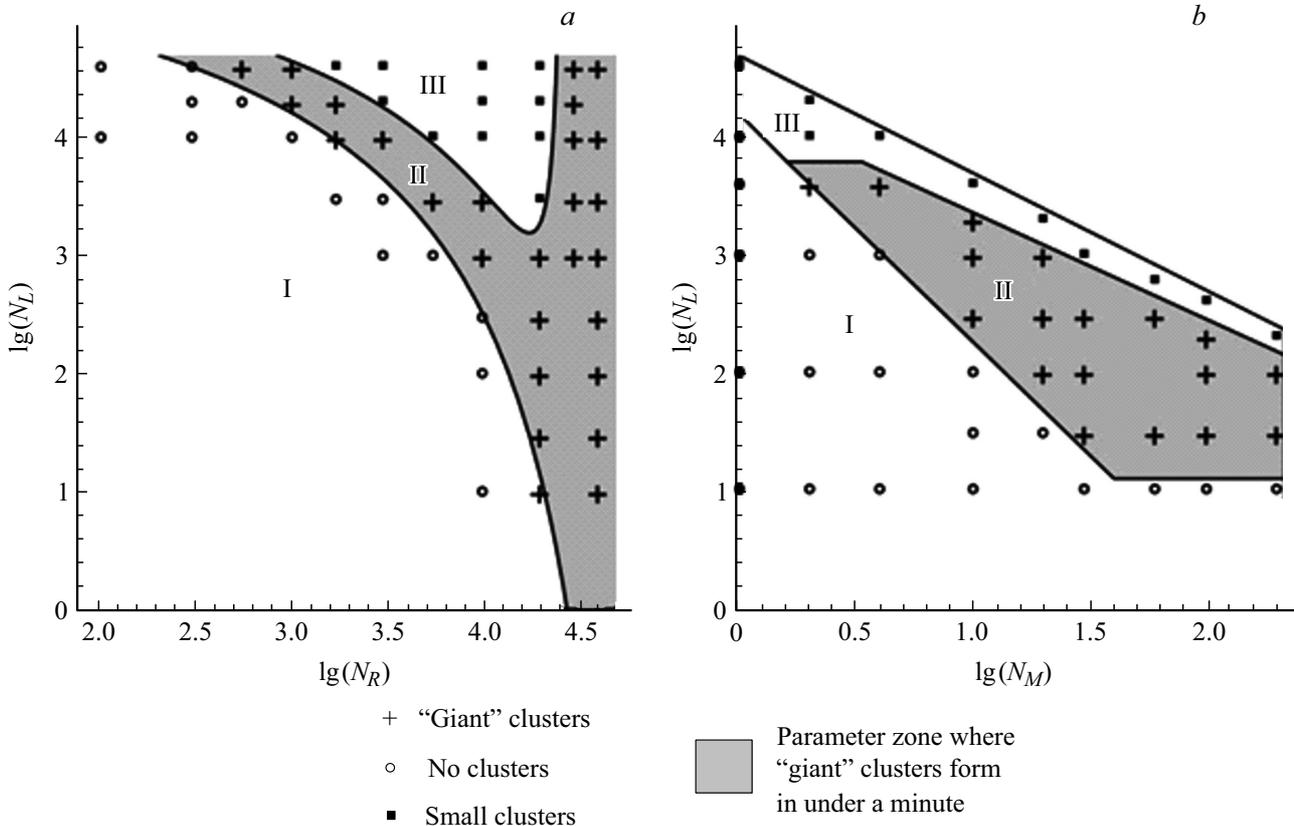
зация возможна при сколь угодно малой концентрации лигандов (рис. 3, штриховой график). По всей видимости возможности натуральных киллеров „чувствовать“ отсутствие лигандов удастся рационально объяснить

тем, что параметры взаимодействия их рецепторов и лигандов отвечают случаю (b) [13].

