

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕЊЕРСТВО И ТЕХНОЛОГИЈЕ

Анђелка Н. Хедрих

**ОСЦИЛАТОРНО ПОНАШАЊЕ *ZONA-E*
RELUCIDA-E МИША ПРЕ И ПОСЛЕ ОПЛОДЊЕ**

докторска дисертација

Београд, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

BIOMEDICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGIES

Andjelka N. Hedrih

**OSCILLATORY BEHAVIOUR OF MOUSE *ZONA
PELUCIDA* BEFORE AND AFTER FERTILIZATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

МЕНТОРИ:

1. др Михаило Лазаревић, редовни професор, Машински факултет, Универзитет у Београду

област научно истраживачког рада: теоријска и примењена механика, мехатронички системи, биомеханика, рачун нецелог реда.

2. др Ана Митровић-Јовановић, ванредни професор, Медицински факултет, Универзитет у Београду

област научно истраживачког рада: гинекологија и акушерство, репродуктивна ендокринологија, хумана репродукција, инфертилитет.

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

1. др Михаило Лазаревић, редовни професор, МЕНТОР, Машински факултет, Универзитет у Београду

2. др Ана Митровић-Јовановић, ванредни професор, МЕНТОР, Медицински факултет, Универзитет у Београду

3. др Дејан Б. Поповић, академик САНУ, редовни професор, Електротехнички факултет, Универзитет у Београду и научни саветник, Институт техничких наука САНУ.

4. др Бранко Бугарски, редовни професор, Технолошко-Металуршки Факултет, Универзитет у Београду

5. др Александра Јауковић, виши научни сарадник, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду

Датум одбране _____

Дизајн корица урађен у сарадњи са
мр Вером Вирјевић-Митровић академским сликаром

Резултате садржане у докторској дисертацији докторант је реализовао у оквиру истраживачке теме Биомеханика на пројекту ОИ 174001: „Динамика Хибридних система сложених структура и механика материјала“, које је финансирало Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, а истраживања су координирана преко Математичког института САНУ, уз консултације са менторима проф.др Михаилом Лазаревићем и проф.др Аном Митровић-Јовановић.

Scio me nihil scire
Sokrat

*Израда и тема твоје докторске дисертације је
као скијање по дубоком снегу
Владимир Хедрих*

*Мом Супругу
мојој деци
родитељима*

Изјаве захвалности

Користим ове странице да се захвалим свим оним људима који су били уз мене све ове године и на свој посебан начин допринели да се ова докторска дисертација реализује и сложи у корице. Захваљујем се најпре мом супругу Владимиру за бескрајно стрпљење и неизмерну психолошку подршку током израде ове докторске дисертације, као и мојој деци што су имала разумевања за мамино бављење науком.

Захваљујем се менторима проф. Михаилу Лазаревићу и проф. Ани Митровић-Јовановић на стручној и психолошкој подршци, на критичком читању овог рукописа, корисним сугестијама, великом стрпљењу и изванредној комуникацији.

Захваљујем се свим члановима комисије што су се прихватили задатка о оцени научне заснованости теме, као и корисним саветима који су претходили избору саме теме докторске дисертације, а наручито академику проф др Дејану Поповићу који ми је дао савет који је одредио избор теме, рекавши: „Узмите тему по којој ћете бити препознатљиви“, и то није требало двапут да каже; проф Бранку Бугарском који ме је очински примио као истраживача стипендисту на пројекту и оставио ми на вољу да бирам тему докторске дисертације и тиме ми пружио шансу да прођем кроз цео развојни пут или боље рећи “производни процес” настанка доктора наука из докторанда. За лепо и корисно искуство неопходно за увид у могућности практичне реализације идеје од инкапсулације хуманих сперматозоида алгинатом до осцилаторног модела *zona-e relicida-e (ZR)* миша. Захваљујем се проф. Катици Хедрих, за несебичну подршку из области нелинеарне механике и теорије осцилација и реологије, без којих реализација овог осцилаторног модела не би постојала; на корисним саветима и критичком читању рукописа у завршној фази као и на психолошкој подршци. Посебно се захваљујем проф. Маринку Угрчићу и доц. Милану Банићу на изузетној сарадњи и помоћи око примене методе коначних елемената у моделовању осцилаторног понашања *zona-e relicida-e* миша која је резултовала радовима на ISCI листи. Захваљујем се и Вери Вирјевић-Митровић аладемском сликару на помоћи око дизајна корица.

Велики је развојни пут који студент докторских студија пређе у процесу учења и стицања сазнања и нових вештина и веома је важно да на том свом путу, ма колико дуго трајао, има око себе и уз себе људе који ће га усмеравати на прави пут недозољавајући му да са њега превисше скрене.

А на крају тог пута, следи нови почетак, или што би академик проф. др Милорад Павић рекао у свом роману *Унутрашња страна ветра*: „Писмен гледа у књигу, научен гледа у мудрог, а мудар гледа у небо или у сукњу, што може и неписмен...“

И тако у круг ...од тачке да мислимо да нешто знамо до тачке када схватимо колико тога не знамо и да смо опет на почетку усред океанске пучине погледа упртих у бескрај или...у Небо.

Сама идеја да оплодња код сисара може да се посматра као осцилаторни феномен а јајна ћелија и ZP као осцилаторне структуре је нов ако изузмемо идеју коју је Green предложио пре 20 година да је један од могућих механизма пенетрације сперматозоида кроз ZP осцилације релаксације.

Остаје да се питамао да ли смо зидали кулу од карата или смо поставили темеље новог погледа на свет репродуктивне биомеханике?

ОСЦИЛАТОРНО ПОНАШАЊЕ *ZONA-E PELUCIDA-E* МИША ПРЕ И ПОСЛЕ ОПЛОДЊЕ

Резиме

Zona pelucida (*ZP*) представља ацелуларни омотач јајне ћелије сисара налик ирегуларној тродимензионалној, вишеслојној мрежи који има веома важну улогу у оогенези, оплодњи и преимплантационом периоду. Постоји међусобна повезаност између зрелости јајне ћелије у тренутку оплодње, њене генске експресије, ослобађања кортикалних гранула при оплодњи, степена постфертилизационог очвршћавања *ZP*, квалитета ембриона и способности рађања живог потомства. Вискоеластична својства *ZP* зигота указују на квалитет ембриона.

Основна идеја ове докторске дисертације је да би процес оплодње могао да се посматра као осцилатронни феномен и сходно томе, циљ ове докторске дисертације је постављање осцилаторног модела *ZP* миша, дефинисање основних поставки и кинетичких параметара модела, одговарајућих апроксимација и ограничења као и испитивање осцилаторног понашања модела под одговарајућим релевантним условима за случајеве пре и после оплодње.

Модел осцилаторне сферне мреже *ZP* миша је у виду дискретне мреже коју сачињавају хетерогени ортогонални ланци сачињени *ZP* гликопротеина повезаних еластичним односно вискоеластичним везама. За претходно постављене системе диференцијалних једначина и добијене аналитичке изразе за решења или апроксимације решења урађена је нумеричка симулација. Коришћењем одговарајућег софтверског програма за нумеричку симулацију, испитивано је осцилаторно понашање чворних (*ZP1*) молекула на репрезентативном узорку дискретно континуалног осцилаторног модела *ZP* миша у слободном и принудном режиму. Нумеричком анализом одређени су услови под којима долази до резонанције између режима осциловања *ZP-e* и сперматозооида који импулсно дејствују на *ZP* мрежу; део сета сопствених кружних фреквенција, фреквенције на којима долази до динамичке апсорпције односно до резонанције у случају принудних осцилација, за *ZP* јајне ћелије и *ZP* ембриона миша. Да бисмо испитали да ли и како угао дејства, распоред и број сперматозооида са ефективним брзинама који импулсно дејствују на *ZP*, утичу на осцилаторно понашање чворних молекула у репрезентативном узорку дискретно континуалног осцилаторног модела *ZP* миша, спровели смо нумерички експеримент користећи методу генералисаних *Lussajous*-ових фигура у одговарајућем софтверском пакету; у циљу одређивања потенцијално слабе тачке у *ZP* током импулног дејства сперматозооида у току оплодње постављен је квазистатички симетрични апроксимативни модел *ZP* у виду шупље сфере, дати су аналитички изрази за напоне и деформације као и специфичан деформациони рад који се јављају у *ZP* у току процеса оплодње приликом дејства сперматозооида на спољашњу површину *ZP* а чија је дистрибуција дејства у виду дискретног хомогеног континуума у радијалном правцу. Дати су и аналитички изрази за динамички континуални модел *ZP*. На основу аналитичких израза за овај *ZP* модел урађена је нумеричка анализа како напон, дилатација, запреминска дилатација и специфични

деформациони рад зависе од: растојања тачке у ZP од центра сфере, дебљине ZP , односа унутрашњег и спољашњег полупречника, спољњег притиска- односно броја сперматозооида, који дејствују на спољашњу контурну површину континуалног модела ZP ; применом метода нецелих извода дате су основне поставке двослојног вискоеластичног модела осцилаторне сферне мреже ZP миша.

С обзиром да вибрационе карактеристике ембриона могу бити од значаја за процену његове виталности, да би одредили сопствене учестаности и облике модова осциловања ембриона миша током микроинјекције стакленом иглом користили смо методе коначних елемената (МКЕ) у оквиру модалне анализе помоћу *ANSYS софтвера*. Употребом МКЕ и транзиторне структурне анализе на моделу континуалног слоја ZP -е коришћењем комерцијалног софтверског пакета *ANSIS* проучавана је динамика нелинеарног фрикционог контакта између сперматозооида и јајне ћелије миша у односу на угао дејства сператозооида. Разматрани су контактни притисак, максимални еквивалентни напон у ZP , укупни контактни напон и напон настао услед трења за различите углове дејства сперматозооида на јајну ћелију. Осцилаторно понашање ZP миша након оплодње разматрано је на нелинеарном вишепараметарском моделу осцилаторне сферне мреже ZP у коме су ZP молекули међусобно повезани виско-нелинеарно еластичним везама по типу *Kelvin-Voigt*-овог елемента и изложени дејству сперматозооида у виду спољне принудне силе. За нумеричку вишепараметарску анализу узет је репрезентативни сегмент вискоеластичног нелинеарног модела осцилаторне сферне мреже ZP , а од параметара у модел су уведени, поред угла под којим сперматозооиди импулсно дејствују на чворне ZP молекуле, фреквенција и амплитуда спољне принудне силе (дејство сперматозооида), на сваком од разматраних молекула, коефицијенат пригушења, коефицијенат линеарне и нелинерне крутости и време. Нелинеарни дискретни модел ZP осцилаторне мреже сматрамо нелинеарним неконзервативним системом, који транзиторно осцилује под принудном силом са пригушењем, а везе између молекула су вискоеластичног типа и осцилаторно понашање молекула у моделу се може описати помоћу дифернцијалних једначина *Duffing*-овог типа са нелинеарношћу трећег степена. На овом нелинеарном вишепараметарском моделу разматрани су услови синхронизације појединих чворних молекула у моделу.

На основу облика генералисаних *Lissajous*-ових кривих, динамичко стање чворних молекула, може бити у пуној синхронизацији његових компонентних померања у мердијалном и циркуларном правцу, или асинхронизацији, налик синхронизацији или налик асинхронизацији, налик хаотичном или стохастичком кретању. Синхроно кретање смо сматрали повољним осцилаторним стањем за оплодњу. Идентификовали смо углове под којим дејствују сперматозооиди дајући синхронизовано кретање чворних молекула. Веома мали као и веома велики углови су неповољни.

Симетрична дистрибуција сперматозооида са истим кинетичким параметрима даће синхронизовано кретање чворних молекула. На облик генералисаних *Lussajous*-ових кривих утичу угао, брзине, распоред и број дејствујућих сперматозооида. Када је у питању међузависност напона који се јавља у ZP према квазистатичком моделу ZP у виду шупље сфере што је растојање од центра сфере веће то је радијална компонента нормалног напона већа, док се циркуларна и мердијална компонента смањују. Са повећањем спољњег притиска на ZP

нелинеарно се повећава деформациони рад и апсолутна вредност запреминске дилатације, која је негативна јер се ради о компресији запремине. Тачке ZP које су ближе површини јајне ћелије трпе мањи специфични деформациони рад. Што је ZP дебља то је већа запреминска дилатација уколико су остале вредности параметара модела константне.

Помоћу двослојног дискретно-континуалног модела сферне осцилаторне мреже ZP могуће је објаснити механизам продора сперматозоида кроз ZP . Модел двослојне осцилаторне мреже ZP фракционог реда даје основу за могући механизам продора сперматозоида кроз мрежу у виду осцилација релаксације. Двослојни осцилаторни модел ZP може да буде и основа за сложенији модел ZP миша, који посматра ZP као осцилаторни гел.

ANSIS анализа је показала да су фреквенције сопствених осцилација ембриона веће у течности него у вакууму и да су реда величине од око 52-55кHz. Анализа показује да осцилације слободног ембриона у вакууму практично нису могуће. Описани метод може да се користи за анализу вибрационих карактеристика ембриона миша, али и хумане врсте, како у физиолошким, тако и у патолошким условима. Модел подржава осцилаторну теорију оплодње.

Анализа динамике нелинеарног фрикционог контакта јајне ћелије и сперматозоида за различите углове дејства сперматозоида показује да брзина сперматозоида осцилује у току времена симулације и зупчасто опада за све посматране углове, указујући на сличност са "*Slip-stick*" ефектом који се може објаснити механизмом настанка осцилација релаксације. Мањи угао дејства сперматозоида боље чува енергију сперматозоида. Контактни притисак, максимални еквивалентни напон у ZP , укупни контактни напон и напон настао услед трења, максимална пенетрација сперматозоида кроз ZP , максимална деформација ZP , као и површина контакта зависе од угла под којим сперматозоид дејствује на јајну ћелију и показују нелинеарну зависност, локалне минимуме и максимуме. Деформације које се јављају при нелинеарном фрикционом контакту између јајне ћелије и сперматозоида су локалног карактера и захватају само површинске делове ZP .

На основу вишепараметарске анализе синхронизације кретања два чворна молекула у репрезентативном узорку нелинеарног вискоеластичног модела ZP ембриона миша, у дијагоналној позицији, запажамо да се са повећањем степена пригушења, коефицијената линеарне и нелинеарне крутости (односно повећањем степена спрегнутости између молекула) посматрани чворни молекули раније синхронизују. Са одмицањем времена атрактор синхронизације показује различите облике (осмице, елипсе).

Са повећањем вредности фреквенција принудне силе посматрани чворни молекули показују феномен транзиторне синхронизације. Синхронизација молекула ZP је боља уколико је већа вискозност, и пригушење као и фреквенција принудне силе. С обзиром да су вискоеластична својства ZP после оплодње повезана са ефикаснијим механизмом *polyspermy block*-а, према овом осцилаторном моделу ZP , након оплодње, повећање вискозности и пригушења које би пратило овај неконзервативни нелинеарни систем, побољшава синхронизацију осцилаторног понашања чворних молекула чиме би могао да се тумачи ефикаснији *polyspermy block*.

Уз одговарајућа ограничења и адаптације сферични осцилаторни модел ZP миша могуће је применити на ZP -у других сисара.

Кључне речи: *zona pelucida*, осцилације, модел осцилаторне сферне мреже, дискретни континуум, сперматозоиди, фрикциони контакт, метода коначних елемената, напон, деформација, синхронизација

Научна област: Биомедицинско инжењерство

Ужа научна област: Моделирање у репродуктивној медицини

УДК број: 577.32:576.37:004.42ANSIS(043.3)

OSCILLATORY BEHAVIOUR OF MOUSE *ZONA PELUCIDA* BEFORE AND AFTER FERTILIZATION

Abstract

Zona pelucida (*ZP*) is the acellular mantle of an mammalian egg similar to an irregular three dimensional multilayer net that serves a very important role in oogenesis, fertilization and in the preimplantation period. There is a multy relation between the maturation status of the oocyte at the moment of fertilization, its genetic expression, release of cortical granules during fertilization, the level of post fertilization hardening of *ZP*, embryo quality and the ability to give birth to live offspring. Viscoelastic properties of the zygote *ZP* indicate the quality of the embryo.

The fundamental idea of this doctoral dissertation is that the process of fertilization can be viewed as an oscillatory phenomenon. Accordingly, the goal of this dissertation is the establishment of an oscillatory model of mouse *ZP*, definition of basic settings and kinetic parameters of the model, appropriate approximations and restrictions, as well as the exploration of oscillatory behaviour of the model under appropriate relevant conditions for cases before and after fertilization.

The spherical net model of the mouse *ZP* is in the form of a discrete net consisting of heterogeneous orthogonal chains consisting of glycoproteins interconnected with elastic or viscoelastic connections. A numerical simulation was conducted for previously established systems of differential equations and obtained analytical expressions for solutions or approximations of solution. Appropriate software was used in a numerical simulation in order to explore the oscillatory behavior of knot (*ZP1*) molecules on a representative sample of discrete-continual oscillatory model of mouse *ZP* in free and forced regimes. Numerical analysis was used for determining conditions under which resonance between *ZP* oscillation regimes and spermatozoa exerting impulse influence on the *ZP* net occurs. Also for determining a part of the set of eigen circular frequencies, frequencies at which dynamical absorption or resonance in case of forced oscillations occurs for *ZP* of oocyte and the *ZP* of mouse embryo. To explore if and how the angle of influence, distribution and number of spermatozoa with effective speeds exerting impulse influence on *ZP* influence the oscillatory behaviour of knot molecules on a representative sample of discrete continual oscillatory model of mouse *ZP*, a numerical experiment was conducted by using the generalized *Lussajous* figures in appropriate software package. For the purpose of determining potential weak points of *ZP* during the impulse influence of spermatozoa in the process of fertilization, a queasy-statistical symmetrical approximate model of *ZP* was established in the form of hollow sphere. Analytical expressions for tensions and deformations, as well as specific deformation work occurring in *ZP* during fertilization on influence of spermatozoa on the outer surface of *ZP*, the distribution of influence of which is in the form of discrete homogenous continuum that is radial oriented have been produced. Analytical expression for dynamical continual model of *ZP* are also presented. A numerical analysis of how tension, dilatations, volume dilatation and specific deformation work depend on the distance between a *ZP* point and the sphere centre, *ZP* thickness, relations between internal and external radius, exterior pressure i.e. the number of spermatozoa influencing the outer contour surface of the continual *ZP* model has been conducted on the basis of these analytical expressions for the model of *ZP*. This was

done by using the fractional calculus which was used to create basic properties of a two layer viscoelastic model of oscillatory spherical net of mouse *ZP*.

As vibration properties of embryo might be significant for assessing its vitality, to determine eigen frequencies and forms of oscillation modes for a mouse embryo during microinjection with a glass needle, finite element method (FEM) was implemented through the ANSYS software package. Using FEM and the transitory structure analysis on the model of continual layer of *ZP* by using the commercial ANSYS software package, dynamics of nonlinear friction contact between mouse spermatozoa and oocyte relative to the angle of spermatozoa influence was examined. Contact pressure, maximum equivalent tension in the *ZP*, total contact tension and tension caused by friction for various angles of influence of spermatozoa on the egg cell was studied. Oscillatory behaviour of mouse *ZP* after fertilization was considered on a nonlinear multi-parameter of oscillatory spherical net model of *ZP* in which *ZP* molecules are interconnected by visco-nonlinear-elastic bonds of the Kelvin-Voigt element type and subjected to influence of spermatozoa in the form of external force. A representative segment of the viscoelastic nonlinear oscillatory spherical net *ZP* model was taken for numerical multi-parameter analysis, and parameters used in the model were angle of spermatozoa impulse influence on *ZP* knot molecules, frequency and amplitude of external force (spermatozoa influence) on each of the molecules included in the analysis, the dumping coefficient, coefficients of linear and nonlinear rigidity and time. Nonlinear discrete model of *ZP* oscillatory network was considered to be a nonlinear non-conservative system which oscillates in a transitory manner under forced force with suppression, and bonds between molecules were considered to be of the viscoelastic type and oscillatory behavior of molecules in the model can be described by using differential equations of Duffing type with third degree of nonlinearity. On this nonlinear multi-parameter model, conditions for synchronization of certain knot molecules were considered.

On the basis of the generalized *Lissajous* curves, dynamical condition of knot molecules may be in full synchronization of its component motions in meridian and circular directions, or in asynchronization, motion similar to synchronization or asynchronization, or similar to chaotic or stochastic motion. Synchronous motion was considered a favourable oscillatory condition for fertilization. Angles under which spermatozoa influence the *ZP* creating synchronous motion of knot molecules were identified. Very large and very small angles are unfavourable.

Symmetrical distribution of spermatozoa with equal kinetic parameters will produce synchronized motion of knot molecules. Angle, velocity, distribution and the number of impacting spermatozoa influence the shape of generalized *Lussajous* curves. Relative to the interdependence of tension occurring in *ZP* according to the quasi statistical *ZP* model in the form of hollow sphere, the higher the distance between the centre of the sphere the higher the radial component of normal tension, while circular and meridian components decrease. With the increase of external pressure on *ZP*, deformation work increases in a nonlinear manner, and the absolute value of volume dilatation increases as well. This volume dilatation is negative since a volume compression is in question. *ZP* points that are closer to the surface of the oocyte suffer smaller specific deformation work. The thicker the *ZP*, the higher the volume dilatation provided other model parameters remain constant.

By using a two-layer discrete-continual model of spherical oscillatory *ZP* net it is possible to explain the mechanism of penetration of spermatozoa through the *ZP*. A

two-layer oscillatory net model of fractional order provides basis for possible mechanism of spermatozoa penetration through the net in the form of relaxation oscillations. A two layer oscillatory model of *ZP* may also provide bases for a more complex model of mouse *ZP* that can be treated as an oscillatory gel.

ANSYS analysis showed that frequencies of eigen oscillations of embryo are higher in fluid than in vacuum, and that they are in the order of magnitude around 52-55 kHz. Analysis showed that oscillations of free embryo in vacuum are practically not possible. The described method may be used for analysis of vibration properties of mouse embryos, but also of human ones, both in physiological and pathological conditions. The model supports the oscillatory theory of fertilization.

Analysis of dynamics of nonlinear frictional contact of oocyte and spermatozoa for various spermatozoa influence angles shows that spermatozoa velocity oscillates during simulations time and decreases step-by-step for all considered angles, thus pointing to a similarity with the “Slip-stick” effect that can be explained by a mechanism of relaxation oscillations occurrence. A smaller spermatozoa influence angle better conserves the energy of spermatozoa. Contact pressure, maximum equivalent pressure in *ZP*, total contact pressure and frictional stress, maximum penetration of spermatozoa through *ZP*, maximum deformation of *ZP*, as well as the contact surface all depend on the angle at which a spermatozoa influences the oocyte. They also show a nonlinear dependence, local minimums and maximums. Deformation occurring with nonlinear friction contact between the oocyte and spermatozoa are of local nature and influence only surface parts of *ZP*.

On the basis of multi-parameter analysis of synchronous motion of two knot molecules in the representative sample of the nonlinear viscoelastic *ZP* model of mouse embryo in diagonal position, it can be noted that with the increase of dumping and linear and nonlinear rigidity coefficient (i.e. increase of the level of coupling between molecules) the observed knot molecules become synchronized earlier. As time passes the attractor of synchronization shows different shapes (eight, ellipse).

With increasing values of external force frequencies the observed knot molecules manifest the phenomenon of transitory synchronization. Synchronization of *ZP* molecules is better if viscosity is higher and also dissipation as well as the frequency of external force. As viscoelastic properties of *ZP* after fertilization are connected to more efficient polyspermy block mechanism, according to this oscillatory *ZP* model, after fertilization, increase of visco-elasticity and dumping, that would be following this non-conservative nonlinear system, improves the synchronization of oscillatory behaviour of knot molecules, that can be a possible explanation for a more efficient polyspermy block.

With appropriate restrictions and adaptations, the spherical oscillatory mouse *ZP* model might be applicable to describing behaviour of *ZP* of other mammals.

Key words: *zona pelucida*, oscillations, oscillatory spherical net model, discrete continuum, spermatozoa, frictional contact finite element method stress, strain, synchronization

Scientific area: Biomedical engineering

Specific scientific area: Modelling in reproductive medicine

UDC No: 577.32:576.37:004.42ANSIS(043.3)

Садржај

Увод	1
1. Хистолошке и функционалне карактеристике јајне ћелије	3
1.1. Физиологија јајне ћелије-процес сазревања	3
1.2. Хемијски састав <i>Zona-e pellucida-e</i>	12
1.2.1. Антигена сличност <i>ZP</i> гликопротеина различитих врста	14
1.2.2. Структура <i>ZP</i> гликопротеина	16
1.2.3. Настанак <i>ZP</i> матрикса	19
1.2.4. Структура <i>ZP</i>	21
1.2.5. Шта утиче на степен гликозилисаности <i>ZP</i> гликопротеина	24
1.2.6. Физичке особине <i>ZP</i>	25
1.2.7. Утицај јонске јачине и температуре на стабилност <i>ZP</i>	26
1.2.8. Утицај <i>pH</i> вредности медијума на набој и структуру <i>ZP</i>	27
1.2.9. Утицај крослинкера на префертилизационо очвршћавање <i>ZP</i>	27
1.3. Улога <i>ZP</i>	28
1.3.1. Гликозилација <i>ZP</i> гликопротеина игра важну улогу у процесу интеракције <i>ZP</i> и сперматозоида	32
1.3.2. Разлика у везивању сперматозоида за нативне и рекомбиноване <i>hZP</i> гликопротеине	33
1.3.3. Експерименти на мишевима који имају мутиране гене за <i>ZP</i> гликопротеине	35
1.3.4. Селективност <i>ZP</i>	36
1.4. 3D структура <i>ZP</i>	37
1.4.1. Имунохистохемијска бојења и различита структура <i>ZP</i> коња и свиње:- локлизација и организација <i>ZP</i> гликопротеина код кобиле и свиње	41
1.5. Параметри <i>ZP</i> који могу утицати на оплодњу (дебљина, мутације и дефекти,...) ..	43
1.6. Промена хемијског састава и структурне организације <i>ZP</i> пре оплодње и након оплодње	45
1.7. Промена механичких својстава <i>ZP</i> пре и после оплодње јајне ћелије	48
2. Механички модели <i>zona-e pelucida-e</i>	52
2.1. Реолошки модели биоматеријала	52
2.1.1. <i>Zener</i> -ов модел	53
2.2. Механичке особине <i>ZP</i>	55
2.3. Методе мерења механичких својстава <i>ZP</i> и механички модели <i>ZP</i> до сада познати у литератури	57
2.3.1. Методе мерења механичких својстава <i>ZP</i>	57
2.3.2. Вишеосни сензор у комбинацији са методом микроињекције	61
2.3.3. Метода тактилног микросензора	63
2.3.4. Метода аспирације микропипетом	66
2.3.5. AFM- принцип рада	67
2.4. Механички теоријски модели коришћени у израчунавању <i>Young</i> - овог модула еластичности <i>ZP</i>	71
2.4.1. <i>Poin-Load Model</i> биомембране (модел биомембране са оптерећењем у тачки)	71
2.4.2. Модификовани Hertz-ов модел	71

2.4.3. Модел хипереластичне греде у комбинацији са <i>Arruda-Boyce</i> -овим моделом полимера	75
2.5 Механичке особине <i>ZP</i>	78
2.6. Промене еластичних својстава јајне ћелије са старењем јединке	82
3. Моделовње осцилаторног понашања <i>zona-e pelucida-e</i> миша пре и после оплодње	89
3.2.Полазне хипотезе.....	91
3.3. Хипотезе специфичне за предмет истраживања	92
3.4. Методе истраживања	93
3.5. Моделовње осцилаторног понашања <i>zona-e pelucida-e</i> миша пре и после оплодње.....	94
3.6. Модел осцилаторне сферне мреже <i>ZP</i> миша.....	95
3.6.1. Основне апроксимације/полазне претпоставке	95
3.6.2. Систем нелинеарних диференцијалних једначина које описују осцилаторно понашање изабраног репрезентативног узорка система <i>ZP</i> мреже.....	102
3.7. Режији осциловања репрезентативног узорка хомогеног осцилаторног модела <i>ZP</i>	112
3.8. Слободне осцилације линеарног система хомогеног дискретног модела <i>ZP</i> осцилаторне мреже	113
3.9. Решења система линеарних диференцијалних једначина за одређене случајеве принудних осцилација.....	118
3.10. Апроксимације решења система нелинеарних диференцијалних једначина за случајеве слободних и принудних осцилација у радијалном правцу	120
3.10.1. Слободне нелинеарне осцилације чворног молекула у радијалном правцу	120
3.10.2. Принудне нелинеарне осцилације чворног молекула у радијалном правцу	124
3.11. Квалитативна анализа могућих принудних осцилаторних режима чворних молекула осцилаторног <i>ZP</i> модела	126
3.12. Осцилаторна својства репрезентативног узорка дискретног осцилаторног модела сферне <i>ZP</i> мреже.....	135
3.13. Систем диференцијалних једначина динамике система материјалних тачака у ланцима у радијалном правцу. Сопствене кружне фреквенције и закони осиловања.....	138
3.14. Систем диференцијалних једначина аутономне динамике система материјалних тачака у ланцима у циркуларном, или меридијалном правцу. Сопствене кружне фреквенције и закони осиловања.	145
3.15. Систем диференцијалних једначина принудне динамике система материјалних тачака у ланцима у циркуларном, или меридијалном правцу. Резонантне кружне фреквенције и закони осиловања.	148
3.16. Промена у осцилаторном понашању јајне ћелије и ембриона миша кроз модел осцилаторне сферне мреже <i>ZP</i> миша	165
3.17. Нумеричко одређивање амплитудно - фреквентних карактеристика принудних осцилација и резонантних вредности кружних фреквенција као и кружних фреквенција на којима се јавља динамичка апсорпција динамике ланца репрезентативног дела дискретног модела <i>ZP</i> јајне ћелије и ембриона миша	173

3.18. Одређивање интеграционих константи за случај сопствених осцилација насталих поремећајем стања равнотеже репрезентативног дела осцилаторне <i>ZP</i> мреже предајом кинетичке енергије једном чворном молекулу.....	196
4. Нумеричка анализа осцилаторног понашања <i>ZP</i>	206
4.1. Утицај угла под којим сперматозооид дејствује на површ <i>mZP</i> на осцилаторно понашање чворних молекула <i>ZP</i> миша.....	206
4.1.1. Основна идеја осцилаторне интеракције јајне ћелије и сперматозоида	209
4.1.2. Анализа осцилаторног понашања чворних молекула <i>ZP</i> миша у дискретном моделу сферне осцилаторне мреже <i>ZP</i> кроз генералисане <i>Lussajous</i> -ове фигуре.	213
4.1.3. Утицај импулсних сила удара 4 сперматозоида са ефективним брзинама	216
4.1.4. Ограничења модела	233
4.2. Утицај почетне брзине кретања и распореда импулсних сила сперматозоида на осцилаторно понашање <i>ZP</i> миша.....	237
4.2.1. Значај брзине кретања и правца импулсног дејства сперматозоида у <i>ZP</i> за успех оплодње	238
4.3. Дистрибуција (распоред) сперматозоида на површини <i>ZP</i> и осцилације <i>ZP</i>	243
4.3.1. Методе	245
4.3.2. Резултати	247
4.3.3. Ограничења модела	260
4.4. Значај броја хиперактивисаних сперматозоида за осцилаторно понашање <i>ZP</i> миша.....	261
4.5. Деформациони рад <i>Zona-e Pelucida-e</i> у процесу оплодње	267
4.5.1. Ефекат брзине сперматозоида и њиховог распореда на осцилаторно понашање <i>ZP</i> миша.....	268
4.5.2. Напони и деформације у механичком моделу <i>ZP</i> као еластичног тела.....	270
4.5.3. Деформациони рад континуалног модела <i>ZP</i>	274
4.5.4. Динамички континуални модел <i>ZP</i>	277
4.6. Вишеслојни дискретно континуални модел осцилаторне сферне мреже <i>ZP</i> миша.....	286
4.6.1. Основни концепт двослојног осцилаторног дискретно континуалног сферног модела <i>ZP</i>	288
5. Примена методе коначних елемената у моделовању осцилаторног понашања <i>Zona-e Pelucida-e</i> миша пре и после оплодње	299
5.1. Вибрационе карактеристике ембриона миша приликом микроињекције ...	303
5.2. Динамика нелинеарног фрикционог контакта између сперматозоида и јајне ћелије миша	311
6. Осцилаторно понашање <i>ZP</i> миша након оплодње	318
Закључак	343
Литература:	363
Прилог 1	388
Прилог 2	398
Прилог 3	421
Биографија Анђелке Н. Хедрих	432

Предмет проучавања ове докторске дисертације је *Zona pelucida* (*ZP*) - ацелуларни омотач јајне ћелије сисара налик ирегуларној тродимензионалној, вишеслојној мрежи који има веома важну улогу у оогенези, оплодњи и преимпалнтационом периоду. То је последња структура кроз коју сперматозоид треба да прође у процесу оплодње. *ZP* је веома динамичка структура која се синтетше у току сазревања јајне ћелије, показује биохемијске, структурне и промене мехничких својстава током сазревања јајне ћелије али и после оплодње.

У првом поглављу приказан је преглед литературе о хемијском саставу *ZP*, хемијским и физичким особинама, начину синтетисања, структурне и биохемијске сличности *ZP* у различитих врста, структурне и промене механичких својстава кроз које пролази ова структура у току процеса сазревања јајне ћелије након процеса оплодње. У другом поглављу дат је преглед досад постојећих механичких модела *ZP* и техника мерења њених механичких својстава.

На основу досадашњих сазнања из доступне литературе о биохемијским основама оплодње, идеја је да се процес ћелијске оплодње (интеракције јајне ћелије и сперматозооида) може посматрати на другачији начин, тј. као осцилаторни феномен. Вођени овом идејом и чињеницом да је *ZP* последња баријера коју сперматозоид треба да савлада да би свој генетски материјал пренео у цитоплазму јајне ћелије, постављен је осцилатронни модел *ZP*. У трећем поглављу је детаљно описан једнослојни модел осцилаторне сферне мреже *ZP* (у даљем тексту осцилаторни *ZP* модел) миша који се заснива на методи дискретног континуума и законима осциловања у ланчаним системима, аналитичкој механици и нелинеарној динамици, теорији еластичности, реологији и науци о наследним материјалима, примењеним на биолошке системе. Детаљно је дата методологија осциловања дискретног континуалног модела *ZP* у слободном и принудном режиму, апроксимације модела, кинетички параметри, и ограничења примене модела.

У четвртном поглављу испитивано је осцилатроно понашање чворних молекула у осцилаторном *ZP* моделу у односу на угао, брзину, распоред и број

сперматозооида који дејствују на репрезентативни узорак осцилаторног ZP модела. Дат је предлог за двослојни вискоеластични осцилаторни модел ZP чија се осцилаторна динамика може описати помоћу нелинеарних диференцијалних једначина нецелог реда. У четвртом поглављу, предложен је и квазистатички континуални модел ZP у виду шупље сфере и разматран ефекат дејства сперматозооида на напон, деформације, запреминску дилатацију, специфичан деформациони рад у зависности од одговарајућих релевантних параметара.

У петом поглављу применом методе коначних елемената испитивано је осцилаторно понашање ембриона миша приликом $ICSI$ технике као и динамика нелинеарног фрикционог контакта јајне ћелије (ZP) и сперматозооида.

У шестом поглављу анализирана је синхронизација чворних молекула у дијагоналној позицији репрезентативног узорка нелинеарног вискоеластичног осцилаторног вишепараметарског ZP модела миша након оплодње који осцилује са пригушењем.

1. Хистолошке и функционалне карактеристике јајне ћелије

1.1. Физиологија јајне ћелије-процес сазревања

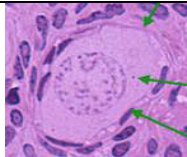


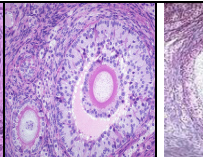
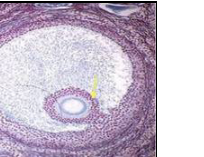
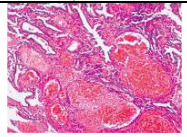
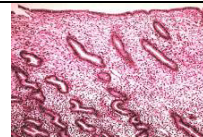
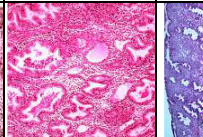
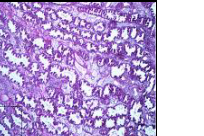

Женске полне ћелије - јајне ћелије настају и сазревају у јајницима-женским полним жлездама у процесу познатом као оогенеза и фоликулогенеза. Фоликулогенеза је процес развоја терцијарног-*de Graaff*-овог фоликула који садржи зрелу јајну ћелију спремну за оплодњу. Фоликулогенеза је цикличан, хормонски зависан процес који зависи од хормона хипоталамуса, хипофизе и хормона јајника. Упоредо са процесом фоликулогенезе, дешавају се цикличне промене и на другим органима и ткивима, нарочито на полним органима – јајницима, јајоводима, материци и вагини. Цикличне промене захватају и везивно ткиво и млечну жлезду. Сврха ових морфо-функционалних промена јесте припрема организма за оплодњу, нидацију и исхрану ембриона током трудноће. Преглед морфо-функционалних промена на полним органима женске једнке сликовито су дате су у Табели. 1 и на Слици 1.1.(*Perović, 2001*).

Зрела јајна ћелија, која се прскањем терцијарног фоликула на површини коре јајника ослобађа у јајовод, састоји се од једра, цитоплазме, плазма мембране-оолеме, ацелуларног слоја који се надовезује на плазма мембрану-*zona-e pelucida-e (ZP)* (зоне пелуциде) и слоја гранулозних ћелија које окружују јајну ћелију а називају се *Corona Radiata*. Цитоплазма зреле јајне ћелије је богата органелама секреторног типа и садржи две врсте гранула -жуманчане и кортикалне грануле. Жуманчане грануле имају улогу складишта хранљивих материја за ембрион у првим данима живота пре нидације. Кортикалне грануле играју важну улогу у процесу оплодње и мењања физико-хемијских особина *ZP* након оплодње. Види Сliku 1.2.

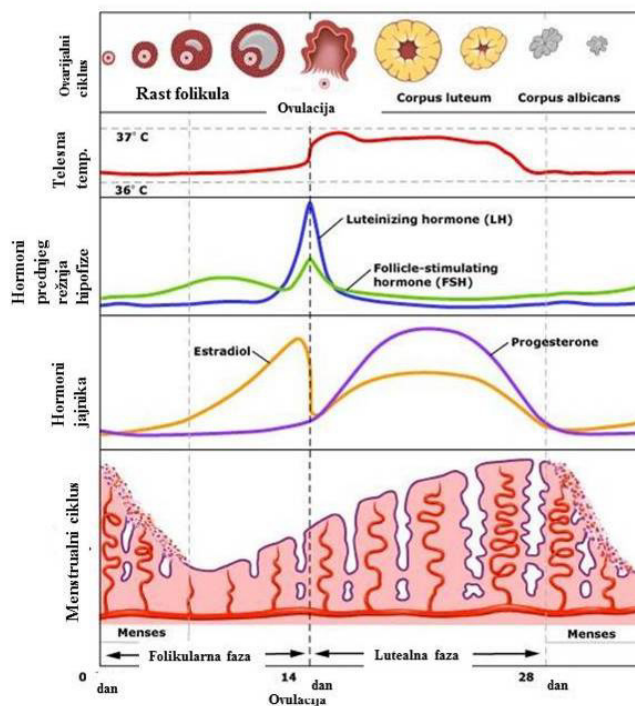
Табела 1.1. Промене у току менструалног циклуса на полним органима. Део
слика преузет са

http://medcell.med.yale.edu/histology/female_reproductive_system_lab.php.

Пристапљено дана 12.04.2016.

оваријални циклус					
фоликулогенеза	примордијални фоликул	примарни униламинарни фоликул	примарни мултиламинарни фоликул	секундарни (антрални) фоликул	терцијарни (de Graff-ов) фоликул
	дијаметар фоликула-25-30µm, неколико спљоштених фоликулинских ћелија оскудно везиво строме	кубичне фоликулинске ћел. Један слој фоликулинских ћелија		стратум гранулозум 6-12 слојева 200 µm	
оогенеза	дијаметар јајне ћелије	повећан бр голџи апарата, рибозома глатког и грануларног ендоплазматског ретикулума (ZP) се први пут уочава на светлосном микроскопу кад јајна ћелија има дијаметар 50-80 µm			
					
материца-менструални циклус		менструална фаза	пролиферативна фаза	рана секреторна фаза	касна секреторна фаза
јајоводи					

вагина					
млечне жлезде					



Слика 1.1. Оваријални и менструални циклус код хумане врсте са пратећим хормонским променама. *Преузето са http://www.sharinginhealth.ca/biology/menstrual_cycle.html. приступљено дана 12.04.2016.*

Фоликулогенеза

Фоликули су лоптасте формације које чине јајна ћелија обмотана са једним или више слојева фоликуларних-гранулозних ћелија. Током сазревања фоликули

јајника пролазе кроз неколико фаза: примордијални, примарни униламинарни, примарни мултиламинарни, секундарни и терцијарни фоликул који се назива још и преовулациони или *de Graff*-ов фоликул.

Примордијални фоликул: најмањи су и најбројнији. Женска јединка се рађа са одређеним бројем примордијалних фоликула чији се број непрекидно смањује једним делом због процеса раста и сазревања, а једним делом због пропадања-атрезије. Једино ова врста фоликула постоји до менархе. У току репродуктивног периода из ових фоликула ће се развит све друге форме фоликула. У средишту примордијалног фоликула налази се јајна ћелија (25-30 μ m код људске врсте) округлог облика са бледим, ексцентрично постављеним једром и неколико спољашњих фоликулинских ћелија. Примордијални фоликули су окружени оскудним везивом строме јајника.

Примарни фоликул је прва фаза у расту и сазревању фоликула јајника. Настаје од примордијалног фоликула променама јајне ћелије, фоликулинских ћелија и стромалних ћелија које окружују фоликул. У сваком оваријалном циклусу одређени број примордијалних фоликула се претвара у примарне фоликуле (код људске врсте 10-15). Јајна ћелија је у њему већа. Фоликулинске ћелије мењају облик из спљоштеног у кубични. Настаје једнослојни фоликулински омотач и такав фоликул се назива **примарни униламинарни фоликул**.

Примарни мултиламинарни фоликул настаје растом униламинарног фоликула-фоликулинске ћелије се уможавају и сада се налазе у више слојева око јајне ћелије и називају се гранулоза ћелије. Вишеслојни омотач који граде се назива *stratum granulosum*. Базална мембрана фоликула зедебљава и постаје *membrana limitans externa*. Везивно ткиво строме које непосредно окружује фоликул згушњава се и образује двослојни омотач који се назива *theca folliculi*.

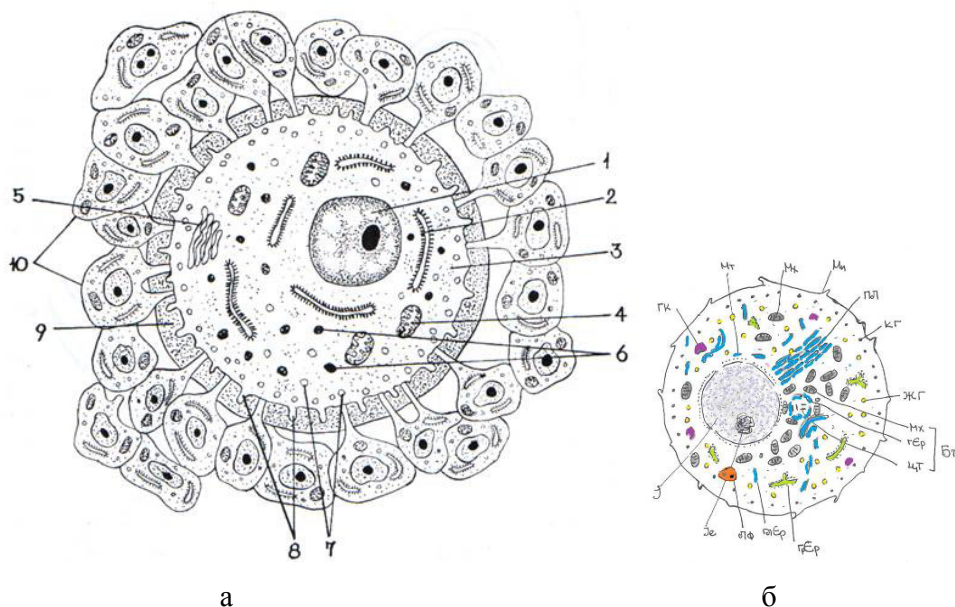
Јајна ћелија у примарном мултиламинарном фоликулу има интензивну секреторну активност и расте број ћелијских органела које су за њу одговорне (голци комплекс, ендоплазматски ретикулум, рибозоми). По први пут се у овој фази на светлосном микроскопу уочава бледа структура која се састоји од гликозаминогликана и гликопротеина између плазма мембране јајне ћелије и

фоликулинских ћелија- *zona pelucida (ZP)*(зона пелуцида-бледа зона). У *zona*-и *pelucida*-и се сустичу микровили јајне ћелије и фоликулинских ћелија.

Секундарни (антрални) фоликул је следећа развојна фаза примарног мултиламинарног фоликула. Поседује већи број слојева фоликулинских ћелија, и течност унутар фоликула која се назива *liquor folliculi* која заправо представља трансудат крвне плазме, богат хијалуронатима. Карактеристично је да је у њему концентрација фактора раста, стероидних и гонадотропних хормона већа него у крви. У овој фази се јасно издваја слој фоликулинских ћелија које непосредно окружују јајну ћелију које се називају *corona radiata*. Јајна ћелија и фоликулинске ћелије су ексцентрично постављене у виду јајног брежуљка -*cumulus oophorus-a* и окружене ликвором.

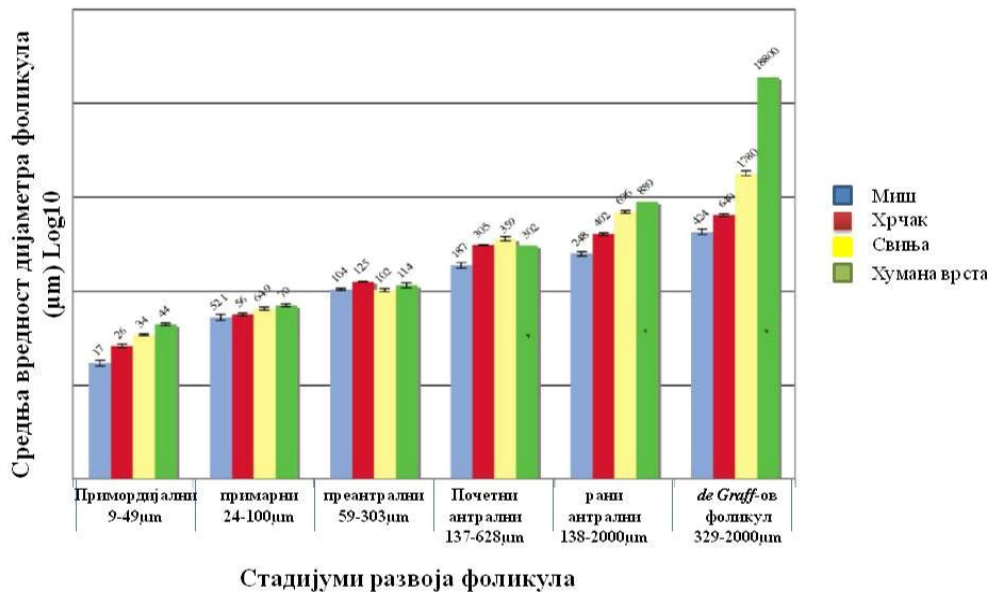
Терцијарни или de Graaff-ов фоликул је завршна фаза у расу и сазревање јајних фоликула. Терцијарни фоликул има већи дијаметар у односу на секундарни и јасно штрчи са површине коре јајника на месту где ће се одиграти овулација. Из њега се у периоду овулације ослобађа јајна ћелија способна за оплодњу. Настаје развојем доминантног секундарног фоликула. Гранулозни слој се истањује на рачун раста ликвора и антрума фоликула. Кад достигне одређени максимални пречник (100-150µm код хумане врсте) јајна ћелија престаје да расте, *zona pelucida* је тад најдебља (20-25 µm код хумане врсте). *Theca folliculi* расте и задебљава упоредо са растом фоликула и на њој се јасно издвајају два слоја - унутрашњи- *theca folliculi interna* и спољашњи- *theca folliculi externa*. Ћелије *theca-e interna-e* имају изглед стероид секреторних ћелија и бројне *LH* рецепторе. *Theca folliculi externa* се састоји од везивног ткива и глатких мишићних ћелија. Прва мејотска деоба јајне ћелије завршава се у терцијарном фоликулу настанком секундарне ооците и првог поларног тела. Одмах након ове деобе секундарна ооцита улази у другу мејотску деобу која се зауставља у метафази. Секундарна ооцита завршава другу мејотску деобу само у случају да у њу продре сперматозооид. Испод плазма мембране секундарне ооците-оолеме налазе се две врсте гранула-кортикалне и жуманчане. Кортиклане грануле су ситније и електроногушне и садрже ензиме. Жуманчане грануле садрже хранљиве материје које служе као извор енергије у раној фази ембиогенезе. У току процеса сазревања дешавају се промене у Голџи комплексу и ендоплазматском ретикулуму у смислу

повећања секреторне активности. Бројне микроресице се са површине оолеме пружају у *zona-y pelucida-y* (Perović, 2001). Слика 1.2.



Слика 1.2. а-јајна ћелија и слој гранулоза ћелија. 1-Ј-једро, Цт-центрозом, Мт-микротубули, 3-цитоплазма, 4-Мтх-митохондрије 5-, Гк-Golgi комплекс, гл ЕР-глатки ендоплазматски ретикулум, 2-грЕР-грануларни ендоплазматски ретикулум, 6-ЖГ-жуманчане грануле, 7-КГ-кортикалне грануле, ПЛ-прстенасте ламеле, Бт-Балбијанијево тело, 8-Микровили. 9-ЗП-зона пелуцида, 10-ГЋ-гранулоза ћелије. Преузето са <http://lektii.org/3-83595.html> приступљено дана 02.03.2016. б. Јајна ћелија-шематски приказ хистолошке грађе.

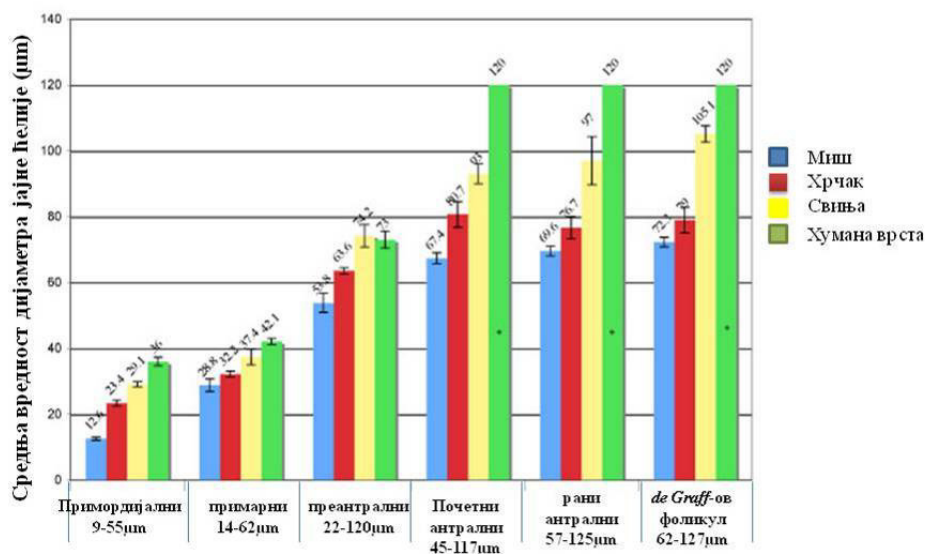
Дијаметар јајне ћелије и фоликула јајника као и број гранулоза ћелија у одговарајућим стадијумима развоја фоликула су различити у различитих врста (Griffin et al, 2006). Види слике 1.3 и 1.4.



Слика 1.3. Промене дијаметра фоликула у различитим фазама раста и развоја код различитих врста: миша (сврто плаво), хрчка (црвено), свиње (жто), хумане врсте (зелено). Запажа се раст фоликула у оквиру врсте од примордијаног до терцијарног фоликула али и разлика у величини фоликула код различитих врста независно од фазе развоја. Од испитиваних врста мишеви имају најмање фоликуле. Преузето из (*Griffin et al, 2006*).

Регресиона анализа броја гранулоза ћелија исказана као функција дијаметра фоликула у различитим фазама фоликулогенезе, указује да квадратна функција најбоље одговара свакој од 4 испитиване врсте (миш, хрчак, свиња, хумана врста). Раст фоликула је прогресиван али није линеаран и показује полиномиални раст за сваку појединачну испитивану врсту у функцији времена. Промене дијаметра јајне ћелије нису директно пропорционалне дијаметру фоликула осим у раним стадијумима раста фоликула. Однос масе тела и величине фоликула је конзервирана код врста (*Griffin et al, 2006*).

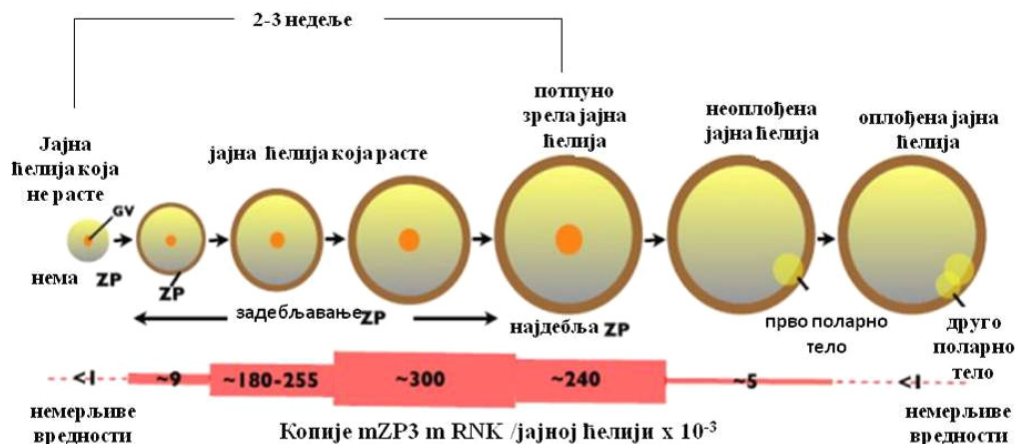
Структура која је предмет проучавања ове докторске дисертације је *ZP* и први пут се појављује у јајној ћелији примарног фоликула. У даљем излагању биће речи о њеном хемијском саставу, физичким особинама, о њеним биолошким улогама (функцијама), и њеној тродимензионалној структури.



Стадијуми развоја фоликула

Слика 1.4. Раст јајне ћелије по фазама развоја код различитих врста: миша (светло плаво), хрчка (црвено), свиње (жута), хумане врсте (зелено). Запажа се раст јајне ћелије у оквиру врсте у склопу раста фоликула, разлика у величини јајне ћелије у оквиру врсте у склопу раста фоликула као и разлика у величини јајне ћелије код различитих врста независно од фазе развоја. Од испитиваних врста мишеви имају најмање јајне ћелије. Преузето из (*Griffin et al, 2006*).

Зона пелуцида- *ZP* динамички мења своју структуру и механичка својства кроз фазе раста и сазревања јајне ћелије. Слика 1.5. Код миша, женке достижу полну зрелост након 6 недеља. Њихови јајници (сваки понаособ) садрже око 8 000 примордијалних фоликула чији је дијаметар око 17 µm а јајна ћелија унутар њега има дијаметар од 12 µm. У току периода раста од око 2 - 3 недеље настаје терцијарни фоликул дијаметра око 125 µm, који код миша садржи три слоја кубоидалних ћелија а јајна ћелија унутар њега има дијаметар од око 80 µm.



Слика 1.5. Повећање дијаметра јајне ћелије и *ZP* током раста и сазревања јајне ћелије. Преузето из (Wassrman, 2008).

Јајна ћелија је у терцијарном фоликулу заустављена у дихтиотену прве мејотичке деобе. Упоредо са растом јајне ћелије расте и задебљава и *ZP* достижући своју коначну дебљину у терцијарном фоликулу ($6.2 \pm 1.9 \mu\text{m}$ према Wassarman & Litscher, 2012, односно $6,5\mu\text{m}$ по Jovine et al, 2007). Слика 1.5. и Табела 1.2.

Табела 1.2. Однос дијаметра јајне ћелије миша за време раста јајне ћелије и дебљине *ZP*. Преузето из (Wassarman & Litscher, 2012)

дијаметар јајне ћелије (μm)	дебљина <i>ZP</i> (μm)
40	1,6±0,4
50	2,5±0,7
60	3,5±0,9
70	5,6±1,3
80	6,2±1,9

Са сазревањем јајне ћелије, повећава се дебљина *ZP* јер јајна ћелија која расте синтетише гликопротеине зоне пелуциде и излучује их у екстрацелуларни - перивителински простор где се они повезују на специфичан начин градећи слој

који се на светлосном микроскопу види као униформан. ZP је најдебља код потпуно зреле јајне ћелије-пред овулацију (Wassarman, 2008). Слика 1.5. О начину повезивања ZP гликопротеина као и факторима који могу на то утицати биће речи касније. Један од модела повезивања ZP гликопротеина дао је Wassarman 1988. Слика 1.6.

Гликопротеине ZP-е миша синтетише јајна ћелија која расте и сазрева повећавајући свој дијаметар и дијаметар ZP (Wassarman, 1996; Wassarman & Kinloch, 1992; Epifano et al 1995b no Prasad et al, 2000, Wasserman, 2008, Qi et al, 2002). Код неких животињских врста (зец, свиња, крава, мармозет, резус мајмун, хумана врста) протеине ZP синтетишу и фоликуларне ћелије (Vanroose et al, 2000). ZP гликопротеини се депонују између јајне ћелије и гранулоза ћелија (Prasad et al, 2000). Код других врста гранулоза ћелије такође експримирају ZP mRNA и /или ZP протеине (Prasad et al, 2000) али наводе да то могу и гранулоза ћелије миша.“ Разлике су можда настале због разлике у коришћеним методама за детекцију протеинске експресије и фиксације протеина, афинитета антитела, сензитивности *in situ* хибридизације као и развојне фазе фоликула (примарни, секундарни фоликул) или кумулусних ћелија“ (Prasad et al, 2000).

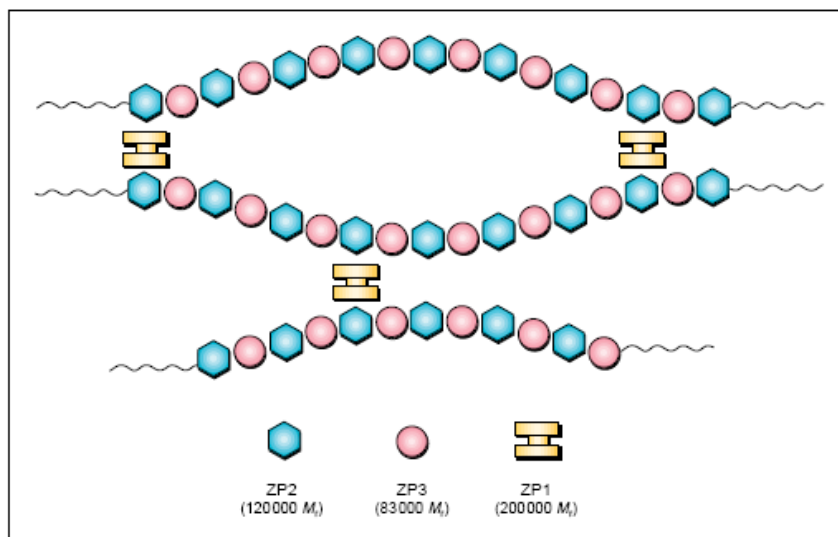
Дебљина ZP је специфична за врсту (1-25 μ m) као и садржај протеина (1-30ng), и као што је наведено варира у зависности од степена зрелости јајне ћелије (5–10 μ m) у оквиру исте врсте/јединке. У миша дебљина ZP јајне ћелије је 6,2 μ m (6,5 μ m) и садржи 3,5ng протеина (Green, 1997, Wassarman, 1988, 2008). Код свиње, дебљина ZP је 16 μ m и садржи 30-33ng протеина (Michelman et al, 2007), код хумане врсте - 10-31 μ m , средња вредност 17.5 μ m, ZP опосума је 2 μ m, краве 25 μ m. (Nakano & Yonezawa 2001 no Michelmann et al, 2007, Prasad et al, 2000, Dunbar & O’Rand, 1991 no Qi et al, 2002).

1.2. Хемијски састав *Zona-e pellucida-e*

Зона пелуцида је ацелуларни тродимензионални екстраћелијски омотач који обавија јајну ћелију сисара и ембрион све до стадијума бластоцисте. Састоји се од сулфатисаних гликопротеина који су међусобно повезани на специфичан начин тако да граде структуру налик мрежи. Има веома важну улогу у оогенези, оплодњи и преимплантационом развоју зигота. Овај еластични рупичасти омотач

налик сунђеру је порозан - пропушта антитела, ензиме, феритин, и његове коњугате, имуноглобулин и мале вирусе (нпр. менговирбус) али не пропушта молекуле са јаким негативним набојем, као што је хепарин. (*Phillips & Shalgi, 1980 no Green & Purves, 1984*). У прилог величини молекула које пропушта - дијаметар феритина је 12 nm а очекивани дијаметар коњугата 20-25 nm, менговирбус има дијаметар од 28 nm (*Phillips and Shalgi, 1980 no Green & Purves, 1984*). Порозна структура ZP представља баријеру за веће вирусе. *Viral diarrhea virus* (BVDV, 40–50 nm) и *bovine herpesvirus-1* (BHV-1; 180–200 nm) бивају заробљени у спољашњим слојевима ZP (*Vansoose et al, 2000*). У првих 24 сата најмање честице од 40 nm могу да се детектују на пола дебљине ZP, куглице од 200 nm допиру само до спољне 1/4 ZP. (*Vansoose et al, 2000*).

У зависности од врсте сисара састоји се од 3 (миш, *mZP1-mZP3*), односно 4 сулфатисана гликопротеина (хумана врста- *hZP1-4*, говече -*bZP1, bZP2, bZP3-a, bZP3-b*, и *bZP4*; пацов, хрчак, свиња, мајмун) (*Vanroose et al, 2000, Izquierdo-Rico et al, 2009*).



Слика 1.6. Модел повезивања гликопротеина ZP миша који је предложио *Wasserman*. Преузето из (*Green, 1997*). Према овом моделу филаменти се састоје из ZP2-ZP3 јединица које се понављају а међусобно су повезане ZP1 молекулима. Однос ZP2:ZP3 је приближно 1:1.

Хемијска структура *ZP* миша, пацова, свиње и човека је врло слична. Ови протеини су организовани у фибриларне структуре које сачињавају матрикс. У миша се састоји од 3 сулфатисана гликопротеина: *ZP1*, *ZP2*, и *ZP3* који чине 95% њеног састава. Њихове молекулске масе су: (*MrZP1*) 200 000 (623 аминокиселине (ак) а димер 1246 ак), (*MrZP2*) 120 000 (713 ак) и (*MrZP3*) 83 000 (424 ак). Код миша *mZP2* и *mZP3* су мономери док је *mZP1* димер који повезује претходна два. Моларни однос *mZP2*: *mZP3* код миша је приближно 1:1,1 а однос *mZP1*: *mZP2*-*mZP3* је 1:5. *ZP2* и *ZP3* имају фибриларну структуру, наизменично су распоређени градећи дуге филаменте који су међусобно повезани са *ZP1*. Слика 1.6. *mZP2* и *mZP3* чине заједно око 80% док *mZP1* чини око 20% укупних *ZP* протеина. *ZP* полипептиди су хетерогено гликозилисани. Олигосахариди имају и сијалинске и сулфатне групе тако да нативни *mZP1-3* имају ниску изоелектричну константу. (Wassarman, 1988). Хетерогеност *ZP* гликопротеина је одређена везаним олигосахаридима а не њеним протеинским делом (Wassarman & Litscher, 2012). Гени за полипептиде *ZP* миша *mZP1-3* се налазе на 19, 7, и 5 хромозому као једна копија гена. Гени који кодирају *mZP1-3* се састоје редом од 12, 18, и 8 егзона. Број и дужина егзона су високо конзервирани у сисара (Wasserman, 2008).

Хумана *ZP* се састоји од 4 гликопротеина: *hZP1* (100 kDa-638 ак), *hZP2* (75 kDa-745ак), *hZP3* (55 kDa-424 ак) и *hZP4* (65 kDa-540ак) (Ganguly et al, 2010). Гени за полипептиде *ZP* хумане врсте *hZP1-4*, се налазе на хромозомима 11, 16, 7 и 1.

1.2.1. Антигена сличност *ZP* гликопротеина различитих врста

ZP полипептиди различитих врста сисара су добро конзервирани. *ZP2* и *ZP3* показују 65-98% сличности а *ZP1* око 40% сличности. "На пример секвенце *ZP2* и *ZP3* мишије и хумане врсте -две врсте које су раздвојене преко 100 година еволуције показују 67% (*ZP3*) сличности" (Prasad et al, 2000, Wasserman, 2008, Wassarman & Litscher, 2012). Табела 1.3. *ZP1* хрчка је хомолог са *ZP1* гликопротеином других сисара (човека -66%, пацова- 80%, миша- 80%) (Izquierdo-Rico et al, 2009). *ZP4* хрчка садржи 1632 нуклеотида који кодирају полипептид од 543 аминокиселине и хомолог је са истим протеином пацова -82% и хумане врсте-

78%. Табела 1.4. Ортолог хуманом *ZP4* гену је присутан у геному миша као псеудоген али се функционални протеин не експримира (*Izquierdo-Rico et al, 2009*). Код пса и говечета је *ZP1* се налази у форми псеудогена (*Izquierdo-Rico et al, 2009*).

Процент истоветности *ZP* протеина између хумане врсте и кобиле је 69% за *ZP1*, 69% за *ZPA/ZP2*, 74% за *ZPB/ZP4* и 76% за *ZPC/ZP3*. (*Mugnier et al, 2009*).

Табела 1.3. Сличност *ZP* гликопротеинских фамилија код различитих врста. Податци преузети из *Prasad et al 2000*.

ZP фамилија	врста	Сличност са хуманом врстом %	Број аминокиселинских остатака	Број N-гликозилационих места
ZP1	Миш	39	623	6
	Зеџ	71	540	6
	Свиња	68	536	5
	Кунџ	92	539	5
	Кобила			
	Хумана врста	-	540	6
ZP2	Миш	60	713	7
	Зеџ	72	684	7
	Свиња	64	716	7
	Кунџ	94	743	7
	Хумана врста	-	745	6
ZP3	Миш	67	424	6
	Зеџ	69	419	5
	Свиња	74	421	4
	Мармозет	91	424	5
	Кунџ	94	424	4
	Хумана врста	-		4
ZP4			540	

ZP2 и *ZP3* су мономери док је *ZP1* димер којег је могуће поделити на идентичне субјединице помоћу еластазе или редукцијом дисулфидних веза. Сва три протеина су сулфатисана и богато гликозилисана тако да је маса протеинског језгра значајно мања од њихове укупне молекулске масе. *ZP1* има 6 потенцијалних места за гликозилацију на N-крају *ZP2* седам а *ZP3* 6. Сва три гликопротеина поседују велики број потенцијалних места за гликозилацију на O-крају. Велики део домена *ZP2* и *ZP3* гликопротеина миша има исту структуру (*Green, 1997*).

Табела 1.4. Сличност ZP гликопротеина хрчка, миша и пацова и хумане врсте.

	нуклеотидна секвенца	амино киселинаска секвенца
ZP1 хрчка са	79% хумане врсте	66% хумане врсте
	84% пацова	80% пацова
	86% миша	80% миша
ZP2 хрчка		54% ZP2 свиње (<i>Jiménez-Movilla et al, 2009</i>).
ZP3 хрчка		66% ZP3 свиње (<i>Jiménez-Movilla et al, 2009</i>).
ZP4 хрчка	78% хумане врсте	62% хумане врсте
	82% пацова	73% пацова
		60% свиње (<i>Jiménez-Movilla et al, 2009</i>).

1.2.2. Структура ZP гликопротеина

ZP полипептиди су конзервирани током еволуције. Сви ZP гликопротеини код различитих врста сисара имају сличну структуру Слика 1.7. (*Wassarman, 2008*), само се разликују минимално према редоследу аминокиселина које улазе у њихов састав и према степену и месту гликозилације. Гликопротеини хумане ZP поседују неке угљенохидратне компоненте које не испољавају друге врсте (*Jimenez-Movilla et al 2004; Familiari et al, 2006*).

Сваки ZP гликопротеин има: N-терминалну хидрофобну сигналну пептидну секвенцу где се налазе потенцијална места гликозилације преко N- и O- група, C- терминални хидрофобни домен кој се надовезује на домен сличан трансмембранском домену (TMD), потенцијално место које исеца протеин конвертаза-фурин-(*potential consensus furin cleavage site -CFCS*) узводно од TMD, ZP домен који има два суб домена (ZP-N и ZP-C) раздвојена линкер регионом. ZP домен се јавља и у неким другим протеинима као на пример TGF, TGFR-3, уромодулину, текторинима, протеину секреторних гранула панкреаса (*Jovine et al., 2005*). Слика 1.7.

Сигнални пептид на N-терминалном крају је различите дужине код сваког ZP протеина без обзира на врсту. Слика 1.7. Нпр код hZP: ZP1 има сигнални пептид који се састоји од 25 ак; ZP2, 38 ак; ZP3, 22 ак; ZP4, 21 ак.

ZP-N субдомен се састоји од 4 конзервиране *Cys* резидуе. Протеини који поседују овај *ZP* домен код различитих врста (мува, миш, хуман врста) могу да поседују оба субдомена, или само *N*-третинални субдомен. „*C*-третинални субдомен се никада не јавља сам (*Jovine et al, 2006*).“ (*Wassarman & Litscher, 2012*) Линкер регион је осетљив на деловање протеаза (*Jovine et al, 2004; Han et al, 2010*).

2.3Å кристална структура *ZP-N* субдомена мишијег *ZP3* је веома сложена (*Monne et al, 2008*). *mZP1* има за разлику од осталих *ZP* протеина и тзв. "Trefoil" домен (Слика 1.7.) за који се сматра да је резистентан на протеолитичко разлагање (*Bork, 1993; Gajhede et al, 1993 no Prasad et al, 2000, Wassarman, 2008*).

„Конзервација *C*-третиналног *CFCS* и трансмембранског домена код различитих *ZP* протеина сисара одражавају исти секреторни пут у њиховој биосинтези.“ (*Izquierdo-Rico et al, 2009*). Конзервирана је хидрофобност, поларност и тенденција увртању на многим позицијама *ZP* домена. (*Bork, 1992; Bork & Sander, 1992 no Prasad et al, 2000*).

Сваки од делова *ZP* гликопротеина има неку улогу у процесу формирања *ZP* матрикса (транспорт кроз цитоплазму, транспорт преко плазма мембране, повезивање са другим *ZP* гликопротеинима у перивителинском простору-полимеризација у *ZP* матрикс...).

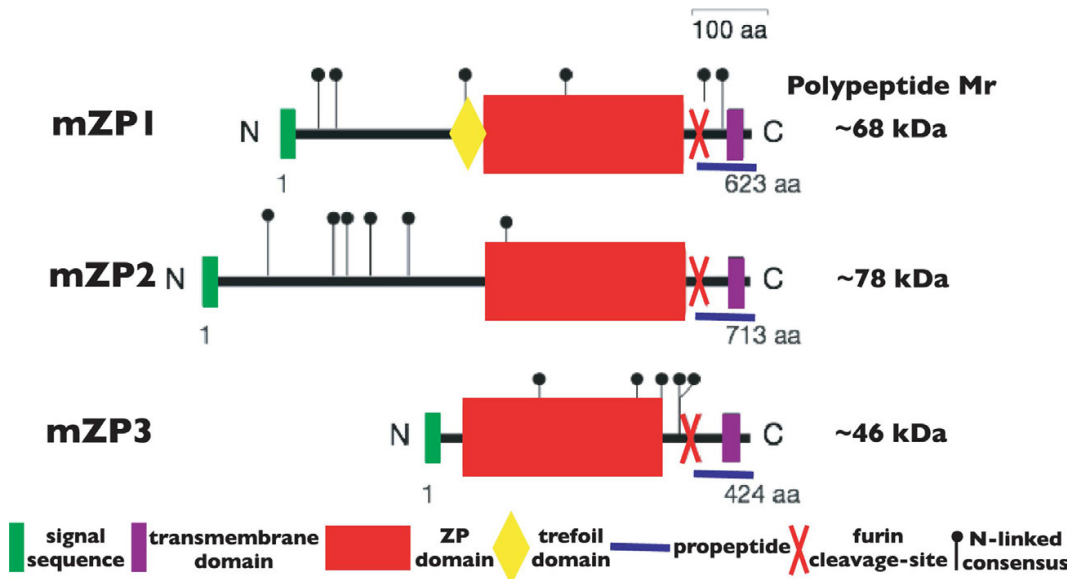
Сигнални пептид на *N*-третиналном крају је важан јер одређује секреторни пут протеина. Овај сигнални пептид се исеца са "зрелог протеина" али се на зна у ком тренутку биосинтезе и повезивања *ZP* протеина се то дешава. У *ZP* матриксу нема сигналног пептида. Код неких протеина мутација *ZP* домена доводи до лошег повезивања протеина што указује на важност овог домена у процесу полимеризације *ZP* протеина у филаментозне структуре. *C*-третинални трансмембрански домен и кратак цитоплазматски реп *ZP2* и *ZP3* гликопротеина није кључан за секрецију ових протеина али је кључан за њихово повезивање (*Jovine et al., 2002*). *TMD* има потенцијалну улогу у излучивању и повезивању у *ZP* матрикс. Још нису дефинисане функције дела протеина који је сличан трансмембранском домену *ZP* протеина.

Настанак *ZP* матрикса укључује регулисану протеолизу на месту које исеца фурин. Постоје контрадикторни резултати око значаја исецања на *CFCS* пре

секреције *ZP* протеина и њихове уградње у *ZP* матрикс (Qi et al., 2002; Zhao et al., 2002)."

ZP-N субдомен је довољан за полимеризацију *ZP3* гликопротеина код миша. (Jovine et al., 2006). Улога *ZP-C* субдомена још није јасно дефинисана *ZP-C* субдомен би могао да има регулаторну улогу у удруживању протеинских комплекса *ZP* домена.

ZP-C субдомен *ZP3* гликопротеина код хумане врсте има улогу у индукцији акрозомалне егзоцитозе (Bansal et al, 2009 no Gupta et al, 2009).



Слика 1.7. Шематски приказ грађе *ZP* гликопротеина миша: *mZP1*, *mZP2* и *mZP3*. *N*- и *C*- терминални крај. Зелено-сигнални пептид, жуто-, *Trefoil*-, домен, црвено-*ZP* домен, црени икс-, consensus furin cleavage-site –*CFCS*, ружичасто-трансмембрански домен, плава црта-*C*-терминални пептидни регион. Црне чиоде-*N*-гликозилациона места. Преузето из (Wassarman, 2008).

Цистеинске резидуде *ZP* домена су конзервиране код хрчка, пацова, миша и хумане врсте. Можда постоји сличност у терцијарној структури *ZP* домена у различитих врста. *CFCS* је такође конзервиран код различитих врста и код *ZP1* и код *ZP4*.

Потенцијална места за *N* гликозилацију код *ZP1* гликопротеина су конзервирана код пацова, миша и хрчка и има их 3. Код хумане врсте постоје 2 таква места али нема података да су и заиста гликозилисана та места. Регион за *O*-гликозилацију *ZP4* гликопротеина је конзервиран код хрчка и пацова (*Izquierdo-Rico et al, 2009*).

1.2.3. Настанак *ZP* матрикса

ZP је високо организован екстраћелијски омотач који окружује јајну ћелију сисара. Код миша га синтетише јајна ћелија у периоду раста и сазревања. Са растом и сазревањем повећава се и синтеза *ZP* гликопротеина који се уграђују у унутрашњи слој *ZP*. Трансмембрански домен на *C*-терминалном крају *mZP2* и *mZP3* се не уграђује у *ZP* и то је неопходно за њихово повезивање у *ZP*. Насцентни *mZP1-3* се синтетишу као прекурсорни полипептиди који имају *N*-терминалну сигналну секвенцу. Ова сигнална секвенца усмерава насцентне полипептиде до места излучивања.

Насцентни мишији *mZP2* и *mZP3* се уграђују у слој који је најближе плазма мембрани јајне ћелије, ексцизијом *C*-терминалног краја гликопротеина помоћу фурина. (*Qi et al, 2002*).

У експериментима у којима је део протеина који исеца фурин био мутиран у *mZP3* гликопротеину тако да фурин не може да га исече, секреција и повезивање *mZP3* се смањују. *mZP3* кад се угради у *ZP* не поседује трансмембрански домен који се налази низводно од мутираног дела који исеца фурин указујући да нека друга протеаза/е исеца овај домен (*Qi et al, 2002*). Како расте и сазрева јајна ћелија, тако се повећава и дијаметар *ZP*. То се дешава чак и ако је јајна ћелија ектопчино постављена (нпр у адреналној жлезди) (*Zamboni & Upadhyay, 1983 по Qi et al, 2002*). Постоји могућност да је постраслациона модификација *mZP2* и *mZP3* гликопротеина која се састоји у томе да фурин (протеин конвертаза) исече део протеина суштинска за секрецију и повезивање *mZP* гликопротеина у филаменте јајне ћелије која расте. Многа питања везана за начин повезивања *ZP* гликопротеина остају отворена.

ZP миша се састоји од дугих међусобно повезаних филамената који граде 6,5 μ m дебео порозни омотач око јајне ћелије. (Greve & Wassarman, 1985; Wassarman et al, 1996, Wassarman and Mortillo, 1991; no Qi et al, 2002). Резултати биохемијске и електрономикроскопске анализе показују да *ZP* филаменте граде полимери сачињени од *mZP2* и *mZP3* повезани са *mZP1*. Експерименти на мишевима који имају мутиране гене за *ZP* гликопротеине указују да су *mZP2* и *mZP3* неопходни за настанак *mZP*. Код хомозигота којима недостаје ген за *mZP2* и *mZP3* недостаје и *mZP* и женке су инфертилне (Liu et al, 1996; Rankin et al, 1996, 2001). Хетерозиготи који немају један ген за *mZP3* имају *ZP* али је она упола тања од *ZP* код дивљег соја (Wassarman et al, 1997). Ови хетерозиготи су подједнако фертилни као и дивљи сојви (Qi et al, 2002).

Филаменти *mZP* се састоје од *mZP2* и *mZP3* и показују структурну периодичност н сваких 14–15 nm дуж филамента (Greve & Wassarman, 1985; Wassarman et al, 1985; Wassarman & Mortillo, 1991 po Qi et al, 2002). Филаменти су повезани са *mZP1* који представља димер који се састоји од два идентична полипептида повезана интермолекуларним дисулфидним везама. "*ZP* је високоорганизовани 3D матрикс који показује структурну периодичност." (Qi et al, 2002). "Око пола новосинтетисаних *ZP* гликопротеина се повезује у *ZP*, остало пролази кроз *ZP* и слој фоликуларних ћелија " (Qi & Wassarman, 1999).

С обзиром да се *ZP* гликопротеини уграђују у унутрашњи слој *ZP* (онај који је ближи оолеми) а самим тим и гушће пакован, постоје шпекулације да је за повезивање *ZP* гликопротеина неопходан неки елеменат у мембрани или пак да се новосинтетисани *ZP* гликопротини додају на крајевима *ZP* филамената, а да се ти крајеви налазе управо у унутрашњем слоју *ZP*. У прилог овоме иде и чињеница да су филаменти у унутрашњем соју орјентисани перпендикуларно на плазма мембрану, а у спољашњем слоју су орјентисани тангенцијално у односу на површину јајне ћелије (Keefe et al, 1997). Иначе вишеслојни модел *ZP* није нов-предложио га је Dickmann, 1965 (Dickmann, 1965) за различите врсте укључујући зеца, свињу, овцу, хрчка и хуману врсту. На светлосном микроскопу се *ZP* зреле јајне ћелије види као глатка аморфна структура. Имунохистохемијском локализацијом уз помоћ антитела на *PSI* угљенохидратне епитопе откривају се

посебни концентрични слојеви -прстенови у *ZP* (Timmons et al., 1990; Skinner et al 1992 no(Prasad et al, 2000).

1.2.4. Структура *ZP*

Унутрашњи део *ZP* је гушће пакован у односу на спољашњи - "*ZP* протеини се секретују и у механички компримовани простор испод њеног горњег слоја који се растеже али није познато колика је та компресија, ако и постоји, као и колика је стрес релаксација коју може да поднесе већ формирана *ZP*." Green (1997) сматра да јајна ћелија служи као сферични модул изнад кога се формира *ZP* потпуно правилног сферичног облика. Након што се формира *ZP* повезивањем *ZP* протеина ооцита се контрахује остављајући за собом узан перивителински простор -између плазма мембране и новонастале *ZP* и након тога избацује прво поларно тело. Није познато колико се *ZP* релаксира након што се јајна ћелија контрахује као ни да ли се та релаксација уопште дешава (Green, 1997).

Гликопротеини *ZP* миша су повезани нековалентним везама што потврђује чињеница да се *mZP* може у потпуности разложити у присуству агенаса који не делују на ковалентне везе: низак *pH*, ниска јонска јачина, блага топлота (Wassarman, 1988).

ZP домен је важан за повезивање *ZP* гликопротеина јер учествује у интеракцији између протеина и у другим протеинима који га поседују. Домен садржи конзервирану секвенцу од 260 аминокиселина укључујући 8 цистеинских резидуа која постоји код свих гликопротеина који улазе у састав омотача јајне ћелије од сисара, птица, водоземаца и риба (Qi et al, 2002). Мутације *mZP3 CFCS* могу само делимично да наруше активност фурина, што се испољава нагомилавањем насцентног *mZP3* у секреторним везикулама јајне ћелије.

Не зна се да ли присуство *C*-терминалног репа код *ZP* гликопротеина спречава њихову олигомеризацију у *ZP* филаменте (Qi et al, 2002).

ZP1 има различиту структуру и функцију код миша у односу *ZP1* код других сисара. Део *ZP1* који садржи 40 ак је конзервиран код свих сисара осим код миша

код којег има различиту само једну аминокиселину. "Trefoil" домен, се састоји од 22 аминокиселине је присутан само код миша (*McLeskey et al, 1998 no Prasad et al, 2000*). Ова разлика у структури *ZPI* може да се одрази у разлици у функцији *ZPI* код глодара и других сисара: нпр-интактна *ZP* глодара је много осетљивија на протеолизу ензимима и дисолуцију хемикалијама као што су детерџенти и материје које редукују дисулфидне везе него *ZP* зеца или свиње (*Dunbar, 1983 no Prasad et al, 2000*).

ZP протеини се експримирају у јајним ћелијама и гранулоза ћелијама у зависности од фазе развоја.

ZP има способност да везује лектине као и шећере обележене радиоизотопима што указује да се понаша као типичан гликокаликс састављен од пептида и шећера. Олигосахаридне групе *ZP* гликопротеина имају кључну улогу у интеракцији са сперматозоидима. Присуство различитих глиоформи сваког од *ZP* гликопротеина прави проблем код њихове идентификације, тако да је идентификација могућа тек након дегликозилације *ZP* (*Izquierdo-Rico et al, 2009*). Након дегликозилације протеини имају мању молекуску масу. Постранслациона модификација *ZP* гликопротеина укључује гликозилацију и сулфатацију (*Prasad et al, 2000*).

Степен гликозилације је различит кроз дебљину слоја *ZP*. Различити степен гликозилације кроз дебљину слоја хумане *ZP*, би могло бити од значаја за различиту способност сперматозоида да се вежу за спољни и унутрашњи део *ZP* (*Jimenez-Movilla et al, 2004*).

Различите глиоформе *ZP* гликопротеина имају хетерогену дистрибуцију кроз дебљину *ZP*: унутрашњи део *ZP* ближи јајној ћелији је гушће пакован-у односу на спољашњи слој који је у додиру са кумулусним ћелијама. Унутрашњи део везује лектине у већем проценту у односу на спољашњи слој *ZP*. Неки шећери се преодоминантно налазе у унутрашњем, а неки у спољашњем слоју *ZP* (*Izquierdo-Rico et al, 2009*).

Анализе ТЕМ и лекитин цитохемијском техником су показале да постоји хетерогени угљенохидратни састав унутрашњег и спољашњег дела *ZP* у различитих врста. (*Jiménez-Movilla et al, 2009, Avilés et al, 1996, 1997, Jiménez-Movilla et al, 2004*). Различита структурна организација *ZP* која настаје током

сазревања јајне ћелије би могла да буде одговорна за различити афинитет везивања сперматозооида за унутрашњи део *ZP* у односу на спољашњи. (*Jiménez-Movilla et al, 2009*).

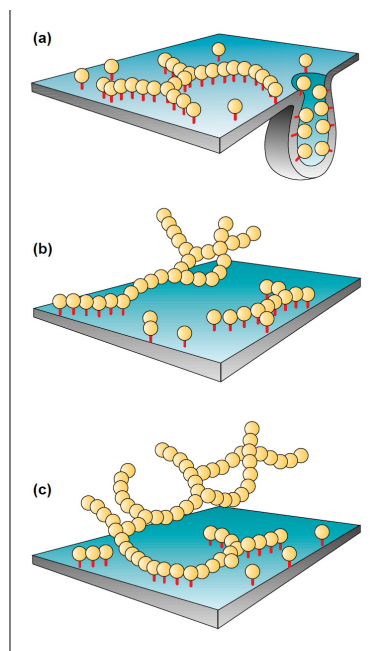
Имунолошко обележавање (специфичним антителима *ZP* свиње) код *ZP* миша и пацова је било веће у унутрашњем него у спољашњем региону *ZP* док је код *ZP* хрчка било обрнуто. Спољашња површина *ZP* код миша и пацова за разлику од унутрашње има способност да индукује акрозомалну реакцију (*Yazawa et al, 1995 no. Jiménez-Movilla et al, 2009*). Угљенохидратни остаци се сматрају важним за везивање сперматозооида за *ZP* јајне ћелије. Да би установили да ли специфична укрштена реактивност са антителима на *ZP* свиње зависи од угљенохидратних остатака или протеинског костура радили су парцијалну дегликозилацију.

Цитохемијске анализе фоликула у различитом стадијуму су показале да су заједнички епитопи експримирани кроз целу дељину *ZP* током ране фоликулогенезе (мутиламнарни примарни фоликули) *ZP* великих фоликула (антрлани фоликули) показује ове епитопе у спољњем региону *ZP* и скоро уопште не у унутрашњем или они пак нису достојни антителима у унутрашњем делу *ZP* зрелијих јајних фоликула. „Јајна ћелија може да мења олигосахарини састав *ZP* гликопротеина“ (*Avilés et al, 2000*). Неки аутори (*Ducibella et al, 1988*) сматрају да би егзоцитоза кортикалних гранула могла да допринесе овом процесу. Још увек се не зна који је молекуларни механизам који контролише различиту организацију *ZP* гликопротеина.

Сличност протеинске структуре и разлика у гликозилацији може да објасни разлике у биохемијским, физикохемијским и имунохемијским особинама *ZP* између врста (*Prasad et al, 2000*). Протеини *ZP* се експримирају у зависности од фазе раста и код хумане врсте могу да их синтетишу не само јајне ћелије већ и гранулоза ћелије. Самтра се да би *ZP* гликопротеина могли да имају и улогу у диференцијацији гранулоза ћелија.

ZP2–ZP3 јединице се процењују да имају дужину од 15–17 μm . За однос *ZP1:ZP2–ZP3* димеру од 1:5 средње растојање између везујућих места на сваком филаменту је отприлике 75–85 nm. Ово би продужило удруживање *ZP1* димера на 100 nm или више (*Green, 1997*). "*mZP2* и *mZP3* су присутни у еквимоларном

односу и налазе се на сваких 15nm дуж *ZP* фибрила. Фибриле су повезане нековалентним везама помоћу *mZP1*." (*Litscher et al, 2009*).



Слика 1.8. Модел повезивања *ZP* гликопротеина у матрикс према *Green*-у.

Преузето из (*Green, 1997*)

1.2.5. Шта утиче на степен гликозилисаности *ZP* гликопротеина

Ултраструктурне анализе указују да је *ZP* миша сачињена од филамената који се граде повезивањем глава-реп гликопротеина *ZP* и да је за синтезу *ZP* гликопротеина потребна оолема (*Green, 1997*). *Green, (1997)* сматра да би садржај који се ослобађа из кортикалних гранула могао да буде 30% масе *ZP1* миша. Овај садржај се преодминантно ослобађа у унутрашњи део *ZP* и његова концентрација би могла да досегне *ZP1*.

Jovine et al (2007) су пронашли неколико региона на насцентним *ZP* гликопротеинима миша који утичу на њихову секрецију и уградњу у *ZP* јајне ћелије миша која расте. Ти региони су: *ZP* домен, *CFCS* и *C*-терминални пептид.

C-терминални пептид садржи трансмембрански домен (*transmembrane domain - TMD*), спољашњи хидрофобни део (*external hydrophobic patch -EHP*), део са набојем- *charged patch (CP)*, конзервиране цистеинске (*Cys*) резидуе и кратак цитоплазматски реп (*cytoplasmic tail -CT*). (Види слику 1.7.). За овај процес је наручито важан *ZP* домен који садржи део од одприлике 260 аминокиселина са конзервираних 8 *Cys* резидуа. Овај део је заједнички за велики број различитих екстрацелуларних протеина који се срећу код вишећелијских еукариота. Овај домен има улогу полимеризационог модула (највећим делом *N*-терминални део који укључује 4 конзервиране цистеинске резидуе. Додатно, постоје две конзервиране хидрофобне секвенце: једна у оквиру *ZP* домена (унутрашњи хидрофобни део- *internal hydrophobic patch- IHP*) и спољашњи хидрофобни део - *EHP* које регулишу полимеризацију насцентних *ZP* гликопротеина. Ови аутори предлажу уопштени механизам повезивања протеина који поседују *ZP* домене на бази повезивања протеолизе и полимеризације (*Jovine et al, 2007*). *Wassarman* и *Litscher*, (2012) наводе да је процес повезивања *ZP* гликопротеина стохастички процес. (*Tong et al, 1995; Qi u Wassarman, 1999; Hoodbhoy et al, 2006 no Wassarman & Litscher, 2012*). *ZP* домен и његов *N*-терминални крај је одговоран за полимеризацију *ZP* протеина у фибриле.

1.2.6. Физичке особине *ZP*

ZP је у суштини сулфатисани гликопротеински гел 2-6% (w/v) у коме су гликопротеини повезани нековалентним везама. Променљивих је физичких особина што одражава промене у његовој хемијској структури. Садржај протеина се разликује од врсте до врсте. Неки аутори наводе да *ZP* миша има 3,5 ng протеина (*Green, 1997*) док други наводе садржај од 4.8 ng протеина по зони што је еквивалентно протеинској концентрацији од 1,4% протеина (*Bleil and Wassarman, 1980*)- садржај протеина варира од соја мишева који су коришћени за експерименте као и од величине јајне ћелије миша. На молекуларном нивоу, код гелова код којих су саставне компоненте повезане нековалентним везама при дужем излагању спољњој сили долази до спонтане дисоцијације нековалентних

веза и до преспајања и изградње нових ближих веза у циљу смањења или укидања тензије услед еластичног истезања (*Green, 1997*). Када се *ZP* изложи нежном пипетирању може да пукне а да не изгуби свој сферични облик у фрагментима (користи се код *ICSI* методе *IVF*-а), тако да се понаша као еластично чврсто тело. Претпоставља се да нековалентне везе у *ZP* имају дуг полуживот и да су у питању интеракције са високим афинитетом (*Green, 1997*).

Код желатина нековалентне интеракције у гелу су присутне током краткотрајног истезања, али током дуготрајног истезања долази до спонтане дисоцијације нековалентних веза и преповезивања бочних ланаца у протеинима (који носе везујућа места) и успостављања нових ближих интеракција. На тај начин се елиминише тензија услед еластичног издужења. Када се *ZP* изложи натријумдодецилсулфату денатурише и настају 3 протеина: *ZP1*, *ZP2* и *ZP3* и понаша се као нековалентни гел -као желатин (*Green, 1997*).

1.2.7. Утицај јонске јачине и температуре на стабилност *ZP*

Повећање притиска у *ZP* услед бубрења *ZP*, може да се изазове ниском јонском јачином. *ZP* свиње се спонтано разлаже на 37°C, али брже ако се налази у раствору ниске јонске јачине него у раствору велике јонске јачине (*Takano et al, 1989 no Green, 1997*). Када снижаванем температуре у раствору мале јонске јачине смањимо разлагање *ZP*, тада је лакше разложити акрозином, што указује да на ниским температурама долази до затезања филамената *ZP* механизмом бубрења гела без разлагања *ZP* и да ово бубрење заправо демаскира места где делују протеолитички ензими. *ZP* може да се разложити слабим киселинама или базама, топлотом или редукујућим супстанцама (*Green, 1997*).

У сваком гелу који поседује набој постоји могућност да дође до међусобног одбијања различитих наелектрисања. Међусобно одбијање наелектрисања може бити маскирано високом јонском јачином. Код гелова који поседују ковалентне везе постоји равнотежа између притиска бубрења који настаје због међусобног одбијања и тензије у матриксу. Код зоне пелуциде ниска јонска јачина би могла да узрокује притисак бубрења који би демаскирао наелектрисања-набој, нарочито

код угљених хидрата што би могло да доведе до иреверзибилног бубрења након иницијаног периода реверзибилног истезања (Green, 1997).

1.2.8. Утицај pH вредности медијума на набој и структуру ZP

Везивање сперматозооида за ZP јајне ћелије је 10 пута веће у медијуму са вишим pH . Површина ZP незреле јајне ћелије хумане врсте у медијуму са већом pH вредношћу показује сунђерасту структуру, а у медијуму са нижим pH компактну и глатку. Сперматозооиди се боље везују за неравну порозну структуру него за компактну и глатку (Familiari et al, 2006).

1.2.9. Утицај крослинкера на префертилизационо очвршћавање ZP

Очвршћавање ZP је типично постфертилизациони феномен који подразумева повећану отпорност ZP на протеолитичке ензиме. Сматра се да ова особина ZP доприноси блокирању продора већег броја сперматозооида кроз структуру ZP -*polyspermy-block*.

Међутим, експериментално је утврђено да уколико се ZP зреле јајне ћелије свиње (код које је у *in vitro* условима изражена полиспермија) и говечета третира Ди-(*N*-сукцинимидил)-3,3-дитиодипропионат-ом (*DSP*) пре оплодне повећава њену отпорност на протеолизу. *DSP* је пермеабилни амин-реактивни крослинкер који прави стабилне амидне везе између NH_2 група у протеину (Coy et al. 2008).

Непермеабилни амин реактивни крослинкер-бис(сулфосукцинимидил) суберат -(*BS3*)-делује на примарне аminer и гради стабилне амидне везе између пептида. Непермеабилни -значи да делује по површини ћелије и омогућава проучавање деловања која се дешавају на површини-за разлику од *DSP-a*.

Код говечета обе врсте крослинкера (и *DSP* и *BS3*) индукују очвршћавање ZP и смањују степен пенетрације сперматозооида. Процент моноспермије, пенетрације и настанак мушког пронуклеуса су били непромењени. Кад је у питању ZP свиње, *BS3* индукује очвршћавање ZP , смањује степен пенетрације, и

настанак мушког пронуклеуса и повећава проценат моноспермије (од 10,1% у контролној групи на 85% у третираној групи). Повећање продуктивности *IVF* протокола код свиње је једино забележено када су јајне ћелије излагане *DSP*-у-тада се повећао проценат деобе и настанак бластоцисте. Ова студија подржава теорију да су механизми за спречавање полиспермије код говеда и свиње различите ефикасности (*Canovas et al, 2009*). Полиспермија се чешће дешава у *in vitro* него у *in vivo* условима (*Hunter 1990 no Canovas et al, 2009*).

DSP повећава отпорност *ZP* краве на деловање проназе на дозно зависан начин али не показује дозно зависан учинак на степен пенетрације и не утиче на проценат моноспермије, средњу вредност сперматозооида који пенетрирају кроз *ZP* једне јајне ћелије нити на формирање мушког пронуклеуса (*Canovas et al, 2009*). *BS3* повећава отпорност *ZP* краве и свиње на деловање проназе на дозно зависан начин. Претпоставља се да очвршћавање *ZP* настаје као последица умрежавања протеина *ZP* путем формирања дисулфидних веза (*Dean, 2004*).

1.3. Улога *ZP*

ZP има веома важну улогу у оогенези, оплодњи и преимплантационом периоду. Одговорна је за везивање сперматозооида специфичних за врсту, блокирање полиспермије, спречавање депресије бластомера у преимплантационом периоду, олакшавање проласка ембриона кроз јајовод и заштита ембриона током раних фаза развоја (*Vanroose et al, 2000*). *ZP* је важна за имунолошко препознавање између гамета (*Clark, 2011*) и понаша се као гликокаликс (*Izquierdo-Rico et al, 2009*).

Гликопротеини зоне пелуциде учествују у распознавању протеина сперматозооида одговарајуће врсте и његовом везивању за *ZP*. Они спречавају везивање других сперматозооида за оплођену јајну ћелију. Ако се уклони *ZP*, сперматозооиди различитих врста могу да се вежу за огољену плазмамембрану јајне ћелије. Пре имплантације *ZP* омогућава правилно дељење оплођене јајне ћелије и обезбеђује интегритет ембриона при његовом путу кроз јајоводе (*Litscher et al, 2009*). Протеини *ZP* су важни за имплантацију ембриона у утерус.

Сваки гликопротеин *ZP* има своју посебну функцију. Код миша *ZP3* је и примарни рецептор за везивање сперматозоида и одговоран је за индукцију акрозомлане егзоцитозе. Након акрозомалне реакције сперматозоид се везује за *mZP2* - секундарни рецептор за везивање сперматозоида, задужен је да сперматозоид код кога је дошло до акрозомалне реакције остане везан за *ZP* (Bleil et al, 1988 no Gupta et al, 2009). Затим сперматозоид пенетрира *ZP* и спаја се са плазма мембраном јајне ћелије. Спајање сперматозоида и јајне ћелије доводи до модификације *ZP* гликопротеина (јајна ћелија ослобађа кортикалне грануле које садрже ензиме који модификују структуру *ZP*- *mZP2* и *mZP3* постају *mZP2f* и *mZP3f* а *ZP* постаје „чвршћа“) тако да претходно везани сперматозоиди не могу да продру у јајну ћелију а нови не могу да се вежу, долази до кортикалне реакције и блокирања полиспермије. Слика 1.9.

Након оплодње долази до модификације *mZP3* и он нема више способност везивања сперматозоида ни индукције акрозомалне реакције. Део гена који је одговоран за овај ефекат налази се низводно од *ZP* домена у региону егзона 7 *mZP3* гена (Litscher et al, 2009). Акрозомална реакција подразумева избацивање акрозома -екстрацелуларна егзоцитоза. Претпоставља се да модификацији гликопротеина доприноси садржај кортикалних гранула који се ослобађа при кортикалној реакцији. Ова модификација доприноси спречавању полиспермије. Полиспермија је инкомпатибилна са опстанком зигота. (Yanagimachi, 1994; Florman & Ducibella, 2006 no Litscher et al, 2009)"

Код неких врста (свиња) се чешће дешава (и то у *in vitro* условима) да сперматозоиди остану везани за површински део *ZP* оплођене јајне ћелије.

Сперматозоид пенетрира *ZP* јајне ћелије под оштрим углом јер је тако сила отпора најмања (Bedford, 2006). У хемијском смислу очвршћавање *ZP* након оплодње значи да је потребно више времена за протеолитичко разлагање *ZP* оплођене јајне ћелије него за разлагање неоплођене јајне ћелије. Везивање сперматозоида за јајну ћелију је вероватно обезбеђено кроз више редундантних механизма (Wassarman, 2008).

ZP1 повезује филаменте сачињене од *ZP2* -*ZP3* хетеродимера и највероватније обезбеђује структурну стабилност *ZP* матрикса. О потенцијалним другим улогама *ZP1* гликопротеина мало се зна.

Код хумане врсте *hZP3* и *hZP4* служе као примарни рецептори за везивање сперматозооида и индукују акрозомалну реакцију код сперматозооида који су прошли кроз процес капацитације, кроз различите сигналне путеве (*Chiu et al, 2008a*). Сигнални путеви индукције акрозомалне реакције преко *hZP1* обухватају тирозин –киназни рецептор повезан са фосфолипазом и *G* протеински рецептор који активира фосфолипазу *Cb1* (*Ganguly et al, 2010*).

У хуманој популацији акрозомалну реакцију могу да изазову *ZP3*, *ZP1* и *ZP4* преко *N*-повезаних гликана који улазе у њихов састав. *mZP3* гликани повезани преко *O*- су кључни за индукцију акрозомалне реакције код миша.

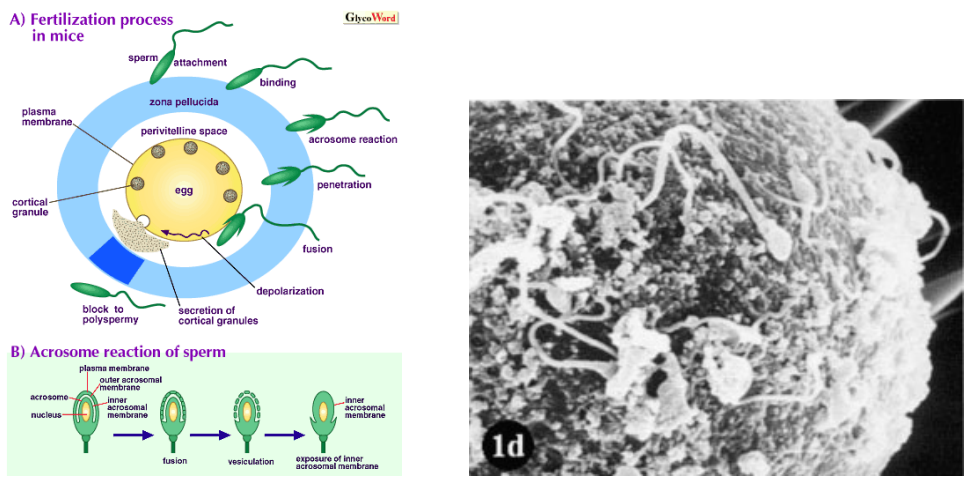
Хумани *ZP1* се везије за акрозомалну капу сперматозооида који је прошао процес капацитације. Постоји дозно зависно повећање акрозомалне егзоцитозе када се хумани сперматозооиди инкубирају са рекомбинованим *ZP* доменом хуманог *ZP1* гликопротеина. Највећи степен индукције акрозомалне реакције се запажа након 60 мин. Ова реакција је независна од пута који је повезан са *Gi*-рецепторским протеинима, захтева екстрацелуларни калцијум и укључује *T*- и *L*-тип волтажно зависних калцијумових канала (*Ganguly et al, 2010*). За разлику од модела оплодње код миша, хумани *ZP4* (присутан као псеудо ген у миша) се везује за предњи део главе сперматозооида који су прошли процес капацитације али имају интактан акрозом и индукује акрозомалну егзоцитозу (*Ganguly et al, 2010*). Око 22% сперматозооида хумане врсте код којих се одиграла акрозомална реакција се везује за *ZP3* а око 14% се везује целом дужином *ZP1*. 70% сперматозооида се везује за *ZP1* у региону акрозомалне капе, а око 30% у екваторијаном региону акрозом-интактних сперматозооида хумане врсте (*Ganguly et al, 2010*).

Могуће је да је за иницирање акрозомалне реакције неопходан и механосензорни сигнал који настаје при пенетрацији сперматозооида кроз *ZP* (*Baibakov et al, 2007, Liu et al, 2007*). Хумани *ZP3* гликопротеин служи као примарни рецептор за везивање сперматозооида што су показали и експерименти са куглицама обложеним хуманим рекомбинованим *ZP3* и сперматозооидима (*Bansal & Gupta, 2009*). Хумани *ZP4* везује хумане сперматозооиде са очуваним акрозомом који су прошли кроз процес капацитације. Хумани *ZP2* се примарно

везује за сперматозооиде код којих је присутна акрозомална реакција те се сматра секундарним рецептором за везивсање сперматозооида (*Gupta et al, 2009*).

Истраживање на хуманим јајним ћелијама је показало да након оплодње долази до биохемијске модификације *ZP1* молекула (евидентирано електрофорезом упоређивањем *ZP1* молекула из оплођених јајних ћелија и јајних ћелија које нису биле погодне за *in-vitro* оплодњу (*Shabanowitz & O'Rand, 1988*). Све *ZP* неоплођених јајних ћелија дале су сличне радиографске налазе (обележено радиоактивним јодом) као и *ZP* јајних ћелија које нису изложене инсеминацији. *ZP* изоловане из активисаних јајних ћелија показале су драмтичну модификацију *ZP1* што се види тек након редукције узорка.

На основу експеримената на мишевима којима недостаје неки од гена за *mZP* гликопротеине, *Rankin et al, (1999, 2001, 2003)* су претпоставили да није у питању посебан протеин за везивање сперматозооида већ је у питању посебна супрамолекуларна структура *ZP*, неопхода за везивање сперматозооида (*Familiari et al, 2006*).



Слика 1.9. а) Процес оплодње код миша и *polyspermy block*. Преузето са: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycoprotein/GPA05E.html>; б) Конвенционални SEM. Хумана не оплођена јајна ћелија. Преузето из (*Familiari et al, 2006*).

1.3.1. Гликозилација ZP гликопротеина игра важну улогу у процесу интеракције ZP и сперматозоида.

Нативни ZP гликопротини јајне ћелије хумане врсте садрже угљенохидрате остатке и то у највећем проценту манозу, за коју се сматра да игра улогу у препознавању јајне ћелије и сперматозоида. Гликозилација хуманих ZP протеина није неопходна за везивање сперматозоида за ZP. Хумани ZP3 и ZP4 индукују дозно зависну акрозомалну егзоцитозу код сперматозоида који су прошли процес капацитације и за тај процес је важна гликозилација на N крају ових протеина што није случај са ZP миша (*Gupta et al, 2009*). Акррозомална реакција је кључна за пенетрацију сперматозоида.

Верује се да хумани ZP3 иницира акрозомалну реакцију али да и ZP4 има извесну улогу у томе. Ове студије су рађене на рекомбинованим ZP протеинима који имају различиту гликозилацију од нативних ZP гликопротеина (*Chiu et al, 2008b*). *Chiu et al, (2008b)* су проучавали ефекат нативних хуманих ZP3 и ZP4 на акрозомалну реакцију и везивање сперматозоида за ZP. ZP3 и ZP4 индукују акрозомалну реакцију и смањују време везивања сперматозоида за ZP дозно зависно у различитом степену. Ова активност ZP3 и ZP4 делимично зависи од њихове гликозилације и то значајно више N- него O-гликозилације. Када се у потпуности уколоне гликани са хуманих ZP3 и ZP4 гликопротеина они губе способност да индукују акрозомалну реакцију (*Chiu et al, 2008b*). N гликозилација чини приближно 37%, 27% и 18% молекулске масе ZP2, ZP3 и ZP4 хуманих ZP гликопротеина. O- гликозилација чини приближно 8% молекулске масе ZP2 и 9% молекулске ZP3. Хумани ZP4 изгледа да није гликозилисан на O-крају (*Chiu et al, 2008b*).

Како што је већ поменуто, дистрибуција угљенохидратних компоненти је хетерогена кроз дебљину ZP матрикса (*Jimenez-Movilla et al, 2004 no Gupta et al, 2009*).

1.3.2. Разлика у везивању сперматозоида за нативне и рекомбиноване *hZP* гликопротеине

Нативни и рекомбиновани *hZP3* се везују за акрозомални регион, нативни се везује за средњи део али не и рекомбиновани. Нативни *hZP2* се везује за акрозомлани, постакрозомални и срењи део мембране сперматозоида, док се рекомбиновани *hZP2* везује примарно за екваторијални сегмент сперматозоида који су прошли кроз акрозомалну реакцију. Нативни *hZP2* се везује и за сперматозоиде који нису прошли кроз акрозомалну реакцију-интактан акрозом.

Претпоставке везане за улогу хуманих *hZP2* и *hZP3*: постоји могућност да везивање *hZP2* за сперматозоиде са интактним акрозомом осигуравају да сперматозоиди остају везани за *hZP* када се плазма мембрана у нивоу акрозома која је прекривена *hZP3* везујућим местима дезинтегрише за време акрозомалне реакције. Друга могућа улога *hZP2* је да учествује у Ca^{2+} сигнализацији олакшавајући акрозомалну реакцију индуковану *hZP3*. У прилог томе иде и налаз да солубилни *hZP* индукују акрозомалну реакцију која је удружена а повећањем Ca^{2+} које се шири од екваторијалног сегмента до постакрозомалног региона (*Shirakawa & Miyazaki, 1999*).

И ако је аминокиселинска секвенца *ZP* протеина високо конзервирана код вертебрата посттранслациона гликозилација је специфична за врсту и суштинска за интеракцију између јајне ћелије и сперматозоида (*Dell et al, 1999; Topfer-Petersen, 1999; Wassarman et al, 2001* по *Chiu et al, 2008b, Litscher et al, 2009*).

Експерименти рађени са мишевима и хуманим генима за *ZP* гликопротеине (*Litscher et al, 2009*) као и нативним и рекомбинованим *ZP* гликопротеинима свиње и њиховом интеракцијом са сперматозоидима говечета и свиње (*Yonezawa et al, (2005)* су показали уколико *ZP* гликопротеине синтетише друга врста уз помоћ генетског инжењеринга везаће се сперматозоиди који одговарају врсти јајне ћелије која их синтетише и ако су у питању гени *ZP* гликопротеина хетерологе врсте (*Litscher et al, 2009*). Мишеви који имају само по један ген за *mZP2* и *mZP3* експримирају гене за *hZP2* и *hZP3* не везују хумане сперматозоиде већ само мишије (*Rankin et al., 1998, 2003* по *Chiu et al, 2008b*)-гликозилација

mZP2 и *mZP3* је ко што би била у миша јер се дешава у цитоплазми јајне ћелије миша у оквиру посттранслационе модификације *ZP* протеина.

Студије на мишевима су показале да сперматозооиди препознају супрамолекуларну структуру *ZP* (Hoodbhoy & Dean, 2004). Нативни *mZP2* и *mZP3* полимеризују у неденатуришућим условима (Litscher et al, 2008). Могуће је да солубилни *hZP* садрже хетеродимере *hZP* гликопротеина који функционишу другачије од пречишћених *hZP* гликопротеина (Chiu et al, 2008б).

Нативни хумани *ZP3* и *ZP4* су ефикаснији у индукцији акрозомалне реакције од рекомбинованих при истој концентрацији (Chiu et al, 2008б). Ова разлика може да се објасни тиме да у току процеса пречишћавања *ZP* гликопротеина долази до денатурације која би могла да утиче на терцијарну структуру *ZP* гликопротеина. Могуће је и да је важна структура *ZP* тј. да нативни *ZP* гликопротеини граде комплексе и да су ти комплекси важни за интеракцију са сперматозооидима.

Процент хиперактивисаних сперматозоида је у позитивној корелацији са везивањем за *ZP* и пенетрацију кроз *ZP* (Yanagimachi, 1994; Stauss et al, 1995 по Chiu et al, 2008). Третирање хуманих сперматозоида јонофорама повећава проценат сперматозоида који показују акрозомалну реакцију од око 7% на око 52%. Нативни *hZP3* се везује у око 51% за сперматозооиде који су прошли процес капацитације-везујућа места су у акрозомалном региону, екваторијалном региону и средњем делу сперматозоида са интактним акрозомом. Након акрозомалне реакције везујућа места за *hZP3* су присутна само на средњем делу (Chiu et al, 2008). Сперматозооиди са интактним акрозомом на целој површини главе сперматозоида поседују везујућа места за *hZP4*. Ова места нестају након акрозомалне реакције. 15мин инкубације хуманих сперматозоида са пречишћеним нативним *hZP3* значајно повећава број хиперактивисаних сперматозоида док *hZP2* или *hZP1* или *hZP4* не дају значајан ефекат. Ако се дуже инкубира (3 сата) то не повећава проценат хиперактивисаних сперматозоида (Chiu et al, 2008б).

1.3.3 Експерименти на мишевима који имају мутиране гене за *ZP* гликопротеине

Истраживања на хуманој популацији су показали да недостатак *ZP1* доводи до стерилитета (*Huang et al, 2014*). Морфо-генетска испитивања 6 чланова кинеске породице која су била хомозиготи са мутацијом гена за *ZP1* су показала да су јајне ћелије абнормалне морфологије-да им недостаје *ZP* и да су *ZP1* дефектни протеини те да се *ZP* не формира чак и ако су *ZP3* гликопротеини присутни и нормалне морфологије. Чланови породице код којих је утврђена ова мутација су инфертилни. *mZP1* је потребан за структурну стабилност *ZP* и недостатак *ZP1* код мишева доводи до раног губитка ембриона (*Rankin et al, 1999*). Зреле јајне ћелије миша којима недостаје ген за *mZP1* поседују *ZP* која се састоји од *mZP2* и *mZP3*. Већина ових женки је фертилна али им је окот упола мањи због раног губитка ембриона. Оваријуми су налик на оваријуме као код женки из дивљег соја а већина фоликула има нормалну морфологију (*Wassarman & Litscher, 2012*). На електронском микроскопу *ZP* јајних ћелија мишева који су *mZP1*^{-/-} је лабаво организована и поремећена и обично тања због растезања. Код мишева који немају ген за *mZP2* у раним фоликулима се запажа танак *ZP* матрикс који не може да се одржи до преовулаторних фоликула. Двоћелијски ембрион код ових јајних ћелија није могуће одржати (*Rankin et al, 2001*). Мишеви који немају ген за *mZP3* имају фоликуле у којима су герминалне везикуле са интактним јајним ћелијама али нема *ZP* матрикса и имају дезорганизовану *corona radiata*-у. Женке су стерилне и развој фоликла је компромитован (*Liu et al, 1996; Rankin et al, 1996*). Зреле јајне ћелије мишева којима недостаје ген за *mZP2*^{-/-} уопште немају *mZP2*^{-/-} зону пелуциду и инфертилне су и ако синтетишу друге две компоненте зоне пелуциде. Имају и мали број јајних ћелија и веома слаб одговор на гонадотропну стимулацију. Хетрозиготи за *mZP3*^{+/-} имају *ZP* али је упола тања од дивљег соја и фетрилне су (*Wassarman et al, 1997*). Јајници мишева којима недостаје *mZP2*^{-/-} или *mZP3*^{-/-} ген немају нормалну морфологију (*Liu et al, 1996; Rankin et al, 1996*). Има мало антралних фоликула у односу на дивљи тип и интеракција између фоликилинских ћелија и јајне ћелије је озбиљно компромитована. Јајници *mZP3*^{-/-} женки су увек већи од јајника дивљег соја и то је нарочито изражено код млађих

женки. Имају и велик број растућих фоликила. *ZP* код јајних ћелија из дивљег соја има разгранате фибриле. Редукција интермолекуларних дисулфидних веза који потичу од *mZP1* солубилизје *ZP* правећи неразгранте фибриле (*Greve & Wassarman, 1985*). "Ћелије *corona radiata-e* код *mZP2-/-* и *mZP3-/-* показују мање уређење у односу на исте ћелије код дивљег соја, као и мањи број ћелија кумулуса оофоруса око јајне ћелије. "*ZP* је веома вискозан екстрацелуларни матрикс. (*Wassarman & Litscher, 2012*)" Дешава се да неке јајне ћелије које немају ген за *mZP2* и *mZP3* достигну пуну величину, уђу у прву мејотичку деобу, могу да буду оплођене у *in vitro* условима, да дође до прве деобе ембриона. Механизам којим се ово дешава није познат (*Wassarman & Litscher, 2012*). Јајне ћелије женики *mZP2-/-* и *mZP3-/-* не поседују *ZP*, потпуно су инфертилне и имају јако редукован број јајних ћелија које су у току овулације у јајоводима, смањену тежину јајника, смањен број терцијарних фоликула и броја фоликула који су у овулацији.

1.3.4. Селективност *ZP*

Због антигене сличности међу *ZP* протеинима различитих врста могуће је да се у *in vitro* условима јави мања или већа селективност *ZP* кад је у питању везивање сперматозоида. *ZP* неких врста сисара може да веже у већој мери сперматозооиде друге врсте, док неке *ZP* то не дозвољавају или дозвољавају у мањој мери. Хумана *ZP* може да веже хумане и сперматозооиде миша, али *ZP* миша не може да веже хумане сперматозооиде. За јајну ћелију миша се закачи отприлике подједнак број сперматозооида миша и пацова, док *ZP* пацова везује мањи проценат сперматозооида миша него пацова. Различита селективност *ZP* миша, пацова и хумане врсте указује на њихову различиту структуру и композицију. Хумани сперматозооиди се везују за *ZP* свиње али не и за *ZP* миша. Сперматозооиди коња могу да се вежу за *ZP* краве али у мањем проценту и за *ZP* свиње (*Mugnier et al, 2009*).

Собзиром да *ZP* кобиле и *ZP* свиње испољавају различите особине када је у питању везивање и пенетрација сперматозооида исте али и друге врсте постоји могућност да је за то делимично одговоран састав и структура *ZP* кобиле и свиње.

Прво- постоје филогенетски заједнички гени за *ZP2* и *ZP3* и *ZP4* гене кобиле и свиње. *ZP3* ген кобиле је заједнички и за пса и за мачку. Заједнички рођачки гени за овај протеин је заједнички и за остале примате. *ZP1* ген кобиле дели заједнички рођачки ген са осталим приматима. Процент сличности *ZP* протеина између кобиле и свиње је 71% за *ZP2*, 75% за *ZP4*, и 76% за *ZP3*. Код свиње *ZP1* има сличну улогу као и код зеца и нехуманих примата.

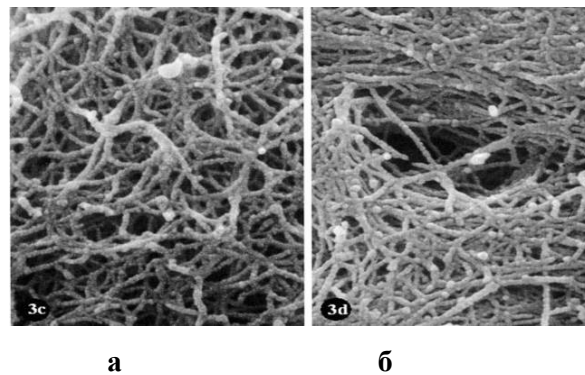
Сазревање *ZP* и способност блокирања полиспермије се разликује од врсте до врсте али зависи и да ли се сазревање јајне ћелије и оплодна дешавају у физиолошким или лабораторијским условима (*Sun et al, 2003*). Спречавање полиспермије је успешније у физиолошким условима. Успешност спречавања полиспермије код свиње и краве зависи од величине пора на *ZP* после оплодне тј структурног преуређења *ZP*. Уколико дође до структурног умрежавања протеина *ZP* након оплодне формирају се поре мањег дијаметра и спречавање полиспермије је ефикасније. Током вештачке оплодне могуће је индуковати ово умрежавање и јачу кортикалну реакцију додавањем амин-реактивних крос-линкера (*Coy et al, 2008*).

1.4. 3D структура *ZP*

Сазревање јајне ћелије и оплодна су праћени променом у распореду и организацији филамената *ZP*-е, што има утицаја на процесе везивања, пенетрације и селекције сперматозоида (*Familiari et al, 1992*).

На скенинг електронском микроскопу (*SEM*), *ZP* се види као рупичаста, структура налик мрежи и/или као глатка и компактна. На већем увећању се види као деликатна мрежа састављена од танких међусобно повезаних филамената. Сунђераста структура *ZP* корелира са зрелом јајном ћелијом (*Familiari et al, 2006*). Слика. 1.10. и 1.11. Код зреле јајне ћелије широке мреже одговарају тзв сунђерастој структури, док густе делови мреже одговарају компактном изгледу на конвенционалном *SEM*-у. (*Familiari et al, 1992, 2006*). На трансмисионом електронском микроскопу (*TEM*) су филаменти прави или увијени, дужине 0.1-0.4 μ m и 10-14 nm дебљине. Мерено *SEM* -ом њихова дебљина износи 22-28nm.

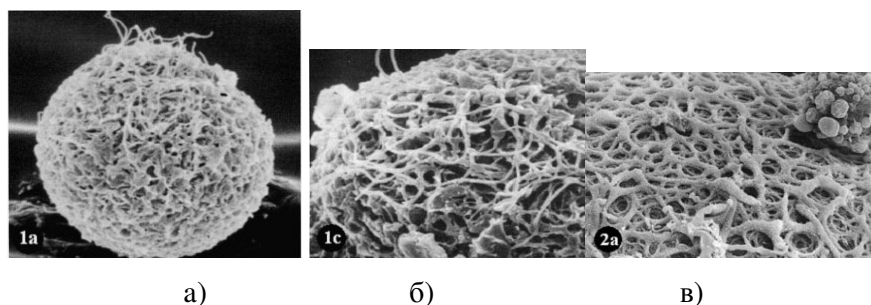
Разлика у дебљини филамената код ове две технике мерења је због употребе металне превлаке код припреме препарата за *SEM*. Распоред филамената *ZP* је различит на унутрашњем и на спољашњем делу у свим фазама сазревања јајне ћелије. Спољашњи део *ZP* је у виду мреже са великим и густо распоређеним порама. На унутрашњој површини *ZP* неоплођене јајне ћелије виде се кратки и прави филаменти који се међусобно спајају градећи рупичасте структуре. *ZP* зреле јајане ћелије и оплођене јајне ћелије на стадијуму пронуклеуса показују регуларне и густе мреже филамената. Незреле и атретичне јајне ћелије имају *ZP* у виду густих мрежа филамената. Након оплодње унутрашња површина *ZP* показује бројне области где су филаменти међусобно фузионисани (*Familiari et al, 1992*).