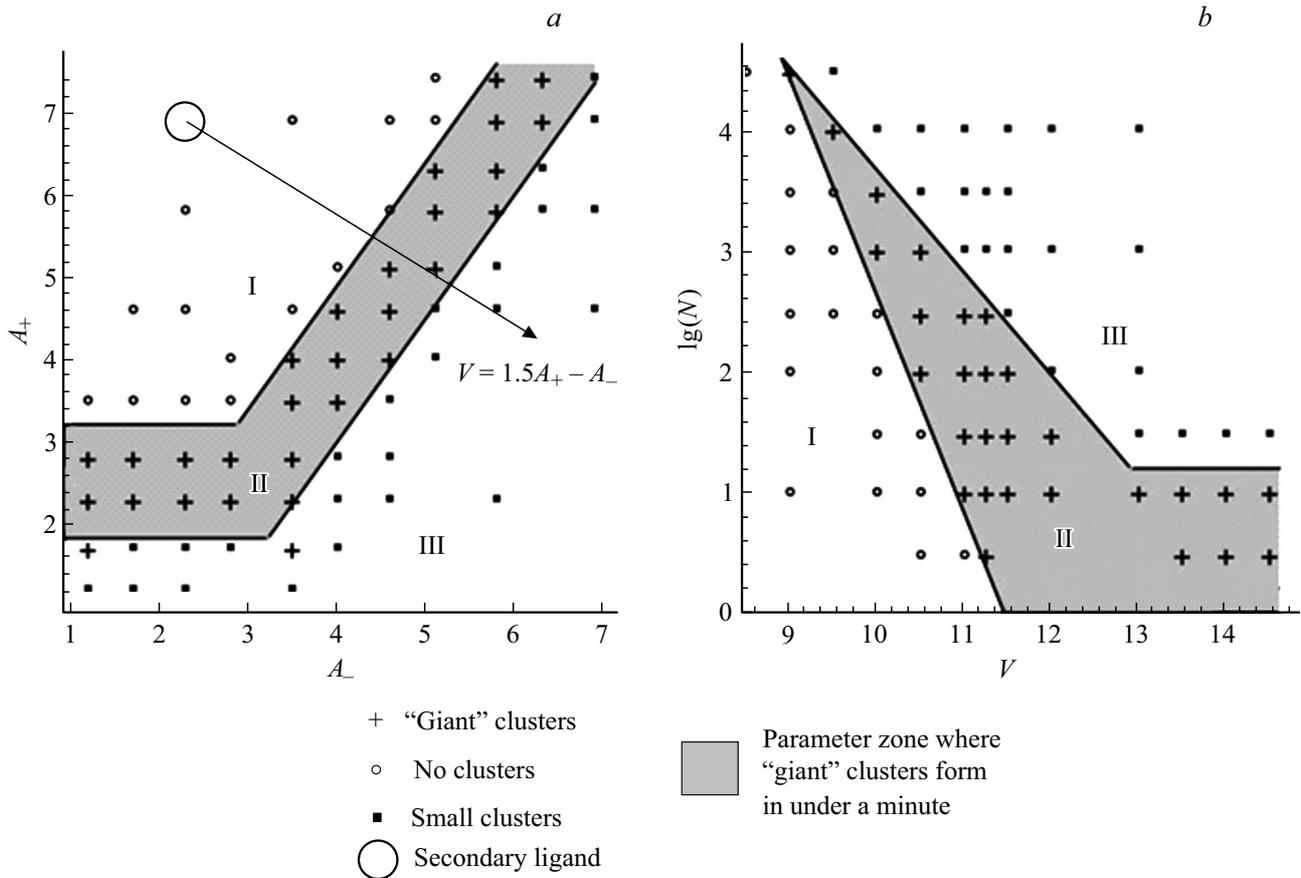
#### 4. Параметрические диаграммы

Как видно из зависимостей, представленных на рис. 3, образование гигантских рецепторных кластеров может иметь место, если количество лигандов попадает в достаточно узкий интервал значений. Представленная на рис. 4, a параметрическая диаграмма отвечает случаю (a). Видно, что увеличение числа рецепторов ( $N_R$ ) делает возможным снижение необходимого для „гигантской“ кластеризации критического количества лигандов ( $N_L$ ). Это значит, что клетки крови в принципе могут изменять свою чувствительность существенным образом, как за счет регулирования экспрессии рецепторов, так и их деградации.

Лиганды, вызывающие активацию у тромбоцитов и В-лимфоцитов, во многих случаях имеют поли- и мультимерные структуры [24]. Так тромбоциты способны реагировать на размотанные в достаточной степени по их поверхности макромолекулы факторов фон Виллебранда [14,25]. На рис. 4, b построена параметрическая диаграмма для мультимерного лиганда при значениях параметра  $A_+ = 4.7$ . Легко видеть, что при высокой мультимерности (больше 30 мономеров)



**Рис. 4.** Параметрические диаграммы состояния системы рецепторов в осях логарифмов количества рецепторов и лигандов. Закрашенная область отображает параметры, при которых в рассмотренной модели наблюдаются активация.



**Рис. 5.** Параметрические диаграммы состояний системы рецепторов в присутствии побочного лиганда. *a* — в осях параметров взаимодействия рецептора и лиганда и введение параметра  $V = 1.5A_+ - A_-$ , описывающего состояние системы в широких пределах. Кругом отмечены параметры побочного лиганда. *b* — в осях вновь введенного параметра  $V$  и количества лиганда.

необходимое для активации количество лигандов практически не зависит от степени мультимерности. При снижении мультимерности необходимое для активации количество лигандов резко растёт.