Слика 1.10. Визуализација спољашње површине *hZP* помоћу специјалне методе бојења (*Sap-RR-Os-TC* метода бојења) а): спољашња површина *ZP* зреле јајне ћелије миша: уочавају се филаменти распоређени у виду разгранате мреже у оквиру сунђерасте структуре *ZP*. б): а) на већем увећању. Филаменти изгледају као структуре налик на куглице на опрузи. (x 50,000). преузето из (*Familiari et al, 2006*).

Филаменти сачињени од *mZP2* и *mZP3* се понављају на сваких 14-15nm. Постоји структурна периодичност у распореду филамената. Неке ћелијске компоненте, вероватно удружене са плазма мембраном јајне ћелије су неопходне за повезивање *mZP2* и *mZP3* у филаменте. Вероватно да се насцентни гликопротеини *ZP* уграђују на крајеве *ZP* филамената и да су ти крајеви присутни само у унутрашњем слоју *ZP*, уз оолему. Истраживања са поларним микроскопом показују да су спољашњем слоју филаменти ређе паковани и распоређени

тангенцијално са ооооомом, а у унутрашњем слоју гушће паковани и радијаног - перпендикуларног распореда. (нпр унутрашњи слој је 6 μm , од 13 μm дебеле *ZP*-код свиње (Keefe *et al*, 1997, Qi *et al*, 2002, Wassarman & Litscher, 2012).



Слика 1. 11. а) неоплођена јајна ћелија-хумана врста на конвенционалном скенинг електронском микроскопу- *ZP* изгледа као рупичаста мрежа (x 2,000).б) део *ZP* са а) на већем увећању (x 4,000). в) *ZP* оплођене јане ћелије -хумана врста- SEM Os-Tс техника бојења без златне превлаке. (x 1,500). Преузето из (Familiari *et al*, 2006).

Овакава структура може да утиче на различити афинитет везивања сперматозоида за унутрашњу и спољашњу страну *ZP*. Полоскоп микроскопија показује да се *ZP* хрчка и човека састоји од 3 различита слоја (Keefe *et al*, 1997). Постоје филаменти који се састоје од *ZP3/ZP2* димера али и од *ZP3/ZP1* димера (Rankin *et al*, 2003; Dean, 2004). Молекуларни механизми који су одговорни за различиту организацију гликопротеина *ZP* још увек нису нађени.

Електронском микроскопијом је утврђено да спољашња површина *ZP* налик на „швајцарски сир“. Као што је већ поменуто порозна структура *ZP* је пропустљива за имуноглобулине и феритин, али је непроустљива за хепарин који има јак негативан набој (Parsad *et al*, 2000). На SEM-у се *ZP* види као рупичаста мрежа која има поре различитог дијаметра на спољњој и унутрашњој површини. Спољна површина показује фенестриран финозрнаст изглед, а унутрашња површина показује груб грануларан изглед (Vanroose *et al*, 2000). *ZP* незреле јајне

ћелије говчета личи на широку мрежу са дубоким отворима. Након сазревања, мрежа постаје финија и отвори су плићи. Код *ZP* оплођене јајне ћелије говчета није запажена мрежаста структура (*Suzuki et al, 1994, 1996 po Vanroose et al, 2000*)

Пре оплодње *ZP* пролази кроз биохемијске промене: киселост *ZP* се повећава током њене матурације што је последица повећане сулфатације олигосахарида. Овај процес сулфатације је важан за сазревање и функцију *ZP*. Уколико јајна ћелија са *ZP* није сулфатисана до краја, то значи да матурација није завршена и јајна ћелија не може да индукује акрозомалну реакцију код сперматозооида док год не заврши матурацију. Тада је индукција акрозомалне реакције одложена (*Rath et al, 2006*). Гликозилација протеина *ZP* није кључна за везивање сперматозооида али је неопходна за индукцију акрозомалне реакције (*Gupta et al, 2009*).

Хумани *hZP2* и *hZP3* могу да замене *mZP2* и *mZP3* и да врате архитектуру мишије *ZP* код хомозигота којима недостају ови гени, али мозаик такве *ZP* миша не дозвољава везивање хуманих сперматозооида (*Avella et al, 2013*).

У миша *ZP* пре оплодње има дебљину од 6,5 μ m, 3,5ng протеина и максимални дијаметар 80 μ m, непосредно након оплодње дебљина је 7 μ m.

Разлика у величини пора *ZP* код различитих врста. Највеће поре у структури *ZP* су нађене код *ZP* зеца и мачке, најмање код краве. Поре су веће на спољној површини *ZP* али им се величина смањује центрипетално. Облик пора *ZP* је различит у зависности од врсте али већина врста има елиптични облик пора. Распоред пора изгледа као да је случајан (миш, говече, свиња, зец, човек) изузев код *ZP* мачке где показује тренд концентричног распореда. Дебљина влакана која сачињавају мрежу се такође разликује од врсте до врсте. Најтања влакна су код *ZP* краве и опосума (*Vanroose et al, 2000*).

Собзиром на постојање разлике у дебљини *ZP* код различитих врста, постоји и разлика у степену пенетрације сперматозооида кроз *ZP* код различитих врста. *ZP* јајне ћелије кобиле је дебља од јајне ћелије свиње у свим варијантама (незрела, *in vitro*, и *in vivo* сазревање). Постоји разлика у структури *ZP* незреле и *in vitro*, сазреле јајне ћелије кобиле и свиње (код кобиле је у овим случајевима *ZP* компактна и има мале поре, а код свиње има велике поре). У случају *in vivo* матурације нема разлике у структури *ZP* ове две врсте. *ZP* обе врсте имају мрежасту структуру са малим порима. Број пора се смањује уколико су поре веће.

Код свиње се дијаметар пора *ZP* разликује код *in vitro* матурације јајне ћелије али не и током *in vivo* матурације, што би могло да објасни већу инциденцу полиспермије код *in vitro* матурације јајне ћелије свиње у *IVF* протоколима који се користе код свиње (*Mugnier et al, 2009*).

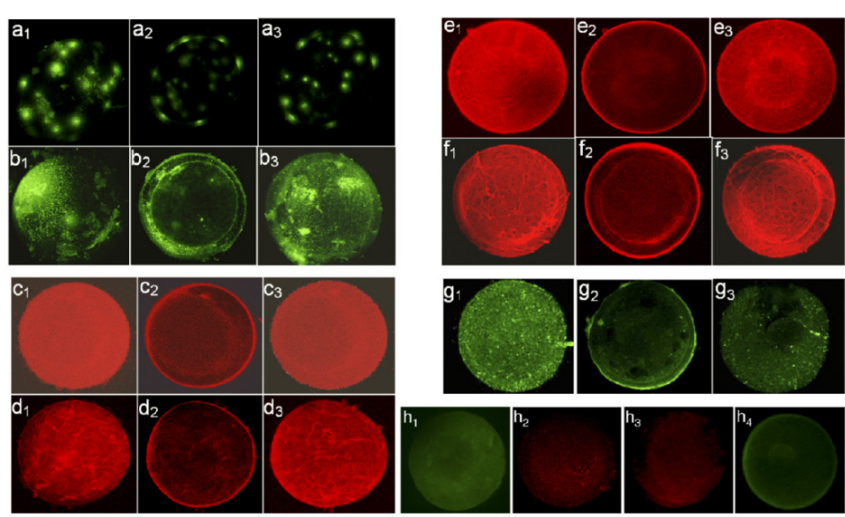
За време *IVF*, *ZP* кобиле представља баријеру за сперматозооиде коња. Код свиње током *IVF* сперматозооиди вепра пролазе кроз јајну ћелију свиње без обзира да ли има или нема *ZP* (*Mugnier et al, 2009*).

1.4.1.Имунохистохемијска бојења и различита структура *ZP* коња и свиње:- локализација и организација *ZP* гликопротеина код кобиле и свиње.

Имунохистохемијске анализе састава и структуре *ZP* кобиле и свиње су показале да су код незреле јајне ћелије кобиле снажно експримирани *ZPA/ZP2* и да су организовани у виду закрпа. Слично је и код *in vitro* и *in vivo* сазреле јајне ћелије. Цитоплазма се не боји антителима за ове протеине. *ZPB/ZP4* и *ZPC/ZP3* су били колокализовани. Код незреле јајне ћелије као и код *in vitro* сазреле, *ZP* гликопротеини су присутни мало и у цитоплазми а много више у *ZP*. Код *in vivo* сазреле јајне ћелије јака хомогена имунореактивност за *ZPB/ZP4* и *ZPC/ZP3* је присутна само у *ZP* али не и у цитоплазми. *ZP1* је присутан у *ZP* незреле, *in vitro* и *in vivo* сазреле јајне ћелије, веома мало или нимало у цитоплазми. У *ZP* коња *ZP1* је распоређен у виду малих тачака униформног распореда (*Mugnier et al, 2009*). Слика 1.12.

Код свиње *ZPA/ZP2* се имунохистохемијски запажа у виду малих тачака организованих у велика поља код незреле јајне ћелије и код јајне ћелије сазреле у *in vitro* условима. Цитоплазма се не боји код ових јајних ћелија. *ZPB/ZP4* и *ZPC/ZP3* су јако експримиране код *ZP* незреле јајне ћелије и код јајне ћелије сазреле у *in vitro* условима док их у цитоплазми има мало. *ZPB/ZP4* су организоване у виду филаментозне мреже код *ZP* свих посматраних незрелих јајних ћелија и само код неких јајних ћелија сазрелих у *in vitro* условима. Код јајних ћелија сазрелих у *in vivo* условима тешко је уочити организовање у

мрежасту структуру *ZPB/ZP4*. *ZPC/ZP3* протеини су организовани у *ZP* виду мрежасте структуре код свих незрелих, *in vitro* као и *in vivo* сазрелих јајаних ћелија свиње (*Mugnier et al, 2009*). Слика 1.12.



Слика 1.12. Визелизација локализације *ZP* гликопротеина код кобиле (a,c,e, g) и код свиње (b,d f) употребом имунофлуоресцентне технике и конфокалног ласер скенинг микроскопа. Н- у одсуству примарних антитела на *ZP* гликопротеине нема визелизације *ZP* гликопротеина. Преузето из (*Mugnier et al, 2009*).

Анализе *ZP* кобиле и свиње помоћу трансмисионог електронског микроскопа показују да *ZP* има хомогену и филаментозну структуру независно од степена зрелости јајне ћелије и начина култивације. Дебљина *ZP* кобиле је мања код незреле јајне ћелије у односу на зрелу јајну ћелију без обзира на начин култивације, док ове разлике не постоје код *ZP* свиње. Након сазревања јајне ћелије кобиле (без обзира на начин култивације) *ZP* је била дебља неко *ZP* свиње. Структура *ZP* кобиле и свиње су сличне након сазревања јајне ћелије у *in vivo* условима и имају грубу структуру налик мрежи са малим порима. Просечан број пора на $100\mu\text{m}^2$ је мањи код *ZP* свиње код незреле и *in vitro* сазреле јајне ћелије али се не разликује након сазревања у *in vivo* условима.

Код кобиле је број пора *ZP* на $100\mu\text{m}^2$ већи код незреле и *in vitro* сазреле јајне ћелије у односу на јајну ћелију сазрелу у *in vivo* условима. Број пора *ZP* се мења код сазревања јајне ћелије кобиле у *in vivo* условима док то није случај са *ZP*

свиње. Дијаметар пора је обрнуто сразмеран њиховом броју: дијаметар пора код *ZP* свиње је већи него дијаметар пора код *ZP* кобиле. (*Mugnier et al, 2009*).

1.5. Параметри *ZP* који могу утицати на оплодњу (дебљина, мутације и дефекти,...)

Дебљина *ZP* утиче на пенетрацију сперматозоида, чак и када се сматра да сперматозоиди имају нормалну морфологију и покретљивост. Дебљина *ZP* је важан предикторски параметар који одређује успех оплодње и имплантације. *ZP* јајних ћелија код којих је успела оплодња имају значајно тању *ZP* односу на јајне ћелије код којих оплодња није успела. ($18.3 \pm 0.2\mu\text{m}$ у односу на $19.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$ -хумане јајне ћелије). Уколико је она дебела ($\geq 22 \mu$ код хумане врсте) успех оплодње је битно смањен (*Bertrand et al, 1995*). Дебљина *ZP* ембриона такође утиче на успех *IVF* протокола. Ембриони који имају тању *ZP* имају бољу шансу за имплантацију у оквиру хуманих *IVF* протокола (*Gabrielsen et al, 2000, Cohen et al. (1989) no Marco-Jiménez, 2012*). Временом у култури дебљина *ZP* се смањује и код ембриона код којих се то дешава већа је вероватноћа да се заврше трудноћом. (*Cohen et al, 1990 no Marco-Jiménez et al, 2012*). Дебљина *ZP* ембриона зеца 2 дана након оплодње је статистички значајно мања него код неоплођене јајне ћелије (мерена је *ZP* зеца на 3 различита места и тражена средња вредност). Јајне ћелије зеца које нису оплођене и ако су биле изложене сперматозоидима имају статистички значајно дебљу *ZP* од јајних ћелија које су оплођене (*Marco-Jiménez et al, 2012*). Неоплођене јајне ћелије имају дебљи унутршњи слој и гушћи спољњи слој док ембрион има и два додатна слоја (*Baranska et al, 1975 no Marco-Jiménez et al, 2012*).

Дебљина *ZP* је важна за имплантацију због улоге у процесу трансформације новог омотача бластоцисте. Једном кад се ембрион закачи и имплантира овај омотач нестаје, и може бити да није од значаја за адекватан развој ембриона до термина. Дебљина *ZP* није од значаја за рођење терминског потомства (*Marco-Jiménez et al, 2012*).

Неки фактори као што су пушење, старост жене, ниво серумског *FSH* су у корелацији са дебљином *ZP* (Shiloh et al, 2004). Хронично пушење повећава дебљину *ZP* (Jennings et al, 2011; Shiloh et al, 2004). На експериментима на мишевима који су 12 недеља излагани дуванском диму и развили деструктивне промене на плућном паренхиму показало се да степен сазревања јајних ћелија није био битно другачији него код контролне групе (број зрелих јајних ћелија по јединки), али је *ZP* мишева који су излагани дуванском диму у поменутом трајању била значајно дебља (22%), јајне ћелије су имале краће и шире деобно вретено, а скоро четвртина јајних ћелија је била абнормална у смислу хромозомског распореда или облика деобног вретена (Jennings et al, 2011). Студије на хуманој популацији показују да дебљина *ZP* је у корелацији са старосном доби особе и нивоом серумског *FSH* (Shiloh & Dirnfeld, 2000; Nawroth et al, 2001; Shiloh et al, 2004; Kilani et al, 2006).

Bergmark et al (1997) претпостављају да је могући механизам утицаја пушења на дебљину *ZP* пеко редокс стауса тиола и последичног утицаја на протеинске итеракције гликопротеина у матриксу. Високе редности NO_2 у дуванском диму би могле да утичу на настанак сулфур-слободних радикала који би могли да утичу на настанак дисулфидних мостова. (no Jennings et al, 2011).

Активно и пасивно пушење доводи до повећања *ZP* јајне ћелије и ембриона и код хумане популације, али не утиче на способност *ZP* да смањује своју дебљину у култури након 48 сати, што указује да је механизам смањења дијаметра *ZP* независан од њене иницијалне дебљине (Shiloh et al, 2004). Непосредно након оплодње *ZP* постаје чвршћа, затим почиње да бива "мекша" и са порастом ембриона постепено тања. Истањење *ZP* је важно за ембрион да би могао да је се ослободи. Истраживање је рађено на 169 испитаница у репродуктивном периоду (21-46 година) код којих је примењена *ICSI* техника било због партнера, било због неуспелог претходног *IVF* циклуса.

Варијације одступања дебљине *ZP* (изражена као релативан однос $ZP_{var}=[ZP_{max}-ZP_{sr}]/ZP_{sr} \times 100$) су мање код ембриона код којих је мајка старија од 35 година. Просечна дебљина *ZP* ембриона се смањује са годинама старости мајке. Варијације одступања дебљине *ZP* су у корелацији са клиничким исходом трудноће након *IVF-a* (*ICSI* протокол). Мања варијација -стопа имплантације 10%,

већа варијација дебљине *ZP* ембриона -стопа имлантације 29%. Тања *ZP* -већа варијација дебљине *ZP* и мањи скор ембрина -односно бољи ембрион. На дебљање *ZP* могу утицати и субоптимални услови култивације јајне ћелије односно ембриона. Код оних испитаница које су остале трудне, варијације одступања дебљине *ZP* ембриона су биле веће. Ембриони са скором мањим од 1.5 су имали тању *ZP* и веће варијације одступања дебљине *ZP* у односу на ембрине са скором преко 1.5.

Добар предиктор исхода трудноће је ако је варијација преко 25%. Локално истањење зоне код таквих ембрина је активан процес који би могао бити удружен са дужином култивације (*Gabrielsen et al, 2000*).

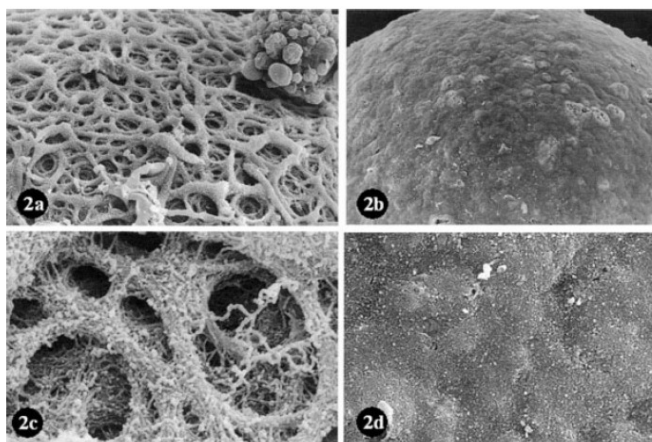
1.6. Промена хемијског састава и структурне организације *ZP* пре оплодње и након оплодње

У току сазревања а пре оплодње *ZP* трпи биохемијске промене: киселост *ZP* расте током њеног сазревања (утврђено гел електрофорезом), јер долази до сулфатисања олигосахарида. Сперматозоиди се боље везују за *ZP* сазрелу у *in vivo* него *in vitro* условима (*Rath et al, 2006*). Након оплодње долази до хемијске модификације *ZP* (утврђено гел електрофорезом) која је највероватније одговорна за блокирање полиспермије (*Shabanowitz & O'Rand, 1988*). Терминални угљенохидратни остаци гликопротеина *ZP* бивају модификовани након оплодње. Унутрашњи и спољњи регион *ZP* садрже различите крајеве ланаца олигосахарида (*Avilés et al, 1997*). *ZP* јајне ћелије у метафази II је компактна и хомогена на *SEM* сликама, има високопорозну структуру у својој спољњој трећини (*Familiari et al, 2006*). У свим стадијумима развоја јајне ћелије поре које се налазе дубље су мањег дијаметра у односу на поре које леже површније. Облик пора-елиптичан или округао, поре насумично распоређене. *ZP* зреле јејне ћелије на *SEM* сликама има мрежаст изглед налик сунђеру. Код оплођене јајне ћелије –зигота *ZP* има више компактну структуру и мањи број пора. Глатка површина без пора се виђа код ембриона (*Vanroose et al, 2000*). Везивање сперматозоида за *ZP* јајне ћелије зависи и од њиховог матурационог статуса. Сперма се састоји од великог броја сперматозоида који се налазе у различитом стадијуму матурације.

У *ZP* јајне ћелије од овулације до бластоцисте, дешавају се ултраструктурне промене. Сапонин-рутениум ред-осмиум тетроксид-тиокарбохидразид (*Sap- RR-Os-Tc*), бојење показје праву микрофиламентозну структуру Слика 1.10. и пратеће структурне промене. То указује да је *ZP* налик гликопротеинској мрежи. Разлике у гликопротеинима *ZP* међу различитим врстама сисара не утичу на њену структурну морфологију и молекуларну организацију, тј морфолошке анализе *ZP* различитих врста сисара добијене горе поменутиим техникама се не разликују значајно по својој структурној организацији (*Familiari et al, 2008*).

На електронском микроскопу *ZP* незреле јајне ћелије је састављена од 3 концентрична слоја. Пре овулације унутрашњи слој *ZP* је гушћи-кондензованији садржи више гликопротеина од спољашњег слоја *ZP* (*Familiari et al, 2006*). На слици 1.10 је приказан изглед 3D структуре *ZP* јајне ћелије миша на SEM-у.

Након оплодње *ZP* има и даље мрежасту, порозну структуру. Слика 1.13а и 1.13с., да би се та структура променила у компактну и глатку. Уколико не дође до оплодње, долази до атрезије-пропадања јајне ћелије и промене структуре *ZP* у глатку. Слика 1.13 :2b и 2d.



Слика 1.13. Н-SEM Os-Tc без златне превлаке а) хумана оплођена јајна ћелија (x1500) б) хумана атретична јајана ћелија с) а на већем увећању (x 18 000) д) б на већем увећању (x 18 000) преузето из (*Familiari et al, 2006*).

Suzuki et al. (1994) су нашли да се морфологија *ZP* неоплођене и оплођене јајне ћелије говечета битно разликују. Неоплођена јајна ћелија има порозну структуру,

а оплођена глатку. Постоји велика разлика у структури *in vitro* и *in vivo* јајних ћелија и ембриона. У *in vivo* условима постоји драстична промена у морфологији *ZP* након оплодње (*Michelmann et al, 2007*)

Промене у структурној организацији *ZP* филамената код различитих врста показују исту тенденцију пре и после оплодње. Поређењем изгледа и дијаметра пора, *ZP* говечета, помоћу *SEM*-а, *in vitro* сазреле јајне ћелије, зигота, осмоћелијског ембриона, и моруле говечета, показује да ооцита и морула имају сунђераст изглед *ZP*, док је код зигота површина глатка са малим бројем пора. Број пора се смањује код зигота у односу на јајну ћелију, али затим расте код осмоћелијског и десетоћелијског ембриона и моруле у односу на зигот. Број пора је већи код зигота у односу на неоплођену јајну ћелију, а код осмоћелијског ембриона мањи у односу на зигот, а код моруле још мањи (*Vanroose et al, 2000*). Табела. 1.5. Промена структуре *ZP* хрчка током фоликулогенезе вероватно је повезана са различитим афинитетом везивња сперматозооида кроз њену дебљину (*Jiménez-Movilla et al, 2009*). Тродимензионална кончаста организација гликопротеинских микрофиламената *ZP* присутна је и код мишије и код *ZP* хумане врсте без обзира што су протеини који граде *ZP* у миша и хумане врсте различити (*Familiari et al, 2006*).

ZP зреле јајне ћелије свиње пре оплодње, на атомик форс микроскопу (*AFM*) има мрежасту структуру. Након оплодње има глатку структуру (*Michelmann et al, 2007*). *Familiari et al* (1992) су идентификовали 4 различита морфолошка типа *ZP* свиње: од порозне, налик мрежи до скоро глатке и компактне површине. Мења се и дијаметар *ZP* пора. Средњи дијаметар пора *ZP* јајне ћелије је мањи од средњег дијаметра пора зигота. *Martinova et al.* (2008) су помоћу *TEM* и *SEM* идентификовали два основна слоја код *ZP* мачке-спољашњи који има грубу сунђерасту структуру и унутрашњи са малим фенестрацијама и у виду глатке фиброзне мреже. Након оплодње спољни слој *ZP* показује грубљу мрежасту структуру и фузију између филамената док унутрашњи има глатку стакласту структуру. На конвенционалном *SEM*-у сунђераста структура одговара зрелој јајној ћелији. На *SEM*-у на већој резолуцији *ZP* се види као фина мрежа сачињена од танких филамената који су међусобно повезани на правилан начин у виду наизменичне шеме широких и густих мрежа. Код зреле јајне ћелије широке мреже

одговарају сунђерастој *ZP*, док густе делови мреже одговарају компактним деловима који окружују поре (*Familiari et al, 2006*).

После оплодње дешава се модификација *ZP1* (*Bleil et al, 1981 no Hatanaka et al, 1992*), *ZP2* (*Bleil & Wassarman, 1986*) и *ZP3* гликопротеина. Могуће је да се модификација не дешава на свим *ZP1* протеинима (*Bleil & Wassarman, 1986*).

Промена композиције *ZP* за време оплодње евидентирана је код миша (*Bleil et al, 1981 no Hatanaka et al, 1992*), хрчка (*Brown et al, 1990 по Hatanaka et al, 1992*), хумане врсте (*Shabanowitz & O'Rand, 1988*), говечета (*Vanroose et al, 2000*), свиње (*Brown, & Cheng, 1986 по Hatanaka et al, 1992, Michelmann et al, 2007*) и приписује се конверзији *ZP2* у *ZP2f*. (*Hatanaka et al, 1992*).

Табела.1.5. SEM анализа дијаметра пора *ZP* јајне ћелије говечета и ембриона насталог у *in vitro* условима. Преузето из (*Vanroose et al, 2000*).

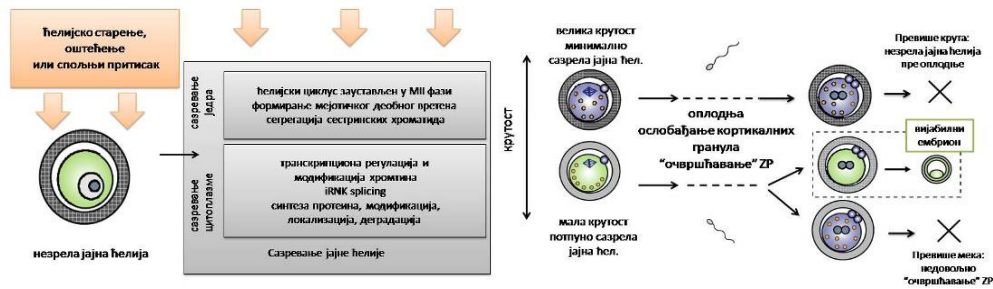
Стадијум развоја	Број испитаних ембриона	Број пора на 5000 μm^2	Средњи дијаметар пора(nm) \pm SD	% пора >50 nm	% пора >200 nm
јајна ћелија	10	1511	182 \pm 69	98	35
зигот	10	1187	223 \pm 95	100	51
8-ћелијски стадијум ембриона	10	1658	203 \pm 79	99	42
морула	10	3259	155 \pm 71	97	19

1.7. Промена механичких својстава *ZP* пре и после оплодње јајне ћелије

Биохемијске промене *ZP* током и након оплодње-кортикална реакција и блокирање полиспермије, независно од врсте, праћене су и променама механичких својстава. Након оплодње *ZP* има вискоеластична својства. (*Khalilian et al, 2010, Papi et al, 2009; Papi et al, 2010, Martinova et al, 2008*). Кортикална реакција *ZP* које се дешава после оплодње, представља повећану отпорност *ZP* на протеолитичке ензиме (услед модификације *mZP2* и *mZP3* гликопротеина) и праћена је повећаном отпорношћу на механички притисак. Први покушај да се измере механичке особине *ZP* објављан је 1988 (*Drobnus et al, 1988*).

Механички параметри корелирају са вијабилношћу ембриона (бластоцисте) и на основу њих се може предвидети рађање живог потомства у термину код мишева. „(55 вијабилних и 55 невијабилних ембриона миша су пребачени у утерус мишева: 12-15 ембриона по женки тако да у једном утерусу буду само вијабилни односно само невијабилни ембриони) (Yanez et al, 2016).

Да би испитали да ли механичке особине зигота зависе од количине преосталих кортикалних гранула у цитоплазми упоредили су механичка својства вијабилних и невијабилних зигота са количином преосталих кортикалних гранула у цитоплазми користећи конфокални микроскоп. Сви вијабилни зиготи (37) показали низак садржај кортикалних гранула унутар цитоплазме, за разлику од невијабилних зигота без обзира да ли вијабилни ембриони показују већу или мању „чврстоћу“ од вијабилних ембриона. Што ће рећи да ослобађање кортикалних гранула може утицати на „чврстоћу“ ембриона али није једини фактор који утиче механичка својства зигота и његову вијабилност.



Слика 1.14. "Неке јајне ћелије не достигну оптималну зрелост због спољних услова током сазревања или наслеђеног слабог квалитета. У време оплодње ове јајне ћелије (плава цитоплазма) могу да буду превише круте и још увек незреле или могу да ослободе недовољну количину кортикалних гранула и да буду превише "меке" након оплодње. Оптимално зреле јајне ћелије (зелена цитоплазма) ће ослободити довољну количину кортикалних гранула у перивителински простор, доћи ће до оптимане промене њихових механичких својстава и успешног развоја ембриона." преузето из (Yanez et al, 2016).

Да би спречили ослобађање кортикалних гранула убризгали су антитело против IP_3 рецептора и посматрали промену у чврстини ембриона након оплодње. Микорињекција ових антитела није спречила пенетрацију сперматозооида у јајну ћелију, али је смањила чврстину ембриона ($0,143 \pm 0,022 \text{N/m}$ код контролних ембриона оних код којих нису ињектирана антитела на IP_3 рецептор на $0,135 \pm 0,012 \text{N/m}$).

Они ембриони којима су ињектирана антитела на IP_3 су били мекши и показивали већу количину кортикалних гранула у цитоплазми од контролних ембриона којима нису убризгана антитела али и у односу на ембрионе са сличним механичким својствима.

„Чврстоћа“ јајне ћелије опада са њеним сазревањем (слични подаци добијени за ZP (Murayama et al, 2006) помоћу AFM -а) ($P < 10^{-5}$ од GV до MI и $P < 10^{-9}$ од MI до MII). Како сазревају, јајне ћелије постају мекше: просечна вредност чврстоће јајне ћелије миша је $0,083 \pm 0,013 \text{N/m}$ у GV стадијуму $0,070 \pm 0,008 \text{N/m}$ у MI стадијуму и $0,056 \pm 0,013 \text{N/m}$ у MII стадијуму. (Yanez et al, 2016).

„Резултати (Yanez, L. et al. 2016) указују да невијабилни ембриони показују различите механичке фенотипове који би могли да одражавају редуковану способност да се заврши ембриогенеза. Ове разлике у механичким својствима су можда узроковане абнормалностима у механичким својствима и сазревању јајне ћелије пре оплодње или у способности избацивања кортикалних гранула у време оплодње.“ (Yanez et al, 2016).

„Невијабилни ембриони имају значајно различиту експерсију гена који контролишу прогресију ћелијског циклуса (укључујући све циклин зависне киназе и многе циклине) у односу на вијабилне ембрионе (чиме се може објаснити зашто се на основу времена прве ћелијске деобе ембриона може предвидети формирање балстоцисте), гене који су важни за кохезију сестринских хроматида, поравнање или сегрегацију, или за место здруживања у деобном вретену (што може да објасни висок степен анеуплоидије код хуманих ембриона код којих је заустављен даљи развој). Као и старе јајне ћелије, невијабилни зиготи имају дефектне механизме за репарацију DNK и одржање теломера-постоје велике међусобне

разлике у вијабилности ембриона код истих пацијената. Невијабилни ембриони показују и недостатке у сазревању цитоплазме. *RNK* секвенционирање показује да невијабилни ембриони погрешно експримирају и неке гене који су одговорни за оплодњу, што би могло да утиче на ослобађање кортикалних гранула и „очвршћавање“ *ZP* и механичка својства ембриона. Невијабилни ембриони имају смањену експресију *ITPRI*.“ (Yanez, et al, 2016). Yanez, et al, (2016) предлажу два могућа механизма који доводе до невијабилности: 1. неадекватна количина ослобођених кортикалних гранула у перивителински простор која је узрокована вероватно неадекватном експресијом гена узводно од гена одговорних за оплодњу; други могући механизам је да јајна ћелија није достигла адекватну зрелост пре оплодње тако да „пречврста“ јајна ћелија даје „пречврст“ ембрион (Yanez, et al, 2016).

Преглед техника мерења механичких својстава *ZP* као и коришћених математичког модела и добијених вредности дат је у наредном поглављу. Табели 2.1. (Hedrih et al, 2013a).

2. Механички модели *zona-e pelucida-e*

У овом поглављу ће бити речи о реолошким моделима којима се описују еластична, виско еластична и пластична својства материјала, као и реолошки модели којима се описују материјали са наследним својствима. Даћемо кратак преглед техника мерења одговора ZP на механички стрес као и механичких модела који су коришћени за израчунавање модула еластичности ZP .

2.1. Реолошки модели биоматеријала

Укратко ће бити изложени реолошки модели материјала који се најчешће користе за описивање механичких својстава ZP као и коефицијенти механичких својстава материјала помоћу којих се описују механички модели и дефинишу њихова својства путем конститутивних релација. Механичка својства од значаја за проучавање механичког понашања ZP су: **еластичност** (као основна особина чврстог тела), **вискозност** (као основна особина вискозног флуида), **пластичност** (као основна особина пластичног течења, када се пређу границе еластичности при оптерећивању преко критичне вредности напона материја) и **наследност материјала** (памћење материјала при напрезању и растерећењу). (*Hedrih (Stevanović), 1988a, 1991, Goroško & Hedrih (Stevanović), 2001*).

Постоје еластични, пластични, виско-пластични и материјали са наследним својствима. "Која ће од ових особина бити доминантна зависи од унутрашње структуре тела и спољњих утицаја (величина оптерећења, количине пренесене топлоте, брзина деформације...)". (*Hedrih (Stevanović), 1975, 1988*). "Функционалне зависности стања напона и стања деформација одређене су унутрашњим физичким особинама материјала" (*Hedrih (Stevanović), 1975, 1988*). Ове функционалне зависности стања напона и стања деформације деформабилних тела се описују одговарајућим конститутивним једначинама.

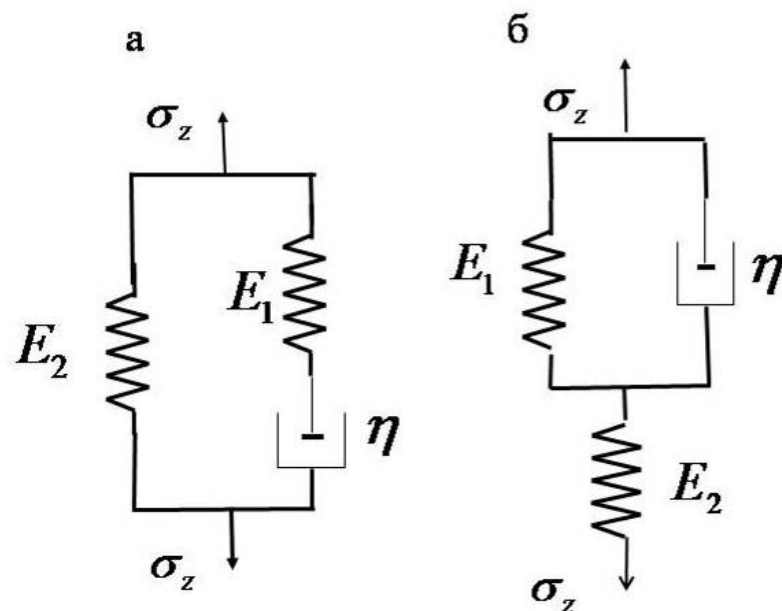
Идеални материјали поседују само по једну од горе наведених особина, у стварности већина материјала има комбинована својства.

Најједноставнији модели за идеално еластични, идеално вискозни и идеално пластични материјал за случај аксијалног напрезања дати су у прилогу. Слика П.1. Најчешће коришћени реолошки модели којима описујемо понашање вискоеластичних материјала су **Kevin-Voigt**-ов модел за идеални виско-еластични материјал и **Maxwell**-ов модел (Слика П.2. у прилогу) за идеални еластовискозни флуид, и **Zener**-ов модел. Реолошке моделе којим се описују вискоеластична својства материјала помињемо јер је експериментално утврђено да *ZP* има вискоеластична својства (*Boccaccio et al 2014, Papi et al, 2013*).

Идеално пластични материјал описујемо **Saint Venant**-овим моделом где је нормални напон константан у току пластичног течења, не зависи од времена и једнак је напону пластичног течења. Особине материјала који имају и еластична и пластична својства се могу описати **Prandtl**-овим телом, (Слика П.4 у прилогу) а особине материјала са наследним својствима можемо описати моделима у чијим се конститутивним релацијама налази извод нецелог реда (Слика П.5.). Схеме као и конститутивне релације поменутих реолошких модела дате су у прилогу. Комбинацијом **Kelvin-Voigt**-овог и **Maxwell**-овог и/или **Saint Venant**-овог модела могу се добити различити сложени реолошки модели материјала. Неки примери сложених реолошких модела материјала као и конститутивне релације које описују однос напона и деформације дати су у прилогу (Слика П.3).

2.1.1. *Zener*-ов модел

Zener-ов модел се често у англосаксонској литератури назива и стандардни линеарни модел чврстог тела (**SLS-Standard linear solid model**). Може се приказати на 2 начина: као паралелна веза опруге и **Maxwell-овог модела**. Слика 2.1а. или као сериска веза опруге и **Kevin-Voigt-овог модела** Слика 2.1б.



Слика 2. 1. *Zener*-ов модел или стандардни линеарни модел чврстог тела (*SLS-Standard linear solid model*). Два равноправна начина приказивања.

Конститутивна релација за напон на крајевима *Zener*-овог модела приказана на Слици 2.1а је :

$$\sigma_z = E_2 \varepsilon + \frac{\eta(E_1 + E_2)}{E_1} \dot{\varepsilon} \quad (2.1.)$$

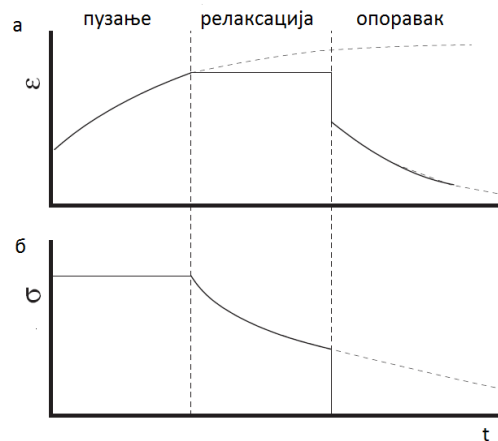
Конститутивна релација за напон на крајевима *Zener*-овог модела приказана на Слици 2.1б је:

$$\sigma_z = \frac{E_1 E_2}{E_1 + E_2} \varepsilon + \frac{E_2 \eta}{E_1 + E_2} \dot{\varepsilon} \quad (2.2.)$$

Zener-ов модел добро квалитативно објашњава пузање и релаксацију вискоеластичних материјала.

Особине *Zener*-овог модела

При примени силе долази до тренутног еластичног издужења. При константном напону долази до пузања материјала и издужења до одређене границе. При константном издужењу долази до релаксације материјала до одређене вредности. Постоје две временске константе: једна за пузање под константним напонам и једна за релаксацију при константном издужењу.

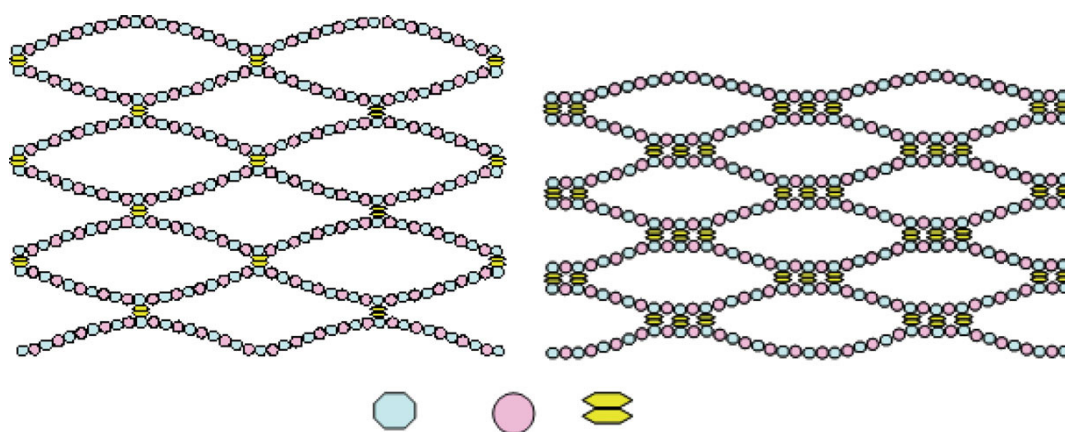


Слика 2.2. *Zener*-ов модел вискоеластичног тела. а. Крива издужење по времену. б. Крива напон-време. Преузето са 1 *3rd Year Engineering Materials. Viscoelasticity* – *Lecture* 3. http://www.acronymchile.com/noteshtml/3rd_Materials/3rdMat06_handout.pdf приступљено 10.09.2015.

2.2. Механичке особине *ZP*

Дебљина *ZP* је геометријска карактеристика *ZP* и њена еластична својства се разликују пре и после оплодње. Након оплодње *ZP* "очвршћава" што онемогућава продор других сперматозооида. Очвршћавање *ZP* је термин који означава да *ZP* постаје теже разложити различитим биохемијским агенсима, односно потребно је

дуже време за њено разлагање него пре оплодње. "Претпоставља се да је то последица модификације гликопротеина након оплодње. Приликом кортикалне реакције долази до повећања нивоа калцијума и егзоцитозе кортикалних гранула чији садржај модификује *ZP* гликопротеине, што доводи до "очвршћавања" *ZP* (Sun et al, 2003). Према Green-овом моделу *ZP* миша (1997) ово очвршћавање би могло да се објасни настанком додатних дисулфидних веза које *ZP1* остварује са *ZP2* и *ZP3* гликопротеинима у току процеса оплодње. Слика 2.3. Ове биохемијске и структурне промене *ZP* су праћене и променама у механичким својствима *ZP*. Након оплодње *ZP* има виско-еластична својства (Khalilian et al, 2010, 2011, Papi et al, 2009, 2010). "Очвршћавање" *ZP* представља повећану отпорност према протеолизи али и повећану чврстоћу мембране у механичком смислу (Papi et al, 2009, 2010).



Слика 2.3. а. Wasserman-ов модел (1988) *ZP* миша. Хетеродимери сачињени од *ZP2* и *ZP3* гликопротеина повезаних дисулфидним везама са *ZP1* гликопротеином-модел одговара стању пре оплодње. б. Модел структуре *ZP* миша након оплодње који је предложио Green, 1997 - број дисулфидних веза који повезују хетеродимере се повећава што, према теорији доводи до "очвршћавања" *ZP*. Преузето из Vocaccio et al, 2012.

За дефинисање механичких својстава *ZP* већина аутора користи *Young*-ов модул еластичности E , *Poisson*-ов коефицијент попречне контракције ν , који се

креће у границама $\frac{1}{4} < \nu < \frac{1}{2}$, а најчешће је $\nu = \frac{1}{3} \approx 0,33$ и коефицијент клизања или смицања материјала \mathbf{G} . Веза између ових коефицијената је следећа:

$$\mathbf{G} = \frac{\mathbf{E}}{2(1+\nu)} \quad (2.3)$$

У теоријским разматрањима користе се и уводе *Lame*-ове константе којима се дефинише веза између модула смицања, *Young*-овог модула еластичности и *Poisson*-овог коефицијента попречне контракције:

$$\mu = \frac{\mathbf{E}}{2(1+\nu)} = G \quad (2.4)$$

$$\lambda = \frac{\nu E}{(1+\nu)(1-2\nu)} \quad (2.5)$$

где је λ *Lame*-ов коефицијент.

2.3. Методе мерења механичких својстава *ZP* и механички модели *ZP* до сада познати у литератури

2.3.1. Методе мерења механичких својстава *ZP*

У литератури је описано више различитих техника мерења механичког одговора *ZP* на примењену механичку силу: помоћу *AFM*-а (*Papic et al, 2009*), помоћу атомик форс микроскопа, помоћу атомик форс спектроскопије (*atomic force spectroscopy –AFS– (Khalilian et al, 2011)*), помоћу дво-осовинског сензора који мери силу која дејствује на ћелију а који је интегрисан у микророботски систем за мерење силе која дејствује на *ZP* и јајну ћелију (*Sun et al, 2003, 2005*) и помоћу аспирационе микропипете у комбинацији са микротактилним сензором (*Murayama et al, 2006, 2008*). Преглед техника мерења механичких својстава *ZP* као и коришћених математичких модела и добијених вредности су приказане у Табели 2.1.

Табела 2.1. Различите вредности *Young*-овог модула еластичности зависе од технике мерења механичког одговора *ZP* и примењеног теоријског модела. (преузето и допуњено из (Hedrih et al, 2013a).

тип ћелије	техника	модел	параметри модела	Young-ов модул еластичности <i>ZP</i> (kPa)	извор
<i>ZP</i> зреле јајне ћелије говечета	изолована <i>ZP</i> *	AFM, AFS-атомик форс спектроскопија	модификован <i>Hertz</i> -ов модел	22±5	<i>Papi et al, 2009, Papi et al, 2010,</i>
<i>ZP</i> оплођене јајне ћелије говечета	изолована <i>ZP</i>		брзина кретања AFM игле: 3μm/s <i>Poisson</i> -ов коефицијенат попречне контракције: $v=0,33N/m'$ угао који врх игле заклапа са површином <i>ZP</i> : $\alpha=15^\circ / \alpha=20^\circ$ *	84±10.	<i>Papi et al, 2012,*</i>
поређење механичког одговора <i>ZP</i> зреле јајне ћелије кобиле и свиње					<i>Papi et al, 2013*</i>
<i>ZP</i> зреле јајне ћелије говечета за мале деформације	изолована <i>ZP</i>	AFM	<i>Aruda-Boyce</i> -ов модел	7,38±0,9	<i>Bocaccio et al, 2012, Bocaccio et al, 2014</i>
<i>ZP</i> зреле јајне ћелије говечета за велике деформације		AFM	<i>Aruda-Boyce</i> -ов модел		
<i>ZP</i> јајне ћелије миша	<i>ZP</i> у склопу јајне ћелије	вишеосни сензор у комбинацији са методом микроињекције	Модификован и <i>Point-Load Model</i> биомембране	17,9	<i>Sun et al, 2003</i>
<i>ZP</i> ембриона миша				42,2.	<i>Sun et al, 2005</i>
<i>ZP</i> јајне ћелије говечета				25,3±7.94	<i>Murayama et al, 2004</i>
<i>ZP</i> јајне ћелије миша-GV			Принцип контактне комплијансе	22,8±10,4	
<i>ZP</i> јајне ћелије миша-M II	<i>ZP</i> у склопу јајне ћелије	Техника микротактилног сензора	и методе фазног помака	8.26 ±5.22	
<i>ZP</i> ембриона миша (стадијум пронуклеуса)				22.3 ±10.5	<i>Murayama et al, 2006,2008</i>
<i>ZP</i> ембриона миша (двоћелијски стадијум)				13,8±3,54	
<i>ZP</i> ембриона миша (четвороћелијски стадијум)				12,6±3,34	

ZP ембриона миша (осмоћелијски стадијум)				5,97±4,97	
ZP ембриона миша -стадијум моруле				1,88±1,34	
ZP ембриона миша-стадијум ране бластоцисте				3,39±1,86	
ZP јајне ћелије миша				11.8±1.47	
ZP ембриона миша (стадијум пронуклеуса)			Модел љуске	36.9±2.34	
ZP јајне ћелије хумане врсте (MII стадијум)				1.05±0.51	
ZP ембриона хумане врсте (стадијум пронуклеуса)			Модел полулопте	2.38±1.24	
ZP јајне ћелије хумане врсте (MII стадијум)	ZP у склопу јајне ћелије	помоћу аспирационе микропипете		7.47±1.29	<i>Khalilian et al, 2010</i>
ZP ембриона хумане врсте (стадијум пронуклеуса)			Слојевити модел	14.19±1.18	<i>Khalilian et al, 2011</i>
ZP јајне ћелије хумане врсте (MII стадијум)				7.34±1.36	
ZP ембриона хумане врсте (стадијум пронуклеуса)			Модел шупље сфере	13.18±1.17	
цела јајна ћелија миша					<i>Liu et al, 2010</i> <i>Liu et al, 2012</i>

*ZP је изолована из јајне ћелије и фиксирана на стаклену плочицу помоћу полилизина. Јајна ћелија се усиса помоћу микро игле а ZP се фиксира на плочицу и држи у DPBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*) пуферу. Све рађено за мале деформације осим у реф: *Vocaccio et al, 2014*.

Неколико механичких модела ZP као биоматеријала може да објасни еластична својстава ZP пре и после оплодње и они су коришћени за израчунавање Young-овог модула еластичности ZP:

- модификовани *Point-Load Model* биомембране (*Sun et al, 2005*),
- модификовани *Hertz*-ов модел (*Khalilian et al, 2011; Papi et al, 2009*),
- модел полулопте (*Khalilian et al, 2010*).
- модел слоја (*Khalilian et al, 2010*).
- модел шупље сфере или дебеле љуске коначне дебљине (*Khalilian et al, 2010*).

- Модел хипереластичне греде у комбинацији са *Arruda-Boyce*-овим моделом полимера (*Boccaccio et al, 2012, 2014*)

Сви горе наведени модели за мерење механичких карактеристика *ZP* усмерени су на мерење и идентификацију *Young*-овог модула еластичности *ZP*, при различитим врстама напрезања материјала. Поједини аутори су мерења радили на *ZP* која је интактна и налази се у склопу јајне ћелије одговарајуће врсте (*Sun et al, 2003, 2005, Murayama et al, 2004, 2006, 2008, Khalilian et al, 2010, 2011*) док су други мерења радили на изолованој *ZP* (*Papi et al, 2009, 2010, 2012, 2013, Boccaccio et al, 2012, 2014*). Изолована *ZP* се добија аспирацијом јајне ћелије уском пипетом. Преостала *ZP* се фиксира на стакленој плочици помоћу полилизина. Тако да је *ZP* у виду слоја одговарајуће дебљине фиксирана за стаклену плочицу претходно третирану полилизином. Ради визуализације *ZP* се може обојити метилен плавим (*Boccaccio et al, 2012, 2014*).

Различите вредности *Young*-овог модула *ZP* за исти стадијум јајне ћелије/ембриона за исту врсту су настале у зависности од коришћене мерне технике и коришћених механичких модела *ZP*, као и врсте напрезања помоћу кога се дошло до параметара стања напона и стања деформација: Табела 2.1. Независно од разлика у *Young*-овом модулу еластичности *ZP* и степена очвршћавања (однос *Young*-овог модула еластичности *ZP* пре и после оплодње), сви аутори се слажу да је *ZP* чвршћа после оплодње (*Murayama et al, 2008*).

И ако су механичка својства *ZP* доста проучавана, нема података о затезној чврстоћи *ZP* на кидање.

Најпре ће бити кратко речи о техникама мерења механичких својстава *ZP*, а затим о механичким моделима који су основи израчунавања *Young*-овог модула еластичности *ZP*.

Најчешће коришћене технике /методе мерења механичких својстава *ZP* су:

- вишеосни сензор у комбинацији са методом микроињекције
- употребом тактилног микросензора,
- техника сукције микропипетом и
- *atomic force* микроскоп-AFM

2.3.2. Вишеосни сензор у комбинацији са методом микроињекције

Вишеосни сензор који региструје силу примењену на ћелију (микроигла) на бази промене капацитативности повезан је са микроелектромеханичким роботским системом.

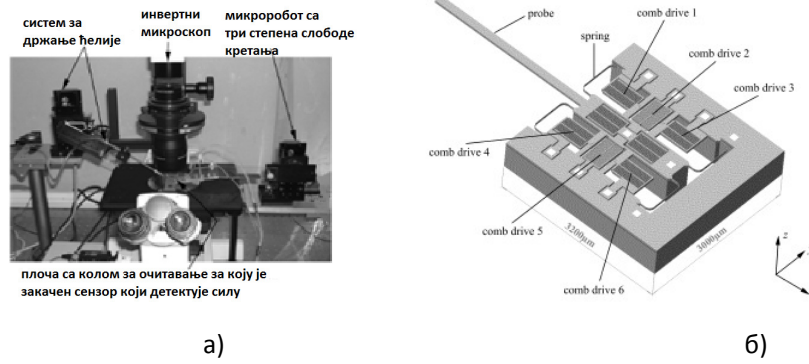
Микророботски систем за манипулацију ћелијом се састоји од сензора који региструје силу примењену на ћелију помоћу микроигле на бази промене капацитативности, система који држи ћелију, вакумске једнице, јединице за сликање ћелије и софтверске јединице. Слика 2.4а. Сензор може да реконструира нормалне силе које дејвују на ћелију као и тангенцијалне силе које настају због лошег положаја сонде ћелијског сензора. Сензор има спољни фиксни (четвртасти оквир) део и унутрашњи покретни који су међусобно повезани помоћу 4 увијене опруге. Слика 4б. Када се примени сила на сонду сензора, унутрашњи део сензора се помера, мењајући растојање између сваког пара прстастих чешљева кондензатора. На бази промене укупне капацитанце одређује се интензитет дејствујуће силе. Чешљеви кондензатора су ортогонално постављени тако да сензор може да мери промену силе у два правца. Сензор може да мери силе до $25\mu\text{N}$ са резолуцијом од $0,01\ \mu\text{N}$ (*Sun et al, 2003*). Да би се добили ваљани мерни резултати неопходно је елиминисати вибрације. Контрола вибрација, односно динамичка изолација система од спољашњих утицаја и поремећаја је постигнута стављањем целог система на посебан сто који га изолује од вибрација (*Sun et al 2003*).

Вакум пипета причвршћује ћелију. На крају сонде сензора налази се микроигла која долази у контакт са ћелијом. Вакуум пипета, ћелија и сонда сензора су у истој хоризонталној оси. Експеримент симулира силу која се примењује на *ZP* при *ICSI* техници. Као одговор на дејство силе настаје деформација ћелије. Слика 2.5.

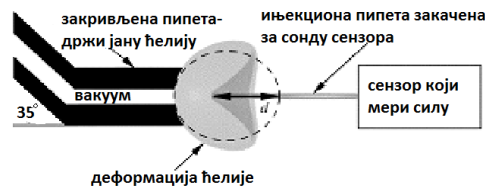
Вредности примењене силе и деформације ћелије мерене микротактилним сензором дате су у Табели 2.2. У питању су велике деформације.

Јединице за сликање се састоји из инвертног микроскопа, камере, хватача фрејмова. Хватач фрејмова хвата 30 фрејмова у секнди. Софтверска јединица

узоркује истовремено податке о деформацији ћелије и дејствујућој сили. У сваком фрејму се мери геометрија ћелијске мембране са резолуцијом од једног пиксела. (Sun et al, 2003).



Слика 2.4. а) Микроелектромеханички систем б) шематски приказ микротакилног вишесовинског сензора за мерење притиска. Преузето из (Sun et al, 2003).



Слика 2.5. Шематски приказ сиситема за мерење сила-растојање. Преузето из (Sun et al, 2003).

Мултиаксијални сензор анализира-упоређује промену резонантне фреквенције и криве помераја мерене микротакилним сензором (Sun et al, 2003, 2005). ZP се ту третира као линеарно еластичнио тело.

Табела 2.2. Вредности примењене силе и деформације *ZP* мерене микротактилним сензором у комбинацији са микроињекционом иглом
Преузето из (*Sun et al, 2003*).

	Највећа деформација	Сила убадања
<i>ZP</i> јајне ћелије миша	44 μ m	7,5 μ N
<i>ZP</i> ембриона миша	53 μ m	13 μ N

2.3.3. Метода тактилног микросензора

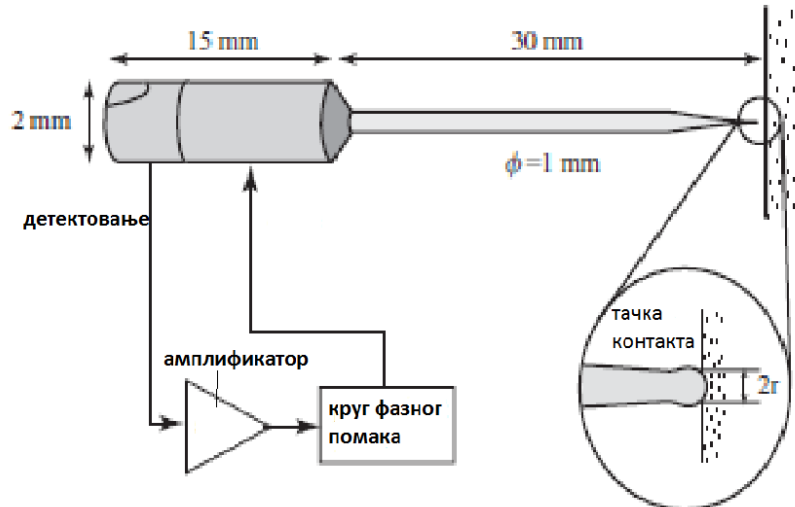
У експериментима *Murayama et al, (2006)* и *Michelmann et al (2007)* за мерење *Young*-овог модула еластичности *ZP* коришћен је микротактилни сензор.

Метода мерења микротактилним сензором (*MTS*) се заснива на резонатор – контактном импедансном мерењу и методи фазне промене. Метода је високосензитивна и може да мери локалну еластичност био-материјала у микрометрима. Микротактилни сензор садржи цилиндрични пијезоелектрични проводник направљен од керамичког материјала олово цирконат титаната и стаклене игле. Стаклена игла има сферични врх пречника од 20 μ m који је прислоњен на *ZP*. Види Слику 2.6.

Микротактилни сензор не мери апсолутне вредности физичких величина већ промену резонантне фреквенце која је у корелацији са еластичношћу објекта. *MTS* упоређује промене у резонантној фреквенцији познатих стандардних желатинских гелова и *ZP* (*Murayama et al, 2006, 2004*).

Резонантна фреквенција сензора се мења у зависности од чврстоће материја са којим долази у контакт. Калибрација сензора је урађена на основу желатинских гелова познате концентрације (4%, 6%, и 8%. -са повећањем концентрације желатинског гела, повећава се и промена резонантне фреквенције). Када се помера сензор мења се и његова резонантна фреквенција. Да би се то избегло при мерењу, јајна ћелија говечета је фиксирана помоћу сукционе микропипете која се налази у истој хоризонталној оси са микротактилним сензором Слика 2.7. Јајна ћелија је у пуферу- *PBS*-у (*phosphate buffered saline*) у коморици на микроманипулационој платформи покривена покровном љуском. Слика 2.7. Сензор је фиксиран, а јајна ћелија се помера константном брзином

(помоћу роботског система) према сензору и лагано притисне сензор доводећи до минималних деформација ZP .



Слика 2.6. Основи делови микротактилног сензора: пијезоелектрични елемент дуг 15mm, спољњег пречника 2 mm, а унутрашњег пречника 1 mm; на пијезоелектрични елемент се надовезује стаклена игла дуга 30 mm, спољњег пречника 1 mm а унутрашњег 0,5 mm. Врх стаклене игле је сферичан, пречника 20μm. Резонантна фреквенција $f_0 = 125kHz$. Преузето из (Murayama et al, 2004).

$Young$ -ов модул еластичности ZP јајне ћелије говечета измерен овом методом је 25.3 ± 7.94 kPa. Овом методом ZP је изложена минималној деформацији за разлику од методе где се користи микроињекциона игла (Khalilian et al, 2010, 2011, Sun et al, 2003, 2005).

Принцип рада микротактилног сензора

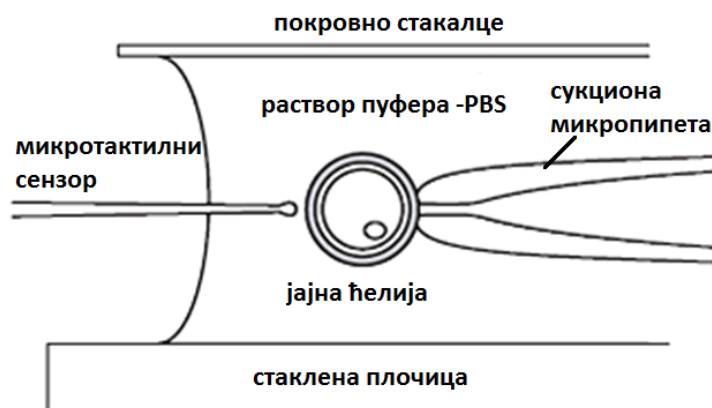
Промена резонантне фреквенције Δf_0 између стања када је сензор изложен биолошком материјалу $-ZP$ и када није се може изразити следећом формулом:

$$\Delta f_0 = \frac{1}{2\pi^2} \left(\frac{k_x}{Z_0} \right) \quad (2.6)$$

$$C_x = \frac{1}{2} \left(\frac{\pi}{S} \right)^{\frac{1}{2}} \frac{(1-\nu^2)}{E} \quad (2.7)$$

Где је k_x је чврстоћа материјала $k_x = \frac{1}{C_x}$, Z_0 је еквивалентна импеданса сензора, C_x је површинска проводљивост, S -контактна површина једнака $S = r^2 \pi$, r је полупречник контактне површине, E - *Young*-ов модул еластичности и ν је *Poisson*-ов коефицијент попречне контракције (однос дилатација у попречном и аксијалном правцу). Контактна површина S се може изразити као функција померања x . С обзиром да су померања узорка током мерења веома мала, за израчунавање *Young*-овог модула примењена је *Hertz*-ова теорија контакта и *ZP* је сматрана идеално еластичним телом. *Young*-ов модул је одређен на основу промене резонантне фреквенције у односу на померање $\Delta f_0 / x$. Метода мерења еластичности *ZP* микротакилним сензором мери локалну еластичност и није искључено да еластичност *ZP* није униформна на целој њеној површини, односно не искључује постојање локалних разлика када је у питању површина *ZP* (*Murayama et al, 2004*). Еластичност *ZP* се мења у току матурације јајне ћелије, оплодње и раног развоја ембриона (*Murayama et al, 2006*). Експериментални резултати јасно указују да кад *ZP* након оплодње очврсне, а затим постепено, како се ћелије ембриона деле, *ZP* смањује своју чврстоћу, тј да је процес очвршћавања пролазни (транзиторни) феномен. (*Murayama et al, 2006*).

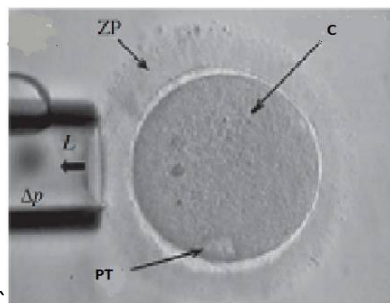
Еластичност *ZP* ембриона се може користити као селекциони критериум за квалитет ембриона који се пребацују у утерус у поступку *IVF-a* (мањи модул еластичности на четвороћелијском стадијуму -слабији квалитет ембриона) (*Murayama et al, 2008*).



Слика 2.7. Мерење чврстоће/еластичности јајне ћелије. Под контролом микроскопа сукциона микропипета фиксира јајну ћелију и налази се у истој оси са микротактилним сензором. Сензор мирује а пипета се креће. Преузето из (*Murayama et al, 2004*).

2.3.4. Метода аспирације микропипетом

Кретање пипете кроз дебљину ZP је контролисано микроманипулатором, који омогућава да се јајна ћелија постави у одговарајући део видног поља микроскопа. При примени сукционог притиска пипете на мембрану јајне ћелије, површина ZP се аспирира у стаклену пипету употребом контролисаног сукционог притиска (Слика 2.8) а последична деформација ZP се мери видео микроскопом. Тест је понављан серијом растућег усисног притиска од $200Pa$ до $2kPa$. Између сваког мерења прављена је пауза од 30s да би ћелија поново постигла равнотежу. Средња вредност пречника употребљених микропипета била је $40\pm 5 \mu m$, а средња вредност дебљине hZP $18.5\pm 4.5 \mu m$. Ова метода се практично заснива на сукцесивним квази-статичким стањима равнотеже мембране ZP у одређеној конфигурацији дејства сила и стања деформација, односно напона.



Слика 2.8. Техника аспирације микропипетом. јајна ћелија хумане врсте у стадијуму МШ. *PT*-поларно тело, *ZP*-Zona pelucida, *L*- дужина *ZP* која се аспирира, Δp -негативни притисак који дејствује на површину *ZP*. Преузето из (Khalilian et al, 2011).

Степен „очвршћавања“ *ZP* миша добијен двема различитим техникама мерења (микротактилни сензор и употребом аспирационе микропипета) је приближно исти (2,7 пута мерено микротактилним сензором односно 3,1 пута мерено методом аспирационе микропипете) (Khalilian et al, 2010).

Употребом микротактилног сензора за одређивање механичких својстава *ZP* ембриона миша, податци који су добијени *in vivo* указују да је *ZP* нешто чвршћа од *ZP* ембриона добијених *in vitro* на сваком упоредном стадијуму. Степен механичког очвршћавања *ZP* након оплодње зависи од количине ослобођених кортикалних гранула у перивителинском простору и од активације ооците (матурација, оплодња) и може се проценити мерењем промене еластичности *ZP*. Ови подаци могу бити корисни у процени квалитета ембриона у асистираним репродуктивним технологијама (Khalilian et al, 2011, Murayama et al, 2008).

2.3.5. AFM- принцип рада

Принцип рада *AFM* приказан је на слици 2.9. Врх сонде (налик на коничну иглу) је изнад површине узорка који се испитује. Мери се промена силе између врха сонде/игле и узорка. Кантилевер (носач сонде/игле) је изнад површине узорка. У зависности од сепарационе дистанце, силе које настају између молекула

узорка и врха сонде/игле могу бити силе које делују на краткој или великој удаљености. Сила се мери на основу савијања кантилевера носача оптичком методом. Ласерски сноп светлости осветљава задњу страну носача сонде, светлост се одбија и пада на фотодетектор. Фотодетектор је повезан са процесором и електронским повратним системом који шаље повратне сигнале у пијезоелектрични елемент. Када су силе између врха сонде/игле и површине узорка мале доћи ће до мале дефлексије носача игле. У случају већих сила настаће већа померања носача - кантилевера. Кад се мере промена силе у функцији положаја добија се топографска слика површине која се испитује.

Врх сонде/игле може да се функционализује разичитим хемијским супстанцама, тако да имамо специфичну интеракцију између сонде и узорка.

Помоћу ове технике могу се добити слике површина, нано структура у високој резолуцији. Од биолошких материјала могу се сликати биоплимери као нпр. ДНК, ћелије, површине ћелија, делови ћелије као нпр. флагеле, површине мембрана итд. Могуће је, у зависности од мода у коме се раде мерења, добити податци о механичким и електричним својствима материјала (*Meyer, 1992*).

Најважнији деови *AFM*- а који омогућавају да се добије слика резолуције на нивоу атома су: кантилевер са оштрим врхом, скенер и јединица за повратну контролу. Чврстоћа кантилевера мора да буде мања од ефективне константе растезања (*spring konstant*) која држи атоме заједно што је реда величине од 1-10nN/nm. Врх игле би требало да има полупречник мањи од 20-50 nm а конични угао треба да буде између 10-20°. Пијезоелектрични скенер је уређај којим се контролише кретање узорка или врха сонде у све три равни. Најчешће кретање у *x-y* равни је 80µm x 80µm и 5 µm у *z* равни. Како фотодетектор мери разлику у светлости која настаје због померања кантилевера по вертикалној осовини степен дефлексије кантилевера је у корелацији са висином узорка. Како за померање кантилевера важи *Hook*-ов закон може се израчунати сила интеракције између врха *AFM*- игле и узорка.

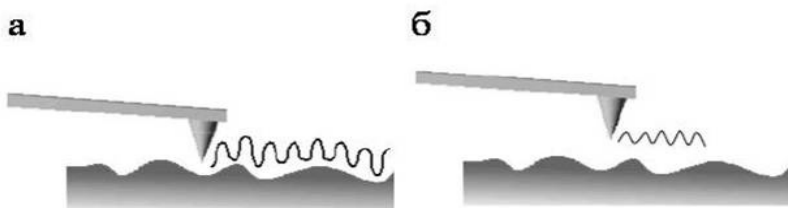
Главна три мода у којима ради *AFM*- су **контактни, неконтактни и *tapping* мод**. У проучавању механичких особина *ZP* најчешће је коришћен контактни мод. Узорак може да буде у течном медијуму.



Слика 2.9.а. Принцип рада *AFM*-а. б. Карактеристичне криве сила-растојање које настају као последица дејства између узорка и врха *AFM* сонде/игле. F -сила, z -растојање сонде од узорка. преузето са http://community.nsee.us/courses/nano_experiments/AtomicForceMicroscopy/AFM%20more%20info.pdf приступљено дана 29.09.2015.

Контактни мод је згодан за прикупљање *3D* топографских података, наноструктура и површина. Код овог мода врх игле кантилевера и узорак остају у контакту. (добијају се криве које су изнад x –осе-режим одбијања интермолекуларних сила). Већина кантилевера има ефективну константу растезања мању од 1 Nm, што је мање од ефективне константе растезања која држи атоме заједно. Негативне стране овог мода су што је игла стално у контакту са узорком те су могуће и латералне силе и трење између узорка и игле што даје нејасне слике и може да оштети узорак. Ови ефекти су повољно искориштени код *lateral force microscopy (LFM)*. Код *tapping* мода врх сонде/игле је у интермитентном контакту са површином узорка (Слика 2.10а). Кантилевер/носач сонде практично осцилује по површини узорка великом фреквенцијом. Латералне силе су у овом моду драстично смањене јер је време контакта само мали део осцилаторног периода кантилевера/носача. У зависности од тога да ли је фаза или амплитуда константна разликујемо фазни /амплитудни имиџинг. Овај мод се користи код узорака који су лабаво везани за подлогу или код меких узорака. У **неконтактном моду** (Слика 2.10б) носач сонде осцилује изнад површине узорка на удаљености где се јављају само привлачне интермолекуларске силе. Између

узорка и врха сонде постоји танак слој течности. Избор *AFM* мода зависи од карактеристика поршине и чврстоће узорка.



Слика 2.10. а. *Tapping AFM* мод б. Неконтактни *AFM* мод

Механичка својства *ZP* могуће је испитати помоћу *AFM* и *AFS* на *ZP* изолованом из зрелих јајних ћелија говечета. *Papi et al* (2009) су реконструисали одговор мембране *ZP* на механички напон користећи модификовани *Hertz*-ов модел контактних напрезања. Дејством механичке силе на *ZP* зреле јајне ћелије говечета помоћу *AFM*-а и коришћењем модификованог *Hertz*-овог модела *Papi et al*, (*Papi et al*, 2009) су добили вредности *Young* - овог модула *ZP* од $E=25\pm 8$ kPa. Промене механичких својстава *ZP* се дешавају паралелно са комплексним биохемијским реакцијама у *ZP*.

Експериментално, при дејству силе малог интензитета, мембрана испољава еластична својства (*Young* - ов модул еластичности, 22 ± 5 kPa). При већим интензитетима силе, мембрана испољава пластична својства (својства пластичне деформације). Критична вредност силе при којој се дешава пластична деформација је $F=2.1\pm 0.4$ nN и угиб мембране од $\delta=550\pm 50$ nm. Ова критична вредност силе и деформације одговара двама слојевима *ZP* између којих постоје нековалентне везе између гликопротеина који је сачињавају. Ове везе имају дуг полуживот (*Papi et al*, 2009).

2.4. Механички теоријски модели коришћени у израчунавању *Young* - овог модула еластичности *ZP*

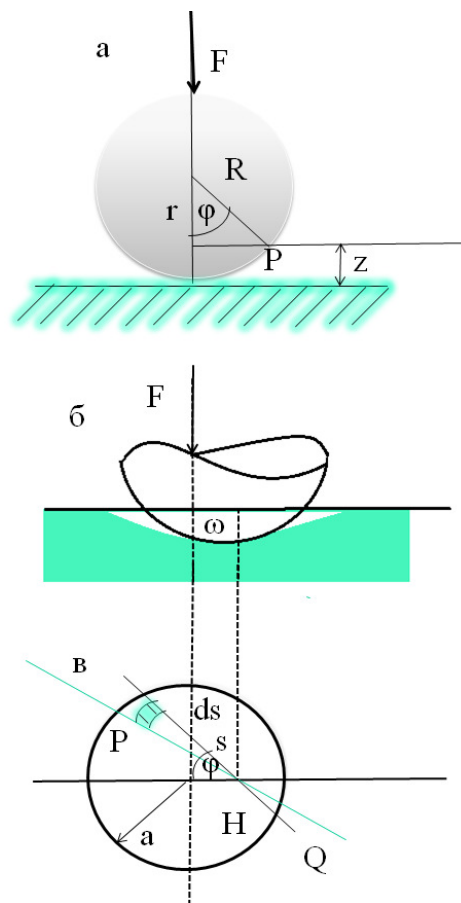
2.4.1. *Point-Load Model* биомембране (модел биомембране са оптерећењем у тачки)

Модел подразумева да је мембрана у виду танког филма, а да цитоплазма обезбеђује хидростатски притисак са унутрашње стране мембране. Биомембрана окружује течност–цитоплазму која прави једнак хидростатски притисак на мембрану; запремина ћелије се не мења. Биомембрана има занемарљиву савојну крутост, тако да деформитет мембране настаје само истезањем мембране. Биомембрана је линеарно еластична. Ћелија не поседује иницијални напон мембране или резидуални напон. Модел почиње планарном циркуларном површи са резидуалним напоном који је једнак нули (*Sun et al, 2005*).

"Механизми структурне реорганизације *ZP* који доводе до повећања биомеханичке чврстоће нису још увек познати у потпуности." (*Sun et al, 2005*).

2.4.2. Модификовани *Hertz*-ов модел

Класична *AFM* анализа базира се на примени класичне *Hertz*-ове теорије контакта која подразумева да је материјал линеарно еластичан, да је напрезање бескрајно, да се у контакту јавља бесконачно велики контактни напон, да су дебљина и величина узорка бескрајне, да је површина контакта мала, да је индентер са идеално глатком сферном површи, (Слика 2.11). У стварности, већина биолошких материјала испољава нелинеарно понашање, *AFM* игле производе велике деформације и модел полулопте не може да се примен на танке биолошке мембране (*Voscaccio et al, 2012*).



Слика 2.11. Контакт круте кугле и еластичног полупростора. Нацртано према (Rašković, 1985).

Према модификованом *Hertz*-овом моделу у експерментима који користе *AFM* технику (Papi et al, 2009, 2010, 2012, 2013) сила која изазива угиб ZP израчуната је по формули:

$$F(\delta) = \frac{2E \tan \alpha}{\pi(1-\nu^2)} \delta^2 \quad (2.8)$$

то је истовремено и сила реакције која настаје као одговор мембране на спољашњу силу а израчунанта је према *Hooke*-овом закону $F=k_c \Delta$, k_c – коефицијент крутости конзолне греде - константе растезања носача сонде 0,038N/m (на основу калибрације), E је *Young*-ов модул еластичности, ν је

Poisson-ов коефицијент попречне контракције (узета вредност 0,33), α је угао полуотварања врха сонде $\alpha=15^\circ$ (одређен са слика начињених електронским микроскопом), δ је угиб ZP $\delta=Z-\Delta$.

Hertz-ова теорија контакта се може објаснити на примеру притиска круте кугле на еластични полупростор: када на куглу дејствује централна концентрисана аксијална сила F , настаје деформација полуравни $z=0$, па је пројекција додирне површи кугле и полуравни круг полупречника a (због симетрија у односу на Oz осу). Слика 2.11в. Да би се одредио угиб неке тачке H у области контактне површине користи се поступак одређивања оптерећења по контури полубескрајног тела-равномерно оптерећење по кругу (*Rašković, 1985*). Специфично оптерећење по јединици површине круга је:

$$p = F / a^2 \pi \quad (2.9)$$

Угиб неке тачке H контурне равни, која се налази у кругу оптерећења, се добија када се кроз тачку H повуку две врло блиске сечице те је елементарна површина једнака:

$$dA = ds ds \varphi \quad (2.10)$$

на њу дејствује сила:

$$dF = p dA = p ds ds \varphi \quad (2.11)$$

те је угиб w

$$w = \frac{1-\nu^2}{\pi E} \iint p ds ds \varphi \quad (2.12)$$

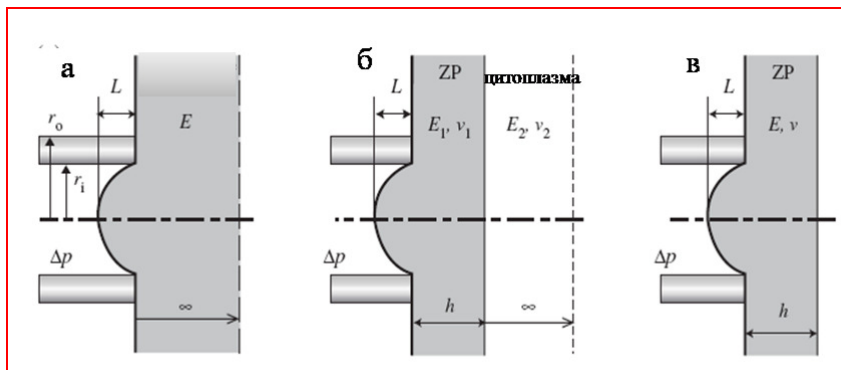
где су ν -*Poisson*-ов коефицијент и E - *Young*-ов модул еластичности.

уколико се узме да је $w = w_0 - z$ (w_0 је угиб средишта круга у тачки додира O , z - првобитно вертикално растјање тачке P од контурне равни), проблем се своди на оптерећење круга притиском по полулопти.

Khalilian et al (2010) су мерили *Young*-ов модул еластичности хумане и мишије *ZP* пре и после оплодње, аспирационом микропипетом. Добијене вредности су имплементирали у три теоријска модела:

1. модел полулопте-јајна ћелија је замишљена као еластична некомп्रेसибилна полулопта;
2. слојевити модел-јајна ћелија је замишљена као еластични компресибилни двослој;
3. модел опне- јајна ћелија је замишљена као еластична компресибилна лопта (*Khalilian et al, 2011.*)

Математички модели промене механичких својстава *ZP* у експериментима са аспирационом микропипетом приказни су на Слици 2.12.



Слика 2.12. математички модели *ZP*: а) модел полулопте. б) слојевити модел, в) модел шупље сфере. E -*Young*-ов модул еластичности материјала, ν - цитоплазма L -аспирациона дужина, Δp примењени негативни притисак, h -дебљина *ZP*, r_1 - унутрашњи пречник микропипете, r_0 -спољашњи пречник микропипете. Преузето из (*Khalilian et al, 2011.*)

У моделу полулопте ZP је изотропни, некомп्रेसибилни еластични материјал у облику полулопте. (Слика 2.12а) Код слојевитог модела ZP је компресибилни хомогени, еластични слој ($E1$) одређене дебљине h који се налази преко изотропног, хомогеног еластичног материјала у облику полулопте кој представља цитоплазму (E_2 и ν_2) (Слика 2.12б). У моделу шупље свере ZP је моделована као компресибилна (ν) слојевита полулота са претпоставком да цитоплазма има чврстоћу нула тако да је ZP еластична шупља свера дебљине h . (Слика 2.12в).

У моделу полопте $Young$ -ов модул еластичности се израчунава по формули:

$$E = \varphi(\eta) \frac{3r_i}{2\pi} \left(\frac{\Delta p}{L} \right), \quad \eta = \frac{r_0 - r_i}{r_i} \quad (2.13)$$

где је $\varphi(\eta)$ функција зида узета као $\varphi=2,1$; r_i је унутрашњи полупречик микропипете, p притисак на површину ZP , L је еквивалентна дужина ZP .

2.4.3. Модел хипереластичне греде у комбинацији са *Arruda-Boyce*-овим моделом полимера

Модел хипереластичне греде

Vossaccio et al (2012, 2014) су извели експерименте на изолованим ZP -ама које потичу од зреле и оплођене јајне ћелије говечета мерењем механичког одговора ZP при притиску игле *AFM* коришћењем нелинеарне анализе методе коначних елемената. Аутори наводе да ова метода укључује нелинеарност процеса, хипереластично понашање и хетерогеност материјала. *Vossaccio et al*, (2012) су показали поређењем три хипереластична конститивна модела ZP (двопараметарски *Mooney-Rivlin* (*MR*)-ов модел, нео *-Hook*-ов (*NH*) модел и *Arruda-Boyce* (*AB*)-ов осмоланчани модел (*Arruda & Boyce*, 1993) да се експериментални резултати који описују структурно понашање ZP на механичку силу- механички одговор, најбоље уклапају у *Arruda-Boyce*-ов осмоланчани модел. С обзиром да се након оплодње $Young$ -ов модул еластичности унутар

дебљине *ZP* нагло мења код свих врста, да код свиње постоји некомплетна или одложена кортикална реакција која доводи до полиспермије и да недостатак биохемиског очвршћавања није повезан са недостатком мехничког очвршћавања од значаја је каква је пропација рекације очвршћавања кроз дебљину *ZP* (*Vossaccio et al. 2012, 2014*).

Изоловане су *ZP* из зрелих и оплођених јајних ћелија говечета и мерени механички одговор посебно за унутрашњи а посебно за спољашњи део *ZP* - да би направили хипереластични модел који описује промену механичких својстава *ZP* пре и после оплодње али која укључује промену кроз целу дебљину *ZP*.

Vossaccio et al. (2012) су *ZP* моделовали као некомп्रेसибилну хипереластичну плочу дугу 60 mm и дебелу 10 mm користећи метод коначних елемената. Контакт између *ZP* и *AFM* игле је узет као африкциони.

***Arruda-Boyce*-ов модел полимера**

Arruda-Boyce-ов осмоланчани модел се користио за описивање механичког понашања биолошких узорака као што су мрежа колагених влакана и једнослој епителних ћелија. Модел се заснива на статистичкој механици и репрезентативном запремиском елементу у виду коцке који поседује 8 ланаца дуж дијагоналних позиција праваца. Очвршћавање некомп्रेसибилног материјала под дејством спољне силе се може предвидети на основу две константе: модула смицања μ_{chain} и растељивости λ_L .

Функција енергије деформације се описује помоћу следећег израза :

$$W = \mu_{chain} \left[\frac{1}{2}(\bar{I}_1 - 3) + \frac{2}{20\lambda_L^2}(\bar{I}_1^2 - 9) + \frac{33}{1050\lambda_L^4}(\bar{I}_1^3 - 27) + \frac{76}{7000\lambda_L^6}(\bar{I}_1^4 - 81) + \frac{519}{673750\lambda_L^8}(\bar{I}_1^4 - 243) \right] \quad (2.14)$$

У софтверском алату *ABAQUS* се уносе вредности модула смицања μ_{chain} и растељивости λ_L и израчунава се *Young*-ов модул еластичности по формули:

$$E_{8chain} = 2(1 + \nu)\mu_{8chain} \quad (2.15)$$

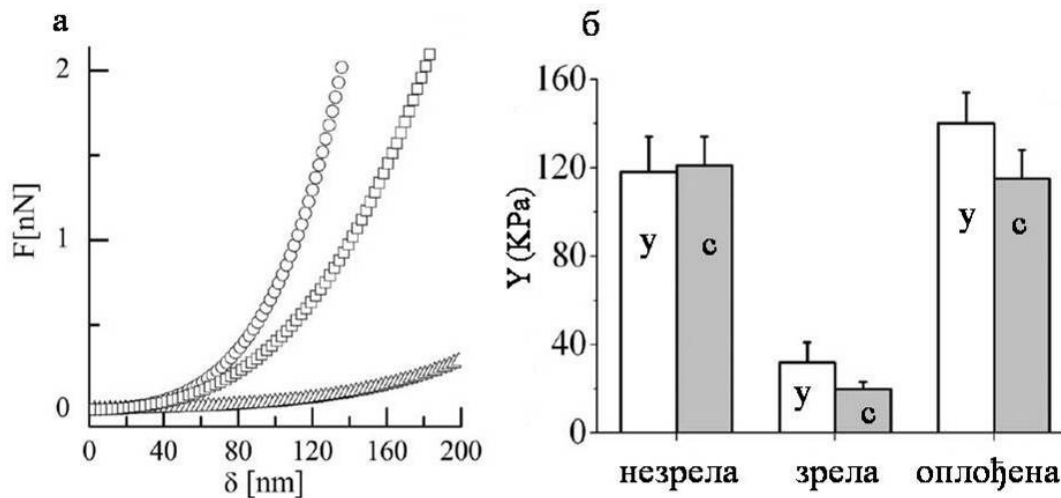
Рађена је анализа крива угиба *ZP* зреле и оплођене јајне ћелије говечета на основу модификованог *Hertz*-овог модела за коничну иглу *AFM*-а израчунавањем силе која изазива угиб *ZP* по формули (2.8). Вредности *Young*-овог модула за *ZP* зреле јајне ћелије говечета добијене овим поступком су: (18.5±1.58) кПа; (145.45±14.06) кПа за унутрашњи и спољашњи (123.51±12.74) кПа слој *ZP* оплођене јајне ћелије говечета.

Анализа криве сила-померај из експеримента са аспирационом микропипетом, где се за моделовање *ZP* користи теорија еластичности примењена на слојевиту љуску (*Khalilian et al, 2011* по *Vossaccio et al, 2012*). Овом методом се могу одредити само средње вредности еластичних својстава *ZP*.

Vossaccio et al, (2012) су био-материјал *ZP* као узорак за експеримент моделовали као хипереластичну плочу која се састоји од 5 слојева користећи методу коначних елемената и *Arruda–Boyce*-ов осмоланчани модел. Користећи софтвер за оптимизацију у софтверском алату програму *ABAQUS* одредили су вредности модула смицања и растегљивости за два слоја близу унутрашњег односно спољашњег дела *ZP*. За средњи слој су узели апроксимацију да се његова механичка својства мењају линеарно од спољашњег ка унутрашњем слоју. Симулиран је угиб мембране од 200 nm. Средња вредност *Young*-овог модула еластичности *ZP* оплођене јајне ћелије говечета одређена овом методом је око 22 кПа. *Vossaccio et al, (2012)* су установили да се чврстоћа *ZP* нагло мења на 100nm дебљине што може да буде повезано са растојањем на коме су повезани филаменти *ZP*.

2.5 Механичке особине ZP

Промене механичких својстава ZP се дешавају у току сазревања јајне ћелије али и након оплодње, и захватају целу дебљину ZP (Слика 2.13) и могу бити повезане са ултраструктурним реаранжманом филамената као је предложио Green 1997. (Boccaccio et al, 2012, Papi et al, 2012).



Слика 2.13. а.Криве сила/угиб-еластична сила реакције која се јавља при угибу ZP који настаје под дејством AFM игле на спољашњу површину ZP зреле неоплођене (троугласта крива), на спољашњу површину оплођене (крива са квадратићима) и на унутрашњу површину ZP оплођене јајне ћелије (крива са кружићима) говечета. б. Хистограм Young-овог модула еластичности за унутрашњу (у) и спољашњу (с) површину зреле, незреле и јајне ћелије оплођене у *in vitro* условима. Преузето из (Papi et al, 2012).

У експерименту (Papi et al, 2012), је коришћена брзина кретања AFM игле 3mm/s, угиб мембране 100nm, мале деформације и Hertz-ов модел и теорија контактне механике за објашњење одговора ZP на примењену механичку силу. Реактивна сила ZP изражена помоћу Young-овог модула по формули (2.8). Енергија E_{pl} неопходна за пластичну деформацију ZP при критичном угибу се може израчунати на основу формуле:

$$E_{pl} = \int_0^{\delta_{\text{porušitnja}}} F(\delta) d\delta \quad (2.16)$$

где је $F(\delta)$ -сила која изазива деформацију ZP тј угиб δ ZP и износи $(3.8 \pm 0.7)10^{-16}$ J за спољашњи слој ZP зреле јајне ћелије говечета и $(6.4 \pm 0.6)10^{-16}$ J за спољашњи слој ZP оплођене јајне ћелије говечета.

Young-ов модул еластичности спољашњег и унутрашњег слоја ZP у истом стадијуму сазревања јајне ћелије говечета (незреле, зреле и оплођене јајне ћелије) се међусобно не разликују статистички значајно, али се *Young*-овог модул еластичности значајно смањује код ZP зреле јајне ћелије у односу на незрелу и то је израженије у спољашњем слоју ZP . (са $E = 121 \pm 13$ kPa на $E = 20 \pm 3$ kPa за спољашњи слој, и са $E = 118 \pm 16$ kPa на $E = 32 \pm 9$ kPa за унутрашњи слој ZP). Код оплођене јајне ћелије *Young*-ов модул еластичности поново расте у односу на зрелу неоплођену јајну ћелију и у спољашњем ($E = 115 \pm 13$ kPa) и у унутрашњем слоју ($E = 140 \pm 14$ kPa). (*Papi et al, 2012*)

Табела 2.3. Дужина (FL) и дебљина (FT) филамената у унутрашњем и спољашњем слоју ZP у одговарајућем стадијуму изражена у nm. Преузето из (*Papi et al, 2012*).

Незрела јајана ћелија говечета		Зрела јајна ћелија говечета <i>in vivo услови</i>		Оплођена јајна ћелија говечета		
	Унутрашњи део ZP	Спољашњи део ZP	Унутрашњи део ZP	Спољашњи део ZP	Унутрашњи део ZP	Спољашњи део ZP
L	53,1±3,2	57,1±4,2	56,5±2,1	111,8±5,1	50,1±2,9	81,2±6,0
T	10,7±0,1	10,4±0,2	10,4±0,2	9,6±0,2	11,2±0,2	10,7±0,2

Трансмисионим електронским микроскопом је утврђено да је распоред филамената унутрашњег и спољашњег слоја ZP у оквиру различитих стадијума сазревања јајне ћелије говечета различит. Дебљина и дужина фламената се мењају у оба слоја са процесом сазревања. Све добијене разлике су статистички значајне. Види Табелу 2.3. (*Papi et al, 2012*). Промене су израженије у

филаментима спољашњег слоја-филаменти су скоро дупло дужи и нешто дебљи код *ZP* зреле јајне ћелије у односу на *ZP* незреле јајне ћелије да би се код оплођене јајне ћелије филаменти спољашњег слоја скратили али не на дужину пре оплодње (дужи су у односу на стање пре оплодње) (*Papi et al, 2012*).

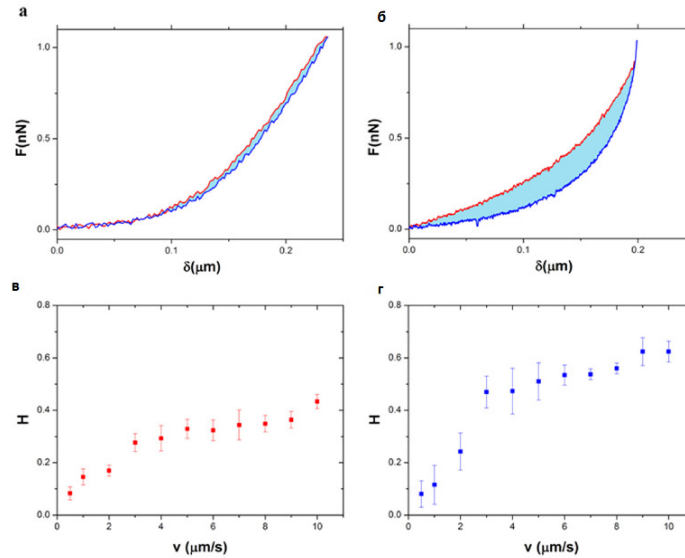
Досадашњи модели су разматрали *ZP* као идеално еластично тело занемаривши вискозна својства и енергију дисипације. *Papi et al, (2013)* први пут укључују енергију дисипације у свој модел. У испитивању механичког одговора *ZP* свиње и кобиле *Papi et al, (2013)* су применили технику *AFM*-а. Ове две врсте су анализирание због разлике у степену полиспермије коју показују у *IVF* протоколима. Код кобиле је степен полиспермије веома низак и она има најмањи *Young*-ов модул еластичности у односу на друге мерене врсте док је код свиње полиспермија веома изражена и има висок модул еластичности. Варирана је механичка сила која се примењује на површину *ZP* променом брзине кретања *AFM* игле од 0.5 $\mu\text{m/s}$ до 10 $\mu\text{m/s}$. Примењен је *Hertz*-ов модел (једначина 2.8) а апроксимација-је да је *ZP* замишљена као полу-бесконечно, изотропно и хомогено еластично тело. Са повећањем брзине кретања игле *AFM* расте и сила реакције *ZP* код обе врсте, што је у складу са примењеном формулом. Као што је и очекивано апсолутне вредности силе која настаје као одговор *ZP* на механички напон је већа код *ZP* свиње у односу на *ZP* кобиле за исту брзину кретања *AFM* игле. Види слику 2.14. *Young*-ов модул еластичности *ZP* је знатно већи код *ZP* кобиле него код *ZP* свиње. Ова разлика се може приписати разлици у структурној и молекуларној организацији *ZP* кобиле и свиње. (*Papi et al, 2013*).

Да би квантификовали удео дисипативних сила у мехничком одговору *ZP* на *AFM* иглу рачунали су енергију расипања за време деформације *ZP* или хистерезу *H* по формули:

$$H = \frac{\int_0^{\delta} F_E(\delta)d\delta - \int_0^{\delta} F_R(\delta)d\delta}{\int_0^{\delta} F_E(\delta)d\delta} = \frac{A_E - A_R}{A_E} \quad (2.17)$$

$F_E(d)$ је сила издужења, $F_R(d)$ - сила реакције ZP , A_E –површина испод $F_E(d)$ криве, A_R –површина испод $F_R(d)$ криве δ –угиб ZP .

Разлика између силе издужења и силе реакције се повећава са повећањем дејствујуће силе Слика 2.14.а и б.а за исте вредности дејствујуће силе већа је код кобиле. Слика 2.14.в и г.



Слика 2.14. Криве напон-издужења (угиб) ZP свиње при брзини кретања AFM игле од а) $0,5 \mu\text{m/s}$ б) $5 \mu\text{m/s}$. Површина између две криве одговара енергији расипања. Запажа се да је енергија расипања (хистерезис- H) већа када се на ZP дејствује AFM већом брзином и код ZP свиње в) и код ZP кобиле г). Преузето из (Papi et al, 2013).

Виско-еластични одговор ZP на механичку екстерну силу Papi et al. (2013) су описали помоћу Zener- овог (SLS модела) реолошког модела. Слика 2.1. Овај модел се стандардно користи за описивање материјала који имају истовремено својства пузања и релаксације. Паралелно везана опруга има крутост k и обезбеђује равнотежу која остаје након релаксације у Maxwell-овим елементу. Модел се користи за описивање вискоеластичних својстава биополимера. Еластична својства полимера настају јер се ланци биомолекула који га сачињавају растежу, вискозна компонента настаје јер молекули клизе један преко других.

Овај једноставан модел комбинује *Hooke*-ов закон еластичности чврстог материјала и Њутнов закон вискозности флуида (*Papi et al, 2013*). У овом моделу апроксимација је да су напон и истезање адитивни.

Сила реакције полимера на дејство механичке спољне силе за гранични услов да $F(z=0) = 0$ и константну брзину v се може описати једначином:

$$F(z) = k_e z + \eta v - \eta v e^{-\frac{k_e z}{\eta v}} \quad (2.18)$$

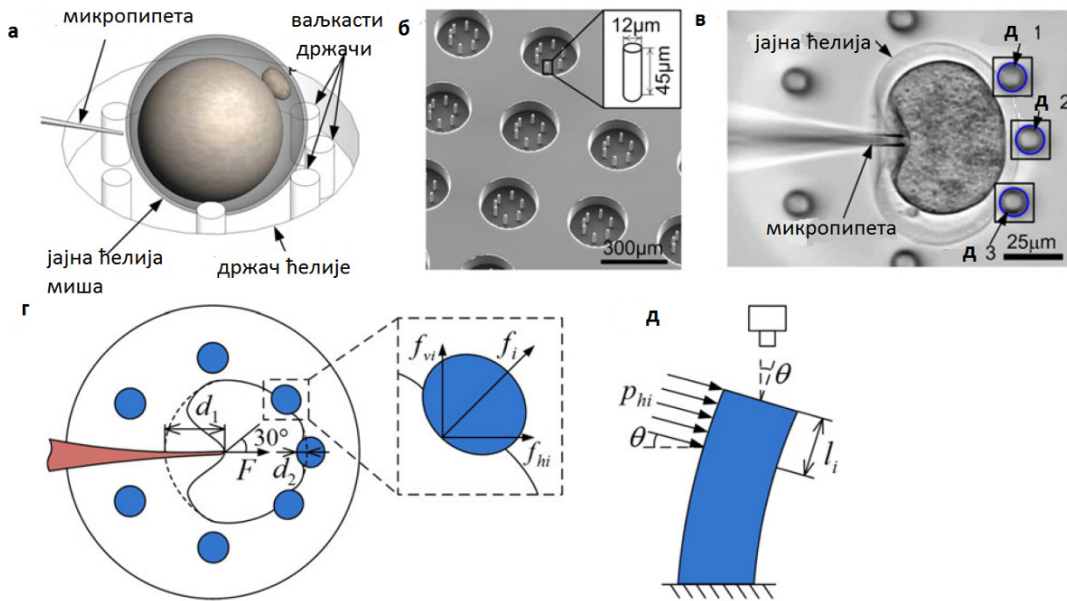
Где су k -коэффицијент крутости *Hooke*-овог еластичног тела η -коэффицијент вискозност *Maxwell*-овог елемента v -брзина, z -издужањење реолошког модела.

За веома мале брзине $F(v \rightarrow 0)$ сила је сразмерна $F(z) \sim k_e z$; за веома велике брзине $F(v \rightarrow \infty)$ брзина значајно доприноси вискозности нелинеарно повећавајући силу реакције полимера до неке граничне вредности неког платоа. Слика 2.2. $F(v \rightarrow \infty) \sim (k_e + K)z$. У практичном смислу модел може да објасни појаву стерилитета код случајева где је проценат хиперактивних сперматозооида (имају велику брзину) у ејакулату повећан. Када сепрматозооиди великом брзином ударе о површину *ZP*, сила реакције *ZP* биће велика и доћи ће до изражаја вискозна својства *ZP* те њено такво механичко стање није повољно за пенетрацију сперматозооида (*Papi et al, 2013*).

2.6. Промене еластичних својстава јајне ћелије са старењем јединке

Liu, et al, (2010, 2012) су испитивали еластичност целе јајне ћелије (не само њеног спољњег омотача *-ZP*) миша које потичу од младих (8-12 недеља) односно старих (40-45 недеља) јединки користећи еластичне ћелиске држаче направљене од полидиметилсилоксана (*PDMS*), микроињекциону технику и компјутерски алгоритам са визуелним праћењем који реконструише ћелијске силе у реалном времену са резолуцијом од 2nN на 30Hz. Систем мери силу деформације целе ћелије. Слика 2.15. *PDMS* ћелијски држачи су израђени техником литографије и

садрже еластичне постове мале чврстоће. *PDMS* је полимер (провидан, мале чврстоће и добре биокompatibilности) који је у широкој употреби као ћелијски сензор који се пасивно деформише на примену силе и служи за мерење силе примењене на ћелије. Следи укратко опис принципа мерења:



Слика 2.15. а. Принцип рада система за мерење одговора јајне ћелије миша на дејство механичке силе. а. Јајна ћелија се налази у калупу од полидиметилсилоксана (*PDMS*) окружена ваљкастим држачима од *PDMS*. Са једне стране јајну ћелију притиска врх стаклене микропипете. б. Слика држача за већи број јајних ћелија начињен од полидиметилсилоксана (*PDMS*) начињена *SEM*-ом. в. Притиском микропипете деформише се јајна ћелија и гура ваљкасте држаче пут споља. Савијање ваљкастих држача се мери визуелним праћењем померања ваљкастих држача-д. г. Баланс сила која при том делују на ћелију. д. Модел дефлексије ваљкастих држача. Преузето из (*Liu et al, 2012*).

Јајне ћелије просечног пречника $96 \mu\text{m}$ се ставе у ћелијски носач дијаметра $12 \mu\text{m}$ и висине $45 \mu\text{m}$. Затим се помоћу микроигле изазове деформација јајне ћелије до угиба ћелије од $25 \mu\text{m}$ брзином од $60 \mu\text{m/s}$. Долази до деформације ћелије као што је приказано на слици 2.15в, г. Ћелија се деформише и на супротној страни од

микроигле савија ваљкасте делове ћелијског држача. На основу дефлексије ваљкастих држача која се мери специјалном камером израчунава се деформација ћелије као и сила која је деформише помоћу одговарајућег аналитичког механичког модела и софтвера.

На основу силе која деформише ваљкасте делове ћелијског држача израчунава се сила која је преко микроигле деформише јајну ћелију (*ZP* и цитоплазму). Узето је да је јајна ћелија идеално еластично тело јер се сматра да је време сувише кратко да би дошло до пузања или релаксације ћелије.

Сила која преко микро игле деформише јајну ћелију F је у равнотежи са хоризонталном компонентом силе која деформише постове f_{hi} :

$$F = \sum_{i=1}^3 f_{hi}, \quad i = 1,2,3 \quad (2.19)$$

$$f_{hi} = p_{hi} a_i, \quad i = 1,2,3 \quad (2.20)$$

Где је p_{hi} интензитет хоризонталне силе, a_i контактна дужина.

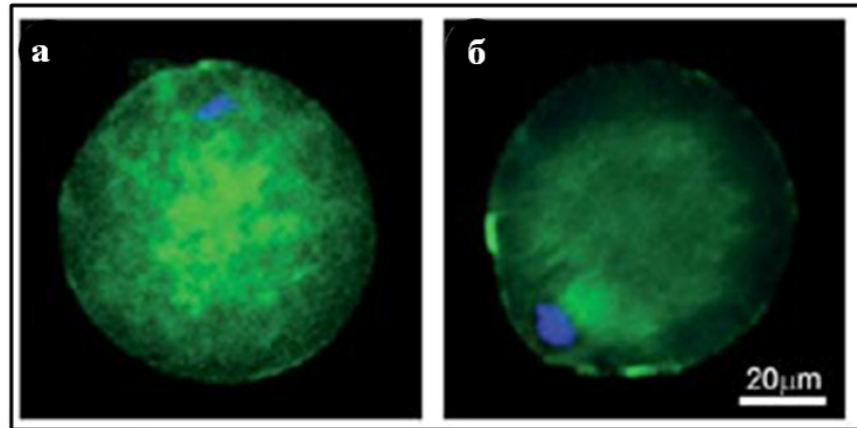
Интензитет хоризонталне силе у зависности од дефлексије ваљкастих држача рачунат је по формули:

$$p_{hi} = \frac{\delta_i}{\frac{40a_i(1+\nu)(2H-a_i)}{9\pi ED^2} + \frac{8(a_i^4 + 8H^3a_i - 6H^2a_i^2)}{3\pi ED^4}}, \quad i = 1,2,3 \quad (2.21)$$

Где је δ_i хоризонтална дефлексија D и H дијаметар и висина поста, E - *Young*-ов модул еластичности а ν -*Poisson*-ов коефицијент попречне контракције за *PDMS* који износи 0,5.

Резултати ових мерења су показали да се са старењем ћелије смањује њена еластичност ($6,4 \pm 1,3 \text{ Nn}/\mu\text{m}$ за ћелије које потичу од младих јединки и $3,3 \pm 0,9 \text{ Nn}/\mu\text{m}$ за јајне ћелије старих јединки) што је у корелацији са количином еластичних влакана у цитоплазми. Са старењем ћелија синтетише мању количину *F*-актина (*Liu, et al, 2010*) Слика 2.16.а мања количина *F*-актина у цитоплазми значи и мању еластичност целе ћелије.

Важно је напоменути да постоји извесна уска зона преклапања вредности чврстоћа (између 4,4 и 4,83Nп/μm) јајних ћелија које потичу од младих и старих јединки које обухвата неких 10% јајних ћелија младих јединки и 15% ћелија старих јединки.



Слика 2.16. Садржај *F*-актина мерен флуоресцентном методом код јајних ћелија миша које потичу од а) младих и б) старих јединки. зелено- *F*-актин плаво-једро. Преузето из (Liu, et al, 2010).

SEM анализа *ZP* јајних ћелија које потичу од младих (8-12 недеља-20 узорак) и старих (40-45 недеља-20 узорак) јединки је показала да *ZP* јајних ћелија које потичу од младих јединки има сунђерасту структуру са многобројним порима. Овакав изглед показује само 20% анализираних јајних ћелија које потичу од старих јединки. Осталих 80% јајних ћелија које потичу од старих јединки има грубу структуру *ZP* без пора, што је у складу са добијеним вредностима чврстоће ћелија за ове две групе у претходним истраживањима (Vanroose et al, 2000, Familiari et al, 2006, Michelmann et al, 2007, Martinova et al, 2008)- дебљина *ZP* јајних ћелија старих и младих јединки се не разликује битно ($7,1 \pm 3 \mu\text{m}$ наспрам $6,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$). Структурном анализом *ZP* помоћу *TEM*-а је показала да је густина *ZP* гликопротеина већа код јајних ћелија које потичу од млађих јединки (Liu, et al,

2010) што би било у складу са резултаима анализе чврстоће јајних ћелија јединки различите старости.

F-актин у цитоплазми је бојен флуоресцентном бојом-фалоидин коњугованим флуоресцеин изотиоцијанатом. Посматра се и слика флуоресцентним микроскопом и квантификује количина *F*-актина у цитоплазми код младих и старих јајних ћелија. Претопставка је да се структура цитоскелета мења са старењем (јер се мења активност гена и генска експресија са старењем) а да то утиче на механичка својства јајне ћелије (*Liu, et al, 2010*).

Користећи исту методологију (*Liu, et al, 2012*) су испитали еластична и вискоеластична својства јајних ћелија миша које потичу од младих и старих јединки. Еластична својства су сагледана преко *Young*-овог модула еластичности а виско-еластична својства преко модула релаксације, релаксационог времена и модула еластичности материјала у почетном тренутку. Сви наведени параметри осим времена релаксације су већи код јајних ћелија миша које потичу од млађих јединки. Време релаксације је дуже код јајних ћелија које потичу од старијих јединки, што указује да се са старењем повећавају вискоеластична својства ћелија. Види Табелу 2.4. Разлика у односу на претходи експеримент: брзина убадања иста $60 \mu\text{m/s}$, при угибу од $40\mu\text{m}$ (око 40% дијаметра ћелије) задршка од 45s, а затим следи релаксација ћелије. Узето је као да су у питању велике деформације јер се деформише преко 10% запремине ћелије.

Тест напон-релаксација након деловања микропипете

Liu, et al, (2012) су дали и механички модел деформације јајне ћелије приликом убадања уз фиксну подршку користећи метод коначних елемената. Јајна ћелија је моделована као нестишљива, изотропна, осносиметрична и континуална сфера. Гранични услови које су користили: ваљкасти држачи су ригидни цилиндри, дуж *x* и *z* осе симетрије нема транслације а дуж *y* осе нема ротације. Контакт између јајне ћелије и ваљкастих држача је без трења, основни елемент је у виду осмочворне линеарне цигле, густина елемената је највећа у контактаној регији.

Табела 2.4. Еластичне и вискоеластичне особине јајних ћелија миша које потичу од младих и старих јединки. $p^* < 0,001$. Преузето из (Liu, et al, 2012).

Тип јајних ћелија	Еластичне особине	Виско-еластичне особине		
	<i>Young</i> -овог модула еластичности E (кПа)	Модул еластичности материјала у почетном тренутку E_0 (кПа)	Модул релаксације E_R (кПа)	Време релаксације (s)
Младе јединке	3,1±0,4	5,2±0,5	2,7±0,4	2,3±0,2
Старе јединке	1,6±0,4*	2,2±0,6*	1,0±0,3*	4,0±0,6*

Криве сила-време настале у периоду релаксације ћелије указују на вискоеластична својства јајне ћелије.

Стандардни вискоеластични модел који је коришћен у раду (Liu, et al, 2012) се описује изразом:

$$E(t) = (E_0 - E_R) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + E_R \quad (2.22)$$

где је $E(t)$ модул еластичности, E_0 модул еластичности материјала у почетном тренутку кад $t=0$, E_R је модул еластичности утернутку релаксације кад је $t \rightarrow \infty$, τ је време релаксације. Најпре је уклапањем података сила-време и константе деформације за време релаксације одређен укупни модул еластичности јајне ћелије $E(t)$, па су затим те вредности замењене у горе поменути једначину да би се добиле вредности вискоеластичних параметара (Liu et al, 2012).

Vossaccio et al, (2014) такође посматрају *ZP* као структуру која има виско-еластична својства. Испитивали су вискоеластична својства изоловне *ZP* свиње – на плочици комбинујући вредности *AFM* мерења и инверзну анализу методе коначних елемената, (нелинеарну анализу методом коначних елемената и нелинеарну оптимизацију помоћу софтвера). Хипереластично понашање *ZP* је описано помоћу *Arruda-Boyce*-овог конститутивног модела а вискозно помоћу *Prony* -јеве серије експанзије бездимензионих релаксационих модулуса. *ZP* је моделована као некомп्रेसибилна виско-хипереластична плоча дуга 30 mm и дебела 6 mm. Део поступка је сличан као и у (*Vossaccio et al, 2012*) с том разликом што су у (*Vossaccio et al, 2014*) поред модула смицања и растегњивости

одређивани и параметри вискозности - *Prony*-јева константа и време релаксације упоређивањем експерименталних резултата добијених *AFM*-ом, њиховим фитовањем у теоријски модел помоћу софтверског алгоритма. Модул смицања расте са порастом брзине убадања *ZP AFM* иглом (*Boccaccio et al, 2014*). Степен варијације вредности *Young*-овог модула еластичности за статички случај коришћењем *Arruda-Boyce*-овог модела за некомп्रेसибилне материјале је сразмеран степену варијације као да се користи класичан *Hertz*-ов модел (*Boccaccio et al, 2014*).

3. Моделовње осцилаторног понашања *zona-e pelucida-e* миша пре и после оплодње

С обзиром да се подаци о вредности модула еластичности *Zona-e Pelucida-e* зреле јајне ћелије и оплођене јајне ћелије разликују за исту врсту у зависности од примењене технике и коришћеног механичког модела за експериментална мерења, дошли смо на идеју да се *ZP* може проучавати са становишта осцилаторног система. У том случају требало би најпре дефинисати услове под којима долази до стварања повољних кинетичких параметара и услова вероватне оплодње са биомеханичког становишта. То би допринело бољем сагледавању процеса промене кинетичких параметара и механичких својстава *ZP-e* током оплодње, услова удара и судара сперматозоида у *ZP-у* и употпунило биохемијски модел оплодње, дајући му нову димензију. У овом поглављу ће бити представљен математички модел сферне осцилаторне мреже *ZP* за случај слободних и случај принудних осцилација. Модел може да објасни нелинеарно осцилаторно понашање *ZP*.

Општи научни циљ дисертације је постављање биомеханичког осцилаторног модела *ZP* миша, одређивање минималног скупа сопствених кружних фреквенција осциловања *ZP-e*, фреквентна анализа, као и одређивање услова настанка резонанције, као и синхронизација кретања чворних материјалних тачака (молекула) осцилаторног модела *ZP-e*.

Посебни циљеви дисертације су:

- Дефинисати основне поставке и кинетичке параметре модела апстракције реалног система динамике *ZP-e* и одговарајуће апроксимације и ограничења. Поставити једнослојни модел осцилаторне сферне мреже *ZP-e* миша коришћењем знања из теорије осцилација, аналитичке механике и нелинеарне динамике примењене на биолошке системе са одговарајућим кинетичким параметрима, уз дефинисање ограничења примене модела.
- За претходно постављене системе диференцијалних једначина и добијене аналитичке изразе за решења или апроксимације решења урадити нумеричку симулацију померања карактеристичних материјалних тачака

модела када систем осцилује у слободном, као и принудном мултифреквентном режиму (одговара стању кад више сперматозооида удара у површину јајне ћелије) коришћењем одговарајућег софтверског програма

- Нумеричком анализом одредити услове под којима долази до резонанције између режима осциловања $ZP-e$ и удара једног, ако и скупа сперматозооида у мрежу
- Нумеричком анализом одредити потенцијалну слабу тачку или област у систему модела сферне мреже ZP_e и услове где би дошло до вероватног продирања сперматозооида.
- Методом *Lissajus*-ових кривих и атрактора синхронизације трајекторија материјалних тачака модела одредити услове синхронизације компонентних вишефреквентних осцилаторних кретања материјалних тачака (одговарају протеинима $ZP-e$) у сферном осцилаторном моделу $ZP-e$. Повезати биохемијски модел оплодње јајне ћелије и биомеханички осцилаторни модел оплодње.
- Дати основне поставке вишеслојног модела сферне осцилаторне мреже $ZP-e$.
- Методом коначних елемената на моделу континуалног слоја $ZP-e$ и коришћењем комерцијалног софтверског пакета *ANSIS* одредити неколико сопствених кружних фреквенција и дати одговарајућу анализу добијених резултата.
- Приказати основне закључке спроведених истраживања и добијених резултата.

3.2.Полазне хипотезе

Истраживање се заснива на примени основних хипотеза теорије линеарних и нелинеарних осцилација и методе дискретног континуума као и претпоставке о конститутивним релацијама понашања материјала *ZP* миша са одређеним апроксимацијама. Остале полазне хипотезе су:

1. *ZP* миша се може моделовати као осцилаторни систем у виду сферне једнослојне мреже која се састоји од нехомогених међусобно ортогоналних ланаца распоређених у меридијалном и циркуларном правцу, који су међусобно повезани чворним тачкама. Сферна мрежа има иста својства у циркуларном и меридијалном правцу. Сферна мрежа *ZP* миша је причвршћена за површину јајне ћелије еластичним односно виско – еластичним везама.
2. Јајна ћелија је сферно ригидно тело одговарајућих димензија.
3. Материјалне тачке у систему сферне осцилаторне мреже *ZP* миша одговарају молекулима који сачињавају *ZP* миша и распоређене су на специфичан начин у односу који одговара моларном односу тригликопротеина који сачињавају *ZP* миша.
4. Карактер веза између материјалних тачака система сферне осцилаторне мреже *ZP* миша се разликује пре и после оплодње јајне ћелије миша. Пре оплодње везе између материјалних тачака су идеално еластичне; после оплодње везе су виско-еластичне.
5. Материјалне тачке у систему сферне мреже *ZP* миша имају три степена слободе кретања (у циркуларном, меридијалном и радијалном правцу)
6. Систем сферне мреже *ZP* миша осцилује у слободном и принудном мултифреквентном режиму.
7. Принудни мултифреквентни режим је последица спољашњег континуираног утицаја већег броја сперматозооида на површину *ZP* миша.

3.3. Хипотезе специфичне за предмет истраживања

1. Карактеристике осцилаторног понашања ZP миша зависе од услова који владају у околини и претходног стања система сферне осцилаторне мреже ZP миша
2. Дефинисањем одговарајућег математичког модела, дискретизацијом помоћу методе дискретног континуума могу се одредити сопствени облици осциловања чворних материјалних тачака осцилаторног система ZP са прихватљивом тачношћу
3. Адекватним избором критеријума оптимизације и ограничења, могуће је одредити сопствене кружне фреквенције, амплитуде и резултујућа померања било које материјалне тачке у систему сферне осцилаторне мреже модела ZP миша.
4. Сперматозоид који осцилује у резонанцији са системом сферне мреже модела ZP миша има највећу вероватноћу да продре у ZP .
5. Применом савремених рачунарских ресурса могуће је одредити оптималне услове за настанак резонанције и продор једног сперматозоида кроз сферну мрежу модела ZP миша
6. Употребом методе *Lissajus*-ових кривих и атрактора синхронизације трајекторија чворних материјалних тачака модела могуће је одредити услове синхронизације компонентних кретања чворних материјалних тачака осцилаторног система ZP миша.
7. Уз одговарајућа ограничења и адаптације сферни осцилаторни модел ZP миша могуће је применити на ZP -у других сисара.

3.4. Методе истраживања

У истраживањима смо користили следеће приступе, методе и алате:

- Метода дискретног континуума биће коришћена за постављање модела апстракције реалног динамичког система ZP -е.
- Описивање динамике модела системима диференцијалних једначина осцилаторног кретања материјалних тачака модела сферне осцилаторне мреже ZP -е (Hedrih, 2011, Hedrih (Stevanović), 2004, 2006). Аналитичке методе решавања система диференцијалних једначина, као и методе одређивања аналитичких апроксимација решења.
- Аналитичке методе и сазнања теорије линеарних и нелинеарних осцилација за одређивање закона осциловања материјалних тачака модела, као и услова резонанције и потенцијално слабе тачке у систему мреже за продор једног сперматозоида кроз модел ZP -е и достизање кинетичких параметара и услова за вероватну успешну оплодњу.
- Метода *Lissajus*-ових кривих и атрактора синхронизације трајекторија материјалних тачака модела биће коришћена за одређивање услова синхронизације компонентних кретања материјалних тачака осцилаторног система ZP .
- За израду вишеслојног модела сферне осцилаторне мреже ZP биће коришћене у комбинацији аналитичке и нумеричке методе са пратећим софтверским алатима за серију нумеричких експеримената и визуелизацију резултата.
- Метода коначних елемената биће коришћена као алтернативна метода за проучавање осцилаторног понашања ZP -е као и динамике фриксионог контакта са сперматозоидом.

3.5. Моделовње осцилаторног понашања *zona-e pelucida-e* миша пре и после оплодње

Молекули у *ZP* мрежи се крећу у три ортогонална правца. Сваки правац представља мултифреквентне асинхроне нелинеарне осцилације које се могу приказати у виду просторних генералисаних *Lissajus*-ових кривих. Биће разматрана осцилаторна стања *ZP* модела која су повољна односно неповољна за оплодњу. Постоји могућност да се *ZP* може наћи у различитим осцилаторним стањима пре оплодње-од чисто периодичних осцилација до осциловања у режиму који је сличан хаотичном осциловању. Режим синхронизованог осциловања чворних молекула смо сматрали кинетички повољним стањима за потенцијалну пенетрацију сперматозоида кроз *ZP* и последичну оплодњу.

Процес оплодње је вишестепени процес, који подразумева интеракцију између јајне ћелије и сперматозоида и праћен је структурним модификацијама у глави сперматозоида и *ZP*-е (*Familiari et al 2008, Martinova et al, 2008*).

Након оплодње долази до "очвршћавања" *ZP*-е (у смислу повећане отпорности на протеолизу односно како је већ поменуто у претходним поглављима, треба више времена да би се *ZP* ензимски разложила, али и повећаног *Young*-овог модула еластичности), што за последицу има спречавање даљег продора других сперматозоида. Претпоставља се да је за овај феномен очвршћавања одговорна модификација *ZP*-гликопротеина, која настаје због ослобађања кортикалних гранула из јајне ћелије. За сада није могуће предвидети степен "очвршћавања" *ZP* јер зависи од броја активираних кортикалних гранула и ослобођеног садржаја из њих у перивителински простор и степена активције јајне ћелије (сазревање, оплодња). С обзиром да сви експериментални подаци указују да *ZP*- има вискоеластична својства после оплодње постављен је нелинеарни осцилаторни модел *ZP*.

Да би смо описали промене механичких особина *ZP* и њено осцилаторно понашање користили смо методу дискретног континуума и моделовали *ZP* као дискретну сферну мрежу у којој су елементи међусобно повезани нелинеарним еластичним и вискоеластичним везама. Биће укратко приказан математички модел, који описује нелинеарне слободне (сопствене-аутономне) и принудне

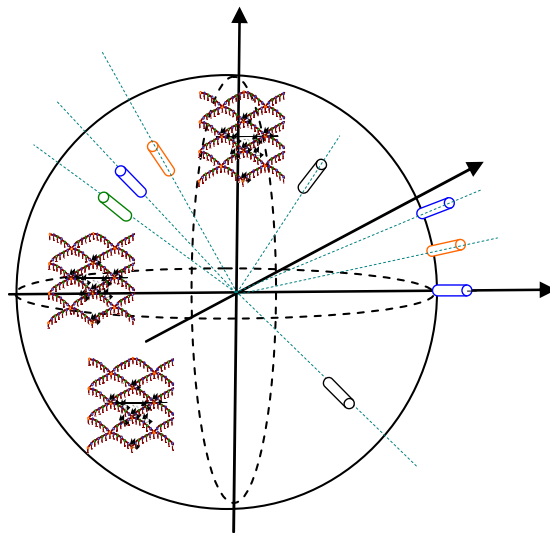
осцилације. Материјалне тачке у моделу одговарају гликопротеинима *ZP* миша и могу се кретати у три ортогонална правца. Сваки од праваца представља нелинеарне мултифрекветне асинхроне осцилације, чије су просторне путање у виду генералисаних *Lissajus*-ових кривих. Да би смо решили три независна подсистема нелинеарних диференцијалних једначина користии смо два метода-*Lagrange*-ов метод варијационих константи, као и асимптотски метод *Krilov Bogolyubov-Mitropolyskiy*. Асимптотски метод *Krilov Bogolyubov-Mitropolyskiy* је коришћен да бисмо добили систем прве апроксимације одговарајућег броја амплитуда и фаза.