Параметры модели, которые использовались в расчетах

| Параметр | Значение            | Пояснение   |
|----------|---------------------|---|
| $D$      | $0.5 \mu\text{m/s}$ | Коэффициент диффузии  |
| $N_R$    | 10 000              | Количество рецепторов   |
| $C_+$    | 4.6                 | Б/р энергия связывания  |
| $C_-$    | 2.3                 | Б/р энергия разрыва связи   |
| $S$      | 0.36                | Б/р энергия стабилизации связи                                    |
| $M$      | 20                  | Количество координационных сфер в которых происходит стабилизация |
| $A_+$    | 4.6                 | Б/р энергия ассоциации рецептора и лиганда                        |
| $A_-$    | 4.6                 | Б/р энергия диссоциации рецептора и лиганда                       |
| $N_M$    | 1                   | Мультимерность лиганда  |
| $\tau_*$ | $1 \mu\text{m}$     | Размер расчетной области  |
| $r$      | $4 \mu$             | Размер ячейки автомата  |
| $\tau$   | $1 \mu$             | Шаг автомата  |

Примечание. Б/р — безразмерная.

У многих рецепторов имеются побочные лиганды, т.е. вещества способные связываться с рецепторами с меньшей константой ассоциации, чем у главного лиганда. Особенно это заметно у рецепторов *T*-лимфоцитов, которые способны различать маленькие фрагменты из 7–11 аминокислот, прикрепленные к их лигандам. Проведенный анализ показал, что добавление побочного лиганда (в дополнение к главному), практически не влияет на форму параметрической диаграммы для главного лиганда, в тех случаях, когда параметры находятся в области I и расположены далеко от ее границы (рис. 5, *a*).

Построив параметрическую диаграмму, приведенную на рис. 5, *a*, мы обнаружили, что за исключением области с чрезвычайно малой энергией образования связи, линии уровня потока закрытических кластеров представляют из себя прямые линии с коэффициентом наклона 1.5. С учетом этого, процессы перехода к кластеризации рецепторов имеет смысл описывать одним „параметром порядка“ —  $V$ , задаваемым уравнением (1)

$$V = 1.5A_+ - A_- \tag{1}$$

На рис. 5, *b* представлена параметрическая диаграмма, которая показывает отклик системы на изменение

количества и характеристики главного лиганда. Видно, что изменение индекса  $V$  в 3 раза делает возможным регистрацию всего одной молекулы лиганда. Все значения параметров, использованных в расчетах, не указанные явно в основном тексте статьи, приведены в таблице.

## 5. Дискуссия

Проанализирован механизм кластеризации рецепторов на поверхности нескольких типов клеток крови. Показано, что в условиях физиологической нормы быстрота кластеризации рецепторов имеет решающее значение для эффективного функционирования клеток и определяет их способность к быстрому реагированию на внешние сигналы. Следует отметить, что для ряда следящих биологических систем было установлено, что их основное состояние является метастабильным, что обеспечивает передачу сигналов в нейронах [26] и в плазменном звене системы свертывания крови [27].

Клетки крови в течение своего жизненного цикла на порядки меняют свою чувствительность, иногда обратимо [28]. Обычно этот феномен связывают с механизмами, отвечающими за изменение клетками общего количества своих рецепторов. В свете полученных результатов представляется важным отметить, что чувствительность существенным образом может изменяться и в зависимости от степени „рыхлости“ кластеров (рис. 2, *b*). Представляется, что мембранные системы даже с небольшим числом рецепторов за счет процессов стремительной кластеризации последних способны разворачивать высокочувствительные кластерные „антенны“ для первичного приема сигналов.

Посредниками для связи между рецепторами могут выступать как мембранные рафты, так и элементы актинового цитоскелета. В частности, гидрофобные примеси могут значительно увеличивать стабильность рафтов [18]. При этом рецепторы могут конформационно изменяться в ходе кластеризации в своей структуре, „разворачивая“ гидрофобные участки в сторону мембраны. В области межклеточных контактов наблюдается активное перестроение цитоскелета. В такого рода случаях ассоциированные с лигандами рецепторы замедляют движение цитоскелета относительно мембраны.

К числу клинически важных следствий построенной модели относится заключение о том, что для перевода клетки из метастабильного состояния III типа в состояние II типа достаточно более 30 лигандов с индексом  $\geq 7$ . Представляется, что введение такого рода лигандов способно быстро купировать активационные процессы в соответствующих клетках. К числу таких ситуаций, по-видимому, относятся остановка стремительного тромбообразования, коррекция острых гипераллергических реакций, а также быстрые реакции „свой-чужой“ в трансплантологии.

## 6. Заключение

Построена модель кластеризации рецепторов на поверхности клеток крови. Результаты расчетов обсуждаются в свете подходов, разработанных в рамках общей теории гетерогенной нуклеации. Построен ряд параметрических диаграмм, позволяющих объяснить характер реакции нескольких типов клеток крови на экзогенные стимулы.