3.6. Модел осцилатроне сферне мреже *ZP* миша

Осцилаторни модел *ZP* миша (*Hedrih, 2011*) инспирисан је *Green*-овом модификацијом *Wasserman*-овог модела *ZP* миша (*Green, 1997*) (види слику у 1.6. и 2.3) и 3D структурним променама *ZP* на *AFM*-у (*Michelmann et al, 2007*) и *SEM*-у (*Vanroose et al, 2000, Martinova et al, 2008, Familiari et al, 2006*) (слике 1.10, 1.11. и 1.13.), а заснива се на законима осциловања у ланчаним системима (*Hedrih (Stevanović) & Hedrih 2009a, 2009b, 2010*). Сврха модела је да објасни промену дебљине и конзистенције *ZP* миша пре и после оплодње и да дефинише потенцијалне кинетичке парметре *ZP* гликопротеина пре и после оплодње. Модел посматра *ZP* јајне ћелије као биомеханички осцилатор.

3.6.1. Основне апроксимације/полазне претпоставке

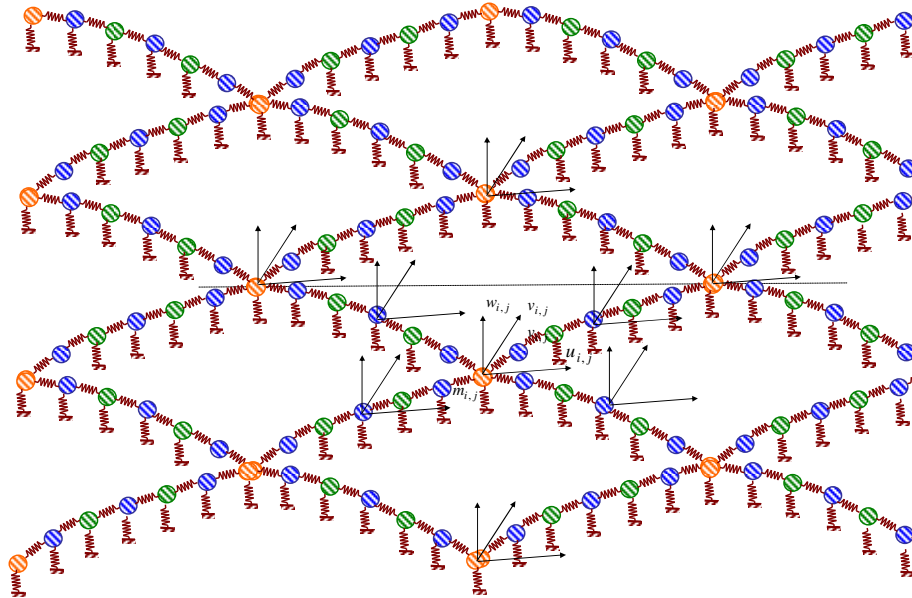
Као што је наведено у уводном делу *ZP* миша се састоји од сулфатисаних гликопротеина, који сачињавају специфичну мрежасту структуру. Моларни однос *ZP2:ZP3* код миша је приближно 1:1, док је *ZP1: ZP2- ZP3* 1:5. *ZP2* и *ZP3* имају фибриларну структуру и ланци *ZP2/ZP3* димера су међусобно повезани помоћу *ZP1* гликопротеина (Види слику 1.6).



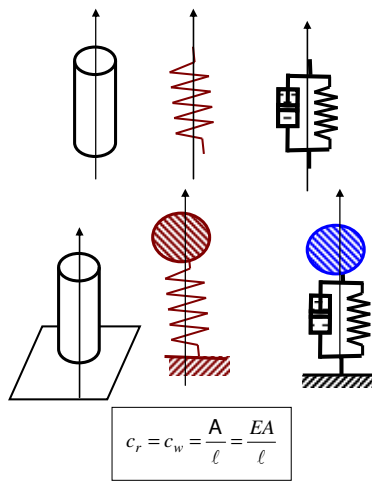
Слика 3.1. Део модела сферне осцилаторне ZP мреже на делу сверне површине јајне ћелије. Наранџасто ($ZP1$), плаво ($ZP2$) и зелено ($ZP3$) представљају ZP гликопротеине. Мрежа је идентична у циркуларном и мердијаном правцу. Осе показују правце кретања ZP гликопротеина. Сваки ZP гликопротеин је повезан са површином јајне ћелије и међусобно еластичним опругама (када разматрамо систем пре оплодње) које осцилују у радијалном правцу.

Уз помоћ методе дискретног континуума (*Hedrih (Stevanović) 2002a, 2004*) ZP је моделована као дискретни систем материјалних тачака са различитим масама, међусобно повезаних еластичним линеарним, нелинеарним или вискоеластичним нелинеарним везама на специфичан начин. Материјалне тачке одговарају ZP гликопротеинима у *Green*-овом моделу ZP (*Green, 1997*) (Слика 3.1. и 3.2.).

С обзиром да експериментални подаци указују да под дејством механичке силе ZP мења своја својства из еластичних у пластична (*Papi et al, 2009*) постављена су два модела осцилаторне мреже ZP -пре и после оплодње. Разлика између ова два модела је у начину повезивања материјалних тачака (молекула) ZP у мрежи: пре оплодње узето је да су материјалне тачке - ZP гликопротеини међусобно повезане идеално еластичним опругама (маса опруге је занемарена у моделу), после оплодње везе између ZP гликопротеина постају вискоеластичне (Слика 3.3.).



Слика 3.2. Део модела сферне осцилаторне мреже *ZP* миша-веће увећање. Наранцасто (*ZP1*), плаво (*ZP2*) и зелено (*ZP3*) представљају *ZP* гликопротеине. Мрежа је идентична у циркуларном и мердијаном правцу. Стрелице приказују правце кретања *ZP* молекула. Публиковано у (*Hedrih et al, 2013a*).



Слика 3.3. Нелинеарни еластични и висло-еластични елемент

Увели смо одређене апроксимације о понашању система осцилаторне мреже ZP пре и после оплодње.

Модел осцилаторне ZP мреже после овулације (пре оплодње) сматрамо конзервативним, хомогеним и нелинеарним системом који осцилује у слободном режиму и везе између ZP молекула сматрамо идеално еластичним.

Након оплодње када један сперматозооид успешно продре кроз ZP и његова мембрана се споји са плазмамембраном јајне ћелије долази до кортикалне реакције јајне ћелије и спречавања полиспермије (*polyspermy block* у англосаксонској литератури). Тада сматрамо да је систем неконзервативан, хомоген и нелинеаран, а да су везе између молекула виско-еластичне и да систем осцилује у принудном мултифреквентном режиму за кратак временски период.

Сваки конзервативни систем осцилује са константном укупном механичком енергијом система, која је једнака укупној механичкој енергији (збир кинетичке и потенцијалне енергије) коју је систем имао у почетном тренутку покретања динамике осцилација система из равнотежног (природног, стабилног) стања система. За такве конзервативне система у сваком кинетичком стању важи:

$$\mathbf{E}_k + \mathbf{E}_p = \mathbf{E}_{k0} + \mathbf{E}_{p0} = \mathbf{E} = \mathbf{E}_0 = \text{const}.$$

Неконзервативни системи су системи у којима постоје неидеалне везе и отпорне силе, које током кретања система врше негативан рад, којим се у току динамике система смањује укупна механичка енергија система. У таквом систему постоје дисипативне силе, и зато се јавља дисипација (смањење) укупне механичке енергије система која тежи нули, а систем тежи стању мировања, када кинетичка енергија постане једнака нули, односно све компонентне брзине елемената система постану једнаке нули. За такве неконзервативне системе у сваком кинетичком стању важи:

$$\mathbf{E}_0 = \mathbf{E}_{k0} + \mathbf{E}_{p0} > \mathbf{E}_k + \mathbf{E}_p = \mathbf{E} \neq \text{const}.$$

Ако су отпорне дисипативне силе линеарно пропорционалне брзинама, $\mathbf{F}_{wk} = -b_k v_k = -\frac{\partial \Phi}{\partial v_k}$, за такав систем можемо

формитрати *Rayleigh*-јеву функцију расипања Φ . Ту *Rayleigh*-јеву функцију

расипања у овом случају можемо написати у облику: $\Phi = \sum_{k=1}^{k=n} \frac{1}{2} b_k v_k^2$. У овом случају

Rayleigh-јева функција расипања Φ представља снагу рада отпорних сила на путу кретања дисипативног неконзервативног система. За такав систем важи:

$\frac{dE}{dt} = \frac{d(E_k + E_p)}{dt} = -2\Phi$, што значи да је двострука *Rayleigh*-јева функција расипања 2Φ мера деградације укупне механичке енергије система (види *Rašković, 1965, 1974*).

У случају да је отпорна дисипативна сила пропорционална *Rayleigh*-јевој функцији расипања n -том степену брзине претходна релација о мери опадања укупне механичке енергије система је $\frac{dE}{dt} = \frac{d(E_k + E_p)}{dt} = -\lambda\Phi_g$, где је λ параметар који зависи од функционалне зависности дисипативне силе и брзине, односно функционалне зависности генералисане *Rayleigh*-јеве функције расипања Φ_g и брзине. (за детаље види *Hedrih (Stevanović) 2012, 2014*, као и *Hedrih & Hedrih (Stevanović) 2014a*).

ZP миша (mZP) је моделована као једнослојна нелинеарна дискретна мрежа која обавија јајну ћелију (Слике 3.1. и 3.2.). Сферна мрежа се састоји из ортогоналних ланаца у меридијалном и циркуларном правцу, који се укрштају у чворним тачкама. Мрежа има исту структуру у циркуларном и меридијалном правцу и концентрична је у односу на јајну ћелију за коју смо узели да има особине ригидног тела. Ланци се састоје од материјалних тачака различите масе међусобно повезаних линеарним или нелинеарним еластичним/виско-еластичним елементима, на специфичан начин. Масу везујућих линеарних или нелинеарних еластичних/виско-еластичних елементима можемо занемарити. Маса материјалних тачака одговара *ZP* гликопротеинима (Види слику 3.1 и 3.2). Материјалне тачке, које представљају *ZP2* и *ZP3* гликопротеине су повезане стандарним лаким еластичним односно виско-еластичним нелинеарним елементима (Слика 3.3), градећи нехомогене ортогоналне ланце, који су међусобно повезани у сферну мрежу. Чворне материјалне тачке представљају *ZP1* гликопротеине (Слика 3.2). За моделовање осцилаторног понашања сферне осцилаторне мреже *ZP* миша користили смо метод дискретног континуума (*Hedrih, 2011, Hedrih (Stevanović), 2002a*).

Чворни молекули су молекули, који се налазе на пресеку два ортогонална ланца-циркуларног и меридијалног и припадају и једном и другом ланцу.

Сваки осцилаторни ланац има коначан број материјалних тачака-молекула, које осцилују са коначним бројем степени слободе.

Сваки молекул има три степена слободе кретања (меридијални, циркуларни и радијани) и повезан је са два суседна молекула у ланцу као и са површином сфере јажне ћелије. Тип веза у моделу је стандардни лаки нелинеарни еластични елемент односно нелинеарни виско-еластични елемент у зависности да ли посматрамо осцилаторно понашање ZP пре или после оплодње. Сваки од стандарних лаких елемената (са еластичним односно виско-еластичним својствима) као и основна својства материјала на бази конститутивних релација напон-деформација (*Hedrih (Stevanovic), 2006, 2008a, 2005, 2009a, 2008b, 2009b, 2008c*) смо дефинисали и одредили математички.

Сада можемо да размотримо слободне и принуде осцилације у сферној осцилаторној мрежи ZP .

Слободне (сопствене, аутономне) осцилације. Сматраћемо да систем осцилаторне сферне мреже ZP -е осцилује у слободном режиму након овулације без присуства сперматозоида. Уколико постоји иницијална пертурбација путем кинетичке или потенцијалне енергије која се предаје структурама ZP које осцилују јавља се само слободни режим осциловања дискретних структура ZP мреже. У овом случају молекули у почетном тренутку добијају иницијално померање које меримо у односу на равнотежни положај и иницијалне брзине. Сматраћемо да, да би дошло до слободних осцилација система ZP довољно је да у стању равнотеже само позиција једног молекула-материјане тачке буде пертурбована или пак да само један молекул добије почетну брзину.

Принудне осцилације. Покретни сперматозоиди који дејствују на површину ZP изазивају принудне осцилације ZP . Када на дискретну мрежу ZP која осцилује у слободном режиму применимо екстерну једно- или мултифреквентне осцилације, ZP осцилује у мултифреквентном принудном режиму.

Према овом осцилаторном моделу ZP , сваки молекул у ZP мрежи у принципу, има три степена слободе кретања и осцилује у три међусобно ортогонална правца: циркуларном, меридијалном и радијалном.

У случају линеаризованог модела, ова померања за сваки молекул представљају главне координате система. Целокупан систем координата за све молекуле који сачињавају ZP осцилаторну мрежу садржи $3N$ координата и сматраћемо их главним координатама система ZP мреже. Сваки молекул ZP мреже повезан је стандардним лаким елементом у радијалном правцу за површину јајне ћелије. Сматраћемо да су померања молекула у правцу који је ортогоналан у односу на ланац коме припадају занемарљива у односу на померања дуж ланца те да се ова компонента може занемарити. То значи да свака материјална тачка (молекул) у меридијалном ланцу има два степена слободе кретања са компонентним померањима у меридијалном и радијалном правцу; сваки молекул у циркуларном ланцу има два степена слободе кретања са компонентним померањима у циркуларном и радијалном правцу. Свака чворна материјална тачка (сваки чворни молекул) има три степени слободе кретања, у радијалном, циркуларном и меридијалном правцу.

За први једноставнији модел -случај пре оплодње- узећемо стандардни лаки идеално еластични елемент са линеарним конститутивним релацијама напон-деформација. За нелинеарни идеално еластични модел узећемо кубичну функцију напон-деформација да би описали однос између силе и напонске деформације стандардног лаког идеално еластичног елемента. У случају виско-еластичног модела однос напон-деформација описујемо помоћу стандардног вискоеластичног елемента представљеног у виду паралелне везе између опруге и пригушнице.

У овој паралелној вези, може опруга бити нелинеарно-еластична, а пригушница (демпер) линеарна (да отпор зависи линеарно од релативне брзине) или да буде фракционог реда.

У уводном делу су разматрани вискоеластични елементи као реолопски елементи, па је и ово анализирано.

Разматраћемо могућност настанка слободних и принудних осцилација дискретне сверне мреже ZP и резултујућу просторну трајекторију сваког молекула.

Да би смо добили одговарајући сет одређених компонентних померања, претпоставићемо сет иницијалних услова, одређених почетним позицијама

молекула и њиховим иницијалним брзинама за сваки молекул, у моделу *ZP* сферне мреже, пре и после оплодње.

Можемо да претпоставимо да у стању мировања до осциловања *ZP* мреже долази услед пертурбације, која може бити изавана процесом овулације. Сперматозооиди делују на *ZP* межу на било који њен чворни молекул иницирајући сопствене или принудне осцилације.

Користећи утицај импулса сперматозооида одредили смо почетна померања и почетне брзине молекула у *ZP* мрежи.

Размотрићемо следеће могућности:

- 1) када само један сперматозооид дејствује на један молекул
- 2) када већи број сперматозооида у исто време дејствује на различите молекуле у *ZP* мрежи. Ове могућности се могу разматрати у светлу спољњих једно или вишефрекцентних побуда.

Након тога ћемо проучити принудне осцилације *ZP* мреже.

3.6.2. Систем нелинеарних диференцијалних једначина које описују осцилаторно понашање изабраног репрезентативног узорка система *ZP* мреже

Сматрајући *ZP* биомеханичким осцилатором моделовали смо њено осцилаторно понашање применивши теорију линеарних и нелинеарних осцилација на модел биолошког система тј. *ZP*. Поступак решавања система линеарних и појединих класа нелинеарних једначина је детаљно описан у (*Rašković, 1965, 1974, Mitropolyskiy, 1955, 1964, 1971, 1995, Mitropolyskiy & Mosseenkov, 1968, 1976, Mitropolyskiy & Van Dao, 2003*).

Претпостављено је да механички модел *ZP* осцилује под изотермним условима. Познато је да температура тела женске јединке порасте за 1-2°C у време овулације (избацивање јајне ћелије из јајника у јајвод) и за време фертилних дана. Утицај температурних варијација је еквивалентан дејству спољне принудне силе која су у складу са термалним модификацијама деформабилних елемената у моделу.

Повећање температуре би изазвало термодилатацију деформабилних елемената у моделу и индуковло силе у правцу ланаца и опруга. У математичком опису модела спољна сила покрива овај термални утицај. Извор спољне силе може бити механичко дејство, али и термо-виско-еластично дејство. То не мења карактер математичког описа (*Goroško & Hedrih (Stevanović), 2001*).

Ради поједностављења модела, узето је да систем осцилује у вакууму и ако у физиолошким условима осцилује у течности јајовода (у *in vivo* условима у петри шољи у одговарајућем *IVF* медијуму).

Да би смо проучили осцилаторно понашање *ZP* размотрићемо репрезентативни узорак модела сферне мреже *ZP* и најпре саставити опште системе диференцијаних линеарних, као и нелинеарних диференцијалних једначина за конзервативне, као и за неконзервативне системе за случајеве сопствених, као и принудних режима осциловања. Такође ћемо навести и претпоставке под којима се поједини систем диференцијалних једначина може сматрати довољно прецизним математичким описом динамике модела, као и одговарајуће описе услова важења истих за кинетичко стање *ZP*. Системи диференцијалних једначина се могу користити за различите репрезентативне узорке изабране из модела дискретне сферне мреже *ZP*, што ће бити дефинисано избором броја ланаца у циркуларном и меридијалном правцу, бројем чворних молекула (чворних тачака) у репрезентативном узорку. Та ограничења ће бити уведена када пређемо на нумерички експеримент за изучавање режима осциловања појединачног репрезентативног узорка *ZP*. Пресудан утицај у избору је свакако софтверски алат који нам је на располагању.

Свака материјална тачка-молекула у дискретној сверичној *ZP* мрежи генерално има три степена слободне кретања и три независне генералисане координате, али користећи рестрикције степена слободне кретања молекула у моделу сферне *ZP* мреже користићемо следеће генералисане координате: $u_{i,j}$ - померање у циркуларном правцу молекула у циркуларним ланцима, $v_{i,j}$ - померање у меридијалном правцу молекула у меридијалним ланцима, $w_{i,i}$ - померање у радијалном правцу у односу на центар површине сфере јајне ћелије за све молекуле.

У компонентним померањима $u_{i,j}$, $v_{i,j}$ и $w_{i,i}$ прва ознака у индексу означава број ланца, а друга место молекула у одговарајућем ланцу у одговарајућој тангентној равни.

Пре оплодње, дискретну ZP мрежу чине молекули који су повезани нелинеарним идеално еластичним везама, те и ZP мрежа има нелинеарна идеално еластична својства.

После оплодње модел се модификује на следећи начин: ZP молекули су повезани стандардним лаким елементом са наследним својствима, који има нелинеарна виско-еластична својства.

ZP која обавија неоплођену јајну ћелију, има нелинеарна идеално еластична својства. Ако узмемо у обзир да сваки молекул осцилује са три степена слободе кретања, овај систем осцилује са $n=3K$ степени слободе и са $3K$ сопствених кружних фреквенција. K је број молекула у сферичној ZP мрежи. У случају дисторзије ситем ће осциловати у $3K$ фреквентном режиму, а у случају да се занемаре померања молекула у попречним правцима на ланцима у тангентној равни на сферну површ јајне ћелије онда је број степени слободе осциловања целог модела ZP дискретне мреже $n=2K+N$, где је N број свих чворова у моделу.

С обзиром да смо занемарили ортогонална померања материјалних тачака у ланцу, сем ортогоналних померања чворних тачака, тада је број степени слободе свих молекула у једном ланцу мањи од $3K$, односно износи $2K + N$ где је N број чворних молекула у једном ланцу, а K број свих молекула у једном ланцу. Тада, један ланац у систему осцилује са $n = 2K + N$ сопствених кружних фреквенција.

Под утицајем сперматозоида долази до иницијалне пертурбације система ZP и модел ZP сферне мреже почиње да осцилује. Може се сматрати да сперматозоид предаје део кинетичке енергије ZP мрежи, која се користи за промену почетног стања.

Померања материјалних тачака у ортогоналном правцу сматрамо да су много мања у односу на померања дуж ланца, те ову компоненту померања можемо занемарити.

За општи механички осцилаторни модел ZP типа дискретног континуума који је приказан на слици 3.1 и 3.2, где су молекули међусобно повезани преко

линеарних или нелинеарних еластичних као и виско-еластичних елемената, можемо користити три типа стандардних лакних везујућих елемената (слика 3.3.):

1. идеално линеарно еластичну опругу са конститутивним релацијама напон-деформација између силе и аксијалног издужења у форми линеарне зависности $F_e = -c\Delta\ell$,

2. идеално нелинеарну еластичну опругу са конститутивним релацијама напон-деформација између силе и аксијалног издужења у форми нелинеарне зависности $F_e = -c\Delta\ell \mp \tilde{c}(\Delta\ell)^3$,

3. нелинеарни висо-еластични елемент са конститутивним релацијама напон-деформација између силе и аксијалног издужења и релативне аксијалне брзине у форми нелинеарне зависности $F_e = -c\Delta\ell \mp \tilde{c}(\Delta\ell)^3$ и $F_w = -bv_{rel} = -b\frac{d(\Delta\ell)}{dt}$ (Види слику 3.3).

F_e је релативна и конзервативна сила, F_w је пригушна неконзервативна сила, $\Delta\ell$ је аксијално издужење-дилатација (екстензија или компресија) стандардног лаког везујућег елемента, v_{rel} релативна брзина аксијалне дилатације елемента, c и \tilde{c} линеарни и нелинеарни коефицијент крутости опруга, b коефицијент пригушења или отпорне силе.

За почетак, размотрићемо општи случај математичког описа система нелинеарних диференцијалних једначина, које описују динамику система са нелинеарним виско-еластичним елементима који принудно осцилује под утицајем спољне вишефреквентне принудне силе. Овај систем садржи три подсистема нелинеарних диференцијалних једначина и то у следећој форми:

1. Први подсистем нелинеарних диференцијалних једначина описује компонентна померања молекула у моделу у радијалном правцу

1.1. за молекуле у циркуларним ланцима:

$$m_{ij}\ddot{w}_{ij} = -c_{(w)ij}w_{ij} - \tilde{c}_{(w)ij}w_{ij}^3 - b_{(w)ij}\dot{w}_{ij} + F_{i,j}\cos(\Omega_{ij}t + \alpha_{ij}) + \tilde{F}_{i,j}\cos(\tilde{\Omega}_{ij}t + \tilde{\alpha}_{ij}). \quad (3.1)$$

где су $i=1,2,\dots,M$, i број циркуларног ланца, M је укупан број циркуларних ланаца, $j=1,2,\dots,C_i$, j је редослед молекула у одређеном циркуларном ланцу, C_i је укупан број молекула у одговарајућем циркуларном ланцу.

1.2. за молекуле у меридијалним ланцима:

$$m_{ij}\ddot{w}_{ij} = -c_{(w)ij}w_{ij} - \tilde{c}_{(w)ij}w_{ij}^3 - b_{(w)ij}\dot{w}_{ij} + F_{i,j} \cos(\Omega_{ij}t + \alpha_{ij}) + \tilde{F}_{i,j} \cos(\tilde{\Omega}_{ij}t + \tilde{\alpha}_{ij}). \quad (3.2)$$

где је $i=1,2,\dots,C$, i редослед меридијалног ланца а, C је укупан број меридијалних ланаца, $j=1,2,\dots,M_i$, j је редослед молекула у једном меридијалном ланцу а, M_i укупан број молекула у одговарајућем меридијалном ланцу.

2. Други подсистем нелинеарних диференцијалних једначина, које описују компонентна померања молекула у циркуларном правцу, као и померања циркуларних ланаца у циркуларном правцу:

$$m_{ij}\ddot{u}_{ij} = +c_{(u)ij}(u_{i+1,j} - u_{i,j}) + \tilde{c}_{(u)ij}(u_{i+1,j} - u_{i,j})^3 - c_{(u)i-1,j}(u_{i,j} - u_{i-1,j}) - \tilde{c}_{(u)i-1,j}(u_{i,j} - u_{i-1,j})^3 - b_{(u)ij}\dot{u}_{ij}. \quad (3.3)$$

у коме је $j=1,2,\dots,M$, j редослед циркуларног ланца у посматраном моделу, M је укупан број циркуларних ланаца, $i=1,2,\dots,C_j$, i је редослед молекула у једном циркуларном ланцу, C_j је укупан број молекула у одговарајућем циркуларном ланцу.

3. Трећи подсистем нелинеарних диференцијалних једначина, који описује компонентна померања молекула у меридијалном правцу:

$$m_{ij}\ddot{v}_{ij} = +c_{(v),j}(v_{i,j+1} - v_{i,j}) + \tilde{c}_{(v),j}(v_{i,j+1} - v_{i,j})^3 - c_{(v)i,j-1}(v_{i,j} - v_{i,j-1}) - \tilde{c}_{(v)i,j-1}(v_{i,j} - v_{i,j-1})^3 - b_{(v),j}\dot{v}_{ij}. \quad (3.4)$$

у коме су: $i=1,2,\dots,C$, i је редослед меридијалног ланца у моделу ZP , а C је укупан број меридијалних ланаца, $j=1,2,\dots,M_i$, j је редослед молекула у једном

меридијалном ланцу а, M_i укупан број молекула у одговарајућем меридијалном ланцу.

Узећемо да су почетни услови за сваки од претходних подсистема изражени преко почетних координата и почетних брзина за сваки молекул у следећем облику:

$$u_{i,j}(0) = u_{0,i,j} \quad \text{и} \quad \dot{u}_{i,j}(0) = \dot{u}_{0,i,j} \quad \text{- почетно померање и почетна циркуларна}$$

компонента брзине молекула у циркуларном ланцу

$$v_{i,j}(0) = v_{0,i,j} \quad \text{и} \quad \dot{v}_{i,j}(0) = \dot{v}_{0,i,j} \quad \text{- почетно померање и почетна мердијална}$$

компонента брзине молекула у меридијалном ланцу и

$$w_{i,i}(0) = w_{0,i,i} \quad \text{и} \quad \dot{w}_{i,i}(0) = \dot{w}_{0,i,i} \quad \text{- почетно померање и почетна радијална}$$

компонента брзине молекула у односу на центар сфере.

$$\text{Укупан број молекула у систему } ZP \text{ модела би био: } K = \sum_{j=1}^{j=M} C_j + \sum_{j=1}^{j=C} M_j - N .$$

$$\text{Укупан број степени слободе система } ZP \text{ модела је: } n = 2 \sum_{j=1}^{j=M} C_j + 2 \sum_{j=1}^{j=C} M_j - N \leq 3K .$$

Систем једначина (3.1), (3.2), (3.3) и (3.4) важи за све молекуле и чворне и нечворне, јер смо узели да су генералисане независне координате ортогоналне, а да су промене правог угла између везаних ланаца у чворовима мале. Уз апроксимацију да је ова геометријска нелинеарност мала у поређењу са нелинеарношћу у везујућим елементима (стандардни лаки елемент) којма су чворни молекули везани за сферну површину јајне ћелије.

Имамо три независна подсистема нелинеарних диференцијалних једначина (3.1), (3.3) и (3.4). Систем (3.1) је декуплавани независни систем нелинеарних диференцијалних једначина (НДЈ). Подсистеми (3.3) и (3.4) су купловани системи НДЈ у којима је нелинеарност мала. Да би поједноставили задатак занемарићемо ову нелинеарност. Подсистем (3.1) НДЈ садржи n независних НДЈ *Georg Duffing*-овог типа.

Сва три подсистема диференцијалних једначина (3.1), (3.3) и (3.4) представљају опис нелинеарних и пригушених осцилација ZP након оплодње. ZP тада представља неконзервативни систем. Поменути систем НДЈ је такође

валидан и за опис динамике система ZP пре оплодње када сматрамо да је систем нелинеаран и конзервативан или у случају једноставнијег модела када је ситем линеаран, али тада у једначинама треба изоставити делове који се односе на пригушну силу.

Следе једначине које се односе на динамику линеараног и нелинеарног система. Када линеаризујемо систем НДЈ (3.1), (3.3) и (3.4) и занемаримо пригушну силу, добијамо опис динамике основног линеарног система у следећем облику:

1. слободне (аутономне, сопствене) осцилације линеарног конзервативног система на изабраном моделу ZP динамика је описана следећим хомогеним системом линеарних диференцијалних једначина:

$$m_{ij}\ddot{w}_{ij} = -c_{(w)ij}w_{ij}. \quad (3.5)$$

$$m_{ij}\ddot{u}_{ij} = +c_{(u)ij}(u_{i+1,j} - u_{i,j}) - c_{(u)i-1,j}(u_{i,j} - u_{i-1,j}). \quad (3.6)$$

$$m_{ij}\ddot{v}_{ij} = +c_{(v)i,j}(v_{i,j+1} - v_{i,j}) - c_{(v)i,j-1}(v_{i,j} - v_{i,j-1}). \quad (3.7)$$

Систем линеарних диференцијалних једначина (ЛДЈ) (3.5), (3.6) и (3.7) одговара ZP моделу пре оплодње и тада претпостављамо да је почетна пертурбација положаја и брзина молекула у односу на равнотежно стање изазвана овулацијом.

2. принудни режим осциловања основног линеарног конзервативног система, који настаје под дејством спољне мултифреквентне принудне силе динамику ZP модела можемо описати следећим нехомогеним системом линеарних диференцијалних једначина:

$$m_{ij}\ddot{w}_{ij} = -c_{(w)ij}w_{ij} + F_{i,j} \cos(\Omega_{ij}t + \alpha_{ij}) + \tilde{F}_{i,j} \cos(\tilde{\Omega}_{ij}t + \tilde{\alpha}_{ij}). \quad (3.8)$$

$$m_{ij}\ddot{u}_{ij} = +c_{(u)ij}(u_{i+1,j} - u_{i,j}) - c_{(u)i-1,j}(u_{i,j} - u_{i-1,j}). \quad (3.9)$$

$$m_{ij}\ddot{v}_{ij} = +c_{(v)i,j}(v_{i,j+1} - v_{i,j}) - c_{(v)i,j-1}(v_{i,j} - v_{i,j-1}). \quad (3.10)$$

Систем линеарних диференцијалних једначина (3.8), (3.9) и (3.10) одговара ZP моделу пре оплодње када сперматозооиди дејствују на ZP узрокујући

пертурбацију и почетног положаја и почетних брзина ZP молекула у односу на равнотежну конфигурацију ZP молекула, али и у континуалном продуженом сукцесивном дејству, посебно у радијалном правцу. Тада ZP модел осцилује у принудном режиму под дејством вишефреквентне спољне ексцитације (принудне силе). При том предпостављамо да су сперматозооиди у дисконтинуираном контакту са ZP , али да имају периодични поновљени контакт са ZP мрежом. Овај принудни режим осциловања ZP би одговарао стању непосредно пре оплодње. Ако претпоставимо да ZP осцилаторна мрежа представља хомогени и нелинеарни систем, тада добијамо:

3. слободне осцилације нелинеарног конзервативног система модела ZP осцилаторне мреже можемо описати следећим хомогеним системом нелинеарних диференцијалних једначина:

$$m\ddot{w}_{ij} = -c_{(w)}w_{ij} - \tilde{c}_{(w)}w_{ij}^3. \quad (3.11)$$

$$m\ddot{u}_{ij} = +c_{(u)}(u_{i+1,j} - u_{i,j}) + \tilde{c}_{(u)}(u_{i+1,j} - u_{i,j})^3 - c_{(u)}(u_{i,j} - u_{i-1,j}) - \tilde{c}_{(u)}(u_{i,j} - u_{i-1,j})^3. \quad (3.12)$$

$$m\ddot{v}_{ij} = +c_{(v)}(v_{i,j+1} - v_{i,j}) + \tilde{c}_{(v)}(v_{i,j+1} - v_{i,j})^3 - c_{(v)}(v_{i,j} - v_{i,j-1}) - \tilde{c}_{(v)}(v_{i,j} - v_{i,j-1})^3. \quad (3.13)$$

Систем нелинеарних диференцијалних једначина (3.11.), (3.12.) и (3.13.) боље описује осциловање ZP мреже пре оплодње када претпостављамо да је почетна пертурбација положаја и брзина молекула у односу на равнотежно стање изазвана овулацијом;

4. принудне осцилације нелинеарног конзервативног система модела ZP осцилаторне мреже можемо описати следећим нехомогеним системом линеарних диференцијалних једначина:

$$m\ddot{w}_{ij} = -c_{(w)}w_{ij} - \tilde{c}_{(w)}w_{ij}^3 + F_{i,j} \cos(\Omega_{ij}t + \alpha_{ij}) + \tilde{F}_{i,j} \cos(\tilde{\Omega}_{ij}t + \tilde{\alpha}_{ij}). \quad (3.14)$$

$$m\ddot{u}_{ij} = +c_{(u)}(u_{i+1,j} - u_{i,j}) + \tilde{c}_{(u)}(u_{i+1,j} - u_{i,j})^3 - c_{(u)}(u_{i,j} - u_{i-1,j}) - \tilde{c}_{(u)}(u_{i,j} - u_{i-1,j})^3. \quad (3.15)$$

$$m\ddot{v}_{ij} = +c_{(v)}(v_{i,j+1} - v_{i,j}) + \tilde{c}_{(v)}(v_{i,j+1} - v_{i,j})^3 - c_{(v)}(v_{i,j} - v_{i,j-1}) - \tilde{c}_{(v)}(v_{i,j} - v_{i,j-1})^3. \quad (3.16)$$

Систем нехомогених нелинеарних диференцијалних једначина (3.14), (3.15) и (3.16) одговара моделу ZP мреже пре оплодње када сперматозооиди

дејствују на ZP мрежу и доводе до почетне пертурбације положаја и почетних брзина молекула у односу на њихово равнотежно стање, али и у континуалном продуженом сукцесивном дејству, посебно у радијалном правцу. Претпостављамо да је утицај сперматозооида еквивалентан вишефреквентној спољној побуди у форми вишефреквентне дисконтинуиране, али периодичне силе која се понавља. Овај принудни осцилаторни режим ZP мреже узимамо као стање непосредно пре оплодње. Крајње позиције и крајње брзине молекула (њихов крајњи положај и кинетичко стање) се узимају, као почетни положаји и почетно кинетичко стање за наредно кинетичко-динамичко стање дискретног осцилаторног модела ZP мреже.

5. Принудне осцилације нелинеарног неконзервативног система модела ZP осцилаторне мреже описане су системом нехомогених нелинеарних диференцијалних једначина:

$$m\ddot{w}_{ij} = -c_{(w)}w_{ij} - \tilde{c}_{(w)}w_{ij}^3 - b_{(w)ij}\dot{w}_{ij} + F_{i,j} \cos(\Omega_{ij}t + \alpha_{ij}) + \tilde{F}_{i,j} \cos(\tilde{\Omega}_{ij}t + \tilde{\alpha}_{ij}). \quad (3.17)$$

$$m\ddot{u}_{ij} = +c_{(u)}(u_{i+1,j} - u_{i,j}) + \tilde{c}_{(u)}(u_{i+1,j} - u_{i,j})^3 - c_{(u)}(u_{i,j} - u_{i-1,j}) - \tilde{c}_{(u)}(u_{i,j} - u_{i-1,j})^3. \quad (3.18)$$

$$m\ddot{v}_{ij} = +c_{(v)}(v_{i,j+1} - v_{i,j}) + \tilde{c}_{(v)}(v_{i,j+1} - v_{i,j})^3 - c_{(v)}(v_{i,j} - v_{i,j-1}) - \tilde{c}_{(v)}(v_{i,j} - v_{i,j-1})^3. \quad (3.19)$$

Систем нехомогених нелинеарних диференцијалних једначина (3.17-3.19) одговара моделу ZP мреже након оплодње, када још неко време други сперматозооиди настављају да дејствују на површину ZP осцилаторне мреже доводећи, до почетне пертурбације и положаја и почетних брзина молекула у односу на њихово равнотежно стање, као и до континуалног продуженог сукцесивног дејства, посебно у радијалном правцу.

Ово кинетичко стање се може моделовати, као принудни режим осциловања ZP мреже под дејством спољне вишефреквентне принудне силе. Такође, сматрамо да су сперматозооиди у дисконтинуираном контакту са сферном ZP мрежом у облику периодичних поновљених контакта. Крајње позиције и крајње брзине молекула (њихов крајњи положај и кинетичко стање) на крају једне фазе ZP динамике, се узимају као почетни положаји и почетно кинетичко стање за

наредну фазу динамике и кинетичко стање ZP мреже описане наредним системом диференцијалних једначина.

Увођењем следећих ознака:

$$\begin{aligned} \omega_{(w)0}^2 = \frac{c_{(w)}}{m}, \quad \omega_{(u)0}^2 = \frac{c_{(u)}}{m}, \quad \omega_{(v)0}^2 = \frac{c_{(v)}}{m}, \quad h_{i,j} = \frac{F_{i,j}}{c_{(w)}}, \quad \tilde{h}_{i,j} = \frac{\tilde{F}_{i,j}}{c_{(w)}}, \\ \tilde{\omega}_{(w)}^2 = \frac{\tilde{c}_{(w)}}{m}, \quad \tilde{\omega}_{(u)}^2 = \frac{\tilde{c}_{(u)}}{m}, \quad \tilde{\omega}_{(v)}^2 = \frac{\tilde{c}_{(v)}}{m}, \quad 2\delta_{(w)0} = \frac{b_{(w)}}{m}. \end{aligned} \quad (3.20)$$

$\omega_{(w)0}^2 = \frac{c_{(w)}}{m}$ - квадрат сопствене кружне фреквенције у радијалном правцу за одговарајући линеарни систем, $\omega_{(u)0}^2 = \frac{c_{(u)}}{m}$ квадрат фреквентног параметра ланаца у меридијалном правцу, $\omega_{(v)0}^2 = \frac{c_{(v)}}{m}$ - квадрат фреквентног параметра ланаца у циркуларном правцу, и имају димезије време на минус други T^{-2} , и јединицу sec^{-2} , m - маса молекула јединице kg , c - крутост линеарности веза - димензија сила кроз дужину $\frac{F}{L}$, јединице $\frac{N}{m} = kg \text{ sec}^{-2}$, $h_{i,j} = \frac{F_{i,j}}{c_{(w)}}$, $\tilde{h}_{i,j} = \frac{\tilde{F}_{i,j}}{c_{(w)}}$, редуковане амплитуде принудних сила и по димензији су дужине L , $\tilde{\omega}_{(w)}^2 = \frac{\tilde{c}_{(w)}}{m}$, $\tilde{\omega}_{(u)}^2 = \frac{\tilde{c}_{(u)}}{m}$, $\tilde{\omega}_{(v)}^2 = \frac{\tilde{c}_{(v)}}{m}$, фреквентни параметри нелинеарности нелинеарно-еластичних веза између материјалних тачака у ланцима и имају димензије време пута дужина на минус други $T^{-2}L^{-2}$, и јединицу $\text{sec}^{-2}m^{-2}$, $2\delta_{(w)0} = \frac{b_{(w)}}{m}$ коефицијенти расипања (коефицијенти сила пригушења), претходно приказани системи диференцијалних једначина за дефинисане режиме сопствених, принудних, линеарних или нелинеарних осциловања, зависно од фазе кинетичког стања пре, у току или након оплодње се могу написати у погоднијем облику за анализирање решења и осцилаторних режима.

3.7. Режи́ми осциловања репрезентативног узорка хомогеног осцилаторног модела ZP

Прво ћемо приказати одговарајуће системе диференцијалних једначина за поједине режими и фазе кинетичог стања осцилација репрезентативног узорка хомогеног осцилаторног модела ZP

3.4.1. За слободне осцилације конзервативног хомогеног система (најједноставнији модел пре оплодње) систем диференцијалних једначина је линеаран хомоген и у облику:

$$\ddot{w}_{ij} + \omega_{(w)0}^2 w_{ij} = 0. \quad (3.21)$$

$$\ddot{u}_{ij} + \omega_{(u)0}^2 (-u_{i-1,j} + 2u_{i,j} - u_{i+1,j}) = 0. \quad (3.22)$$

$$\ddot{v}_{ij} + \omega_{(v)0}^2 (-v_{i,j-1} + 2v_{i,j} - v_{i,j+1}) = 0. \quad (3.23)$$

3.4.2. За принудни режим осциловања основног линеарног конзервативног и хомогеног дискретног система модела ZP мреже, који осцилује под дејством спољне вишефреквентне принудне силе (најједноставнији модел пре оплодње) систем диференцијалних једначина је линеаран, хомоген и неаутономан, и у облику:

$$\ddot{w}_{ij} + \omega_{(w)0}^2 w_{ij} = h_{i,j} \cos(\Omega_{ij} t + \alpha_{ij}) + \tilde{h}_{i,j} \cos(\tilde{\Omega}_{ij} t + \tilde{\alpha}_{ij}). \quad (3.24)$$

$$\ddot{u}_{ij} + \omega_{(u)0}^2 (-u_{i-1,j} + 2u_{i,j} - u_{i+1,j}) = 0. \quad (3.25)$$

$$\ddot{v}_{ij} + \omega_{(v)0}^2 (-v_{i,j-1} + 2v_{i,j} - v_{i,j+1}) = 0. \quad (3.26)$$

3.4.3. За слободне (сопствене, аутономне) осцилације нелинеарног конзервативног хомогеног система (нелинеарни модел пре оплодње) систем диференцијалних једначина је нелинеаран и хомоген и у облику:

$$\ddot{w}_{ij} + \omega_{(w)0}^2 w_{ij} = -\tilde{\omega}_{(w)}^2 w_{ij}^3. \quad (3.27)$$

$$\ddot{u}_{ij} + \omega_{(u)0}^2 (-u_{i-1,j} + 2u_{i,j} - u_{i+1,j}) = +\tilde{\omega}_{(u)}^2 (u_{i+1,j} - u_{i,j})^3 - \tilde{\omega}_{(u)}^2 (u_{i,j} - u_{i-1,j})^3. \quad (3.28)$$

$$\ddot{v}_{ij} + \omega_{(v)0}^2 (-v_{i,j-1} + 2v_{i,j} - v_{i,j+1}) = +\tilde{\omega}_{(v)}^2 (v_{i,j+1} - v_{i,j})^3 - \tilde{\omega}_{(v)}^2 (v_{i,j} - v_{i,j-1})^3. \quad (3.29)$$

3.4.4. За принудне осцилације нелинеарног неконзервативног хомогеног система модела *ZP* осцилаторне мреже (нелинеарни неконзервативни систем након оплодње) систем диференцијалних једначина је линеаран и хомоген, али и неаутономан, и у облику:

$$\ddot{w}_{ij}(t) + 2\delta_{(w)0} \dot{w}_{ij} + \omega_{(w)0}^2 w_{ij}(t) = -\tilde{\omega}_{(w)}^2 w_{ij}^3(t) + h_{i,j} \cos(\Omega_{ij}t + \alpha_{ij}) + \tilde{h}_{i,j} \cos(\tilde{\Omega}_{ij}t + \tilde{\alpha}_{ij}). \quad (3.30)$$

$$\ddot{u}_{ij} + \omega_{(u)0}^2 (-u_{i-1,j} + 2u_{i,j} - u_{i+1,j}) = +\tilde{\omega}_{(u)}^2 (u_{i+1,j} - u_{i,j})^3 - \tilde{\omega}_{(u)}^2 (u_{i,j} - u_{i-1,j})^3. \quad (3.31)$$

$$\ddot{v}_{ij} + \omega_{(v)0}^2 (-v_{i,j-1} + 2v_{i,j} - v_{i,j+1}) = +\tilde{\omega}_{(v)}^2 (v_{i,j+1} - v_{i,j})^3 - \tilde{\omega}_{(v)}^2 (v_{i,j} - v_{i,j-1})^3. \quad (3.32)$$

3.8. Слободне осцилације линеарног система хомогеног дискретног модела *ZP* осцилаторне мреже

Пре свега ћемо размотрити слободне (сопствене) осцилације конзервативног система хомогеног дискретног модела *ZP* осцилаторне мреже, описане системом линеарних хомогених диференцијалних једначина (3.21), (3.22) и (3.23). Користећи позната решења система линеарних хомогених диференцијалних једначина добијена тригонометријском методом (*Rašković, 1965, 1974, Hedrih (Stevanovic), 2006*) добијамо решења поменутих диферецијалних једначина:

1. За осцилаторно померање чворних молекула у радијалном правцу одговарајуће решење линеаризоване диференцијалне једначине (3.21) облика

$\ddot{w}_{ij} + \omega_{(w)0}^2 w_{ij} = 0$ је:

$$w_{ij}(t) = A_{(w)ij} \cos(\omega_{(w)0}t + \alpha_{(w)ij}),. \quad (3.33)$$

где су $A_{(w)ij}$ амплитуда и $\alpha_{(w)ij}$ фаза једнофреквентне осцилације, кружне фреквенције $\omega_{(w)0} = \sqrt{\frac{c_{(w)}}{m}}$, и непознате су константе које се одређују из почетних услова-почетног помераја у односу на положај стабилне равнотеже и почетне компоненте брзине саопштене чворној тачки у почетном тренутку времена, а у радијалном правцу.

Осциловање сваког чворног молекула у радијалном правцу $w_{ij}(t)$ је једнофреквентно са истом сопственом кружном фреквенцијом $\omega_{(w)0} = \sqrt{\frac{c_{(w)}}{m}}$ и периодом осциловања $T_{(w)0} = \frac{2\pi}{\omega_{(w)0}} = 2\pi \sqrt{\frac{m}{c_{(w)}}}$ јер сви чворни молекули имају исту масу (одговарају маси *ZPI* гликопротеина), а узели смо да су сви везујући елементи исти и имају исте карактеристике, те ће и њихова крутост бити иста.

Применом тригонометриске методе (*Rašković, 1965, Hedrih (Stevanović), 2004, K. Hedrih (Stevanović)* и *Hedrih, 2010*) на системе хомогених линеарних диференцијалних једначина (3.22) и (3.23), којима се описују осцилаторне динамике хомогених ланаца, могуће је добити решења, која описују осциловање молекула и у циркуларном и мердијалном правцу.

Решења система хомогених линеарних диференцијалних једначина (3.22) и (3.23), претпоставимо у облику:

$$u_{ij}(t) = A_{(u)ij} \cos(\omega_{(u)j}t + \alpha_{(u)j}), \quad v_{ij}(t) = A_{(v)ij} \cos(\omega_{(v)i}t + \alpha_{(v)i}) \quad (3.34)$$

у којима амплитуде $A_{(u)ij}$ и $A_{(v)ij}$ претпостављамо у облику:

$$A_{(u)ij} = C_{(u)j} \sin i\varphi, \quad A_{(v)ij} = C_{(u)i} \sin j\vartheta. \quad (3.35)$$

У претходно претпостављеним амплитудама $A_{(u)ij}$ и $A_{(v)ij}$, карактеристичне сопствене константе $C_{(u)j}$ и $C_{(u)i}$, као и φ и ϑ одређујемо из услова да су

задовољене хомогене диференцијалне једначине (3.22) односно (3.23), као и гранични услови на крајевима ланаца и почетни услови. Зато уносимо претпостављена решења (3.34) узимајући у обзир (3.35) уносимо у систем (3.22) односно (3.23) и добијамо следеће релације:

$$\frac{\omega_{(u)j(s)}^2}{\omega_{(u)0}^2} = \lambda_{(u)j(s)} = 4 \sin^2 \frac{\varphi_{js}}{2} \quad \text{и} \quad \frac{\omega_{(v)i(r)}^2}{\omega_{(v)0}^2} = \lambda_{(v)i(r)} = 4 \sin^2 \frac{\vartheta_r}{2} \quad (3.36)$$

које представљају карактеристичне бројеве, у којима су $\omega_{(u)j(s)}^2, s = 1, 2, 3, \dots, N_{(u)j}$ односно $\omega_{(v)i(r)}^2, r = 1, 2, 3, \dots, N_{(v)j}$ скупови квадрата сопствених кружних фреквенција линеарних осциловања одговарајућег циркуларног ланца, са $K_{(u)j}$ материјалних тачака у њему, односно меридијоналног ланца, са $K_{(v)j}$ материјалних тачака у њему. Како смо добили скуп карактеристичних бројева, то значи да постоје и одговарајући скупови амплитуда:

$$A_{(u)ij}^{(s)} = C_{(u)j} \sin i \varphi_{js}, s = 1, 2, 3, \dots, N_{(u)j} \quad \text{и} \quad A_{(v)ij}^{(r)} = C_{(v)j} \sin j \vartheta_r, r = 1, 2, 3, \dots, N_{(v)j} \quad (3.37)$$

те се општа решења система хомогених диференцијалних једначина (3.22), односно (3.23), могу написати као сума партикуларних решења. За свако партикуларно решење из скупа за $s = 1, 2, 3, \dots, N_{(u)j}$, односно из скупа за $r = 1, 2, 3, \dots, N_{(v)j}$, која одговарају по једној од сопствених кружних фреквенција из одговарајућег скупа можемо написати у облику:

$$\begin{aligned} u_{ij}(t) &= \sum_{s=1}^{N_{(u)j}} A_{(u)ij}^{(s)} \cos(\omega_{(u)j(s)} t + \alpha_{(u)j(s)}) \\ v_{ij}(t) &= \sum_{r=1}^{N_{(v)j}} A_{(v)ij}^{(r)} \cos(\omega_{(v)i(r)} t + \alpha_{(v)i(r)}). \end{aligned} \quad (3.38)$$

Сада је потребно да одредимо субсетове карактеристичних бројева $\varphi_s, s = 1, 2, 3, \dots, N_{(u)j}$ и $\vartheta_r, r = 1, 2, 3, \dots, N_{(v)j}$, узимајући у обзир да је потребно да буду задовољени гранични услови на крају сваког од ланаца који осцилују

вишефреквентно. На бази тригонометријског метода из претходно добијених резултата, закључујемо да постоје два субсета сопствених кружних фреквенција-сопствених осцилација материјалних тачака у правцима ланаца којима припадају.

а. За сопствене осцилације материјалних тачака, које припадају ланцу у циркуларном правцу, субсет сопствених кружних фреквенција је:

$$\omega_{(u)j(s)} = \omega_{(u)0} \sqrt{\lambda_{(u)j(s)}} = 2\omega_{(u)0} \sin \frac{\varphi_{js}}{2}. \quad s = 1, 2, \dots, N_u, \quad j = 1, 2, \dots, M_u \quad (3.39)$$

и

б. За сопствене осцилације материјалних тачака, које припадају ланцу у меридијалном правцу, субсет сопствених кружних фреквенција је:

$$\omega_{(v)j(r)} = \omega_{(v)0} \sqrt{\lambda_{(v)j(r)}} = 2\omega_{(v)0} \sin \frac{\vartheta_{jr}}{2}. \quad r = 1, 2, \dots, N_v, \quad i = 1, 2, \dots, N_v \quad (3.40)$$

који зависе од елемената из субсета катактеристичних бројева φ_{js} , $s = 1, 2, 3, \dots, N_{(u)j}$, $j = 1, 2, \dots, M_u$ и ϑ_{jr} , $r = 1, 2, 3, \dots, N_{(v)j}$, $i = 1, 2, \dots, N_v$, односно преко њих и од граничних услова, где су N_u и N_v број молекула у циркуларним односно мердијалним ланцима.

Сопствене кружне фреквенције зависе од граничних услова за одговарајући ланац на његовим крајевима и од броја молекула у ланцу. Ако узмемо у обзир да крајеви ланаца могу бити слободни и/или фиксирани (причвршћени) постоје следећи случајеви:

а. кад су оба краја ланца фиксирани (обострано везани ланац):

$$\varphi_{js} = \frac{s\pi}{N_u + 1}, \quad s = 1, 2, \dots, N_u. \quad (3.41)$$

$$\vartheta_{ir} = \frac{r\pi}{N_v + 1}, \quad r = 1, 2, \dots, N_v. \quad (3.42)$$

б. кад су оба краја ланца слободна (слободни ланац):

$$\varphi_{js} = \frac{s\pi}{N_u}, \quad s = 1, 2, \dots, N_u. \quad (3.43)$$

$$\vartheta_{ir} = \frac{r\pi}{N_v}, r = 1, 2, \dots, N_v. \quad (3.44)$$

в. један крај ланца је слободан, а други је фиксиран (ланац на носачу, конзолни ланац):

$$\varphi_{js} = \frac{(2s-1)\pi}{2N_u+1}, s = 1, 2, \dots, N_u. \quad (3.45)$$

$$\vartheta_{ir} = \frac{(2r-1)\pi}{2N_v+1}, r = 1, 2, \dots, N_v. \quad (3.46)$$

Као решења система хомогених линеарних диференцијалних једначина (3.22) и (3.23), које описују линеарне вишефреквентне осцилације молекула у правцима одговарајућих ланаца, добијени су следећи вишефреквентни временски изрази, односно одговарајуће функције:

а. за компонентна осцилаторна мултифреквентна померања молекула у циркуларном правцу:

$$u_{ij}(t) = \sum_{s=1}^{N_u} C_{(u)j} \sin i \varphi_{js} \cos(\omega_{(u)j(s)} t + \alpha_{(u)j(s)}), \quad i = 1, 2, 3, \dots, N_u, \quad j = 1, 2, \dots, M_u. \quad (3.47)$$

б. за компонентна осцилаторна мултифреквентна померања молекула у меридионалном правцу:

$$v_{ij}(t) = \sum_{r=1}^{N_v} C_{(v)i} \sin j \vartheta_{ir} \cos(\omega_{(v)i(r)} t + \alpha_{(v)i(r)}), \quad i = 1, 2, \dots, N_v, \quad j = 1, 2, \dots, M_v. \quad (3.48)$$

Изрази (3.47) и (3.48) описују слободни вишефреквентни режим осциловања са одговарајућим бројем сопствених кружних фреквенција $\omega_{(u)j(s)}$ дефинисаних изразом (3.39) и $\omega_{(v)i(r)}$ дефинисаних изразом (3.40).

У решењима (3.47) и (3.48), константе $C_{(u)j}$ и $C_{(v)i}$, представљају непозанте интеграционе константе, као и фазе $\alpha_{(u)j(s)}$ и $\alpha_{(v)i(r)}$, које се одређују из почетних услова. φ_{js} и ϑ_{ir} су карактеристични бројеви који зависе од одговарајућих услова

на крају ланаца (да ли су ланци учвршћени или слободни на оба односно на једном крају) (*Hedrih, (Stevanović), 2002a, 2004, 2006, 2008, Hedrih (Stevanović), Hedrih, 2010, Rašković, 1965*).

Трајекторије чворних молекула су у простору и представљају резултујуће три ортогоналне вибрације - једне једнофреквентне и две мулти-фреквентне. Трајекторија је у облику генерализоване просторне *Lissajous*-ове криве.

компонентно једнофреквентно осцилаторно померање молекула у радијалном правцу одређено је следећим законом:

$$w_{ij}(t) = A_{(w)ij} \cos(\omega_{(w)0}t + \alpha_{(w)ij}), \quad i = 1, 2, \dots, N_u, \quad j = 1, 2, \dots, M_u. \quad (3.49)$$

Трајекторије сваког појединачног молекула у циркуларном ланцу су у виду трајекторија у равни и представљају резултат две ортогоналне осцилације-једне једнофреквентне-у радијалном правцу и друге вишефреквентне-у циркуларном правцу. Резултујућа трајекторија појединачног молекула је у виду генерализоване раванске *Lissajous*-ове криве у равни ортогоналној на сферну површ јајне ћелије која у себи садржи циркуларни ланац.

Трајекторије сваког појединачног молекула у меридијалном ланцу су у виду трајекторија у равни и представљају резултат две ортогоналне осцилације-једне једнофреквентне-у радијалном правцу и друге вишефреквентне-у меридијалном правцу. Резултујућа трајекторија појединачног молекула је у виду генерализоване раванске *Lissajous*-ове криве у равни ортогоналној на сферну површ јајне ћелије која у себи садржи меридијални ланац.

3.9. Решења система линеарних диференцијалних једначина за одређене случајеве принудних осцилација

Систем линеарних диференцијалних једначина (3.24), (3.25) и (3.26), које описују принудне осцилације *ZP* дискретне мреже, се само разликује по диференцијалној једначини која описује осцилације у радијалном правцу (3.21), односно закон принудног осциловања у радијалном правцу се разликује од

радијалне компоненте (3.49) за случај слободних (сопствених) осцилација. Зато решавамо само први подсистем диференцијалних једначина (3.24), чија решења су позната из литературе, (*Rašković, 1965, Hedrih (Stevanovic), 2006, Hedrih (Stevanović) u Hedrih, 2009,2010*) те на основу тога добијамо одговарајуће решење.

- Израз за принудно осцилаторно померање чворних молекула у радијалном правцу је:

$$w_{ij}(t) = A_{(w)ij} \cos(\omega_{(w)0}t + \alpha_{(w)ij}) + \frac{h_{i,j}}{\omega_{(w)0}^2 - \Omega_{ij}^2} \cos(\Omega_{ij}t + \alpha_{ij}) + \frac{\tilde{h}_{i,j}}{\omega_{(w)0}^2 - \tilde{\Omega}_{ij}^2} \cos(\tilde{\Omega}_{ij}t + \tilde{\alpha}_{ij}),$$

$$i = i_{N1}, i_{N2}, \dots, i_{Nk}, \quad j = j_{M1}, j_{M2}, \dots, j_{Mk}. \quad (3.50)$$

где су непознате $A_{(w)ij}$ амплитуда, а $\alpha_{(w)ij}$ фаза, које одговарају члану са једнофреквентним компонентним осцилацијама са фреквенцијом сопствених осцилација, док су наредна два члана са познатим амплитудама $\frac{h_{i,j}}{\omega_{(w)0}^2 - \Omega_{ij}^2}$ и

$\frac{\tilde{h}_{i,j}}{\omega_{(w)0}^2 - \tilde{\Omega}_{ij}^2}$, фазама α_{ij} и $\tilde{\alpha}_{ij}$, и са фреквенцијама Ω_{ij} и $\tilde{\Omega}_{ij}$ принудних осцилација

периодичних принудних сила једнаких фреквенција. Непознате интеграционе константе $A_{(w)ij}$ амплитуда, и $\alpha_{(w)ij}$ фаза се одређују из почетних услова; $w_{ij}(t)$, $i = i_{N1}, i_{N2}, \dots, i_{Nk}$, $j = j_{M1}, j_{M2}, \dots, j_{Mk}$ важи за осцилације чворних молекула у радијалном правцу. Свака чворна тачка у овом, принудном режиму осцилује са три фреквенције, једне из сета сопствених фреквенција слободних осцилација и две из сета принудних осцилација:

- по једана фреквенција сета сопствених кружних фреквенција слободних осцилација система $\omega_{(w)0} = \sqrt{\frac{c_{(w)}}{m}}$; -и по једна фреквенција, Ω_{ij} и $\tilde{\Omega}_{ij}$, из сваког од два сета кружних фреквенција Ω_{ij} и $\tilde{\Omega}_{ij}$ принудних осцилација, једнаких фреквенцијама периодичних принудних сила двофреквентних принудних осцилација.

Фреквенције сопствених осцилација чворних молекула у радијалном правцу су исте за све чворне млекуле, јер су масе свих чворних молекула исте, а крутости смо узели да буду исте.

Укратко, у линеарном принудном режиму осциловања чворни молекули осцилују у три ортогонална праца: трофреквентно у радијалном правцу (3.50), вишефреквентно у мердијалном правцу (3.48) и вишефреквентно у циркуларном правцу (3.47). Резултујућа трајекторија појединачног чворног молекула је у виду генералисане просторне *Lissajous*-ове криве.

3.10. Апроксимације решења система нелинеарних диференцијаних једначина за случајеве слободних и принудних осцилација у радијалном правцу

3.10.1. Слободне нелинеарне осцилације чворног молекула у радијалном правцу

Слободне нелинеарне осцилације молекула у радијалном правцу описане су системом (3.27) неспрегнутих нелинеарних диференцијалних једначина свака са једним степеном слободе кретања, а по типу *Georg Duffing*-ових нелинеарних диференцијалних једначина. Уколико узмемо у обзир да је нелинеарност мала и да је пригушење мало и применимо *Lagrange*-ов метод варијационих константи и усредњавања или пак асимптотски метод *Kirilov-Bogolyubov-Mitropolyski* (*Mitropolyskiy & Mosseenkov, 1968, 1976, Mitropolyskiy, 1971, 1995, Mitropolyskiy & Van Dao, 2003*) за решавање овог система нелинеарних диференцијалних једначина, добићемо:

решење одговарајуће линеаризоване диференцијалне једначине:

$$w_{ij}(t) = R_{(w)0ij} e^{-\delta_{(w)} t} \cos(p_{(w)0} t + \alpha_{(w)0}) \quad \text{Где је } p_{(w)0} = \sqrt{\omega_{(w)0}^2 - \delta_{(w)}^2}. \quad (3.51)$$

и

прву асимптотску апроксимацију нелинеарне диференцијалне једначине *Georg Duffing*-овог типа, блиског решењу (3.51) одговарајуће линеарне диференцијалне једначине у облику:

$$w_{ij}(t) = R_{(w)ij}(t) e^{-\delta_{(w)} t} \cos \Phi_{(w)ij}(t). \quad (3.52)$$

где су пуна фаза $\Phi_{(w)ij}(t) = p_{(w)0} t + \phi_{(w)ij}(t)$, фазна разлика $\phi_{(w)ij}(t)$ и $R_{(w)ij}(t)$ амплитуда непознате у функцији од времена, које се одређују из система диференцијалних једначина прве асимптотске апроксимације и имају следећи облик:

$$\begin{aligned} \dot{R}_{(w)ij} &= 0 \\ \dot{\phi}_{(w)ij}(t) &= \frac{3}{8} \frac{\tilde{\omega}_{(w)}^2}{p_{(w)0}} e^{-2\delta_{(w)} t} [R_{(w)ij}]^2. \end{aligned} \quad (3.53)$$

Након интеграљења за $\delta_{(w)} \neq 0$ узимајући у обзир почетне услове $R_{(w)ij}(0) = R_{(w)0ij}$ и $\phi_{(w)ij}(0) = \phi_{(w)0ij}$, за прву апроксимацију амплитуда $R_{(w)ij}(t)$ и фазне разлике $\phi_{(w)ij}(t)$ добијамо:

$$\begin{aligned} R_{(w)ij}(t) &= R_{(w)0ij} = \text{const} \\ \phi_{(w)ij}(t) &= -\frac{3}{16} \frac{\tilde{\omega}_{(w)}^2}{p_{(w)0} \delta_{(w)}} e^{-2\delta_{(w)} t} [R_{(w)ij}]^2 + \phi_{(w)0ij} + \frac{3}{16} \frac{\tilde{\omega}_{(w)}^2}{p_{(w)0} \delta_{(w)}} [R_{(w)ij}]^2. \end{aligned} \quad (3.54)$$

Видимо да је амплитуда $R_{(w)ij}(t) = R_{(w)0ij} = \text{const}$ константна у првој асимптотској апроксимацији и једнака почетној вредности, док је фазна разлика $\phi_{(w)ij}(t)$, нелинеарна функција почетне амплитуде и експоненцијална функција споро променљивог времена.

• Тако да прва асимптотска апроксимација закона сопственог нелинеарног осциловања у радијалном правцу за нелинеарни принудни режим осциловања у неконзервативном систему-за случај $\delta_{(w)} \neq 0$ $\delta_{(w)}$ -коэффициент расипања од пригушења у радијалном правцу, имала следећи облик:

$$w_{ij}(t) = R_{(w)ij}(t) e^{-\delta_{(w)} t} \cos \left(t \sqrt{\omega_{(w)0}^2 - \delta_{(w)}^2} - \frac{3}{16} \frac{\tilde{\omega}_{(w)}^2}{p_{(w)0} \delta_{(w)}} e^{-2\delta_{(w)} t} [R_{(w)ij}]^2 + \phi_{(w)0ij} + \frac{3}{16} \frac{\tilde{\omega}_{(w)}^2}{p_{(w)0} \delta_{(w)}} [R_{(w)ij}]^2 \right). \quad (3.55)$$

Видимо да су ове нелинеарне и пригушене осцилације материјалних тачака у радијалном правцу са експоненцијално опадајућом амплитудом $R_{(w)ij}(t)e^{-\delta_{(w)}t}$, што је последица присуства линеарних дисипативних сила у моделу (вискоеластична својства модела), што се јавља и у другим системима са пригушењем (*Hedrih (Stevanović), 2002b, Karličić et al, 2015*), док је фреквенција нелинеарних дисипативних осцилација у радијалном правцу нелинеарна функција почетне амплитуде и времена и коефицијента пригушења:

$$\omega_{w,nl} = \sqrt{\omega_{(w)0}^2 - \delta_{(w)}^2} - \frac{3}{16} \frac{\tilde{\omega}_{(w)}^2}{p_{(w)0} \delta_{(w)}} \left(e^{-2\delta_{(w)}t} - 1 \right) \left[R_{(w)ij} \right]^2 \quad (3.56)$$

То значи да су ове нелинеарне осцилације неизохроне, јер је перид једнофреквентног осциловања са фреквенцијом зависном од почетне амплитуде и времена трајања осцилација система и да временом долази до смиривања осцилација у радијалном правцу.

Прву асимптотску апроксимацију нелинеарне диференцијалне једначине (3.27) *Georg Duffing*-овог типа, блиског решењу (3.51) одговарајуће линеарне диференцијалне једначине, за случај конзервативног система када је $\delta_{(w)} = 0$ одређујемо у облику (3.55) у коме се пуна фаза $\Phi_{(w)ij}(t) = p_{(w)0}t + \phi_{(w)ij}(t)$, фазна разлика $\phi_{(w)ij}(t)$ и $R_{(w)ij}(t)$ амплитуда као непознате у функцији од времена, одређују из система диференцијалних једначина прве асимптотске апроксимације које имају следећи облик:

$$\begin{aligned} \dot{R}_{(w)ij} &= 0, \\ \dot{\phi}_{(w)ij}(t) &= \frac{3}{8} \frac{\tilde{\omega}_{(w)}^2}{p_{(w)0}} \left[R_{(w)ij} \right]^2. \end{aligned} \quad (3.57)$$

а одговарајућа прва апроксимација кружне фреквенције за нелинеарни конзервативни систем који осцилује без пригушења $\delta_{(w)} = 0$, је:

$$\omega_{(w)0(nl)} = \omega_{(w)0} + \frac{3}{8} \frac{\tilde{\omega}_{(w)}^2}{P_{(w)0}} [R_{(w)ij}]^2. \quad (3.58)$$

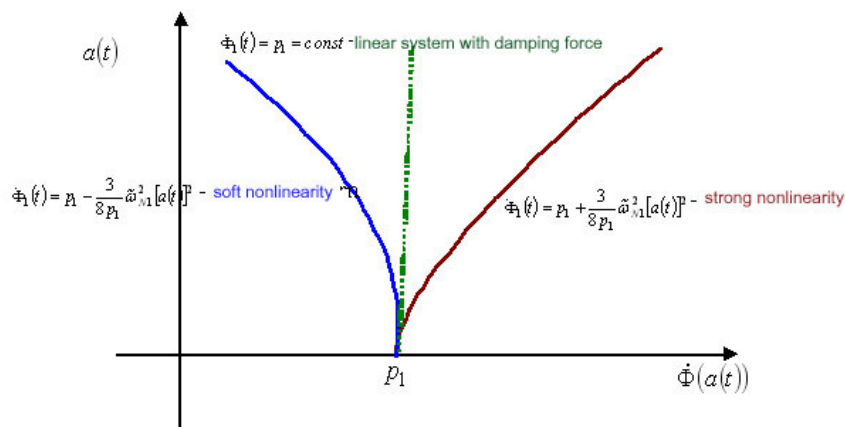
На основу израза (3.58) видимо да је кружна фреквенција $\omega_{(w)0(non-li)}$ у функцији од почетне амплитуде $R_{(w)ij}$ није константна као и да су нелинеарне осцилације и у првој апроксимацији нелинеарне и неизохроне. График зависности кружне фреквенције за нелинеарни систем има облик параболе у функцији амплитуде. Амплитудно фреквентна крива на Слици 3.4 приказује случајеве мале (меке) тврде нелинеарности.

Те криве су скелетне криве за амплитудно фреквентне графике принудних нелинеарних једнофреквентних осцилација у стационарном режиму.

Прва апроксимација решења нелинеарне диференцијалне једначине (3.27), за случај да нема пригушења $\delta_{(w)} = 0$, односно за конзервативни систем, који побуђујемо спољним поремећајем стања равнотеже ZP модела – почетним померајем чворног молекула из равнотежног положаја и почетном брзином, представља закон сопственог осцилаторног једнофреквентног померања чворног молекула у радијалном правцу, у првој асимптотској апроксимацији, и има облик:

$$w_{ij}(t) = R_{(w)ij}(t) \cos \left[\left\langle \omega_{(w)0} + \frac{3}{8} \frac{\tilde{\omega}_{(w)}^2}{P_{(w)0}} [R_{(w)ij}]^2 \right\rangle t + \phi_{(w)0ij} \right]. \quad (3.59)$$

Израз (3.59) показује да осциловање није изохроно, јер фреквенција зависи од почетних услова.



Слика 3.4. Амплитудно -фреквентна крива за случајеве меке (плаво) и тврде (црвено) нелинеарности. Публиковано у (Hedrih et al, 2013a).

3.10.2. Принудне нелинеарне осцилације чворног молекула у радијалном правцу

За принудне осцилације чворног молекула у радијалном правцу, под дејством спољашње једнофреквентне силе, фреквенције Ω_{ij} , нелинеарна диференцијална једначина је у следећем облику:

$$\ddot{w}_{ij}(t) + \omega_{(w)0}^2 w_{ij}(t) = -\tilde{\alpha}_{(w)}^2 w_{ij}^3(t) + h_{i,j} \cos(\Omega_{ij}t + \alpha_{ij}). \quad (3.60)$$

Прва асимптотска апроксимација решења је (види *Mitropolyskiy & Mosseenkov, 1968, 1976, Mitropolyskiy, 1955, 1964, 1971, 1995, Mitropolyskiy & Van Dao, 2003, Goroško & Hedrih (Stevanović), 2001*):

$$w_{ij}(t) = R_{(w)ij}(t) e^{-\delta_{(w)} t} \cos \Phi_{(w)ij}(t) \quad (3.61)$$

у коме се пуна фаза $\Phi_{(w)ij}(t) = p_{(w)0}t + \phi_{(w)ij}(t)$, фазна разлика $\phi_{(w)ij}(t)$ и $R_{(w)ij}(t)$ амплитуда непознате у функцији од времена, и одређују се из система

диференцијалних једначина прве асимптотске апроксимације, које имају следећи облик:

$$\begin{aligned} \dot{R}_{(w)ij} &= \frac{h_{i,j}}{(\omega_{(w)0} + \Omega_{ij})R_{(w)ij}} \sin \phi_{(w)ij}(t) \\ \dot{\phi}_{(w)ij}(t) &= \omega_{(w)0} - \Omega_{ij} + \frac{3}{8} \frac{\tilde{\omega}_{(w)}^2}{P_{(w)0}} e^{-2\delta_{(w)}t} [R_{(w)ij}]^2 - \frac{h_{i,j}}{(\omega_{(w)0} + \Omega_{ij})R_{(w)ij}} \cos \phi_{(w)ij}(t). \end{aligned} \quad (3.62)$$

Претходни систем (3.62) диференцијалних једначина, који се односи на амплитуде и фазе у првој асимптотској апроксимацији, решења у првој асимптотској апроксимацији нелинеарног система важи за случај да се спољња принудна фреквенција $\Omega_{ij} \approx \omega_{(w)0}$ налази у резонантном фреквентном интервалу блиском скупу сопствене кружне фреквенције одговарајућег линеарног система.

Претходни систем (3.62) диференцијалних једначина, у првој апроксимацији, по непознатим: фазној разлици $\phi_{(w)ij}(t)$ и $R_{(w)ij}(t)$ амплитуди се решава по некој од нумеричких метода. Ако се елиминише време добија се зависност амплитуде $R_{(w)ij}(t)$ од фреквенције Ω_{ij} , као и зависност фазне разлике $\phi_{(w)ij}(t)$ од фреквенције Ω_{ij} те можемо скицирати амплитудно-фреквентни и фазно-фреквентни график нелинеарног система. $\Phi_{(w)ij}(t) = \omega_{(w)0}t + \phi_{(w)ij}(t)$, $R_{(w)ij}(t)$ и $\phi_{(w)ij}(t)$ су временске функције, које одређујемо нумерички уз одговарајуће задате почетне услове.

У литератури се могу наћи графици ових кривих, које ћемо користити за анализу принудног режима осциловања чворних тачака у радијалном правцу.

3.11. Квалитативна анализа могућих принудних осцилаторних режима чворних молекула осцилаторног ZP модела

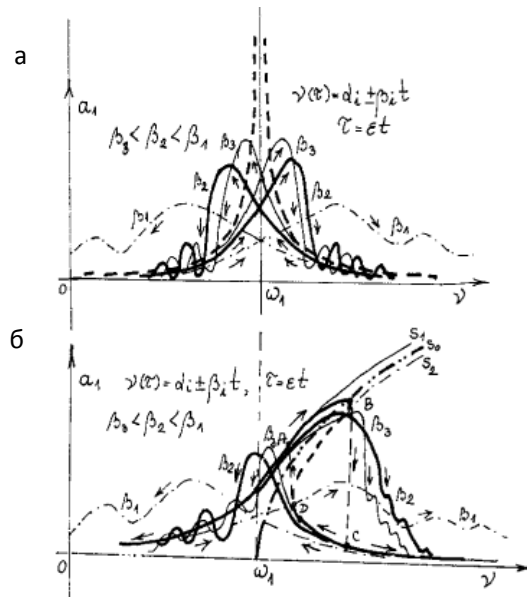
Сада усмеримо нашу пажњу на анализу режима осциловања молекула у чворовима репрезентативног узорка дискретног модела ZP сферне мреже, а користећи аналитичке апроксимације решења за линеарне и нелинеарне осцилације које смо приказали у претходном поглављу на моделу хомогеног система.

Претходни систем (3.62) диференцијалних једначина, у првој апроксимацији, по непознатим- фазној разлици $\phi_{(w)ij}(t)$ и $R_{(w)ij}(t)$ амплитуди за $\Omega_{ij} \approx \omega_{(w)0}$ фреквенцију спољашње принудне једнофреквентне силе која је у резонантном опсегу сопствених кружних фреквенција одговарајућег линеарног система, је аналитичко решење. Стога је потребно да се примени нумерички метод решавања овог система диференцијалних једначина прве апроксимације, за елаборацију података који се могу приказати графички. Користићемо амплитудно-фреквентне и фазно-фреквентне графике познате у литератури за квалитативну анализу принудних осцилаторних режима померања чворних молекула у радијалном правцу. Приказани су квалитативни графици зависности амплитуде $R_{(w)ij}(t)$ од фреквенције Ω_{ij} , као и зависност фазне разлике $\phi_{(w)ij}(t)$ од фреквенције Ω_{ij} .

На слици 3.5 приказан је амплитудно-фреквентни дијаграм принудних линеарних (а) и принудних нелинеарних осцилација (б) за резонантне стационарне и нестационарне једнофреквентне принудне режиме, а за померања чворних молекула у радијалном правцу и за линеарни дискретни модел ZP .

Принудне осцилације чворног молекула у радијалном правцу пролазе кроз нестационарна стања и резонантно фреквентни интервал у зависности од фреквенције спољашње побудне силе. На основу амплитудно фреквентних графика на слици 3.5.а видимо да чворни молекул пролази кроз резонантни интервал различитом брзином промене фреквенције спољашње силе, и да се при мањим брзинама промене те фреквенције развијају веће амплитуде, а за веће брзине промене фреквенције принуде осцилације чворног молекула не добијају

велике амплитуде и брзо изађу из области кинетичког стања резонанције. У случају линеарног модела слика амплитудно-фреквентних кривих стационарног резонантног стања је симетрична у односу на сопствену кружну фреквенцију за исте брзине проласка кроз резонантно стање при смањењу и повећању брзине промене фреквенције принуде. За случај нелинеарног модела та симетрија не постоји. При порасту брзине промене фреквенције у правцу повећања исте развијају се веће амплитуде, него при смањењу вредности фреквенције принуде. На доњем графику са слике за случај нелинеарне динамике јављају се два резонантна скока, које прате и амплитудно-фреквентне криве нестационарног резонантног стања за веома мале брзине пораста или опадања фреквенције спољашње принуде.

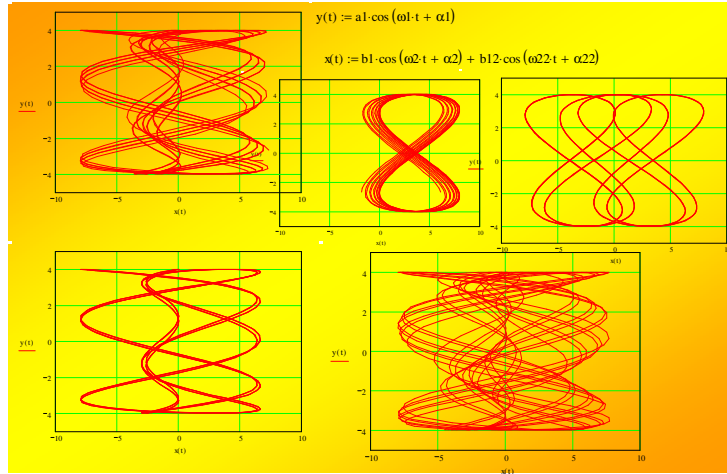


Слика 3.5. Амплитудно -фреквентни дијаграм принудних линеарних (а) и нелинеарних једнофреквентних осцилација (б) за стационарана и нестационарна стања у фреквентном интервалу који је у околини резонантне фреквенције. График одговра амплитудно фреквентном дијаграму за радијални правац за линеаризовани систем. Публиковано у (Hedrih et al, 2013a).

Из претходне анализе можемо закључити да код нелинеарних принудних осцилација чворних молекула у радијалном правцу, ако су фреквенције спољашње силе константне дискретне вредности у резонантном интервалу се појављују три вредности амплитуда, две стационарне стабилне, и једна стационарна нестабилна амплитуда, којима чворни молекул стабилно или нестабилно осцилује, и могућност појаве резонантног скока амплитуде. То се може остварити ако је сперматозоид дејствује на чворни молекул константном фреквенцијом. Ако фреквенција дејства сперматозоида променљива, што је могуће, онда имамо нестационарно нелинеарно резонантно осциловање чворног молекула у радијалном правцу. Ако је то мала брзина промене фреквенције дејства сперматозоида развијају се веће амплитуде осциловања молекула при порасту фреквенције спољашње побуде, а мање амплитуде, ако та фреквенција опада. Те амплитуде утичу на повећање или смањење дебљине ZP у моделу.

Примери из литературе за амплитудно фреквентне графике за двофреквентне нелинеарне осцилације (*Hedrih (Stevanović), et al, 2015a, 2015b*), указују на интеракцију нелинеарних модова у вишефреквентном принудном стационарном и у нестационарним режимима, која се изражава и у преносу енергије са једног на други мод, као и у повећању или смањењу амплитуда једног или другог нелинеарног мода осциловања. То је ефекат који би могао значајно да утиче на кинетичка осцилаторна стања чворних молекула, а самим тим и целог дискретног модела ZP . Овде само квалитативно указујемо на утицај интеракције нелинеарних модова на кинетичко стање осциловања ZP .

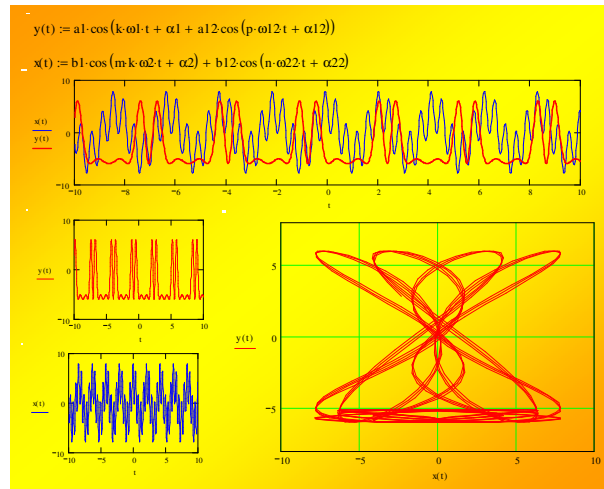
Примери, могућег компонентног периодичног кретања чворних молекула у равни, која је тангентна на површину сфере јајне ћелије, за случај дискретног хомогеног модела ZP приказани су на сликама 3.6. и 3.7. Трајекторије су у виду генералисаних *Lissajous*-ових кривих у равни, и представљају периодичне атракторе добијене сабирањем (ортогоналном суперпозицијом) осцилаторних вишефреквентних померања у два ортогонална правца, меридијаном и циркуларном. Осцилаторно померање чворног молекула у радијалном правцу није укључено. Уколико укључимо и радијално померање добићемо просторне генералисане *Lissajous*-ове криве (померање у сва три ортогонална правца).



Слика 3.6. Серија могућих генералисаних *Lissajous*-ових кривих која приказује скоро периодичне атракторе -примери периодичних резултујућих путања сопственог осцилаторног кретања молекула у *ZP* мрежи, као ортогонална суперпозиција два компонентна (једног једнофреквентног и једног двофреквентног) померања у два ортогонална правца- радијалном и циркуларном. Публиковано у (*Hedrih et al, 2013a*).

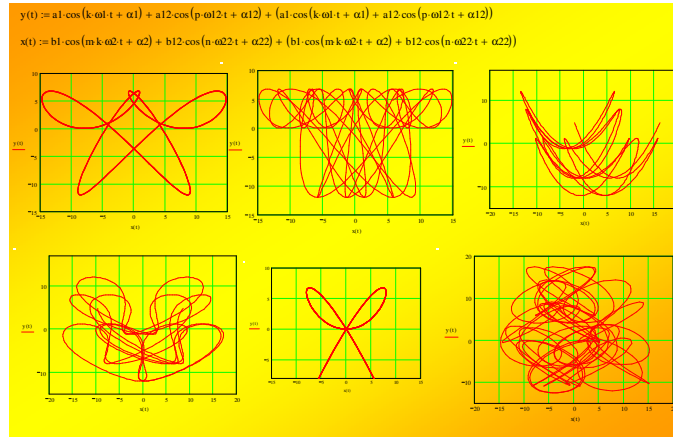
На слици 3.7. приказан је пример периодичне резултујуће путање сопственог осцилаторног кретања чворног молекула у *ZP* мрежи, као ортогонална суперпозиција два компонентна, оба двофреквентна осцилаторна померања у два ортогонална правца- циркуларном и меридионалном правцу. Лево на слици су приказани временски дијаграми промена компонентних померања чворног молекула у циркуларном и меридионалном правцу за почетне услове који дозвољавају успостављање двофреквентних сопствених осцилација у оба правца.

На слици 3.8. приказани су примери периодичних и хаотичних резултујућих путања сопственог осцилаторног кретања чворних молекула у *ZP* мрежи, у равни, која је тангентна на површину сфере јајне ћелије, као ортогонална суперпозиција два компонентна, оба четворофреквентна осцилаторна померања, у два ортогонална правца - циркуларном и меридијалном правцу, за почетне услове који дозвољавају успостаљање четворофреквентних сопствених осцилација чворног молекула у оба правца.



Слика 3.7. Пример периодичног резултујућег путања сопственог осцилаторног кретања чворног молекула у ZP мрежи, као ортогонална суперпозиција два компонентна, оба двофреквентна осцилаторна померања у два ортогонална правца- циркуларном и меридијалном правцу. Лево на слици су приказани временски дијаграми промена компонентних померања чворног молекула у циркуларном и меридијалном правцу за почетне услове који дозвољавају успостављање двофреквентних сопствених осцилација у оба правца. Публиковано у (Hedrih et al, 2013a).

Укратко, ZP и јајну ћелију, смо посматрали као биомеханички дискретни осцилатор са коначним бројем степени слободе осциловања. Овај приступ је иновативан и погодан за проучавање промена биомеханичких, односно биокинетичких параметара ZP током процеса сазревања и оплодње. Намера нам је била да покушамо да објаснимо са становишта теорије осцилација, биомеханичке промене и идентификујемо биокинетичке линеарне и нелинеарне феномене и могуће режиме осциловања ZP које су последица биохемијских и структурних промена ZP које се дешавају током појединих сукцесивних фаза оплодње.



Слика 3.8. Примери периодичних и хаотичних резултујућих путања сопственог осцилаторног кретања молекула у ZP мрежи, у равни, која је тангентна на површину сфере јајне ћелије, као ортогонална суперпозиција два компонентна оба четворофреквентна осцилаторна померања у два ортогонална правца-циркуларном и меридијалном правцу, за почетне услове који дозвољавају успостаљање четворофреквентних сопствених осцилација чворног молекула у оба правца. Публиковано у (*Hedrih et al, 2013a*).

ZP миша је моделована као дискретна једнослојна сферна осцилаторна мрежа, која пролази кроз три различите фазе до оплодње, и кроз најмање три од више могућих различитих осцилаторних стања од овулације до оплодње. Дали смо различите системе линеарних и нелинеарних диференцијалних једначина кретања молекула у дискретној сферној ZP мрежи, зависно од претпостављених својстава дискретног модела сферне ZP мреже и његових материјалних параметара, за свако стање и типове кретања молекула одредили аналитичка решења, тачна или апроксимативна, где су сазнања математике то дозвољавала или користећи аналогне графике из литературе добијене нумеричким путем, и разматрали њихову могућу биолошку улогу.

Крајњи положаји и крајње брзине материјалних тачака (кинетичко стање) из претходне фазе и по једном моделу описаном једним системом диференцијалних једначина, су узети као почетне позиције и почетна кинетичка стања за наредно осцилаторно стање ZP мреже у наредној фази и одговарајућем моделу описаном

другим системом диференцијалних једначина, линеарним, или нелинеарним или аутономним или неаутономним.

Материјалне тачке (молекули) у ZP мрежи одговарају ZP гликопротеинима. Осцилатронски модел ZP мреже сматрамо након овулације конзервативним, хомогеним и нелинеарним и он социлује у слободно режиму сопствених (аутономних) осцилација. Везе између материјалних тачака –молекула су идеално еластичне и ZP мрежа има идеално еластична својства.

Да би смо математички описали слободне линеарне (3.21-3.23) односно нелинеарне осцилације (3.27-3.29) чворних молекула инициране овулацијом користимо одговарајуће системе диференцијалних једначина. Сматрамо да овулација изазива иницијалну пертурбацију молекула ZP мењајући им стање мировања и положаје стабилне равнотеже природног стационарног стања премештањем из почетног положаја и саопштавајући им почетну брзину.

Да би смо нашли прву апроксимацију аналитичког решења нелинеарне диференцијалне једначине, прво смо линеаризовали систем и нашли његово решење, а затим тражили прву асимптотску апроксимацију блиску том решењу, а која одговара решењу у нелинеарном случају за хомогени модел. У овом случају очекујемо да резултујуће померање молекула ZP мреже буде у виду периодичних атрактора у форми генерализованих просторних *Lissajus*- ових крива (*Hedrih et al, 2013a*).

Када је ZP изложена сперматозоидима, који делују на њену површину у форми дисконтинуираног поновљеног еластичног удара, ZP мрежа осцилује у принудном вишефреквентном режиму. Тада сматрамо да је ZP линеаран, конзервативни систем. Везе између елемената ZP мреже су и даље идеално еластичне.

Да би смо математички описали принудне линеарне (3.24-3.26) односно принудне нелинеарне осцилације (3.30-3.32) чворних молекула инициране дисконтинуираним периодичним дејством сперматозоида на спољну површину ZP мреже, користимо одговарајуће диференцијалне једначине. У овом стању, очекујемо да су резултујућа померања ZP молекула могу бити у форми периодичних атрактора али такође, и кретање молекула може бити налик хаотичном или налик стохастичком. Резултујућа путање кретања чворних

молекула су у форми генерализаних просторних *Lissajus*-ових кривих. Пенетрација сперматозооида кроз *ZP* мрежу је могућа једино када молекули осцилују периодично. У случају вишефреквентних принудних осцилација могућност за периодично кретање је мање и могућности да већи број сперматозооида пенетрира *ZP* мрежу се такође смањују.

Након што један сперматозооид успешно продре кроз *ZP* настаје кортикална реакција *ZP* и остали сперматозооиди бивају одбијени и спречен њихов продор кроз *ZP* – „*polyspermy block*„ Сад је систем *ZP* нелинеаран и осцилује у принудном режиму још кратко време. Након ове транзиторне фазе, *ZP* систем није више под утицајем сперматозооида и има следеће карактеристике: систем је нелинеаран, хомоген и неконзервативан, анизохоран и осцилује у слободном режиму са пригушењем. *ZP* мрежа сада има високо еластична својства.

На основу резултата прве апроксимације аналитичких решења, пре оплодње очекујемо да су померања молекула у осцилаторној *ZP* мрежи у форми периодичних атрактора генерализаних *Lissajus*-ових кривих; након оплодње очекујемо да су кретања *ZP* молекула слична хаотичном кретању али и да постоје и периодична кретања.

На основу претходних анализа могућих комбинација померања чворних молекула *ZP* мреже у сва три ортогонална правца као и померања нечворних молекула у два правца, можемо да закључимо да су пре оплодње могући различити типови мултифреквентних режима осциловања-од чисто периодичних до налик хаотичним и налик случајним. Такође је могуће да се јавља синхронизација и асинхронизација. Уколико чворне тачке у моделу сферне осцилаторне мреже осцилују синхроно – то сматрамо повољним осцилаторним кинетичким стањем за успешни продор сперматозоода кроз *ZP* и последичну оплодњу. Кретања *ZP* гликопротеина, која су слична хаотичном или стохастичком кретању сматрамо неповољним осцилаторним кинетичким стањем за продор сперматозооида. Модел може да послужи за објашњење осцилаторног понашања *ZP* јајних ћелија сисара, које се састоје од 3 *ZP* гликопротеина.

Када је један молекул у *ZP* мрежи побуђен дво- или вишефреквентним спољним побудама у радијалном правцу, може да дође до интеракције између

нелинеарних модова, а у резонантном режиму могућа је и појава више резонантних скокова.

Имајући у виду, да се при нелинеарним принудним осцилацијама у резонантном фреквентном опсегу јављају могуће три стационарне амплитуде, од чега су све стабилне а једна између њих нестабилна, те три вредности заједно чине један тригер спрегнутих стационарних амплитуда у резонантном фреквентном опсегу. На крајевима тог тригера спрегнутих стационарних амплитуда јављају се резонантни скокови амплитуда са више на нижу стабилну, или обрнуто са ниже на вишу стабилну стационарну амплитуду. То се може уочити са амплитудно – фреквентне криве стационарног резонантног стања са слике 3.5. Такав тригер спрегнуте три стационарне фазе је могуће уочити и на фазно-фреквентним графицима нелинеарних система у резонантним фреквентним интервалима. На фазно-фреквентним графицима на крајевима са скупом тригера спрегнутих сингуларитета за једнофреквентне осцилације се јављају резонантни скокови фаза.

Молекули у *ZP* мрежи се померају у три ортогонална правца и осцилацију у сваком правцу у вишефреквентном режиму осциловања и асинхроно и у виду просторних генерализаних *Lissajus*-ових крива. Модел дискретне осцилаторне мреже *ZP* је осцилаторни модел и омогућава нам да апроксимативно одредимо сет сопствених кружних фреквенција *ZP* мреже. Модел може да објасни осцилаторно понашање *ZP* у процесу оплодње, промену њеног дијаметра и конзистенције.

Предложени осцилаторни модел *ZP* представља нови приступ у објашњењу структурних промена *ZP* пре и у току процеса оплодње, услове за пенетрацију сперматозооида и *polyspermy block*. Осцилаторни модел *ZP* може да објасни зашто је могуће да само један сперматозооид продире кроз *ZP* у процесу оплодње-то би био онај који осцилује у резонанцији са *ZP* мрежом односно сету фреквенција које одговарају делу сета сопствених фреквенцијама осциловања *ZP* мреже. Потребне су додатне нумеричке анализе за мултипараметарско повезивање кинетичких параметара модела и резонантних стања, али на комплетном моделу сферне мреже са коначно много великим бројем степени слободе кретања и одговарајућим бројем диференцијалних једначина кретања истих.

Један од даљих праваца истраживања био би унапређење осцилаторног модела и развој вишеслојног модела ZP мреже. Такође било би интересно и значајно размотрити, како се систем понаша када је окружен течностима (више би одговарало реалном систему оплодње) када осцилује у слободном и принудном режиму- у том случају би систем осциловао са пригушењем и разматрали би се феномени интеракције флуида и ZP и скупа сперматозооида. То отвара нове правце за шири тим истраживача. Остају отворена и многа друга интересантна питања као што су на пример: услови под којима долази до резонанције, синхронизација кретања молекула у осцилаторној ZP мрежи, што тражи и експериментална истраживања (Hedrih et al, 2013a).

3.12. Осцилаторна својства репрезентативног узорка дискретног осцилаторног модела сферне ZP мреже

На слици 3.9ц приказан је минимални сегмент сферне осцилаторне дискретне мреже ZP који задржава моларни однос ZP молекула као у ZP миша ($ZP1: (ZP2-ZP3)= 1:5$ и $ZP2: ZP3=1:1,1$). Овај сегмент ћемо назвати репрезентативни сегмент осцилаторног модела ZP мреже.

Ланци на сликама 3.9а и г представљају нехомогене ланце аналогних својстава када су одвојени. У овом делу ћемо најпре приказати осцилаторна својства тих ланаца у сопственим, као и принудним режимима осциловања. под дејством спољашње силе или поремећаја њихове стабилне равнотеже у мировању. Затим ће ти резултати одговарајућим комбинацијама у циркуларном и меридијалном правцу за четири таква укрштена ланца одговарајућим суперпозицијама (колинеарним или ортогоналним) послужити за анализу различитих кинетичких параметара и осцилаторних режима репрезентативног сегмента модела осцилаторне ZP мреже.

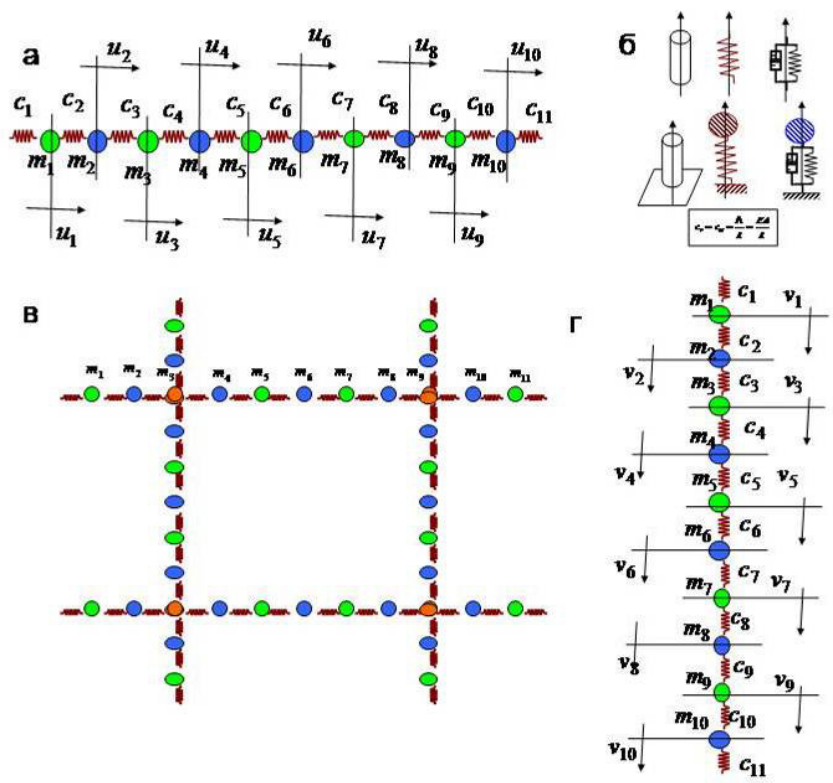
На слици 3.10. приказани су модели кратких репрезентативних ланаца у радијалном правцу, којима се повезују дугачки ортогонални ланци у циркуларном и меридијалном правцу, а који формирају сферну површинску мрежу. Кратким

ланцима се сферна површинска мрежа од ланаца у циркуларном и меридијалном правцу везује за сферну површ јајне ћелије.

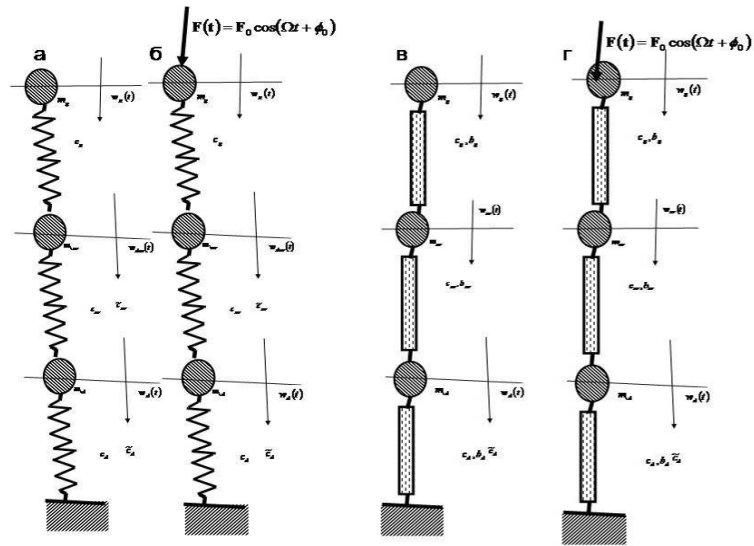
Имајући у виду, да су три правца радијални, циркуларни и меридијални ортогонални, то су и померања тачака у тим правцима ортогонална, и представљају главне нормалне координате система. Описивањем динамике целог система преко тих координата померања материјалних тачака и везама стандарним елементима вискоеластичних својстава се обезбеђује независност померања тачака у тим правцима. Из тих разлога се систем диференцијалних једначина целокупног механичког модела репрезентативног узорка ZP дели на три независна подсистема диференцијалних који су истовремено и главни ланци механичке мреже и модела осциловања система.

То значи да су главни подсистеми посматраног модела система динамички независни и да је довољно да проучимо кинетичке параметре три типа ланаца у режимима сопствених и принудних осцилација, као и са различитим својствима везивања материјалних тачака у тим ланцима. Имајући то у виду када одредимо својства три карактеристична ланца и аналитичке изразе за померања материјалних тачака у правцима протезања тих ланаца, није тешко, мењањем почетних услова, направити квалитативну и квантитативну анализу компонентних померања сваке од материјалних тачака (молекула) у ланцима. За различите почетне услове добићемо једно или вишефреквентне осцилације у правцима ланаца, којима припадају те материјалне тачке, скицирати временске функције сваког од компонентних померања сваке материјалне тачке на изабраном површинском сегменту сферне мреже, као и за поједине чворне тачке.

Слагањем ортогоналних осцилација, ортогоналних компонентних померања једне материјалне тачке, односно сваке од материјалних тачака редом можемо, за различите почетне услове (почетне брзине и померања од равнотежне конфигурације система), моделирати њихове путање коришћењем генералисаних *Lissajus*-ових кривих, које представљају површинске путање појединих материјалних тачака и испитивати услове синхронизације и асинхронизације, као и *Lissajus*-ових атрактора, и на основу тога извести поједине закључке о погодности или непогодности проласка сперматозоида кроз дискретну сферну мрежу.



Слика 3.9.а. репрезентативни минимални узорак нехомогеног ланца у циркуларном правцу $u_k(t)$, $k=1,2,3,\dots,10$. б. стандардним лаки елементи везе међу њима. в. сегмент модела сферне дискретене мреже ZP миша који задржава моларни однос ZP гликопротеина као у ZP миша. г. репрезентативни минимални узорак нехомогеног ланца у меридијалном правцу $v_k(t)$, $k=1,2,3,\dots,10$. Наранџасто ($ZP1$)-чворни молекули, плаво ($ZP2$) и зелена ($ZP3$) који се периодично понављају.



Слика 3.10. Разни могући модели ланца са три степена слободe кретања за везивање чворних молекула у радијалном правцу, у моделу дискретне сферне мреже ZP , за сферну површ јајне ћелије; померања чворног молекула и друга два молекула, у ланцу у радијалном правцу, су означена са $w_k(t)$, $k = 1, 2, 3$. Модели радијалних ланаца а и б са еластичним везама међу молекулима, в и г са вискоеластичним елементима спреге. Модели радијалних ланаца а и в за изучавање сопствених осцилација, а б и г принудних осцилација материјалних тачака у радијалним правцима.

3.13. Систем диференцијалних једначина динамике система материјалних тачака у ланцима у радијалном правцу. Сопствене кружне фреквенције и закони осиловања.

Диференцијалне једначине осциловања материјалних тачака модела ланца у радијалном правцу, састављамо избором генералисаних координата, померања материјалних тачака у радијалном правцу $w_k(t)$, $k = 1, 2, 3$, које смо изабрали сагласно степенима слободe кретања материјалних тачака о којима смо закључили у уводном делу да су главне координате подсистема независних неспрегнутих ланаца.

На слици 3.10 приказани су разни модели ланца у радијалном правцу - померања $w_k(t)$, $k=1,2,3$. а Модел ланца у радијалном правцу пре фертилизације, у режиму слободних осцилација; б. Модел ланца, у радијалном правцу, пре фертилизације, у режиму принудних осцилација; в. Модел ланца у радијалном правцу, после фертилизације у режиму слободних осцилација; г Модел ланца, у радијалном правцу, после фертилизације у режиму принудних осцилација.

Имајући, сада претходно речено у виду, то за случај модела са слике 3. 10а имамо идеално еластични ланац са три степена слободне кретања, па за исти можемо написати изразе за кинетичку и потенцијалну енергију за слободне осцилације система у следећем облику:

Кинетичка енергија је једнака збиру половина производа масе и квадрата брзне сваке од три материјалне тачке.:

$$E_k = \frac{1}{2}(m_g \dot{w}_g^2 + m_{sr} \dot{w}_{sr}^2 + m_d \dot{w}_d^2) \quad (3.63)$$

Матрица инерцијских коефицијената система за посматрани ланац са три материјалне тачке у радијалном правцу се формира од коефицијаната квадратне форме кинетичке енергије, и дијагонална је, јер нема мешовитих чланова већ само квадратне чланове брзина, у радијалном правцу, те је:

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} m_g & & \\ & m_{sr} & \\ & & m_d \end{pmatrix} \quad (3.64)$$

Потенцијална енергија се формира од потенцијалних енергија створених деформационим радом у процесу деформисања опруга истезањем или сабијањем за разлику померања сваке од тачака за које је везана $(w_{sr} - w_g)$, $(w_d - w_{sr})$ и (w_d) , па је израз за потенцијалну енергију:

$$E_p = \frac{1}{2}c_g (w_{sr} - w_g)^2 + \frac{1}{2}c_{sr} (w_d - w_{sr})^2 + \frac{1}{2}c_d w_d^2 \quad (3.65)$$

Матрица коефицијена еластичности система, састављена од коефицијената квадратне форме (3.65), је:

$$\mathbf{C} = \begin{pmatrix} c_g & -c_g & 0 \\ -c_g & c_g + c_{sr} & -c_{sr} \\ 0 & -c_{sr} & c_{sr} + c_d \end{pmatrix} \quad (3.66)$$

Систем дифернцијалних једначина, динамике материјалних тачака у радијалном ланцу и у радијалном правцу, се може саставити, помоћу матрица инерције и матрице коефицијена еластичности, у следећем облику:

$$\mathbf{A} \begin{Bmatrix} \ddot{w}_g \\ \ddot{w}_{sr} \\ \ddot{w}_d \end{Bmatrix} + \mathbf{C} \begin{Bmatrix} w_g \\ w_{sr} \\ w_d \end{Bmatrix} = 0 \quad (3.67)$$

или у развијеном облику

$$\begin{pmatrix} m_g & & \\ & m_{sr} & \\ & & m_d \end{pmatrix} \begin{Bmatrix} \ddot{w}_g \\ \ddot{w}_{sr} \\ \ddot{w}_d \end{Bmatrix} + \begin{pmatrix} c_g & -c_g & 0 \\ -c_g & c_g + c_{sr} & -c_{sr} \\ 0 & -c_{sr} & c_{sr} + c_d \end{pmatrix} \begin{Bmatrix} w_g \\ w_{sr} \\ w_d \end{Bmatrix} = 0 \quad (3.68)$$

Решења претпоставимо у облику:

$$\begin{Bmatrix} w_g \\ w_{sr} \\ w_d \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} A_g \\ A_{sr} \\ A_d \end{Bmatrix} \cos(\omega t + \alpha) \quad (3.69)$$

и други извод претпостављеног решења је:

$$\begin{Bmatrix} \ddot{w}_g \\ \ddot{w}_{sr} \\ \ddot{w}_d \end{Bmatrix} = -\omega^2 \begin{Bmatrix} A_g \\ A_{sr} \\ A_d \end{Bmatrix} \cos(\omega t + \alpha) \quad (3.70)$$

У претпостављеном решењу матрица колоне $\begin{Bmatrix} A_g \\ A_{sr} \\ A_d \end{Bmatrix}$ садржи непознате

амплитуде и непознату фреквенцију ω и фазу α .

Уношењем претпостављеног решења и другог извода решења и скраћивањем са чиниоцем $\cos(\omega t + \alpha)$ добијамо матричну алгебарску једначину по непознатим амплитудама A_g , A_{sr} и A_d и фреквенцији ω , у облику:

$$-\omega^2 \begin{pmatrix} m_g & & \\ & m_{sr} & \\ & & m_d \end{pmatrix} \begin{Bmatrix} A_g \\ A_{sr} \\ A_d \end{Bmatrix} + \begin{pmatrix} c_g & -c_g & 0 \\ -c_g & c_g + c_{sr} & -c_{sr} \\ 0 & -c_{sr} & c_{sr} + c_d \end{pmatrix} \begin{Bmatrix} A_g \\ A_{sr} \\ A_d \end{Bmatrix} = 0 \quad (3.71)$$

или

$$\begin{pmatrix} c_g - \omega^2 m_g & -c_g & 0 \\ -c_g & c_g + c_{sr} - \omega^2 m_{sr} & -c_{sr} \\ 0 & -c_{sr} & c_{sr} + c_d - \omega^2 m_d \end{pmatrix} \begin{Bmatrix} A_g \\ A_{sr} \\ A_d \end{Bmatrix} = 0 \quad (3.72)$$

Да би претходни систем алгебарских једначина у матричном облику имао решења, која су различита од тривијалних, једнаких нули, потребно је да детерминанта тог система буде једнака нули. Из тог услова добијамо фреквентну једначину, чији корени (нуле) представљају квадрате сопствених кружних фреквенција слободног (сопственог, аутономног) осциловања овог система, односно молекула, у радијалном правцу. На основу тога пишемо следећи услов:

$$f(\omega^2) = |\mathbf{C} - \omega^2 \mathbf{A}| = 0 \quad (3.73)$$

односно у развијеном облику:

$$f(\omega^2) = \begin{vmatrix} c_g - \omega^2 m_g & -c_g & 0 \\ -c_g & c_g + c_{sr} - \omega^2 m_{sr} & -c_{sr} \\ 0 & -c_{sr} & c_{sr} + c_d - \omega^2 m_d \end{vmatrix} = 0 \quad (3.74)$$

Који даје фреквентну једначину осцилаторног система.

У развијеном облику ова фреквентна једначина осциловања молекула, линеарног система у радијалном правцу, гласи:

$$f(\omega^2) = (c_g - \omega^2 m_g)(c_g + c_{sr} - \omega^2 m_{sr})(c_{sr} + c_d - \omega^2 m_d) - c_g^2(c_{sr} + c_d - \omega^2 m_d) - c_{sr}^2(c_g - \omega^2 m_g) = 0 \quad (3.75)$$

С обзиром да се ради о нелинеарној алгебарској једначини кубној по квадрату ω^2 , карактеристичном броју њене корене не можемо одредити у аналитичком облику, те користимо одговарајући софтверски алат који користи једну од многих нумеричких метода за одређивање нула (корена) алгебарске нелинеарне једначине. Одредићемо те карактеристичне бројеве помоћу графика функције и њених пресека са апсцисном осом.

Сада да би се у софтверском пакету у одредила три корена, претходне фреквентне једначине, која је алгебарска нелинеарна једначина, потребно је да се нацрта функција

$$f(x) = (c_g - x m_g)(c_g + c_{sr} - x m_{sr})(c_{sr} + c_d - x m_d) - c_g^2(c_{sr} + c_d - x m_d) - c_{sr}^2(c_g - x m_g)$$

односно увиђењем смене $x = \omega^2$ ради поједностављења:

$$f(x) = (c_g - x m_g)(c_g + c_{sr} - x m_{sr})(c_{sr} + c_d - x m_d) - c_g^2(c_{sr} + c_d - x m_d) - c_{sr}^2(c_g - x m_g) \quad (3.76)$$

За задате вредности маса m_g, m_{sr} и m_d и крутости оприга c_g, c_{sr} и c_d , цртамо график претходне функције и са графика прочитамо вредности апсциса $x_1 = ?$, $x_2 = ?$ и $x_3 = ?$, где функција $f(x)$ пресеца апсцисну осу. Те вредности су три карактеристична броја и представљају квадрате три сопствене кружне фреквенције сопствених осцилација система приказаног моделом 3.10а. Када се прочитају те вредности онда се из њих одређују квадратни корени, па се тиме добијају три сопствене кружне фреквенције посматраног ланца.

$$\omega_1 = \sqrt{x_1}, \quad \omega_2 = \sqrt{x_2}, \quad \omega_3 = \sqrt{x_3} \quad (3.77)$$

Тиме су дређене нумеричке вредности три сопствене кружне фреквенције модела са слике 3.10а.

Даља решења матричне диференцијалне једначине (3.68), имајући у виду да смо добили три вредности сопствених фреквенција, то значи да смо добили и три партикуларна решења која одговатају свакој од добијених фреквенција, па је опште решење једнако збиру партикуларних решења, опште решење добијамо у трофреквентном режиму:

$$\begin{Bmatrix} w_g \\ w_{sr} \\ w_d \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} A_g^{(1)} \\ A_{sr}^{(1)} \\ A_d^{(1)} \end{Bmatrix} \cos(\omega_1 t + \alpha_1) + \begin{Bmatrix} A_g^{(2)} \\ A_{sr}^{(2)} \\ A_d^{(2)} \end{Bmatrix} \cos(\omega_2 t + \alpha_2) + \begin{Bmatrix} A_g^{(3)} \\ A_{sr}^{(3)} \\ A_d^{(3)} \end{Bmatrix} \cos(\omega_3 t + \alpha_3) \quad (3.78)$$

У коме су односи амплитуда партикуларних решења:

$$\frac{A_g^{(s)}}{c_g^2} = \frac{A_g^{(s)}}{c_{sr}(c_g - \omega_s^2 m_g)} = \frac{A_g^{(s)}}{c_g^2 - (c_g - \omega_s^2 m_g)(c_g + c_{sr} - \omega_s^2 m_{sr})} = C_s, \quad s = 1, 2, 3 \quad (3.79)$$

Изрази у имениоцима претходног односа (3.79) су кофактори $K_{3k}^{(s)}$, $k = 1, 2, 3$, $s = 1, 2, 3$ елемената треће врсте из детерминанте у фреквентној једначини (3.72) односно (3.74). Овај однос (3.79) треба израчунати за сваки од корена ω_s^2 , $s = 1, 2, 3$, које смо одредити, што значи да за сваку непознату амплитуду добијамо три:

$$\begin{aligned} A_g^{(s)} &= c_g^2 C_s = K_{31}^{(s)} C_s & s &= 1, 2, 3 \\ A_g^{(s)} &= c_{sr}(c_g - \omega_s^2 m_g) C_s = K_{32}^{(s)} C_s & s &= 1, 2, 3 \\ A_g^{(s)} &= [c_g^2 - (c_g - \omega_s^2 m_g)(c_g + c_{sr} - \omega_s^2 m_{sr})] C_s = K_{33}^{(s)} C_s & s &= 1, 2, 3 \end{aligned} \quad (3.80)$$

Када се одреде ове амплитуде, онда се враћамо у трофреквентна решења (3.78) у којима су непознате константе интеграције C_1 , C_2 и C_3 , као и α_1 , α_2 и α_3 , и има их шест и одређују се из почетних услова. Почетни услови се бирају, тако да решења у општем случају могу бити трофреквентна, двофреквентна или једнофреквентна у различитим комбинацијама.

Решења у коначном облику се могу написати:

$$\begin{Bmatrix} w_g \\ w_{sr} \\ w_d \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} K_{31}^{(1)} \\ K_{32}^{(1)} \\ K_{33}^{(1)} \end{Bmatrix} C_1 \cos(\omega_1 t + \alpha_1) + \begin{Bmatrix} K_{31}^{(2)} \\ K_{32}^{(2)} \\ K_{33}^{(2)} \end{Bmatrix} C_2 \cos(\omega_2 t + \alpha_2) + \begin{Bmatrix} K_{31}^{(3)} \\ K_{32}^{(3)} \\ K_{33}^{(3)} \end{Bmatrix} C_3 \cos(\omega_3 t + \alpha_3) \quad (3.81)$$

у којима су непознате константе интеграције C_1 , C_2 и C_3 , као и α_1 , α_2 и α_3 , које се одређују из почетних услова: три почетна померања из равнотежног положаја молекула у радијалном правцу и три почетне брзине молекула у радијалном правцу:

$$\begin{Bmatrix} w_g(0) \\ w_{sr}(0) \\ w_d(0) \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} w_{g,0} \\ w_{sr,0} \\ w_{d,0} \end{Bmatrix} \quad \text{и} \quad \begin{Bmatrix} \dot{w}_g(0) \\ \dot{w}_{sr}(0) \\ \dot{w}_d(0) \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} \dot{w}_{g,0} \\ \dot{w}_{sr,0} \\ \dot{w}_{d,0} \end{Bmatrix} \quad (3.82)$$

Тиме је комплетно решен систем диференцијалних једначина које описују трофреквентне сопствене осцилације три молекула у радијалном ланцу за померања у радијалном правцу.

Можемо увести матрицу колону главних координата ланца у радијалном правцу са три молекула, у облику:

$$\begin{Bmatrix} \xi_1 \\ \xi_2 \\ \xi_3 \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} C_1 \cos(\omega_1 t + \alpha_1) \\ C_2 \cos(\omega_2 t + \alpha_2) \\ C_3 \cos(\omega_3 t + \alpha_3) \end{Bmatrix} \quad (3.83)$$

Функционална зависност главних координата од времена је периодична са одговарајућом сопственом кружном фреквенцијом и те функционалне периодичне зависности представљају главне сопствене модове сопствених осцилација овог ланчаног система са три степени слободе осциловања.

Помоћу кофактора $K_{3k}^{(s)}$, $k=1,2,3$, $s=1,2,3$ елемената треће врсте из детерминанте у фреквентној једначини (3.72), можемо саставити модалну матрицу ланчаног система са три степени слободе осциловања, у облику:

$$\mathbf{R} = \begin{pmatrix} K_{31}^{(1)} & K_{31}^{(2)} & K_{31}^{(3)} \\ K_{32}^{(1)} & K_{32}^{(2)} & K_{32}^{(3)} \\ K_{33}^{(1)} & K_{33}^{(2)} & K_{33}^{(3)} \end{pmatrix} \quad (3.84)$$

и помоћу те модалне матрице и главних координата, написати решења за сопствене осцилације молекула у радијалном правцу, у облику:

$$\begin{Bmatrix} w_g \\ w_{sr} \\ w_d \end{Bmatrix} = \mathbf{R} \begin{Bmatrix} C_1 \cos(\omega_1 t + \alpha_1) \\ C_2 \cos(\omega_2 t + \alpha_2) \\ C_3 \cos(\omega_3 t + \alpha_3) \end{Bmatrix} = \mathbf{R} \begin{Bmatrix} \xi_1 \\ \xi_2 \\ \xi_3 \end{Bmatrix} \quad (3.85)$$

Из претходног израза лако је закључити да у општем случају почетних услова сва три сопствена мода осциловања система доприносе режиму осциловања и да су сопствене осцилације трофреквентне. Почетним условима се може моделирати режим осциловања молекула у ланцу у радијалном правцу.

3.14. Систем диференцијалних једначина аутиномне динамике система материјалних тачака у ланцима у циркуларном, или меридијалном правцу. Сопствене кружне фреквенције и закони осциловања.

Као што смо већ приказали ланци на сликама 3.9. а, г, представљају нехомогене ланце аналогних својстава када су одвојени.

Сада ћемо изучити осцилаторна својства тих ланаца у сопственим аутономним режимима осциловања.

Диференцијалне једначине осциловања материјалних тачака (молекула) ланца у циркуларном и меридијалном правцу, састављамо избором генерализаних координата, померања материјалних тачака у циркуларном u_k или меридијалном v_k , $k = 1, 2, 3, \dots, 10$ правцу, које смо изабрали сагласно степенима слободе кретања материјалних тачака. За одређивање сопствених кружних фреквенција ланчаног

система са коначним бројем степени слободe кретања користимо теоријаски приступ из претходног параграфа. Потребно је значи одредити матрице инерције и матрицу коефицијената крутости идеално-еластичног система са коначним бројем степени слободe, и помоћу тих матрица система саставити фреквентну једначину, ако у претходном параграфу.

Матрица инерционих коефицијената за нехомогени ланац са десет материјалних тачака (молекула), са померањима у правцу ланца, је:

$$A = \begin{pmatrix} m_1 & & & & & & & & & \\ & m_2 & & & & & & & & \\ & & m_3 & & & & & & & \\ & & & m_4 & & & & & & \\ & & & & m_5 & & & & & \\ & & & & & m_6 & & & & \\ & & & & & & m_7 & & & \\ & & & & & & & m_8 & & \\ & & & & & & & & m_9 & \\ & & & & & & & & & m_{10} \end{pmatrix} \quad (3.86)$$

Матрица коефицијената еластичности за нехомогени ланац са десет материјалних тачака (молекула), које су међусобно везане идеално линеарно-еластичним опругама и са померањима у правцу ланца је:

$$C = \begin{pmatrix} c_1+c_2 & -c_2 & & & & & & & & \\ -c_2 & (c_2+c_3) & -c_3 & & & & & & & \\ & -c_3 & (c_3+c_4) & -c_4 & & & & & & \\ & & -c_4 & (c_4+c_5) & -c_5 & & & & & \\ & & & -c_5 & (c_5+c_6) & -c_6 & & & & \\ & & & & -c_6 & (c_6+c_7) & -c_7 & & & \\ & & & & & -c_7 & (c_7+c_8) & -c_8 & & \\ & & & & & & -c_8 & (c_8+c_9) & -c_9 & \\ & & & & & & & -c_9 & (c_9+c_{10}) & -c_{10} \\ & & & & & & & & -c_{10} & (c_{10}+c_{11}) \end{pmatrix} \quad (3.87)$$

Фреквентна једначина за ланац са 10 материјалних тачака (молекула) везаних идеално еластичним линеарним опругама, је степена функција десетог степена по сопственом карактеристичном броју ω^2 (3.73):

$$\mathbf{R} = \begin{pmatrix} K_{10,1}^{(1)} & K_{10,1}^{(2)} & \dots & K_{10,1}^{(10)} \\ K_{10,2}^{(1)} & K_{10,2}^{(2)} & \dots & K_{10,2}^{(10)} \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ K_{10,10}^{(1)} & K_{10,10}^{(2)} & \dots & K_{10,10}^{(10)} \end{pmatrix} \quad (3.90)$$

Помоћу модалне матрице (3.90) и главних координата (3.89), можемо написати решења за сопствене осцилације молекула у циркуларном или меридијалном правцу у десетофреквентном облику:

$$\begin{pmatrix} u_1 \\ u_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ u_{10} \end{pmatrix} = \mathbf{R} \begin{pmatrix} C_1 \cos(\omega_1 t + \alpha_1) \\ C_2 \cos(\omega_2 t + \alpha_2) \\ \cdot \\ \cdot \\ C_{10} \cos(\omega_{10} t + \alpha_{10}) \end{pmatrix} = \mathbf{R} \begin{pmatrix} \xi_1 \\ \xi_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \xi_{10} \end{pmatrix} \quad (3.91)$$

Из претходног израза лако је закључити да у општем случају почетних услова свих десет сопствених модова осцилација система доприносе режиму осциловања и да су сопствене осцилације десетофреквентне. Почетним условима се може моделирати режим осциловања молекула у ланцу у одговарајућем правцу ланца.

3.15. Систем диференцијалних једначина принудне динамике система материјалних тачака у ланцима у циркуларном, или меридијалном правцу. Резонантне кружне фреквенције и закони осиловања.

Изучаваћемо динамику ланца са 11 молекула у ланцу.

Диференцијалне једначине осциловања материјалних тачака у ланцу у циркуларном или меридијалном правцу, састављамо избором генерализаних координата, померања материјалних тачака у циркуларном u_k , $k=1,2,3,\dots,10,11$ или меридијалном v_k , $k=1,2,3,\dots,10,11$ правцу, које смо изабрали сагласно степенима слободе кретања материјалних тачака, о којима смо закључили у

уводном делу да су главне координате подсистема независних неспрегнутих ланаца.

За одређивање сопствених кружних фреквенција ланчаног система са коначним бројем степени слободне кретања -11 користимо теоријски приступ из претходних параграфа. Потребно је одредити матрице инерције и матрицу коефицијената крутости идеално-еластичног система са коначним бројем степени слободне, и помоћу тих матрица система саставити фреквентну једначину, као у претходном параграфу.