Выдвинуто предположение о том, что рецепторные системы ряда клеток крови (в том числе тромбоцитов, лимфоцитов и лейкоцитов) в пределах физиологической нормы являются метастабильными. Как следствие, акцептирование клетками экзогенных стимулов может осуществляться по механизму гетерогенной нуклеации, имея своим итогом образование „гигантских“ кластеров. Последние при этом выступают в качестве затравочных каталитических подложек для оперативной трансляции сигналов внутрь клеток и дальнейших внутриклеточных этапов активации.

### Финансирование работы

Работа была частично поддержана Российским научным фондом (грант № 19-11-00260).

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] J.E. Till, E.A. McCulloch. *Rad. Res.* **14**, 213 (1961).
- [2] Р. Шмидт, Г. Тевс. *Физиология человека*. Мир, М. (2005). Т. 2. 314 с.
- [3] W.M. Isenberg, R.P. McEver, D.R. Phillips, M.A. Shuman, D.F. Bainton. *J. Cell Biology* **104**, 1655 (1987)
- [4] B. Wójciak-Stothard, L. Williams, A.J. Ridley. *J. Cell Biology* **145**, 1293 (1999).
- [5] I.I. Singer, S. Scott, D.W. Kawka, J. Chin, B.L. Daugherty, J.A. DeMartino, J. DiSalvo, S.L. Gould, J.E. Lineberger, L. Malkowitz, M.D. Miller, L. Mitnaul, S.J. Siciliano, M.J. Staruch, H.R. Williams, H.J. Zweerink, M.S. Springer. *J. Virology* **75**, 3779 (2001).
- [6] M. Eriksson, G. Leitz, E. Fällman, O. Axner, J.C. Ryan, M.C. Nakamura, C.L. Sentman. *J. Exp. Medicine* **190**, 1005 (1999).
- [7] S.V. Pageon, T. Tabarin, Y. Yamamoto, Y. Ma, P.R. Nicovich, J.S. Bridgeman, A. Cohnen, C. Benzing, Y. Gao, M.D. Crowther, K. Tungatt, G. Dolton, A.K. Sewell, D.A. Price, O. Acuto, R.G. Parton, J.J. Gooding, J. Rossy, J. Rossjohn, K. Gaus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **113**, E5454 (2016).
- [8] R. Becker, W. Döring. *Annal. Phys.* **24**, 719 (1935).
- [9] D. Turnbull. *J. Chem. Phys.* **18**, 198 (1950).
- [10] J.W. Schmelzer, V.M. Fokin, A.S. Abyzov, E.D. Zanotto, I. Gutzow. *Int. J. Appl. Glass Sci.* **1**, 16 (2010).
- [11] N. H. J. Fletcher. *J. Chem. Phys.* **29**, 572 (1958).
- [12] R.P. Sear. *J. Phys.: Condensed Matter* **19**, 033101 (2007).
- [13] P. Stern, M. Gidlund, A. Örn, H. Wigzell. *Nature* **285**, 341 (1980).

- [14] M. Stockschlaeder, R. Schnepfenheim, U. Budde. *Blood Coagulation Fibrinolysis* **25**, 206 (2014).
- [15] O. Feinerman, R.N. Germain, G. Altan-Bonnet. *Mol. Immunology* **45**, 619 (2008).
- [16] Я.Г. Синай. Теория фазовых переходов. Наука, М. (2006). 208 с.
- [17] D. Gunton. *Phase Transitions Critical Phenomena* **8**, 267 (1983).
- [18] V.A.J. Frolov, Y.A. Chizmadzev, F.S. Cohen, J. Zimmerberg. *Biophys. J.* **91**, 189 (2006).
- [19] D. Bray, M.D. Levin, C.J. Morton-Firth. *Nature* **393**, 85 (1998).
- [20] T. Vicsek. *Fractal growth phenomena*. World scientific (1992). 510 p.
- [21] M. Markus, B. Hess. *Nature* **347**, 56 (1990).
- [22] M. Eigen, R. Winkler. *Laws of the game: how the principles of nature govern chance*. Princeton University Press (1993). 368 p.
- [23] J. Conway. *Sci. Am.* **223**, 4 (1970).
- [24] B.S. Coller, E.I. Peerschke, L.E. Scudder, C.A. Sullivan. *Blood* **61**, 99 (1983).
- [25] K.E. Zlobina, G.Th. Guria. *Sci. Rep.* **6**, 30508 (2016).
- [26] R. Fitzhugh. *J. General Physiology* **43**, 867 (1960).
- [27] Г.Т. Гурия. Наука (Изд. дом „Коммерсантъ“), М. (2011). Т. 9. С. 54.
- [28] M. Hansson R. Kiessling, B. Andersson, K. Kärre, J. Roder. *Nature* **278**, 174 (1979).

*Редактор Д.В. Жуманов*