Матрица инерционих коефицијената за нехомогени ланац са једанаест материјалних тачака (молекула), са померањима у правцу ланца, је:

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} m_1 & & & & & & & & & & & & \\ & m_2 & & & & & & & & & & & \\ & & m_3 & & & & & & & & & & \\ & & & m_4 & & & & & & & & & \\ & & & & m_5 & & & & & & & & \\ & & & & & m_6 & & & & & & & \\ & & & & & & m_7 & & & & & & \\ & & & & & & & m_8 & & & & & \\ & & & & & & & & m_9 & & & & \\ & & & & & & & & & m_{10} & & & \\ & & & & & & & & & & m_{11} & & \end{pmatrix} \quad (3.92)$$

Матрица коефицијената еластичности за нехомогени ланац са једанаест материјалних тачака (молекула), које су међусобно везане идеално линеарно-еластичним опругама и са померањима у правцу ланца, је:

$$\begin{Bmatrix} \xi_1 \\ \xi_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \xi_{11} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} C_1 \cos(\omega_1 t + \alpha_1) \\ C_2 \cos(\omega_2 t + \alpha_2) \\ \cdot \\ \cdot \\ C_{11} \cos(\omega_{11} t + \alpha_{11}) \end{Bmatrix} \quad (3.95)$$

Функционална зависност главних координата од времена је периодична са одговарајућом сопственом кружном фреквенцијом из скупа ω_s , $s=1,2,\dots,11$ и те функционалне периодичне зависности представљају главне сопствене модове сопствених осцилација овог ланчаног система са једанаест степени слободe осциловања.

Помоћу кофактора $K_{11,k}^{(s)}$, $k=1,2,3,\dots,10,11$, $s=1,2,3,\dots,10,11$ елемената једанаесте врсте из детерминанте у фреквентној једначини (3.73) и (3.94), можемо саставити модалну матрицу ланчаног система са једанаест степени слободe осциловања, у облику:

$$\mathbf{R} = \begin{pmatrix} K_{11,1}^{(1)} & K_{11,1}^{(2)} & \cdot & \cdot & K_{11,1}^{(11)} \\ K_{11,2}^{(1)} & K_{11,2}^{(2)} & \cdot & \cdot & K_{11,2}^{(11)} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ K_{11,11}^{(1)} & K_{11,11}^{(2)} & \cdot & \cdot & K_{11,11}^{(11)} \end{pmatrix} \quad (3.96)$$

помоћу модалне матрице (3.96) и главних координата (3.95), можемо написати решења за сопствене осцилације молекула у циркуларном или меридијалном правцу у једанаестофреквентном облику:

$$\begin{Bmatrix} u_1 \\ u_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ u_{11} \end{Bmatrix} = \mathbf{R} \begin{Bmatrix} C_1 \cos(\omega_1 t + \alpha_1) \\ C_2 \cos(\omega_2 t + \alpha_2) \\ \cdot \\ \cdot \\ C_{11} \cos(\omega_{11} t + \alpha_{11}) \end{Bmatrix} = \mathbf{R} \begin{Bmatrix} \xi_1 \\ \xi_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \xi_{11} \end{Bmatrix} \quad (3.97)$$

Из претходног израза лако је закључити да у општем случају почетних услова свих једанаест сопствених модова осциловања система доприносе режиму осциловања и да су сопствене осцилације једанаестофреквентне. Почетним условима се може моделирати режим сопственог осциловања молекула у ланцу у одговарајућем правцу ланца.

Принудне осцилације ланца са једанаест степени слободе осциловања.

Имајући у виду да су у репрезентативном узорку модела ZP (Слика 3.9в) чворни молекули- трећи односно девети, ради изучавања принудних осцилација чворних тачака у сва три правца, решаваћемо задатак принудних осцилација ланца са 11 молекула који је побуђен спољашњом принудном силом која дејствује на трећи или девети молекул, односно чворни молекул.

Претпостављамо да поновљени ударци одређене фреквенције на чворне молекуле (трећи или девети) у ланцу потичу од скупа сперматозооида који периодично нападају ZP , као што смо то већ анализирали. Матрице спољашњих принудних сила, познатих амплитуда F_{03} и F_{09} познатих фреквенција Ω_3 и Ω_9 , која дејствују на чворни молекул (трећи односно девети молекул у ланцу), у репрезентативном узорку дискретног модела сферне мреже ZP су у облику:

$$\{Q_3\} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ F_{03} \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \cos \Omega_3 t \qquad \{Q_9\} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ F_{09} \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \cos \Omega_9 t \quad (3.98)$$

Те силе су генерализане силе које одговарају трећој u_3 , односно деветој u_9 независној генерализаној координати.

Систем диференцијалних једначина принудних осцилација ланца је:

$$\mathbf{A}\{\ddot{u}\} + \mathbf{C}\{u\} = \{Q\} = \{F_0\} \cos \Omega t \quad (3.99)$$

У развијеном облику одговарајуће диференцијалне једначине имају облике:

$$\mathbf{A} \begin{Bmatrix} \ddot{u}_1 \\ \ddot{u}_2 \\ \ddot{u}_3 \\ \ddot{u}_4 \\ \ddot{u}_5 \\ \ddot{u}_6 \\ \ddot{u}_7 \\ \ddot{u}_8 \\ \ddot{u}_9 \\ \ddot{u}_{10} \\ \ddot{u}_{11} \end{Bmatrix} + \mathbf{C} \begin{Bmatrix} u_1 \\ u_2 \\ u_3 \\ u_4 \\ u_5 \\ u_6 \\ u_7 \\ u_8 \\ u_9 \\ u_{10} \\ u_{11} \end{Bmatrix} = \{Q_3\} = \begin{Bmatrix} 0 \\ 0 \\ F_{03} \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{Bmatrix} \cos \Omega_3 t \quad \text{ИЛИ} \quad \mathbf{A} \begin{Bmatrix} \ddot{u}_1 \\ \ddot{u}_2 \\ \ddot{u}_3 \\ \ddot{u}_4 \\ \ddot{u}_5 \\ \ddot{u}_6 \\ \ddot{u}_7 \\ \ddot{u}_8 \\ \ddot{u}_9 \\ \ddot{u}_{10} \\ \ddot{u}_{11} \end{Bmatrix} + \mathbf{C} \begin{Bmatrix} u_1 \\ u_2 \\ u_3 \\ u_4 \\ u_5 \\ u_6 \\ u_7 \\ u_8 \\ u_9 \\ u_{10} \\ u_{11} \end{Bmatrix} = \{Q_9\} = \begin{Bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ F_{09} \\ 0 \\ 0 \end{Bmatrix} \cos \Omega_9 t \quad (3.100)$$

Партикуларно решење претходне матричне диференцијалне једначине претпоставимо у облику:

$$\begin{Bmatrix} u_1 \\ u_2 \\ u_3 \\ u_4 \\ u_5 \\ u_6 \\ u_7 \\ u_8 \\ u_9 \\ u_{10} \\ u_{11} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ C_3 \\ C_4 \\ C_5 \\ C_6 \\ C_7 \\ C_8 \\ C_9 \\ C_{10} \\ C_{11} \end{Bmatrix} \cos \Omega_3 t \quad \text{односно у облику} \quad \begin{Bmatrix} u_1 \\ u_2 \\ u_3 \\ u_4 \\ u_5 \\ u_6 \\ u_7 \\ u_8 \\ u_9 \\ u_{10} \\ u_{11} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} D_1 \\ D_2 \\ D_3 \\ D_4 \\ D_5 \\ D_6 \\ D_7 \\ D_8 \\ D_9 \\ D_{10} \\ D_{11} \end{Bmatrix} \cos \Omega_9 t \quad (3.101)$$

У којима су колоне са елементима C_k и D_k , $k=1,2,3,\dots,10,11$ непознате амплитуде партикуларног решења.

По уношењу претпостављеног решења (3.101) у систем диференцијалних једначина, у матричном облику (3.100), и после скраћивања са $\cos \Omega_3 t$, односно са

$\cos \Omega_9 t$, добијамо два система алгебарских матричних нехомогених једначина у облику:

$$\left(\mathbf{C} - \Omega_3^2 \mathbf{A} \right) \begin{Bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ C_3 \\ C_4 \\ C_5 \\ C_6 \\ C_7 \\ C_8 \\ C_9 \\ C_{10} \\ C_{11} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} 0 \\ 0 \\ F_{03} \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{Bmatrix} \quad \text{или} \quad \left(\mathbf{C} - \Omega_9^2 \mathbf{A} \right) \begin{Bmatrix} D_1 \\ D_2 \\ D_3 \\ D_4 \\ D_5 \\ D_6 \\ D_7 \\ D_8 \\ D_9 \\ D_{10} \\ D_{11} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ F_{09} \\ 0 \\ 0 \end{Bmatrix} \quad (3.102)$$

Претходни систем алгебарских нехомогених једначина се решава по *Cramer*-овом правилу. Зато је потребно да детерминанта одговарајућег система (3.102) буде различита од нуле. Детерминанта система је:

$$\Delta(\Omega_3^2) = |\mathbf{C} - \Omega_3^2 \mathbf{A}| \neq 0 \quad \text{односно} \quad \Delta(\Omega_9^2) = |\mathbf{C} - \Omega_9^2 \mathbf{A}| \neq 0 \quad (3.103)$$

Ако је једнака нули онда су фреквенције спољашње силе једнаке фреквенцијама сопствених осцилација, јер је фреквентна једначина за ланац са 11 материјалних тачака је степена функција једанаестог реда: $f(\omega^2) = |\mathbf{C} - \omega^2 \mathbf{A}| = 0$, као што смо то показали у (3.97), па следи да ако је бар једна фреквенција спољашње силе, једнака бар једној од фреквенција сопствених осцилација, детерминанта није различита од нуле па се ради о резонантном стању када је :

$$\Omega_3^2 = \omega_s^2 \quad \text{или} \quad \Omega_9^2 = \omega_r^2, \quad s, r = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 \quad (3.104)$$

Детерминанта система за ланац са једанаест молекула односно материјалних тачака у ланцу, односно за системе (3.101) алгебарских једначина су:

$$\tilde{\Delta}^{(10)}(\Omega_3^2) = \begin{vmatrix} (c_1+c_2)-\Omega_3^2 m_1 & & & & & & & & & & \\ & -c_2 & & & & & & & & & \\ & & (c_2+c_3)-\Omega_3^2 m_2 & & & & & & & & \\ & & & -c_3 & & & & & & & \\ & & & & (c_3+c_4)-\Omega_3^2 m_3 & & & & & & \\ & & & & & -c_4 & & & & & \\ & & & & & & (c_4+c_5)-\Omega_3^2 m_4 & & & & \\ & & & & & & & -c_5 & & & \\ & & & & & & & & (c_5+c_6)-\Omega_3^2 m_5 & & \\ & & & & & & & & & -c_6 & \\ & & & & & & & & & & (c_7+c_8)-\Omega_3^2 m_7 & \\ & & & & & & & & & & & -c_7 & \\ & & & & & & & & & & & & (c_8+c_9)-\Omega_3^2 m_8 & \\ & & & & & & & & & & & & & -c_8 & \\ & & & & & & & & & & & & & & (c_9+c_{10})-\Omega_3^2 m_9 & \\ & & & & & & & & & & & & & & & -c_9 & \\ & & & & & & & & & & & & & & & & (c_{10}+c_{11})-\Omega_3^2 m_{10} & \\ & & & & & & & & & & & & & & & & & -c_{10} & \\ & & & & & & & & & & & & & & & & & & -c_{11} \end{vmatrix}$$

(3.109)

Ова детерминанта је написана за десет тачака. За једанаест тачака у ланцу треба да се продужи једанаестом врстом и једанаестом колоном. Или у развијеном облику је:

$$\Delta(\Omega_3^2) = \langle (c_{11} + c_{12}) - \Omega_3^2 m_{11} \rangle \Delta^{(10)}(\Omega_3^2) + c_{11} \tilde{\Delta}^{(10)}(\Omega_3^2) \quad (3.110)$$

овај израз можемо добити развијањем детерминанте (3.106) односно (3.107) по елементима једанаесте врсте или колоне. Очигледно је за елемент $\langle (c_{11} + c_{12}) - \Omega_3^2 m_{11} \rangle$ у 11 колони и 11 врсти субдетерминанта $\Delta^{(10)}(\Omega_3^2)$ прва детерминанта из скупа (3.108), а за елемент $-c_{11}$ у 11 колони и 10 врсти субдетерминанта $\tilde{\Delta}^{(10)}(\Omega_3^2)$ је облика детерминанте друге из скупа (3.108).

Субдетерминанта $\Delta^{(10)}(\Omega_3^2)$, елемента у 11 колони и 11 врсти из детерминанте $\Delta^{(11)}(\Omega_3^2)$ система (3.106 и 3.107) за ланац са 11 молекула и једанаест степени слободне осциловања, истовремено представља и детерминанту система за случај принудних осцилација ланца са десет молекула у ланцу.

За одређивање непознатих амплитуда C_k и D_k , $k=1,2,3,\dots,10,11$ партикуларног решења за режим принудних осцилација потребне су нам детерминанте, које се добијају тако што се редом колоне у претходној детерминанти $\Delta^{(10)}(\Omega_3^2)$ замењују колоном слободних чланова – амплитудама сила.

принудна сила, онда на основу пермутације и логичке аналогije, можемо користити претходне резултате и написати да су партикуларна решења за амплитуде за померања чворних тачака, треће и девете у правцу ланца када спољашња једнофреквентна сила дејствује на девету тачку у ланцу:

Амплитуда $D_{9(9)}(\Omega_9^2)$ партикуларног решења за принудне осцилације чворне (девете) тачке у ланцу, са 11 материјалних тачака, на коју дејствује принудна једнофреквентна сила у правцу ланца:

$$D_{9(9)}(\Omega_9^2) = C_{3(3)}(\Omega_9^2) = \frac{\Delta_{3(3)}(\Omega_9^2)}{\Delta(\Omega_9^2)} \quad (3.124)$$

и једнака је амплитуди $C_{3(3)}(\Omega_9^2)$ партикуларног решења за принудне осцилације чворне тачке, треће материјалне тачке у ланцу, са 11 материјалних тачака, на коју дејствује принудна једнофреквентна сила у правцу ланца.

Партикуларно решење за принудно померање у правцу ланца - принудне осцилације чворне тачке- девете материјалне тачке у ланцу, са 11 материјалних тачака, на коју дејствује принудна сила у правцу ланца је:

$$u_{9(9)}(t, \Omega_9^2) = D_{9(9)}(\Omega_9^2) = C_{3(3)}(\Omega_9^2) \cos \Omega_9 t, \quad u_{9(9)}(t, \Omega_9^2) = \frac{\Delta_{3(3)}(\Omega_9^2)}{\Delta(\Omega_9^2)} \cos \Omega_9 t \quad (3.125)$$

Амплитуда $D_{3(9)}(\Omega_9^2)$ партикуларног решења за принудне осцилације чворне тачке - треће материјалне тачке у ланцу, са 11 материјалних тачака, а када принудна једнофреквентна сила, дејствује на девету материјалну тачку у правцу ланца је:

$$D_{3(9)}(\Omega_9^2) = C_{9(3)}(\Omega_9^2) = \frac{\Delta_{9(3)}(\Omega_9^2)}{\Delta(\Omega_9^2)} \quad (3.126)$$

и једнака је амплитуди $C_{9(3)}(\Omega_9^2)$ партикуларног решења за принудне осцилације чворне тачке, девете материјалне тачке у ланцу, са 11 материјалних тачака, а када принудна једнофреквентна сила, дејствује на трећу материјалну тачку у правцу ланца.

Партикуларно решење за принудно померање у правцу ланца - принудне осцилације чворне тачке, треће материјалне тачке у ланцу, са 11 материјалних тачака, а када принудна једнофреквентна сила, дејствује на девету материјалну тачку у правцу ланца.

$$u_{3(9)}(t, \Omega_9^2) = D_{3(9)}(\Omega_9^2) \cos \Omega_9 t = C_{9(3)}(\Omega_9^2) \cos \Omega_9 t,$$

$$u_{3(9)}(t, \Omega_9^2) = \frac{\Delta_{9(3)}(\Omega_9^2)}{\Delta(\Omega_9^2)} \cos \Omega_9 t \quad (3.127)$$

Даље, када се одреде ови изрази услед дејства сила на чворне тачке, онда изразе за померања чворних тачака, треће и девете у циркуларном и меридијалном правцу можемо комбиновати, као и померања услед сопствених осцилација и правити *Lissajous*-ове криве и атракторе као и за слободне осцилације.

Овде за чворне тачке, а и за свих једанаест материјалних тачака, можемо направити амплитудно-фреквентне криве по изразима:

$$C_{k(3)}(\Omega_3^2) = \frac{\Delta_{k(3)}(\Omega_3^2)}{\Delta(\Omega_3^2)}, \quad k = 1, 2, 3, \dots, 11 \quad (3.128)$$

Посебно ћемо користити амплитудно фреквентне криве за чворне тачке:

$$C_{9(3)}(\Omega_3^2) = \frac{\Delta_{9(3)}(\Omega_3^2)}{\Delta(\Omega_3^2)}, \quad C_{3(3)}(\Omega_3^2) = \frac{\Delta_{3(3)}(\Omega_3^2)}{\Delta(\Omega_3^2)} \quad (3.129)$$

Такђе ћемо имати у виду да је:

$$D_{3(9)}(\Omega_9^2) = C_{9(3)}(\Omega_9^2) = \frac{\Delta_{9(3)}(\Omega_9^2)}{\Delta(\Omega_9^2)} \quad (3.130)$$

$$D_{9(9)}(\Omega_9^2) = C_{3(3)}(\Omega_9^2) = \frac{\Delta_{3(3)}(\Omega_9^2)}{\Delta(\Omega_9^2)} \quad (3.131)$$

$$D_{11(9)}(\Omega_9^2) = C_{1(3)}(\Omega_9^2) = \frac{\Delta_{1(3)}(\Omega_9^2)}{\Delta(\Omega_9^2)} \quad (3.132)$$

На фреквенцији принудне силе на којој је нула ових амплитудно фреквентних кривих јавља се динамичка апсорбција, а на вредностима фреквенција принудне силе које су једнаке једној од сопствених кружних фреквенција сопствених осцилација јавља се резонанција, а на тим вредностима криве график амплитудно фреквентних кривих имају асимптоте.

Уопштено, систем диференцијалних једначина којима се описују принудне осцилације молекула у ланцима, једнака су збиру решења хомогених диференцијалних једначина и партикуларног решења за сваку од генерализаних координата које одговарају координатама померања сваке од материјалних тачака у ланцу:

$$\begin{Bmatrix} u_1 \\ u_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ u_{11} \end{Bmatrix} = \mathbf{R} \begin{Bmatrix} C_1 \cos(\omega_1 t + \alpha_1) \\ C_2 \cos(\omega_2 t + \alpha_2) \\ \cdot \\ \cdot \\ C_{11} \cos(\omega_{11} t + \alpha_{11}) \end{Bmatrix} + \begin{Bmatrix} C_{1(3)} \\ C_{2(3)} \\ \cdot \\ \cdot \\ C_{11(3)} \end{Bmatrix} \cos \Omega_3 t \quad (3.133)$$

$$\begin{Bmatrix} u_1 \\ u_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ u_{11} \end{Bmatrix} = \mathbf{R} \begin{Bmatrix} C_1 \cos(\omega_1 t + \alpha_1) \\ C_2 \cos(\omega_2 t + \alpha_2) \\ \cdot \\ \cdot \\ C_{11} \cos(\omega_{11} t + \alpha_{11}) \end{Bmatrix} + \begin{Bmatrix} D_{1(9)} \\ D_{2(9)} \\ \cdot \\ \cdot \\ D_{11(9)} \end{Bmatrix} \cos \Omega_9 t \quad (3.134)$$

у којима је модална матрица (3.90) у облику:

$$\mathbf{R} = \begin{pmatrix} K_{10,1}^{(1)} & K_{10,1}^{(2)} & \dots & K_{10,1}^{(10)} \\ K_{10,2}^{(1)} & K_{10,2}^{(2)} & \dots & K_{10,2}^{(10)} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ K_{10,10}^{(1)} & K_{10,10}^{(2)} & \dots & K_{10,10}^{(10)} \end{pmatrix} \quad (3.135)$$

а чији елементи су кофактори фреквентне детерминате. Непознате интеграционе константе C_s и α_s , $s=1,2,3,\dots,11$ у општим решењима (3.133) и (3.134), одређују се из почетних услова, као и за случај сопствених осцилација.

Ако фреквенције принудне силе нису у близини ни једне сопствене кружне фреквенције сопствених осцилација, ако претпоставимо да је удео чланова у општем решењу врло мали, можемо занемарити чланове са сопствеим кружним фреквенцијама и узети само партикуларно решење, за принудне осцилације молекула. Ако то није случај, морамо посматрати опште решење као закон принудних осцилација (*Hedrih (Stevanović) & Hedrih, 2016*).

3.16. Промена у осцилаторном понашању јајне ћелије и ембриона миша кроз модел осцилаторне сферне мреже *ZP* миша

Као што је већ напоменуто *ZP* мења своја механичка својства током процеса сазревања и оплодње од еластичних до вискоеластичних (*Familiari et al, 2008, Murayama et al, 2006, Papi et al, 2009*). Процес оплодње посматрамо као биомеханички осцилаторни проблем (*Hedrih, 2012, Hedrih et al, 2013a*) и претпостављамо да се јајна ћелија и ембрион налазе у различитим осцилаторним стањима. Поставља се питање који су то осцилаторни процеси у ембриону миша који не дозвољавају пенетрацију других сперматозоида кроз *ZP* после продора једног и оплодње јајне ћелије? Наша истраживања су усмерена на проналажење осцилаторних модела и стања који би с биомехеничког аспекта дали могуће одговоре. Користећи модел осцилаторне сферне мреже *ZP* (*Hedrih, 2011, Hedrih et*

al, 2013) одредићемо приближне вредности сета најмањег броја сопствених кружних фреквенција ZP јајне ћелије и ембриона миша.

Фреквентна анализа кружних фреквенција и амплитуда принудних осцилација дискретног модела сферне мреже ZP под дејством периодичне једнофреквентне спољашње побуде изазвана периодичним ударима сперматозоида у ZP спроведена је за обе фазе (јајна ћелија и ембрион) и стадијуме кинетичких стања система. За одређивање услова динамичке апсорбције и кружних фреквенција на којима се јавља динамичка апсорпција у поменутој осцилаторној динамици модела дискретне мреже ZP јајне ћелије и ембриона миша користили смо партикуларна и општа решења за принудне осцилације модела ланца са 11 степени слободе осциловања одговарајућих амплитудно фреквентних карактеристика, када сила дејствује на трећи односно девети молекул у нехомогеном ланцу добијена аналитички (види параграф 3.13).

Аналза кружних фреквенција и амплитудно фреквентних кривих као и феномени резонанције и динамичке апсорбције урађени су нумерички на репрезентативном узорку осцилаторног модела ZP сферне мреже.

Перманентно дејство спољашње једнофреквентне или вишефреквентне силе у времену, на бар један молекул доводи до поремћаја стабилне статичке равнотеже и систем ZP почиње да осцилује у принудном једно или вишефреквентном режиму. Код линеарних модела постоје главни модови који су независни, али код нелинеарних модела нелинеарни модови осцилација су у интеракцији и постоји пренос енергије са једног нижег на виши мод и обрнуто.

Најпре ћемо одредити сет сопствених кружних фреквенција за главне модове осцилација ланца са 11 молекула у репрезентативном узорку осцилаторне ZP мреже помоћу корена фреквентне једначине. Зато је потребно да одредимо фреквентну једначину и њена решења добијемо нумерички. Аналитичка решења фреквентне једначине (3.73) смо одредили у параграфу 3.13.

Репрезентативни сегмент је у стању статичке равнотеже (када сматрамо да су везе између молекула ненапрегнуте) централно симетричан у односу на пресек дијагонала правоугаоника чија су темена у чворним тачкама као и да је распоред молекула у ланцима симетричан у односу на шести молекул у сваком од ланца. Слика 3.9.

За нумеричко одређивање сопствених кружних фреквенција потребно је да задамо материјалне, инерцијске и коефицијенте еластичности веза између молекула. Према подацима из литературе усвајамо да је моларни однос између маса појединих молекула у репрезентативном узорку, односно у дискретном моделу ZP сферне мреже ($ZP1: ZP2- ZP3 = 1:5$)

За одређивање сопствених кружних фреквенција сопствених осцилација ZP фреквентну једначину одрђујемо на основу теоријских анализа и резултата из параграфа 3.13. те на основу (3.73) фреквентну једначину пишемо у облику:

$$f(\omega^2) = |\mathbf{C} - \omega^2 \mathbf{A}| = 0 \quad (3.73)$$

где је \mathbf{C} матрица крутости за ланац са 11 молекула, \mathbf{A} матрица инерционих коефицијената за нехомогени ланац са 11 материјалних тачака (молекула), са померањима у правцу ланца, ω^2 је квадрат сопствене кружне фреквенције.

Уз претпоставку да су молекули везани идеално еластичним везама међусобно, да су ланци обострано фиксирани на крајевима ($c_1 \neq 0, c_{12} \neq 0$) да су све крутости еластичних веза између молекула једнаке и да се масе опруга могу занемарити матрица крутости \mathbf{C} има облик: (3.93):

$$\mathbf{C} = \begin{pmatrix} c_1+c_2 & -c_2 & & & & & & & & & & & & \\ -c_2 & (c_2+c_3) & -c_3 & & & & & & & & & & & \\ & -c_3 & (c_3+c_4) & -c_4 & & & & & & & & & & \\ & & -c_4 & (c_4+c_5) & -c_5 & & & & & & & & & \\ & & & -c_5 & (c_5+c_6) & -c_6 & & & & & & & & \\ & & & & -c_6 & (c_6+c_7) & -c_7 & & & & & & & \\ & & & & & -c_7 & (c_7+c_8) & -c_8 & & & & & & \\ & & & & & & -c_8 & (c_8+c_9) & -c_9 & & & & & \\ & & & & & & & -c_9 & (c_9+c_{10}) & -c_{10} & & & & \\ & & & & & & & & -c_{10} & c_{10}+c_{11} & -c_{11} & & & \\ & & & & & & & & & -c_{10} & -c_{11} & c_{11}+c_{12} & & \\ & & & & & & & & & & & & & \end{pmatrix} \quad (3.93)$$

Вредности коефицијената крутости еквивалентне опруге рачунали смо као аксијалну крутост штапа по формули:

$$c = \frac{E(R^2 - r^2)\pi}{2R} \quad (3.136)$$

у којој је *E-Young*-ов модул еластичности *ZP* јане ћелије/ембриона миша добијен из експерименталних података из (*Sun et al, 2003*), *R* полупречник ћелије/ембриона миша *r*-је плупречник јајне ћелије/ембриона миша умањен за апроксимативну вредност дебљине *mZP*. Поменуте вредности за јајну ћелију миша су: $E_0=17.5 \text{ kPa}$, $2R_0=56.5 \mu\text{m}$ $\delta_0=4.8 \mu\text{m}$ - апроксимативна вредност дебљине *ZP* (добијено на основу података из (*Sun et al, 2003*), дијаметар јајне ћелије миша $72,3 \mu\text{m}$ и дебљина *ZP* $6,2 \mu\text{m}$ (*Griffin et al, 2006*).

На основу претходних података из литературе и формуле (3.136) добијена приближна вредност линеарне крутости везе између молекула у репрезентативном узорку дискретне сферне мреже *ZP* $c_0=0.253 \frac{N}{m}$ -у.

$$c_1 = c_2 = c_3 = c_4 = c_5 = c_6 = c_7 = c_8 = c_9 = c_{10} = c_{11} = 0.253 \frac{N}{m}$$

Матрица инерционих коефицијената за нехомогени ланац са 11 материјалних тачака (молекула) садржи по дијагонали моларне масе *ZP* молекула редом као што је то приказано на слици 3.9. а, в, г. изражене у килограмима

$$m_1 = m_5 = m_7 = m_{11} = 137.8248 \cdot 10^{-24} \text{ kg}, \quad m_2 = m_4 = m_6 = m_8 = m_{10} = 199.2648 \cdot 10^{-24} \text{ kg},$$

$m_3 = m_9 = 332.1080 \cdot 10^{-24} \text{ kg}$ (Моларне масе *ZP*₁, *ZP*₂ и *ZP*₃ гликопротеина су преведене из килодалтона : (*MrZP*₁): (200 000 Da, *MrZP*₂): 120 000 Da и (*MrZP*₃): 83,000 у kg).

Развијени облик фреквентне једначине је исти као и (3.94) и има облик:

$$f(\omega) = \begin{vmatrix} (c_1+c_2)-\omega^2 m_1 & -c_2 & & & & & & & & & & & \\ -c_2 & (c_2+c_3)-\omega^2 m_2 & -c_3 & & & & & & & & & & \\ & -c_3 & (c_3+c_4)-\omega^2 m_4 & -c_4 & & & & & & & & & \\ & & -c_4 & (c_4+c_5)-\omega^2 m_4 & -c_5 & & & & & & & & \\ & & & -c_5 & (c_5+c_6)-\omega^2 m_5 & -c_6 & & & & & & & \\ & & & & -c_6 & (c_6+c_7)-\omega^2 m_6 & -c_7 & & & & & & \\ & & & & & -c_7 & (c_7+c_8)-\omega^2 m_7 & -c_8 & & & & & \\ & & & & & & & -c_8 & & & & & \\ & & & & & & & & -c_{10} & (c_{10}+c_{11})-\omega^2 m_{10} & & & \\ & & & & & & & & & -c_{11} & (c_{11}+c_{12})-\omega^2 m_{11} & & \\ & & & & & & & & & & & & \end{vmatrix} = 0 \quad (3.94)$$

За задате нумеричке податке из претходне фреквентне једначине одредили смо једанаест сопствених кружних фреквенција: ω_s^2 , $s = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11$ користећи одговарајући софтвер за цртање графика функције. Међутим ограниченост софтверског алата да прихвати само матрице и детерминанте ранга (10x10) нас приморава да претходну детерминанту која је ранга (11x11) изразимо преко детерминани ранга (10x10). Користећи иста објашњења као и изразе за развијање детерминанте ранга 11x11 и добијеног израза (3.110) којим је развијена и изражена детерминанта ранга 11x11 преко детерминанти ранга 10x10:

$$f(\omega^2) = f_{11}(\omega^2) = \langle (c_{11} + c_{12}) - \omega^2 m_{11} \rangle f_{10}(\omega^2) + c_{11} \tilde{f}_{10}(\omega^2) = 0 \quad (3.137)$$

$f_{11}(\omega^2)$ и $f_{10}(\omega^2)$ су фреквентне функције за ланчане системе са 11 и 10 материјалних тачака, док је $f_{10}(\omega^2)$ субдетерминанта елемента једанаесте колоне и десете врсте детерминанте са $f_{11}(\omega^2)$. У нумеричком експерименту коришћењем одговарајућег софтверског алата за ове детерминанте користећемо аналогне релације $|g(\omega^2)| \Rightarrow f_{10}(\omega^2)$ и $|h(\omega^2)| \Rightarrow \tilde{f}_{10}(\omega^2)$ које ћемо објаснити кроз поступак коришћења могућности одговарајућег софтверског пакета.

За прорачуне помоћу одговарајућег софтверског пакета морали смо избећи његова ограничења у рачунању са малим бројевима, те су бројне вредности моларних маса молекула уношене помножене мултипликатором 10^{12} , да би програм могао да рачуна и нацрта график функције $f(x)$ помоћу које смо посредно одредили корене функције $f_{11}(\omega^2) = 0$, као и ради усклађивања јединица. Корекциони фактор је дакле 10^{12} .

Матрице система потребне за цртање графика фреквентне функције (3.137), унете у одговарајући софтверски пакет за ланац са 11 степени слободе кретања из репрезентативног узорка пара укрштених ортогоналних ланаца дискретног модела осцилаторне сферене ZP мреже су:

$$g(x) := \begin{pmatrix} c1 + c2 - m1 \cdot x & -c2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -c2 & c2 + c3 - m2 \cdot x & -c3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -c3 & c3 + c4 - m3 \cdot x & -c4 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -c4 & c4 + c5 - m4 \cdot x & -c5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -c5 & c5 + c6 - m5 \cdot x & -c6 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -c6 & c6 + c7 - m6 \cdot x & -c7 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c7 & c7 + c8 - m7 \cdot x & -c8 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c8 & c8 + c9 - m8 \cdot x & -c9 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c9 & c9 + c10 - m9 \cdot x & -c10 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c10 & c10 + c11 - m10 \cdot x & -c11 \end{pmatrix} \quad (3.138)$$

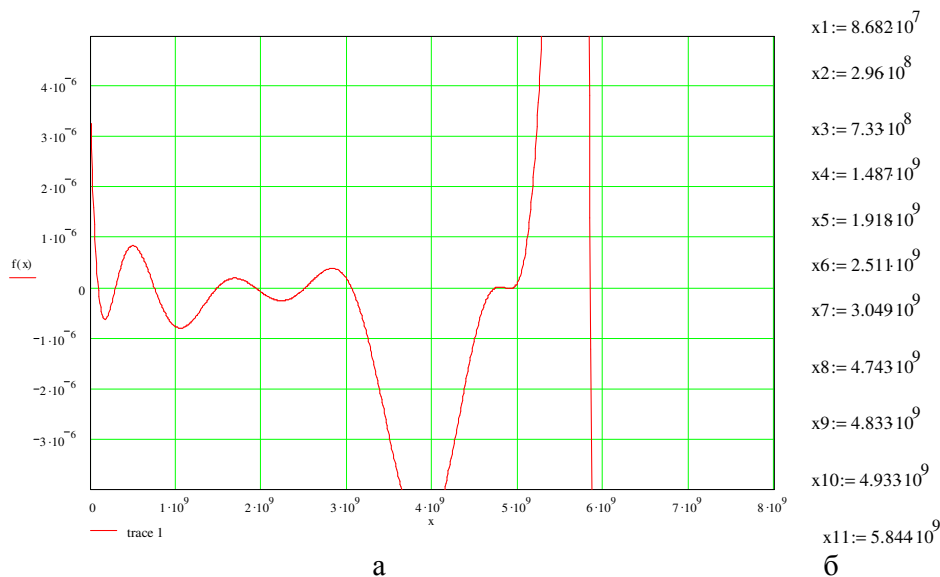
$$h(x) := \begin{pmatrix} c1 + c2 - m1 \cdot x & -c2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -c2 & c2 + c3 - m2 \cdot x & -c3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -c3 & c3 + c4 - m3 \cdot x & -c4 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -c4 & c4 + c5 - m4 \cdot x & -c5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -c5 & c5 + c6 - m5 \cdot x & -c6 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -c6 & c6 + c7 - m6 \cdot x & -c7 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c7 & c7 + c8 - m7 \cdot x & -c8 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c8 & c8 + c9 - m8 \cdot x & -c9 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c9 & c9 + c10 - m9 \cdot x & -c10 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c10 & c10 + c11 - m10 \cdot x \end{pmatrix} \quad (3.139)$$

У софтверском пакету за графичко приказовање функција, цртамо график функције:

$$f(x) := (c11 + c12 - m11 \cdot x) \cdot |g(x)| + c11 \cdot |h(x)| \quad (3.140)$$

У претходно дефинисаној аналогној фреквентној функцији уведена смена $x = 10^{-12} \omega^2$, тако да су масе молекула $\tilde{m}_k = 10^{12} m_k, k = 1, 2, 3, \dots, 11$.

График фреквентне функције (3.140) приказан је на слици 3.11.а, док су на 3.11.б приказане бројне вредности нула те функције прочитане са графика.



Слика 3.11. График фреквентне функције за модел осцилаторне ZP мреже за јајну ћелију миша, која има 11 нула у пресецима графика са апсцисном осом. б. нуле аналогне фреквентне функције прочитане са графика.

График фреквентне функције који одговара ембриону добијен је истим поступком само што су коришћени подаци који се односе на ZP ембриона миша: $E_e=42.2\text{kPa}$, $2R_e=61\ \mu\text{m}$ -средњи дијаметар ембриона миша из (*Sun et al, 2003*), $\delta_e=5.34\ \mu\text{m}$ -процењена дебљина ZP ембриона миша и коефицијент крутости изрчунат по формули (3.136) - $c_e=0.646\text{N/m}$.

Након читавања нула функција са графика (вредности дате у оквиру слика 3.11.б. и 3.12.б.) сопствене кружне фреквенције су израчунате по формули:

$$\omega_s = \sqrt{10^{12} x_s} = 10^6 \sqrt{x_s}, \quad s = 1, 2, 3, \dots, 11 \quad (3.141)$$

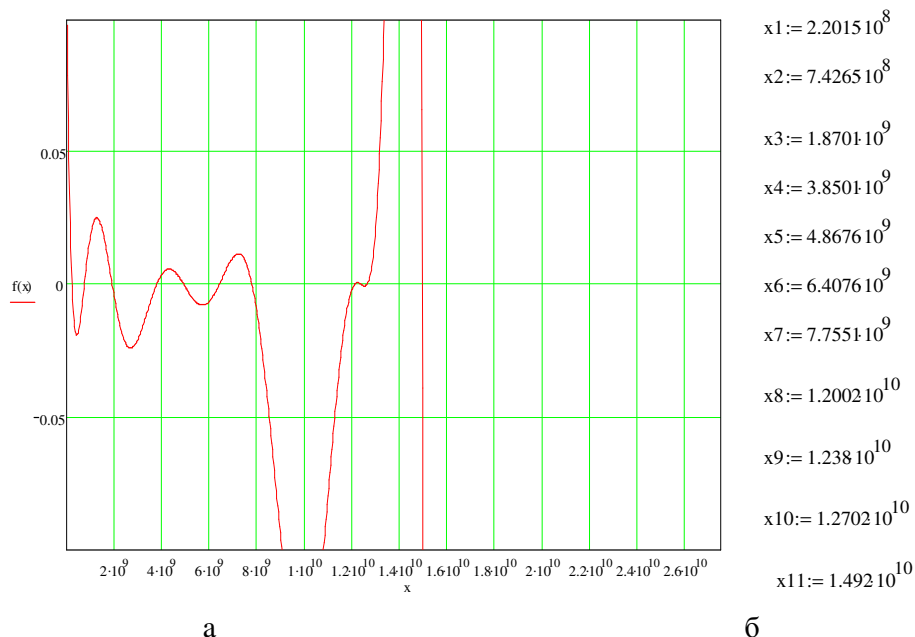
Добијене вредности сопствених кружних фреквенција за ZP јајне ћелије миша су: $\omega_{01}=9.318 \times 10^9 \text{ rad/s}$, $\omega_{02}=1.72 \times 10^{10} \text{ rad/s}$, $\omega_{03}=2.707 \times 10^{10} \text{ rad/s}$, $\omega_{04}=3.856 \times 10^{10} \text{ rad/s}$, $\omega_{05}=4.379 \times 10^{10} \text{ rad/s}$, $\omega_{06}=5.011 \times 10^{10} \text{ rad/s}$, $\omega_{07}=5.522 \times 10^{10} \text{ rad/s}$, $\omega_{08}=6.887 \times 10^{10} \text{ rad/s}$, $\omega_{09}=6.952 \times 10^{10} \text{ rad/s}$, $\omega_{010}=7.024 \times 10^{10} \text{ rad/s}$, $\omega_{011}=7.645 \times 10^{10} \text{ rad/s}$.

Добијене вредности сопствених кружних фреквенција за *ZP* ембриона миша су:

$$\omega_{e1} = 1.484 \times 10^{10} \text{ rad/s}, \quad \omega_{e2} = 2.725 \times 10^{10} \text{ rad/s}, \quad \omega_{e3} = 4.324 \times 10^{10} \text{ rad/s}$$

$$\omega_{e4} = 6.205 \times 10^{10} \text{ rad/s}, \quad \omega_{e5} = 6.977 \times 10^{10} \text{ rad/s}, \quad \omega_{e6} = 8.005 \times 10^{10} \text{ rad/s},$$

$$\omega_{e7} = 8.806 \times 10^{10} \text{ rad/s}, \quad \omega_{e8} = 1.096 \times 10^{11} \text{ rad/s}, \quad \omega_{e9} = 1.193 \times 10^{11} \text{ rad/s}, \quad \omega_{e10} = 1.127 \times 10^{11} \text{ rad/s}$$

$$\omega_{e11} = 1.221 \times 10^{11} \text{ rad/s}.$$


Слика 3.12. - График фреквентне функције за модел осцилаторне *ZP* мреже за ембрион миша, која има 11 нула у пресецима графика са апсцисном осом. б. нуле аналогне фреквентне функције прочитане са графика.

3.17. Нумеричко одређивање амплитудно - фреквентних карактеристика принудних осцилација и резонантних вредности кружних фреквенција као и кружних фреквенција на којима се јавља динамичка апсорбција динамике ланца репрезентативног дела дискретног модела ZP јајне ћелије и ембриона миша

Под дејством спољашње силе ZP ће принудно осциловати. Узећемо случај када спољна сила дејствује на чворни молекул (трећи у ланцу). Користимо аналитичке изразе за одређивање амплитудно-фреквентних карактеристика по формулама (3.128 и 3.129). Скуп вредности фреквенције спољашње силе на којима долази до резонанције одредићемо на основу фреквентно-резонантне функције дате изразом (3.110) преко детерминанте система, као и скупа фреквенција на којима долази до динамичке апсорбције из једначина $C_k(3)(\Omega_{3,rez}^2) = 0$.

За добијање резонантних фреквенција спољашње силе користићемо услов да је детерминанта система (3.110) једнака нули чиме се дефинише фреквентно резонантна функција. Овом функцијом се дефинишу вредности сопствених кружних фреквенција сопствених осцилација на којима наступа резонантно стање, ако је фреквенција спољашње принудне силе једнака једној од њих.

За одређивање скупа кружних фреквенција спољашње принудне силе на којима долази до динамичке апсорпције потребно је поставити услов да је амплитуда партикуларног решења једнака нули, односно да је $C_k(3)(\Omega_{3,rez}^2) = 0$ одакле следи:

$$\Delta_k(3)(\Omega_{3,rez}^2) = 0 \quad (3.142)$$

За нумерички експеримент користићемо софтверски пакет и претходно наведене нумеричке податке за ZP јајну ћелију/ембрион миша. Како нас, посебно интересују принудне осцилације првог молекула у ланцу, чворних молекула као и б. молекула у ланцу (средина сваког од ланца у репрезентативном делу

развијамо по елементима прве колоне који су сви једнаки нули, сем прве колоне и треће врсте, па је минор тог елемента детерминанта коју смо добили брисањем 1 колоне и треће врсте):

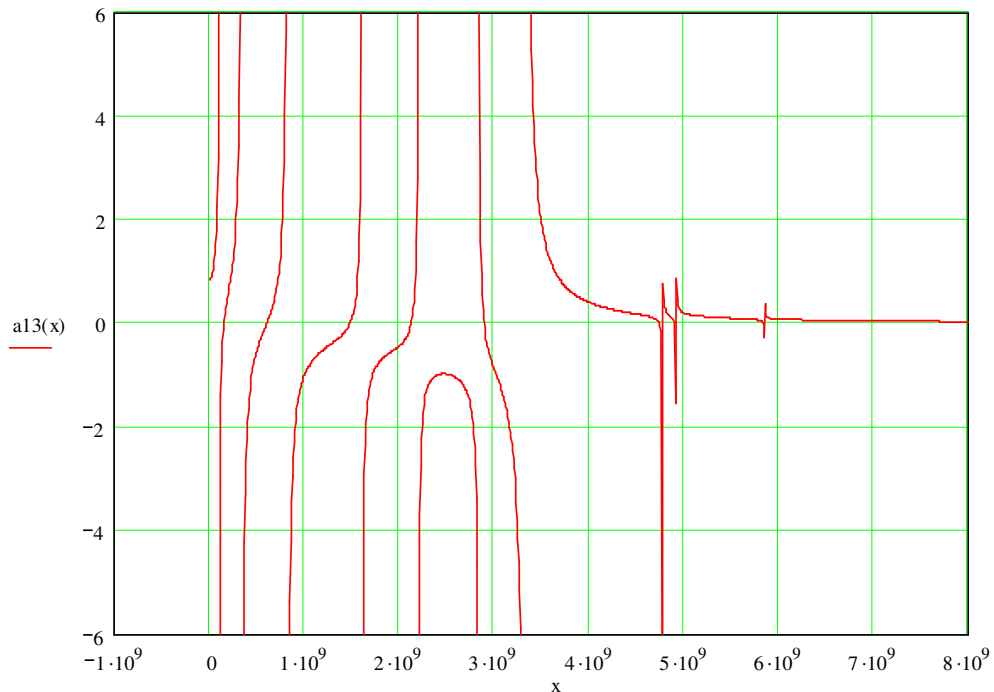
$$g1(x) := \begin{pmatrix} -c2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ c2 + c3 - m2x & -c3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -c4 & c4 + c5 - m4x & -c5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -c5 & c5 + c6 - m5x & -c6 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -c6 & c6 + c7 - m6x & -c7 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -c7 & c7 + c8 - m7x & -c8 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c8 & c8 + c9 - m8x & -c9 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c9 & c9 + c10 - m9x & -c10 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c10 & c10 + c11 - m10x & -c11 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c11 & c11 + c12 - m11x \end{pmatrix}$$

(3.144)

Амплитудно фреквентни график у нумеричко-софтверском алату цртамо по формули:

$$a13(x) := |g1(x)| \div |g(x)|$$

(3.145)

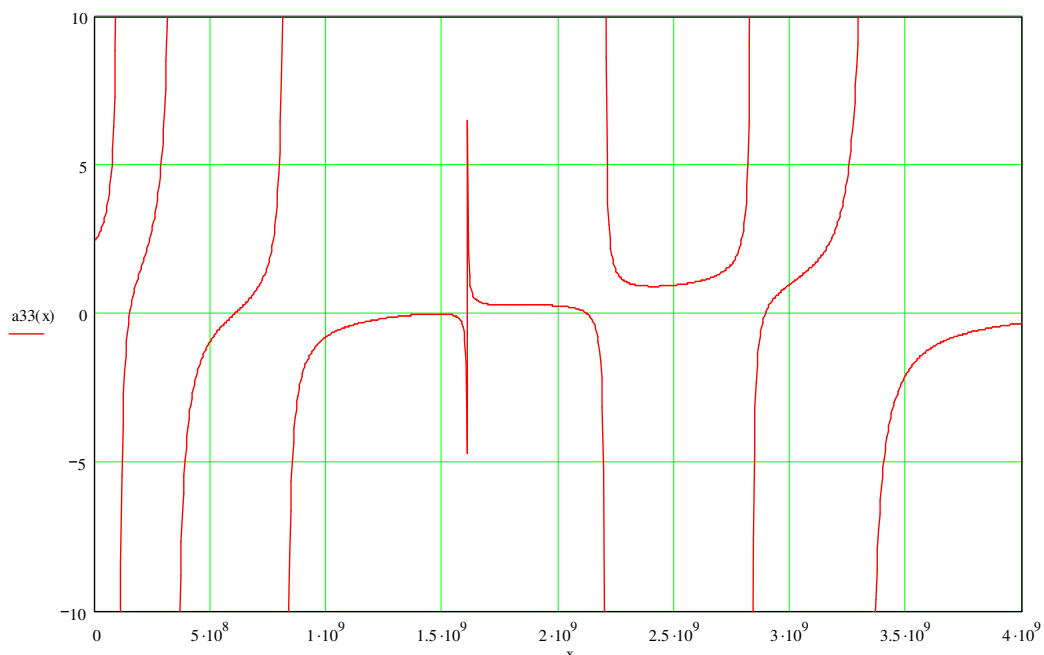


Слика 3.13. Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања прве материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободе осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне

ZP меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају ZP јане ћелије миша. На апсциси су приказане фреквенције, а на ординати амплитуде.

На слици 3.13 приказани је амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања прве материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободе осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне ZP мреже, дејствује једнофреквентна принудна сила.

Са слике 3.13. са амплитудно-фреквентних графика принудних осцилација првог молекула, се види да постоји 11 вертикалних асимптота на кружним фреквенцијама које одговарају сопственим кружним фреквенцијама система а то су и резонантне вредности кружних фреквенција спољашње силе. На тим кружним фреквенцијама под принудним дејством спољашње силе са неком од тих фреквенција елонгације материјалне тачке се увећавају и теже бесконачности (*Hedrih (Stevanovic) & Hedrh, 2016*). На графику се виде и 8 нула те функције које одговарају кружним фреквенцијама на којима је амплитуда партикуларног решења принудних осцилација првог молекула у ланцу, када спољашња сила дејствује на трећи молекул у ланцу. Са графика 3.13 прочитали смо нуле функције: $x_{11}=1,52 \times 10^8$, $x_{12}=6,24 \times 10^8$, $x_{13}=1,496 \times 10^9$, $x_{14}=2,136 \times 10^9$, $x_{15}=2,888 \times 10^9$, $x_{16}=4,738 \times 10^9$, $x_{17}=4,898 \times 10^9$, $x_{18}=5,827 \times 10^9$ и сада помоћу њих одређујемо следеће кружне фреквенције: $\Omega_{a,s} = 10^6 \sqrt{x_{a,s}}$, спољашње силе: $\Omega_{a,1,1}=1,233 \times 10^{10}$, $\Omega_{a,1,2}=2,458 \times 10^{10}$, $\Omega_{a,1,3}=3,868 \times 10^{10}$, $\Omega_{a,1,4}=4,622 \times 10^{10}$, $\Omega_{a,1,5}=5,374 \times 10^{10}$, $\Omega_{a,1,6}=6,883 \times 10^{10}$, $\Omega_{a,1,7}=6,999 \times 10^{10}$, $\Omega_{a,1,8}=7,633 \times 10^{10}$ у јединицама sec^{-1} . Овај сет кружних фреквенција, којих има 8 представља скуп фреквенција спољашње принудне силе на којима долази до динамичке апсорбције принудних осцилација првог молекула у ланцу кад на трећу материјални тачку дејствује та сила. Динамичка апсорпција се јавља у системима са већим бројем степени слободе кретања (у нашем случају 11) када на систем дејствује спољња принудна сила. У зависности од параметара система (кофицијента еластичности, амплитуда, фреквенција осциловања) постоји могућност да под дејством спољашње



Слика 3.14. Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања треће материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободe осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне ZP меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају ZP јајне ћелије миша. На апсциси су приказане фреквенције, а на ординати амплитуде.

На слици 3.14. приказана је амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања треће (чворне) материјалне тачке, у ланцу са 11 степени слободe осциловања, када на трећу материјалну тачку ланца у моделу дејствује једнофреквентна принудна сила. На графику постоје 11 вертикалних асимптота чије вредности одговарају сопственим кружним фреквенцијама система осцилаторног модела ZP јајне ћелије миша а то су истовремено и резонантне вредности кружних фреквенција спољашње силе. На графику се виде и 4 нуле те функције, које одговарају кружним фреквенцијама на којима је амплитуда партикуларног решења принудних осцилација трећег молекула у ланцу, када спољашња сила дејствује на тај трећи молекул у ланцу. Тим нулама одговарају четири фреквенције принудне силе, на којима наступа

динамичка апсорпција. Феномен динамичке апсорпције у режиму принудних осцилација молекула, на који дејствује принудна сила, је феномен на који треба посебно обратити пажњу и посебно исти анализирати са аспекта режима осциловања репрезентативног узорка.

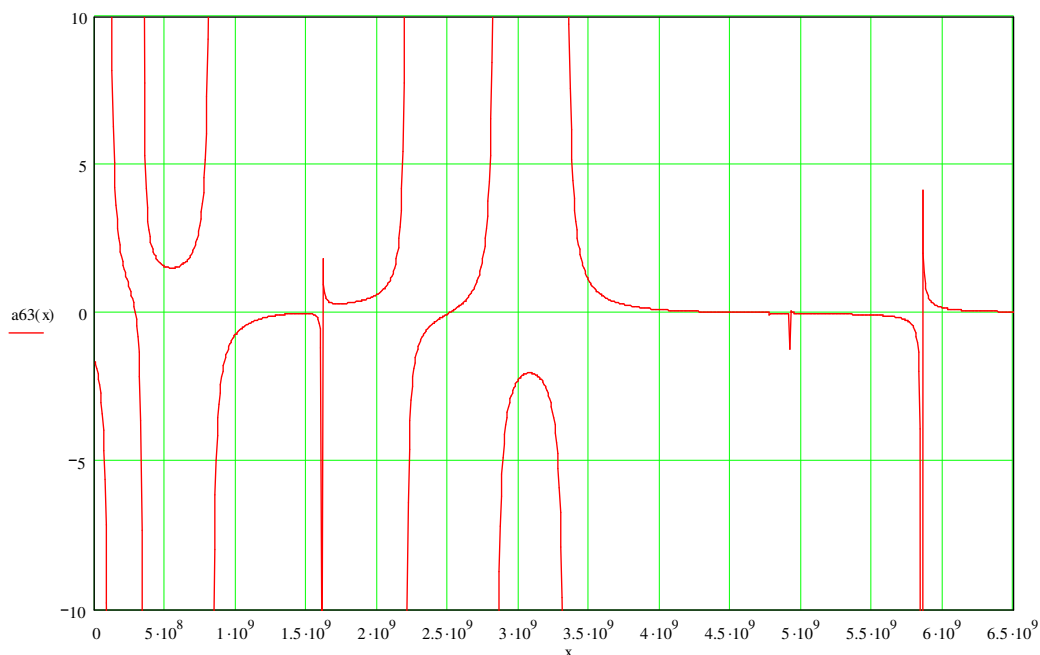
За добијање графика амплитудно фреквентне криве за партикуларно решење, које одговара померању у правцу ланца шесте материјалне тачке (молекул на средини ланца) у ланцу потребне су, такође две детерминанте, детерминанта система и специфична детерминанта:

$$g_6(x) := \begin{pmatrix} c_1 + c_2 - m_1 x & -c_2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -c_2 & c_2 + c_3 - m_2 x & -c_3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -c_4 & c_4 + c_5 - m_4 x & -c_5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -c_5 & c_5 + c_6 - m_5 x & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -c_6 & -c_7 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & c_7 + c_8 - m_7 x & -c_8 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_8 & c_8 + c_9 - m_8 x & -c_9 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_9 & c_9 + c_{10} - m_9 x & -c_{10} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_{10} & c_{10} + c_{11} - m_{10} x & -c_{11} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_{11} & c_{11} + c_{12} - m_{11} x & 0 \end{pmatrix}$$

$$a_6(x) := |g_6(x)| \div |g(x)|$$

(3.149)

На слици 3.15. приказана је амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања шесте материјалне тачке, у ланцу са 11 степени слободе осциловања, када на трећу материјалну тачку ланца у моделу дејствује једнофреквентна принудна сила. На графику постоје 11 вертикалних асимптота чије вредности одговарају сопственим кружним фреквенцијама система осцилаторног модела *ZP* јајне ћелије миша а то су истовремено и резонантне вредности кружних фреквенција спољашње силе када амплитуде теже бесконачности. Те елонгације нису одмах бесконачне, већ се увећавају са временом трајања резонантног стања.



Слика 3.15. Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања шесте материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободe осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне ZP меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају ZP јајне ћелије миша. На апсциси су приказане фреквенције, а на ординати амплитуде.

На слици 3.15 се уочавају и 3 нуле те функције, које одговарају кружним фреквенцијама на којима је амплитуда партикуларног решења принудних осцилација шестог молекула у ланцу, када спољашња сила дејствује на трећи молекула у ланцу. На тим фреквенцијама се јавља динамичка апсорпција.

За добијање графика амплитудно-фреквентне криве за партикуларно решење, које одговара померању у правцу ланца девете материјалне тачке (молекула) у ланцу потребне детерминанте су:

детерминанта која је добијена из детерминанте система заменом девете колоне колоним амплитуда спољашње силе за одговарајуће координате:

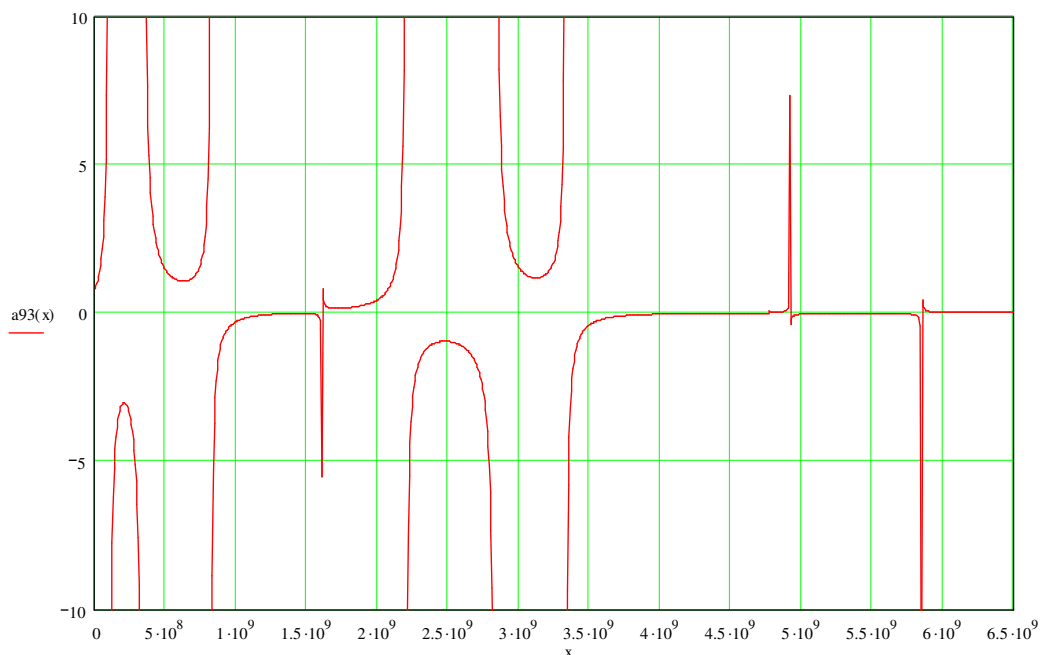
$$\Delta_9(\Omega_3^2) = F_{00} \begin{vmatrix} (c_1+c_2)-\Omega_3^2 m_1 & -c_2 & & & & & & & & & & & \\ -c_2 & (c_2+c_3)-\Omega_3^2 m_2 & -c_3 & & & & & & & & & & \\ & -c_4 & (c_4+c_5)-\Omega_3^2 m_4 & -c_5 & & & & & & & & & \\ & & -c_5 & (c_5+c_6)-\Omega_3^2 m_5 & -c_6 & & & & & & & & \\ & & & -c_6 & (c_6+c_7)-\Omega_3^2 m_6 & -c_7 & & & & & & & \\ & & & & -c_7 & (c_7+c_8)-\Omega_3^2 m_7 & -c_8 & & & & & & \\ & & & & & -c_8 & (c_8+c_9)-\Omega_3^2 m_8 & -c_9 & & & & & \\ & & & & & & & -c_{10} & & & & & \\ & & & & & & & & c_{10}+c_{11}-\Omega_3^2 m_{10} & -c_{11} & & & \\ & & & & & & & & -c_{11} & & c_{11}+c_{12}-\Omega_3^2 m_{11} & & \end{vmatrix} \quad (3.121)$$

За рад у софтверском алату, у претходну детерминанту $\Delta_{9(3)}(\Omega_3^2)$ уводимо смену $x = 10^{-12}\Omega^2$, као и да се масе материјалних тачака са вредностима $\tilde{m}_k = 10^{12}m_k$, $k = 1, 2, 3, \dots, 11$, тако да сада матрица, претходне детерминанте има следећи облик:

$$g^9(x) := \begin{pmatrix} c_1 + c_2 - m_1 x & -c_2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -c_2 & c_2 + c_3 - m_2 x & -c_3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -c_4 & c_4 + c_5 - m_4 x & -c_5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -c_5 & c_5 + c_6 - m_5 x & -c_6 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -c_6 & c_6 + c_7 - m_6 x & -c_7 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_7 & c_7 + c_8 - m_7 x & -c_8 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_8 & c_8 + c_9 - m_8 x & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_9 & -c_{10} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & c_{10} + c_{11} - m_{10} x & -c_{11} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_{11} & c_{11} + c_{12} - m_{11} x & \end{pmatrix} \quad (3.150)$$

Амплитудно фреквентни график у софтверском алату цртамо по формули:

$$a_{93}(x) := |g^9(x)| \div |g(x)| \quad (3.151)$$

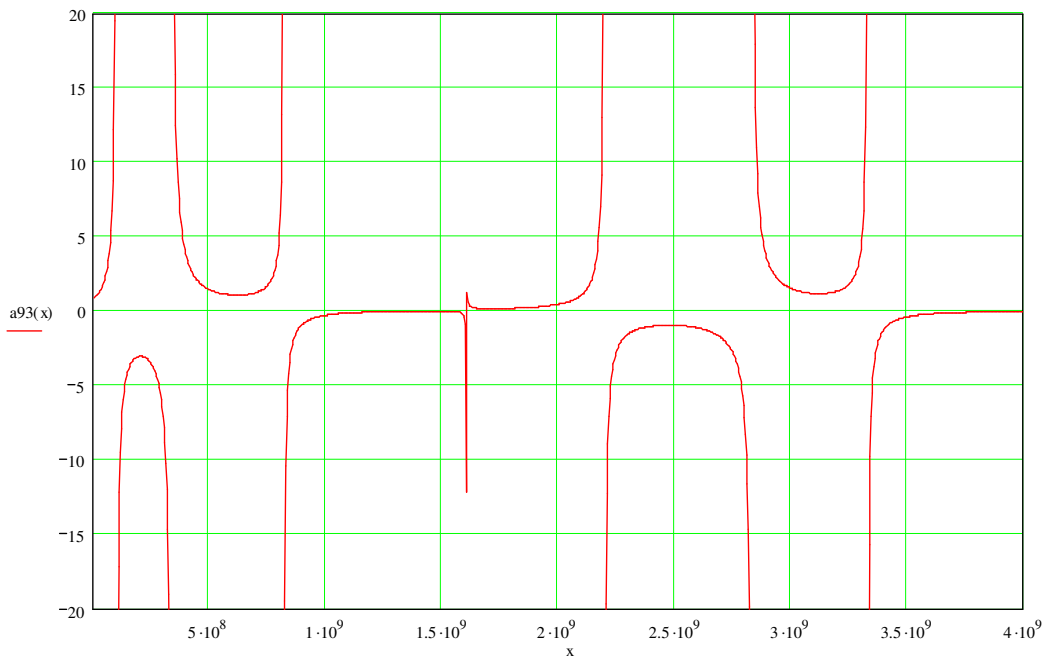


Слика 3.16. Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања девете материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободе осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне ZP меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају ZP јајне ћелије миша. На апсциси су приказане фреквенције, а на ординати амплитуде.

На амплитудно-фреквентној кривој амплитуде партикуларног решења принудног осциловања девете материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободе осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне ZP меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају ZP јајне ћелије миша (слика 3.16) се уочавају 11 сопствених и истовремено резонантних фреквенција као и да нема ни једне једине нуле те функције. То значи да не постоји ни једна фреквенција принудне силе на којој би дошло до динамичке апсорпције на тој координати, иако је удаљенија од тачке на коју дејствује сила, у односу на прву и шесту на којима се јавља више могућности динамичких апсорпција (Слика 3.17).

Ради анализе промене броја кружних фреквенција на којима се јавља динамичка апсорпција на појединим амплитудно-фреквентним кривим које одговарају амплитудам партикуларних решења за принудне осцилације материјалних тачака у ланцу са 11 молекула, у продужетку ћемо приказати по истој методологији све потребне матрице и детерминанте система, као и у претходним примерима, за остале молекуле у ланцу.

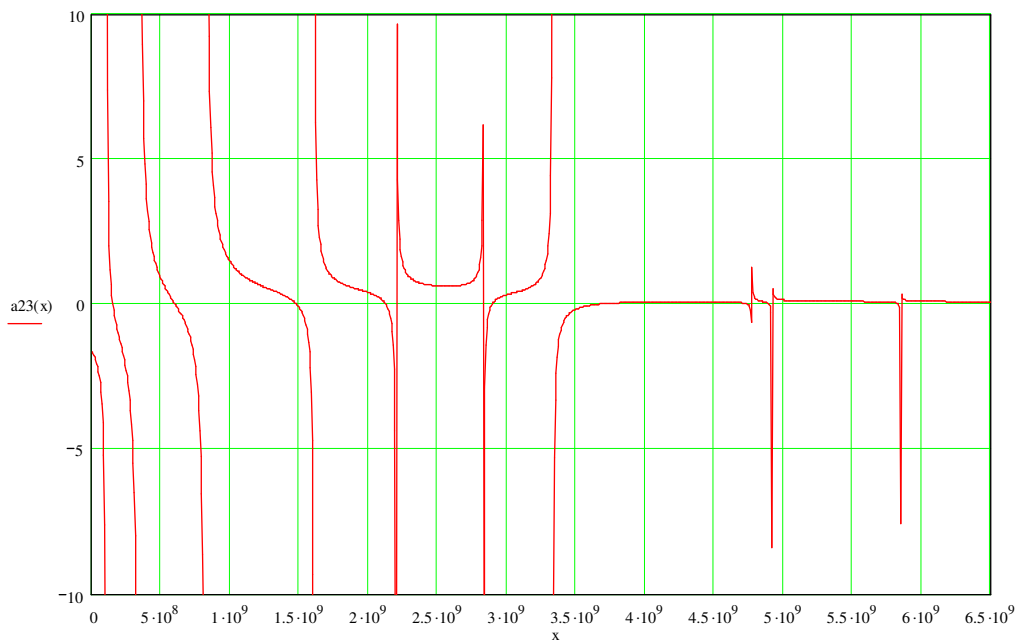
За добијање графика амплитудно-фреквентне криве за партикуларно решење, које одговара померању у правцу ланца другог молкула у ланцу, поред детерминанте система потребна је детерминанта следеће матрице:



Слика 3.17. Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања девете материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободе осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне ZP меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају ZP јане ћелије миша. На апсциси су приказане фреквенције (први сегмент са слике 3.16), а на ординати амплитуде.

$$g_2(x) := \begin{pmatrix} c_1 + c_2 - m_1 x & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -c_2 & -c_3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -c_4 + c_5 - m_4 x & -c_5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -c_5 & c_5 + c_6 - m_5 x & -c_6 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -c_6 & c_6 + c_7 - m_6 x & -c_7 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -c_7 & c_7 + c_8 - m_7 x & -c_8 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_8 & c_8 + c_9 - m_8 x & -c_9 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_9 & c_9 + c_{10} - m_9 x & -c_{10} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_{10} & c_{10} + c_{11} - m_{10} x & -c_{11} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_{11} & c_{11} + c_{12} - m_{11} x & -c_{11} \end{pmatrix} \quad (3.152)$$

$$a_{23}(x) := |g_2(x)| \div |g(x)| \quad (3.153)$$



Слика 3.18. Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања друге материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободе осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне ZP меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају ZP јајне ћелије миша. На апсциси су приказане фреквенције, а на ординати амплитуде.

Кружне фреквенције $\Omega_{a,2,s}$ спољашње силе на којима наступа динамичка апсорпција на координати другог молекула у принудном режиму осциловања:

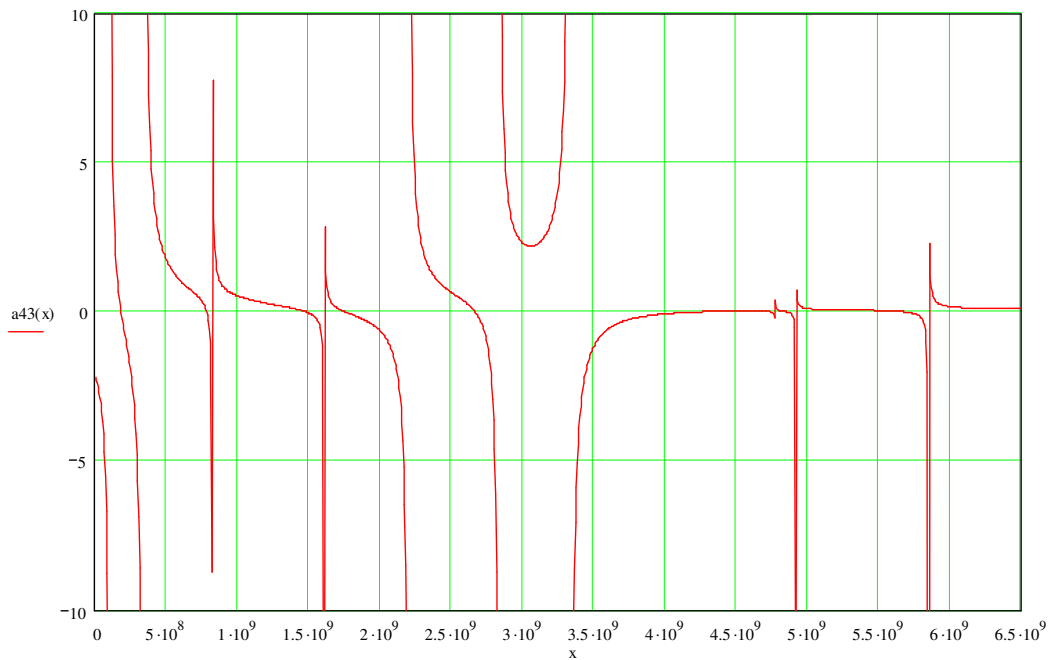
$$\Omega_{a,2,1} = 1,223 \times 10^{10}, \quad \Omega_{a,2,2} = 2,445 \times 10^{10}, \quad \Omega_{a,2,3} = 3,85 \times 10^{10}, \quad \Omega_{a,2,4} = 4,611 \times 10^{10},$$

$$\Omega_{a,2,5} = 5,384 \times 10^{10}.$$

За добијање графика амплитудно-фреквентне криве за партикуларно решење, које одговара померању у правцу ланца четврте материјалне тачке у ланцу, поред детерминанте система потребна је детерминанта следеће матрице:

$$g^4(x) := \begin{pmatrix} c1 + c2 - m1x & -c2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -c2 & c2 + c3 - m2x & -c3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -c4 & -c5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & c5 + c6 - m5x & -c6 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -c6 & c6 + c7 - m6x & -c7 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -c7 & c7 + c8 - m7x & -c8 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c8 & c8 + c9 - m8x & -c9 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c9 & c9 + c10 - m9x & -c10 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c10 & c10 + c11 - m10x & -c11 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c11 & c11 + c12 - m11x & 0 \end{pmatrix} \quad (3.154)$$

$$a43(x) := |g^4(x)| \div |g(x)| \quad (3.155)$$



Слика 3.19. Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања четврте материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободе осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне ZP меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају

ZP јайне ћелије миша. На апсциси су приказане фреквенције, а на ординати амплитуде.

Кружне фреквенције $\Omega_{a,4,s}$ спољашње силе на којима наступа динамичка апсорпција на координати четвртог молекула у принудном режиму осциловања:
 $\Omega_{a,4,1}=1,344 \times 10^{10}$, $\Omega_{a,4,2}=2,793 \times 10^{10}$, $\Omega_{a,4,3}=3,842 \times 10^{10}$, $\Omega_{a,4,4}=4,155 \times 10^{10}$,
 $\Omega_{a,4,5}=5,162 \times 10^{10}$,

За добијање графика амплитудно-фреквентне криве за партикуларно решење, које одговара померању у правцу ланца пете материјалне тачке у ланцу, поред детерминанте система потребна је детерминанта следеће матрице:

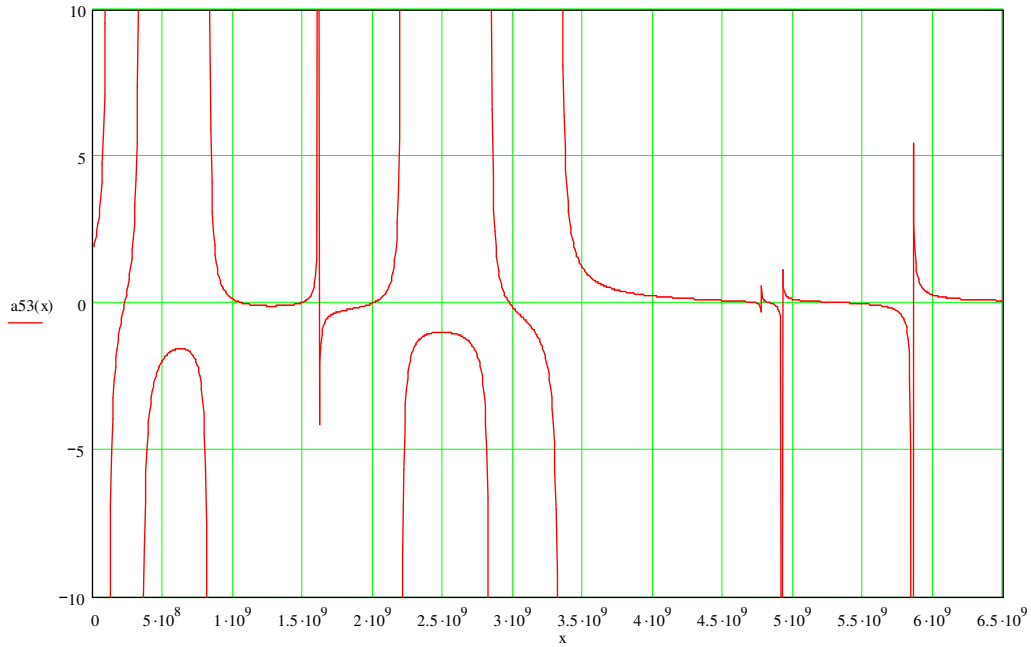
$$g^5(x) := \begin{pmatrix} c1 + c2 - m1x & -c2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -c2 & c2 + c3 - m2x & -c3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -c4 & c4 + c5 - m4x & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -c5 & -c6 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & c6 + c7 - m6x & -c7 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -c7 & c7 + c8 - m7x & -c8 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c8 & c8 + c9 - m8x & -c9 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c9 & c9 + c10 - m9x & -c10 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c10 & c10 + c11 - m10x & -c11 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c11 & c11 + c12 - m11x & 0 \end{pmatrix}$$

(3.156)

$$a53(x) := |g^5(x)| \div |g(x)| \tag{3.157}$$

Кружне фреквенције $\Omega_{a,5,s}$ спољашње силе на којима наступа динамичка апсорпција на координати петог молекула у принудном режиму осциловања
 $\Omega_{a,5,1}=1,508 \times 10^{10}$, $\Omega_{a,5,2}=4,442 \times 10^{10}$, $\Omega_{a,5,3}=4,978 \times 10^{10}$ Слика 3.20.

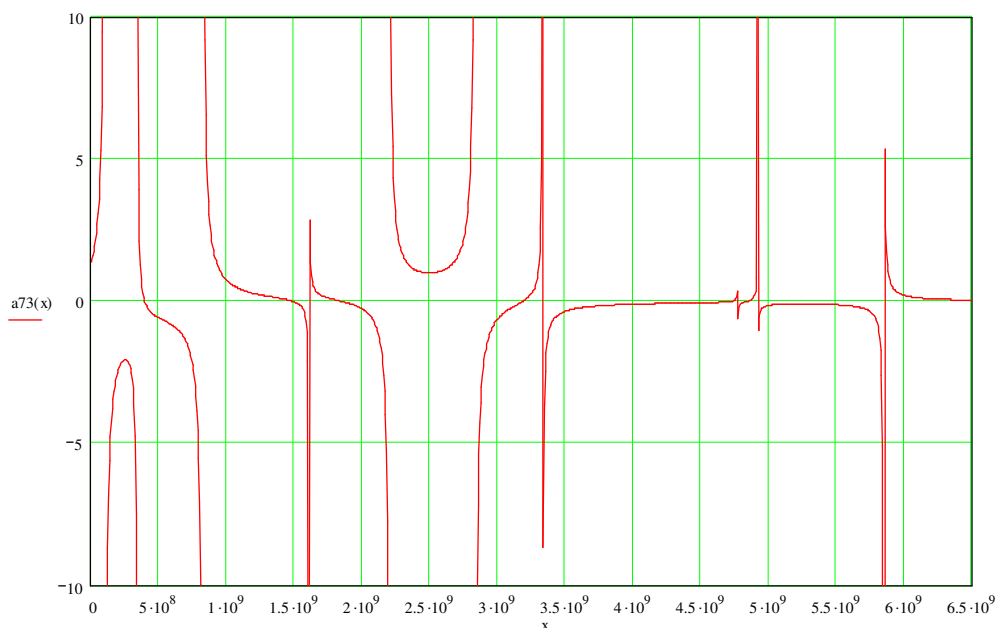
За добијање графика амплитудно-фреквентне криве за партикуларно решење, које одговара померању у правцу ланца седмог молкула у ланцу, поред детерминанте система потребна је детерминанта следеће матрице:



Слика 3.20. Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања пете материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободe осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне ZP меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају ZP јајне ћелије миша. На апсциси су приказане фреквенције, а на ординати амплитуде.

$$g7(x) := \begin{pmatrix} c1 + c2 - m1 \cdot x & -c2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -c2 & c2 + c3 - m2 \cdot x & -c3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -c4 & c4 + c5 - m4 \cdot x & -c5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -c5 & c5 + c6 - m5 \cdot x & -c6 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -c6 & c6 + c7 - m6 \cdot x & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c7 & -c8 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & c8 + c9 - m8 \cdot x & -c9 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c9 & c9 + c10 - m9 \cdot x & -c10 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c10 & c10 + c11 - m10 \cdot x & -c11 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c11 & c11 + c12 - m11 \cdot x & 0 \end{pmatrix} \quad (3.158)$$

$$a73(x) := |g7(x)| \div |g(x)| \quad (3.159)$$



Слика 3.21. Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања седме материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободе осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне ZP меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају ZP јајне ћелије миша. На апсциси су приказане фреквенције, а на ординати амплитуде.

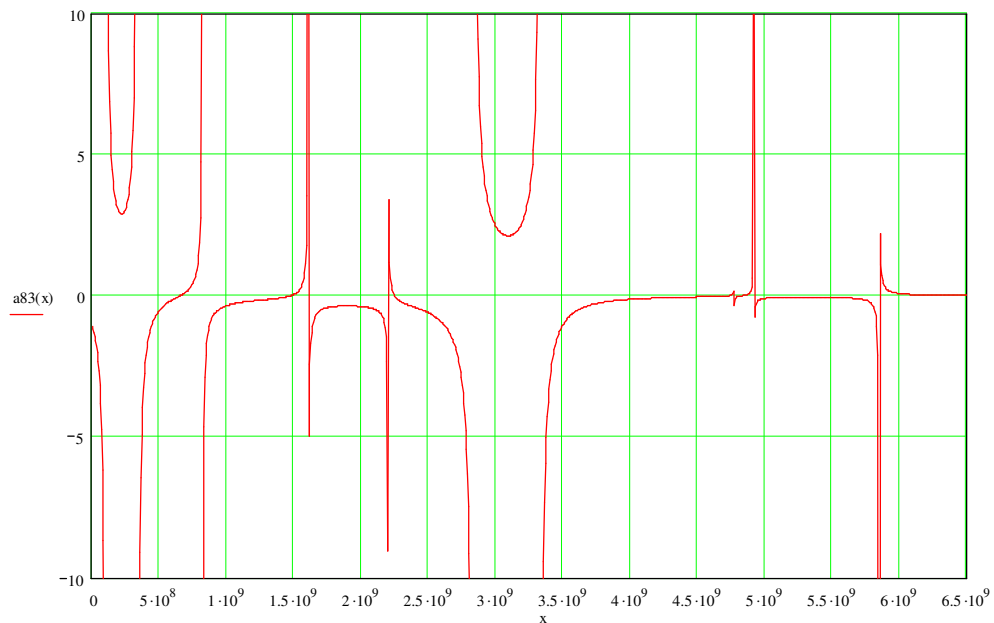
Кружне фреквенције $\Omega_{a,7,s}$ спољашње силе на којима наступа динамичка апсорпција на координати седмог молекула у принудном режиму осциловања:

$$\Omega_{a,7,1}=1,975 \times 10^{10}, \Omega_{a,7,2}=3,75 \times 10^{10}, \Omega_{a,7,3}=4,274 \times 10^{10}, \Omega_{a,7,4}=5,659 \times 10^{10}.$$

Слика 3.21. За добијање графика амплитудно-фреквентне криве за партикуларно решење, које одговара померању у правцу ланца осме материјалне тачке у ланцу, поред детерминанте система потребна је детерминанта следеће матрице:

$$g_8(x) := \begin{pmatrix} c_1 + c_2 - m_1 x & -c_2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -c_2 & c_2 + c_3 - m_2 x & -c_3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -c_4 & c_4 + c_5 - m_4 x & -c_5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -c_5 & c_5 + c_6 - m_5 x & -c_6 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -c_6 & c_6 + c_7 - m_6 x & -c_7 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_7 & c_7 + c_8 - m_7 x & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_8 & -c_9 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & c_9 + c_{10} - m_9 x & -c_{10} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_{10} & c_{10} + c_{11} - m_{10} x & -c_{11} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_{11} & c_{11} + c_{12} - m_{11} x & 0 \end{pmatrix} \quad (3.160)$$

$$a_{83}(x) := |g_8(x)| \div |g(x)| \quad (3.161)$$



Слика 3.22. Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања осме материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободe осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне ZP меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају ZP јајне ћелије миша. На апсциси су приказане фреквенције, а на ординати амплитуде.

Кружне фреквенције $\Omega_{a,8,s}$ спољашње силе на којима наступа динамичка апсорпција на координати осмог молекула у принудном режиму осциловања

$$\Omega_{a,8,1} = 2,604 \times 10^{10}, \Omega_{a,8,2} = 3,876 \times 10^{10}, \Omega_{a,8,3} = 4,735 \times 10^{10}, \Omega_{a,8,4} = 6,953 \times 10^{10}$$

За добијање графика амплитудно-фреквентне криве за партикуларно решење, које одговара померању у правцу ланца десете материјалне тачке у ланцу, поред детерминанте система потребна је детерминанта следеће матрице:

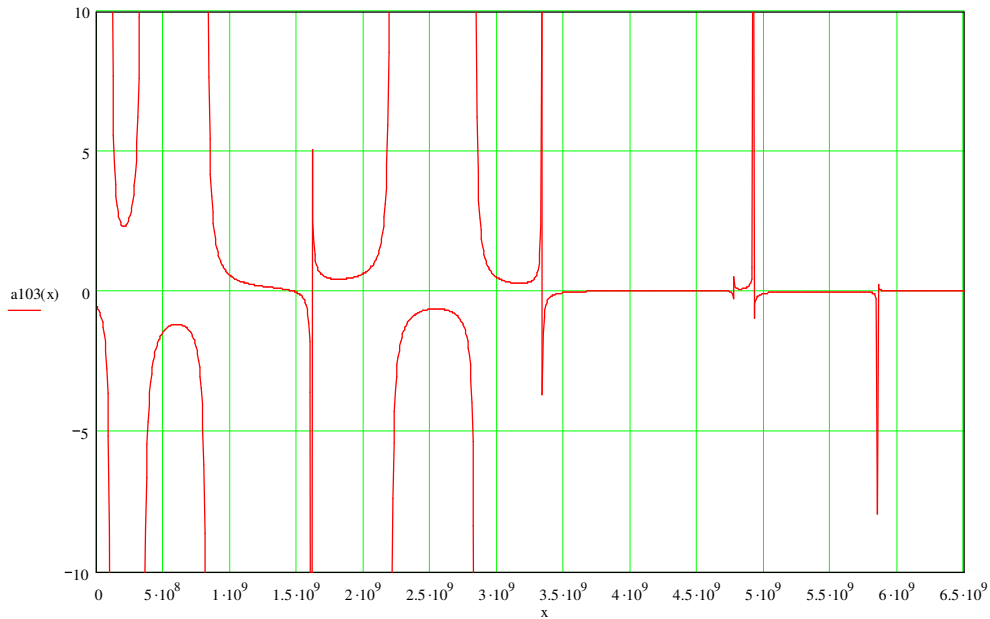
$$g_{10}(x) := \begin{pmatrix} c_1 + c_2 - m_1 x & -c_2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -c_2 & c_2 + c_3 - m_2 x & -c_3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -c_4 & c_4 + c_5 - m_4 x & -c_5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -c_5 & c_5 + c_6 - m_5 x & -c_6 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_6 & c_6 + c_7 - m_6 x & -c_7 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_7 & c_7 + c_8 - m_7 x & -c_8 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_8 & c_8 + c_9 - m_8 x & -c_9 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_9 & c_9 + c_{10} - m_9 x & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_{10} & -c_{11} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & c_{11} + c_{12} - m_{11} x \end{pmatrix}$$

(3.162)

$$a_{103}(x) := |g_{10}(x)| \div |g(x)| \quad (3.163)$$

Кружне фреквенције $\Omega_{a,10,s}$ спољашње силе на којима наступа динамичка апсорпција на координати десетог молекула у принудном режиму осциловања:

$$\Omega_{a,10,1} = 3,756 \times 10^{10}$$



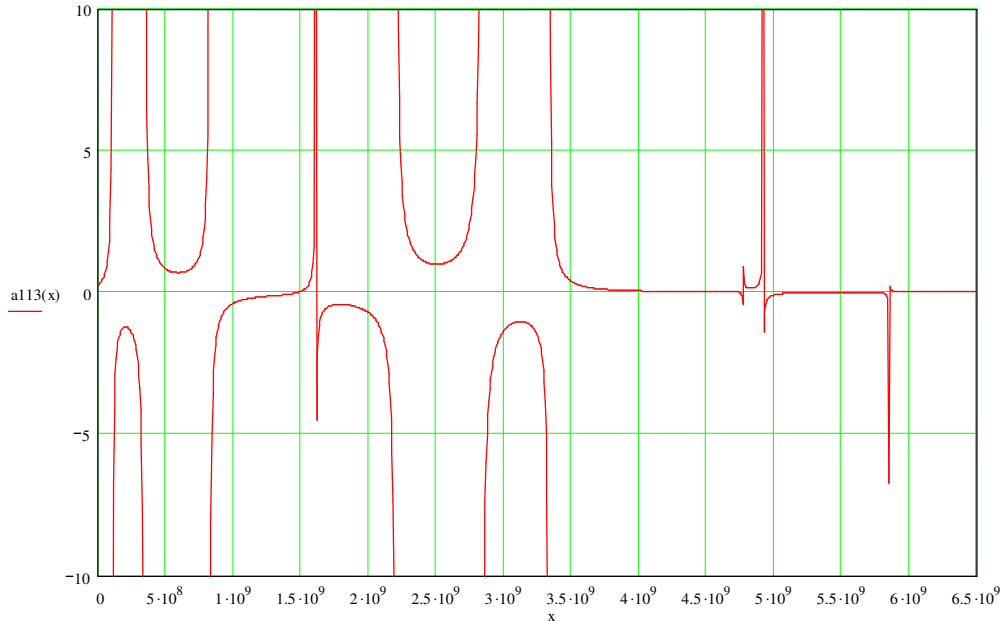
Слика 3.23. Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања десете материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободe осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне ZP меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају

ZP јане ћелије миша. На апсциси су приказане фреквенције, а на ординати амплитуде.

За добијање графика амплитудно-фреквентне криве за партикуларно решење, које одговара померању у правцу ланца једанаесте материјалне тачке у ланцу, поред детерминанте система потребна је детерминанта следеће матрице:

$$g_{11}(x) := \begin{pmatrix} c_1 + c_2 - m_1 x & -c_2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -c_2 & c_2 + c_3 - m_2 x & -c_3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -c_4 & c_4 + c_5 - m_4 x & -c_5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -c_5 & c_5 + c_6 - m_5 x & -c_6 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -c_6 & c_6 + c_7 - m_6 x & -c_7 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_7 & c_7 + c_8 - m_7 x & -c_8 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_8 & c_8 + c_9 - m_8 x & -c_9 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_9 & c_9 + c_{10} - m_9 x & -c_{10} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_{10} & c_{10} + c_{11} - m_{10} x & -c_{11} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_{11} \end{pmatrix} \quad (3.164)$$

$$a_{113}(x) := |g_{11}(x)| \div |g(x)| \quad (3.165)$$



Слика 3.24. Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања једанаесте материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободе осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне ZP меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које

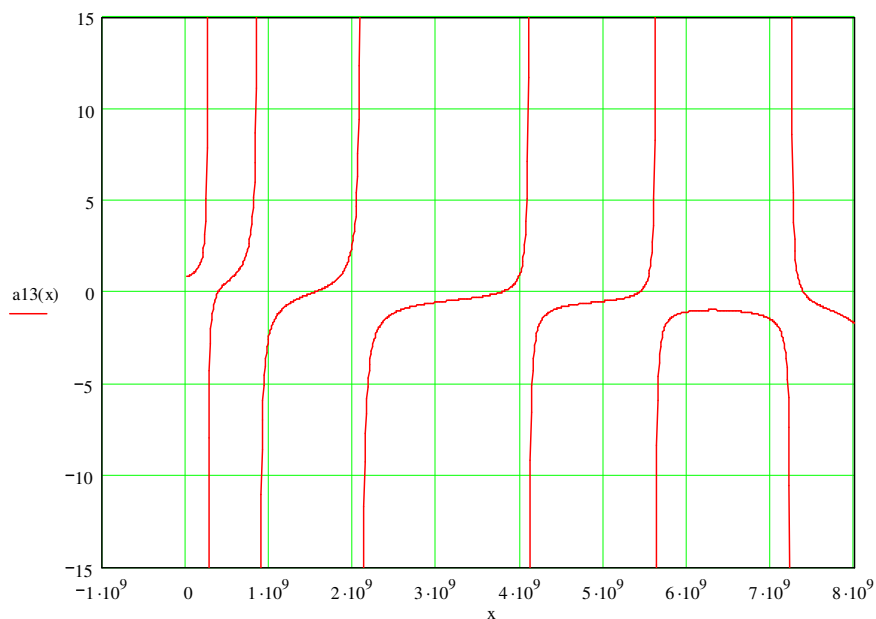
одговарају *ZP* јажне ћелије миша. На апсциси су приказане фреквенције, а на ординати амплитуде.

Кружне фреквенције $\Omega_{a,11,s}$ спољашње силе на којима наступа динамичка апсорпција на координати једанаестог молекула у принудном режиму осциловања: $\Omega_{a,11,1}=3,873 \times 10^{10}$, $\Omega_{a,11,2}=6,387 \times 10^{10}$.

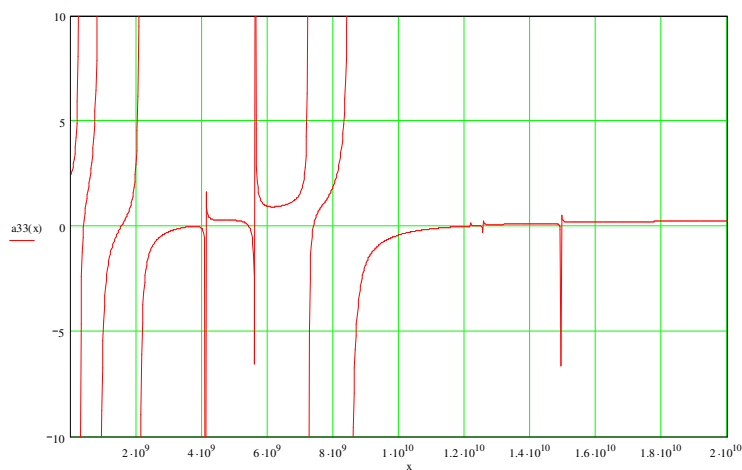
На основу нумеричког експеримента видимо да се динамичка апсорпција за поједине молекуле у ланцу дешава на различитом броју фреквенција када принудна сила дејствује на трећи молекул у ланцу. Највећи број могућности за динамичку апсорпцију је на првом молекулу у ланцу (8), затим другом и четвртном (5), па трећем, петом и шестом (3), једанаестом (2), десетом (1) и на крају на деветом на коме не долази до динамичке апсорпције.

Исти поступак је примењен и за модел осцилатроне мреже *ZP* ембриона миша, само са подацима који одговарају *ZP* ембриона миша (*Sun et al, 2003*) (маса *ZP* молекула су исте, везе узете као идеално еластичне али су вредности за крутости веза израчунате по формули (3.136) тако да одговарају вредностима које се односе на *ZP* ембриона миша $c_e=0.646\text{N/m}$). Биће приказани амплитудно фреквентни дијаграми за први, трећи, шести и девети молекул.

Фреквенције на којима долази до динамичке апсорпције на трећем молекулу у ланцу када спољна принудна сила дејствује на трећи молекул у ланцу у случају осцилаторног модела *ZP* ембриона миша: $\Omega_{e,3,1}=2.145 \times 10^{10}\text{rad/s}$, $\Omega_{e,3,2}=3.95 \times 10^{10}\text{rad/s}$, $\Omega_{e,3,3}=7.335 \times 10^{10}\text{rad/s}$, $\Omega_{e,3,4}=8.602 \times 10^{10}\text{rad/s}$, $\Omega_{e,3,4}=1.22 \times 10^{11}\text{rad/s}$ и $\Omega_{e,3,5}=1.118 \times 10^{11}\text{rad/s}$.

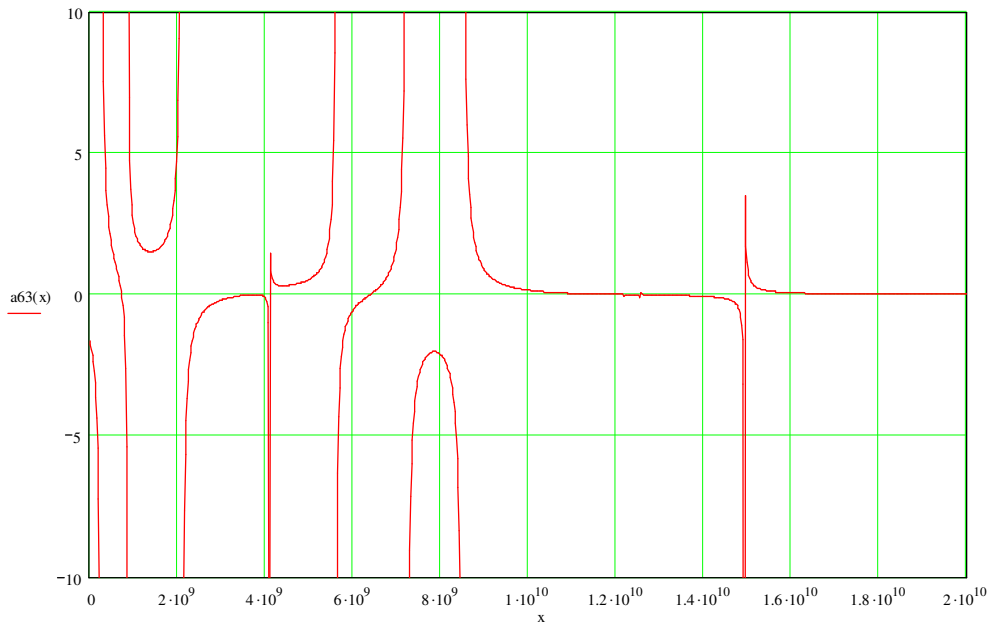


Слика 3.25 Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања прве материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободе осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне *ZP* меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају *ZP* ембриона миша. На апсциси су приказане фреквенције, а на ординати амплитуде.



Слика 3.26 Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања треће материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободе

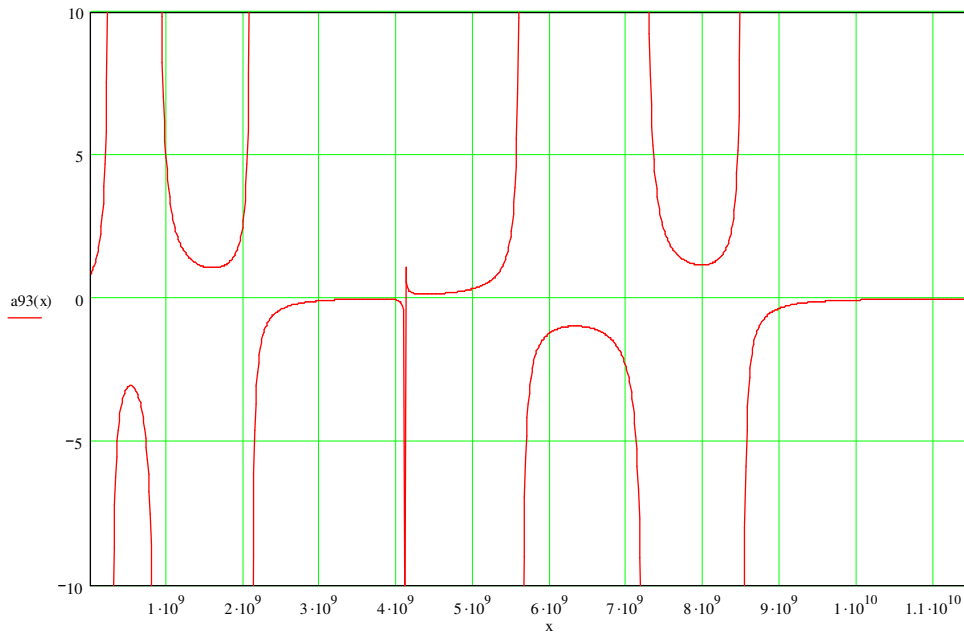
осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне *ZP* меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају *ZP* ембриона миша. На апсциси су приказане фреквенције, а на ординати амплитуде.



Слика 3.27 Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања шесте материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободе осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне *ZP* меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају *ZP* ембриона миша. На апсциси су приказане фреквенције, а на ординати амплитуде.

Фреквенције на којима долази до динамичке апсорпције на шестом молекулу у ланцу када спољна принудна сила дејствује на трећи молекул у ланцу у случају осцилаторног модела *ZP* ембриона миша: $\Omega_{e,6,1} = 2.683 \times 10^{10}$ rad/s, и $\Omega_{e,6,2} = 8.655 \times 10^{10}$ rad/s,

Под истим условима не долази до динамичке апсорпције на деветом молекулу у осцилаторном моделу *ZP* ембриона миша.



Слика 3.28. Амплитудно-фреквентна крива амплитуде партикуларног решења принудног осциловања девете материјалне тачке у ланцу са 11 степени слободне осциловања, када на трећу материјалну тачку у ланцу, дискретног модела сферне *ZP* меже, дејствује једнофреквентна принудна сила за вредности које одговарају *ZP* ембриона миша. На апсциси су приказане фреквенције, а на ординати амплитуде.

Young-ов модул еластичности *ZP* зреле јајне ћелије миша има 2.5 веће вредности у поређењу са *ZP* ембриона миша (*Sun et al, 2003*). Сперматозооиди не могу да продру кроз *ZP* ембриона. Након оплодње долази до *polyspermy block*-а кад други сперматозооиди не могу да се закаче за површину *ZP* а они већ закачени бивају одбијени. Процес је рецепторски и ензимски посредован и укључује одбијање наелетисања између *ZP* и мембрне сперматозооида. Покушали смо да објаснимо овај процес са становишта теорије осцилација користећи модел осцилаторне сферне мреже *ZP* јајне ћелије и ембриона миша. Када сперматозооиди принудно дејствују на трећи (чворни) молекул у ланцу на репрезентативном узорку осцилаторног модела *ZP*, нумеричке анализе показују да

су вредности за сопствене кружне фреквенције ZP ембриона миша веће у поређењу са вредностима за сопствене кружне фреквенције ZP јајне ћелије миша. Ово указује да ће за потенцијалну пенетрацију кроз ZP ембриона сперматозоидима требати више енергије. У живом систему то није могуће с обзиром да током времена долази до губитка енергије потребне за кретање сперматозоида. Након оплодње нема сперматозоида који би могли да одговоре на ове повећане захтеве. На амлитудно фреквентним графицима нуле одговарају местима динамичке апсорпције. За исте молекуле динамичка апсорпција наступа на вишим фреквенцијама у моделу ZP ембриона миша у односу на ZP јајне ћелије миша (*Hedrih, 2014*). Ови резултати указују да се ZP јајне ћелије и ембриона налази у различитим осцилаторним стањима и да би то могло да има биолошку улогу. Ова транзиција из јајне ћелије у ембрион је ирверзибилан процес.

3.18. Одређивање интеграционих константи за случај сопствених осцилација насталих поремећајем стања равнотеже репрезентативног дела осцилаторне ZP мреже предајом кинетичке енергије једном чворном молекулу

Да би смо одредили закон сопствених осцилација материјалних тачака (молекула) у репрезентативном узорку модела дискретне сферне мреже ZP потребно је да за одређене почетне услове одредимо интеграционе константе. Интеграционе константе смо одредили за кинетичка стања сопствених осцилација молекула у репрезентативном узорку модела дискретне сферне мреже ZP проузрокована поремећајем стационарног стања модела ZP почетним брзинама предатим чворним молекулима. То је зато што смо разматрали случај када један или више сперматозоида тренутним ударом у чворни молекул крећући се одређеном брзином преда одређену кинетичку енергију чворном молекулу. Апроксимовали смо да нема продуженог дејства на ZP па је то случај побуђивања сопствених осцилација поремећајем само у почетном тренутку (*Hedrih et al, 2015a*).

По одређивању једанаест квадрата сопствених кружних фреквенција ω_s^2 , $s = 1, 2, 3, \dots, 10, 11$ из фреквентне једначине осциловања (3.73) односно у матричном

облику (3.94), константујемо да постоји једанаест сопствених главних модова за једанаестофреквентни осцилаторни режим сваког од молекула у ланцу и у правцу ланца. Сада на основу те функционалне зависности главних координата од времена, која је периодична са одговарајућом сопственом кружном фреквенцијом из скупа ω_s , $s=1,2,\dots,11$, формирамо општа решења за једанаестофреквентна сопствена осцилаторна померања молекула у правцима самих ланаца према раније изведеном матричном изразу (3.97), као и одговарајуће брзине молекула у једанаестофреквентном режиму у облику

$$\begin{Bmatrix} u_1(t) \\ u_2(t) \\ \vdots \\ u_{11}(t) \end{Bmatrix} = \mathbf{R} \begin{Bmatrix} C_1 \cos(\omega_1 t + \alpha_1) \\ C_2 \cos(\omega_2 t + \alpha_2) \\ \vdots \\ C_{11} \cos(\omega_{11} t + \alpha_{11}) \end{Bmatrix} \text{ и } \begin{Bmatrix} \dot{u}_1(t) \\ \dot{u}_2(t) \\ \vdots \\ \dot{u}_{11}(t) \end{Bmatrix} = -\mathbf{R} \begin{Bmatrix} \omega_1 C_1 \sin(\omega_1 t + \alpha_1) \\ \omega_2 C_2 \sin(\omega_2 t + \alpha_2) \\ \vdots \\ \omega_{11} C_{11} \sin(\omega_{11} t + \alpha_{11}) \end{Bmatrix} \quad (3.166)$$

у којима су 11 амплитуда C_s , $s=1,2,3,\dots,11$ и 11 фаза α_s , $s=1,2,3,\dots,11$ сопствених осцилаторних модова ланца са 11 степени слободe осциловања непознати, што укупно износи 22 непознате интеграционе константе за сопствена осцилаторна померања 11 молекула у сваком од ланаца репрезентативног узорка дискретног осцилаторног модела ZP мреже. У решењу (3.166), \mathbf{R} је модална матрица (3.96), која се формира од кофактора $K_{11,k}^{(s)}$, $k=1,2,3,\dots,10,11$, $s=1,2,3,\dots,10,11$ елемената једанаесте врсте из детерминанте у фреквентној једначини (3.73), односно (3.94), и можемо саставити ту модалну матрицу ланчаног система са једанаест степени слободe осциловања, у облику следеће матрице ранга 10×10 :

$$\mathbf{R} = \begin{pmatrix} K_{11,1}^{(1)} & K_{11,1}^{(2)} & \cdots & K_{11,1}^{(11)} \\ K_{11,2}^{(1)} & K_{11,2}^{(2)} & \cdots & K_{11,2}^{(11)} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ K_{11,11}^{(1)} & K_{11,11}^{(2)} & \cdots & K_{11,11}^{(11)} \end{pmatrix} \neq 0 \quad (3.167)$$

Да би смо одредили непознате интеграционе константе, 11 амплитуда C_s , $s=1,2,3,\dots,11$ и 11 фаза α_s , $s=1,2,3,\dots,11$ потребно је да формулишемо почетне услове. Задајемо следеће почетне услове:

- 11 почетних положаја – почетних пертурбација молекула из равнотежне или стационарне конфигурације ланца, када су идеално еластичне везе међу њима биле ненапрегнуте, претпостављамо да та конфигурација у почетном тренутку није била поремећена:

•

$$\begin{Bmatrix} u_1(0) \\ u_2(0) \\ \cdot \\ \cdot \\ u_{11}(0) \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} u_{1,0} \\ u_{2,0} \\ \cdot \\ \cdot \\ u_{11,0} \end{Bmatrix} = \mathbf{R} \begin{Bmatrix} C_1 \cos(\omega_1 t + \alpha_1) \\ C_2 \cos(\omega_2 t + \alpha_2) \\ \cdot \\ \cdot \\ C_{11} \cos(\omega_{11} t + \alpha_{11}) \end{Bmatrix} \Big|_{t=0} = \mathbf{R} \begin{Bmatrix} C_1 \cos \alpha_1 \\ C_2 \cos \alpha_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ C_{11} \cos \alpha_{11} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} 0 \\ 0 \\ \cdot \\ \cdot \\ 0 \end{Bmatrix} \quad (3.168)$$

- 11 почетних брзина сперматозоида су пре дејства на чворни молекул су једнаке нули:

$$\begin{Bmatrix} \dot{u}_1(0) \\ \dot{u}_2(0) \\ \dot{u}_3(0) \\ \cdot \\ \dot{u}_{11}(0) \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} \dot{u}_{1,0} \\ \dot{u}_{2,0} \\ \dot{u}_{3,0} \\ \cdot \\ \dot{u}_{11,0} \end{Bmatrix} = -\mathbf{R} \begin{Bmatrix} \omega_1 C_1 \sin(\omega_1 t + \alpha_1) \\ \omega_2 C_2 \sin(\omega_2 t + \alpha_2) \\ \omega_3 C_3 \sin(\omega_3 t + \alpha_3) \\ \cdot \\ \omega_{11} C_{11} \sin(\omega_{11} t + \alpha_{11}) \end{Bmatrix} \Big|_{t=0} = -\mathbf{R} \begin{Bmatrix} \omega_1 C_1 \sin \alpha_1 \\ \omega_2 C_2 \sin \alpha_2 \\ \omega_3 C_3 \sin \alpha_3 \\ \cdot \\ \omega_{11} C_{11} \sin \alpha_{11} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} 0 \\ 0 \\ \dot{u}_{3,0} \\ \cdot \\ 0 \end{Bmatrix} \quad (3.169)$$

Значи да сада за изабране почетне услове имамо систем од 22 нехомогене алгебарске једначине у облику:

$$\mathbf{R} \begin{Bmatrix} C_1 \cos \alpha_1 \\ C_2 \cos \alpha_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ C_{11} \cos \alpha_{11} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} 0 \\ 0 \\ \cdot \\ \cdot \\ 0 \end{Bmatrix} \quad \text{и} \quad \mathbf{R} \begin{Bmatrix} \omega_1 C_1 \sin \alpha_1 \\ \omega_2 C_2 \sin \alpha_2 \\ \omega_3 C_3 \sin \alpha_3 \\ \cdot \\ \omega_{11} C_{11} \sin \alpha_{11} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} 0 \\ 0 \\ -\dot{u}_{3,0} \\ \cdot \\ 0 \end{Bmatrix} \quad (3.170)$$

које садрже 22 непознате интеграционе константе, 11 амплитуда C_s , $s=1,2,3,\dots,11$ и 11 фаза α_s , $s=1,2,3,\dots,11$. које треба одредити из тог система. Анализом претходног система (3.170) алгебарских једначина, можемо закључити да он садржи два подсистема, од којих је први систем хомогених алгебарских једначина по једанаест непознатих $\tilde{L}_s = C_s \cos \alpha_s$, $s=1,2,3,\dots,11$ и да је други подсистем нехомоген по непознатим $L_s = C_s \sin \alpha_s$, $s=1,2,3,\dots,11$ и да су са тако уведеним непознатим, та два система практично независна и да се могу решавати посебно.

На основу претходног закључка, прво приступамо решавању првог подсистема хомогених алгебарских једначина из (3.170) по једанаест непознатих $\tilde{L}_s = C_s \cos \alpha_s$, $s=1,2,3,\dots,11$. Како је детермината тог система детерминанта модалне матрице \mathbf{R} дефинисане са (3.96) односно (3.167) осцилаторног система и како је она резличита од нуле $\mathbf{R} \neq 0$, то значи да су сва решења првог подсистема хомогених алгебарских једначина тривијална, односно да су једнака нули, па следи да је решење тог подсистема по једанаест непознатих $\tilde{L}_s = C_s \cos \alpha_s$, $s=1,2,3,\dots,11$:

$$\tilde{L}_s = C_s \cos \alpha_s = 0, \quad s=1,2,3,\dots,11 \quad (3.171)$$

одакле следи да свих 11 непознатих амплитуда C_s , $s=1,2,3,\dots,11$ мора бити различито од нуле да би постојале осцилације $C_s \neq 0$, $s=1,2,3,\dots,11$, јер ако су једнаке нули сви молекули би били у мировању. Даље следи да је

$$\cos \alpha_s = 0, \quad s=1,2,3,\dots,11 \quad \text{односно} \quad \alpha_s = \frac{\pi}{2}, \quad s=1,2,3,\dots,11 \quad (3.172)$$

чиме смо решили први подсистем хомогених алгебарских једначина и добили решења за првих 11 непознатих, односно за 11 фаза α_s , $s=1,2,3,\dots,11$, које су сада познате фазе $\alpha_s = \frac{\pi}{2}$, $s=1,2,3,\dots,11$, сопствених модова за задате почетне

услове. Са тим решењима, за познате фазе $\alpha_s = \frac{\pi}{2}$, $s = 1, 2, 3, \dots, 11$, улазимо у решавање другог подсистема нехомогених алгебарских једначина из система (3.170) по непознатим $L_s = C_s \sin \alpha_s$, $s = 1, 2, 3, \dots, 11$. После уношења претходног решења за фазе $\alpha_s = \frac{\pi}{2}$, $s = 1, 2, 3, \dots, 11$, а како је $\sin \alpha_s = \sin \frac{\pi}{2} = 1$ за свако $s = 1, 2, 3, \dots, 11$, добијамо следећи подсистем:

$$\mathbf{R} \begin{Bmatrix} \omega_1 C_1 \\ \omega_2 C_2 \\ \omega_3 C_3 \\ \cdot \\ \omega_{11} C_{11} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} 0 \\ 0 \\ -\dot{u}_{3,0} \\ \cdot \\ 0 \end{Bmatrix} \quad (3.173)$$

који садржи 11 непознатих амплитуда C_s , $s = 1, 2, 3, \dots, 11$ сопствених мода за задате почетне услове. Како је то систем нехомогених алгебарских једначина, то је потребно одредити детерминанту тог система и детерминанте у којима су одговарајуће колоне замењене колоном слободних чланова и применити *Cramer*-ово правило.

Да би одредили матрицу другог подсистема (3.173) система (3.170) извршимо множење модалне матрице с матрицом колоном из подсистема (3.173) тако да добијемо:

$$\begin{pmatrix} K_{11,1}^{(1)} & K_{11,1}^{(2)} & \cdot & \cdot & K_{11,1}^{(11)} \\ K_{11,2}^{(1)} & K_{11,2}^{(2)} & \cdot & \cdot & K_{11,2}^{(11)} \\ K_{11,3}^{(1)} & K_{11,3}^{(3)} & \cdot & \cdot & K_{11,3}^{(11)} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ K_{11,11}^{(1)} & K_{11,11}^{(2)} & \cdot & \cdot & K_{11,11}^{(11)} \end{pmatrix} \begin{Bmatrix} \omega_1 C_1 \\ \omega_2 C_2 \\ \omega_3 C_3 \\ \cdot \\ \omega_{11} C_{11} \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} \omega_1 C_1 K_{11,1}^{(1)} + \omega_2 C_2 K_{11,1}^{(2)} + \omega_3 C_3 K_{11,1}^{(3)} + \dots + \omega_{11} C_{11} K_{11,1}^{(11)} \\ \omega_1 C_1 K_{11,2}^{(1)} + \omega_2 C_2 K_{11,2}^{(2)} + \omega_3 C_3 K_{11,2}^{(3)} + \dots + \omega_{11} C_{11} K_{11,2}^{(11)} \\ \omega_1 C_1 K_{11,3}^{(1)} + \omega_2 C_2 K_{11,3}^{(2)} + \omega_3 C_3 K_{11,3}^{(3)} + \dots + \omega_{11} C_{11} K_{11,3}^{(11)} \\ \cdot \\ \omega_1 C_1 K_{11,11}^{(1)} + \omega_2 C_2 K_{11,11}^{(2)} + \omega_3 C_3 K_{11,11}^{(3)} + \dots + \omega_{11} C_{11} K_{11,11}^{(11)} \end{Bmatrix} \quad (3.174)$$

Затим издвојимо чинилац у виду матрице колоне 11 непознатих амплитуда C_s , $s = 1, 2, 3, \dots, 11$ тако да добијемо:

$$\begin{pmatrix} \omega_1 K_{11,1}^{(1)} & \omega_2 K_{11,1}^{(2)} & \omega_3 K_{11,1}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,1}^{(11)} \\ \omega_1 K_{11,2}^{(1)} & \omega_2 K_{11,2}^{(2)} & \omega_3 K_{11,2}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,2}^{(11)} \\ \omega_1 K_{11,3}^{(1)} & \omega_2 K_{11,3}^{(2)} & \omega_3 K_{11,3}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,3}^{(11)} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \omega_1 K_{11,11}^{(1)} & \omega_2 K_{11,11}^{(2)} & \omega_3 K_{11,11}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,11}^{(11)} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_1 \\ C_2 \\ C_3 \\ \cdot \\ C_{11} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \omega_1 C_1 K_{11,1}^{(1)} + \omega_2 C_2 K_{11,1}^{(2)} + \omega_3 C_3 K_{11,1}^{(3)} + \dots + \omega_{11} C_{11} K_{11,1}^{(11)} \\ \omega_1 C_1 K_{11,2}^{(1)} + \omega_2 C_2 K_{11,2}^{(2)} + \omega_3 C_3 K_{11,2}^{(3)} + \dots + \omega_{11} C_{11} K_{11,2}^{(11)} \\ \omega_1 C_1 K_{11,3}^{(1)} + \omega_2 C_2 K_{11,3}^{(2)} + \omega_3 C_3 K_{11,3}^{(3)} + \dots + \omega_{11} C_{11} K_{11,3}^{(11)} \\ \cdot \\ \omega_1 C_1 K_{11,11}^{(1)} + \omega_2 C_2 K_{11,11}^{(2)} + \omega_3 C_3 K_{11,11}^{(3)} + \dots + \omega_{11} C_{11} K_{11,11}^{(11)} \end{pmatrix} \quad (3.175)$$

На основу претходног резултата трансформације производа из подсистема (3.173), тај подсистем нехомогених алгебарских једначина можемо добити у облику:

$$\begin{pmatrix} \omega_1 K_{11,1}^{(1)} & \omega_2 K_{11,1}^{(2)} & \omega_3 K_{11,1}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,1}^{(11)} \\ \omega_1 K_{11,2}^{(1)} & \omega_2 K_{11,2}^{(2)} & \omega_3 K_{11,2}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,2}^{(11)} \\ \omega_1 K_{11,3}^{(1)} & \omega_2 K_{11,3}^{(2)} & \omega_3 K_{11,3}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,3}^{(11)} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \omega_1 K_{11,11}^{(1)} & \omega_2 K_{11,11}^{(2)} & \omega_3 K_{11,11}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,11}^{(11)} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_1 \\ C_2 \\ C_3 \\ \cdot \\ C_{11} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ -i_{3,0} \\ \cdot \\ 0 \end{pmatrix} \quad (3.176)$$

из кога добијамо матрицу \mathbf{K} коефицијената система тих алгебарских нехомогених једначина у облику:

$$\mathbf{K} = \begin{pmatrix} \omega_1 K_{11,1}^{(1)} & \omega_2 K_{11,1}^{(2)} & \omega_3 K_{11,1}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,1}^{(11)} \\ \omega_1 K_{11,2}^{(1)} & \omega_2 K_{11,2}^{(2)} & \omega_3 K_{11,2}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,2}^{(11)} \\ \omega_1 K_{11,3}^{(1)} & \omega_2 K_{11,3}^{(2)} & \omega_3 K_{11,3}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,3}^{(11)} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \omega_1 K_{11,11}^{(1)} & \omega_2 K_{11,11}^{(2)} & \omega_3 K_{11,11}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,11}^{(11)} \end{pmatrix} \quad (3.177)$$

Остале потребне матрице \mathbf{K}_s , $s = 1, 2, 3, \dots, 11$, којих је 11, за одређивање 11 непознатих амплитуда C_s , $s = 1, 2, 3, \dots, 11$ се добијају тако што се у матрици \mathbf{K} редом замењују прва, друга, трећа,.. и тако редом до једанаесте колоне колоном

слободних чланова из матричне једначине (176), те на основу тога редом пишемо те матрице:

$$\mathbf{K}_1 = \begin{pmatrix} 0 & \omega_2 K_{11,1}^{(2)} & \omega_3 K_{11,1}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,1}^{(11)} \\ 0 & \omega_2 K_{11,2}^{(2)} & \omega_3 K_{11,2}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,2}^{(11)} \\ -i_{3,0} & \omega_2 K_{11,3}^{(2)} & \omega_3 K_{11,3}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,3}^{(11)} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ 0 & \omega_2 K_{11,11}^{(2)} & \omega_3 K_{11,11}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,11}^{(11)} \end{pmatrix} \quad (3.178)$$

$$\mathbf{K}_2 = \begin{pmatrix} \omega_1 K_{11,1}^{(1)} & 0 & \omega_3 K_{11,1}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,1}^{(11)} \\ \omega_1 K_{11,2}^{(1)} & 0 & \omega_3 K_{11,2}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,2}^{(11)} \\ \omega_1 K_{11,3}^{(1)} & -i_{3,0} & \omega_3 K_{11,3}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,3}^{(11)} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \omega_1 K_{11,11}^{(1)} & 0 & \omega_3 K_{11,11}^{(3)} & \cdot & \omega_{11} K_{11,11}^{(11)} \end{pmatrix} \quad (3.179)$$

$$\mathbf{K}_3 = \begin{pmatrix} \omega_1 K_{11,1}^{(1)} & \omega_2 K_{11,1}^{(2)} & 0 & \cdot & \omega_{11} K_{11,1}^{(11)} \\ \omega_1 K_{11,2}^{(1)} & \omega_2 K_{11,2}^{(2)} & 0 & \cdot & \omega_{11} K_{11,2}^{(11)} \\ \omega_1 K_{11,3}^{(1)} & \omega_2 K_{11,3}^{(2)} & -i_{3,0} & \cdot & \omega_{11} K_{11,3}^{(11)} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \omega_1 K_{11,11}^{(1)} & \omega_2 K_{11,11}^{(2)} & 0 & \cdot & \omega_{11} K_{11,11}^{(11)} \end{pmatrix} \quad (3.180)$$

.....

$$\mathbf{K}_{11} = \begin{pmatrix} \omega_1 K_{11,1}^{(1)} & \omega_2 K_{11,1}^{(2)} & \omega_3 K_{11,1}^{(3)} & \cdot & 0 \\ \omega_1 K_{11,2}^{(1)} & \omega_2 K_{11,2}^{(2)} & \omega_3 K_{11,2}^{(3)} & \cdot & 0 \\ \omega_1 K_{11,3}^{(1)} & \omega_2 K_{11,3}^{(2)} & \omega_3 K_{11,3}^{(3)} & \cdot & -\dot{u}_{3,0} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \omega_1 K_{11,11}^{(1)} & \omega_2 K_{11,11}^{(2)} & \omega_3 K_{11,11}^{(3)} & \cdot & 0 \end{pmatrix} \quad (3.181)$$

Решења за непознате интеграционе константе - 11 непознатих амплитуда C_s , $s = 1, 2, 3, \dots, 11$ добијамо у следећем облику:

$$C_s = \frac{|\mathbf{K}_s|}{|\mathbf{K}|}, \quad s = 1, 2, 3, \dots, 11 \quad (3.182)$$

Закони сопствених једнаестифреквентних осцилација молекула у једном ланцу за задате почетне услове гласи:

$$\begin{Bmatrix} u_1(t) \\ u_2(t) \\ u_2(t) \\ \cdot \\ u_{11}(t) \end{Bmatrix} = \mathbf{R} \begin{Bmatrix} C_1 \cos(\omega_1 t + \alpha_1) \\ C_2 \cos(\omega_2 t + \alpha_2) \\ C_3 \cos(\omega_3 t + \alpha_3) \\ \cdot \\ C_{11} \cos(\omega_{11} t + \alpha_{11}) \end{Bmatrix} = \mathbf{R} \begin{Bmatrix} C_1 \cos\left(\omega_1 t + \frac{\pi}{2}\right) \\ C_2 \cos\left(\omega_2 t + \frac{\pi}{2}\right) \\ C_3 \cos\left(\omega_3 t + \frac{\pi}{2}\right) \\ \cdot \\ C_{11} \cos\left(\omega_{11} t + \frac{\pi}{2}\right) \end{Bmatrix} = \mathbf{R} \begin{Bmatrix} C_1 \sin(\omega_1 t) \\ C_2 \sin(\omega_2 t) \\ C_3 \sin(\omega_3 t) \\ \cdot \\ C_{11} \sin(\omega_{11} t) \end{Bmatrix} \quad (3.183)$$

$$\begin{Bmatrix} u_1(t) \\ u_2(t) \\ u_2(t) \\ \cdot \\ u_{11}(t) \end{Bmatrix} = \begin{pmatrix} K_{11,1}^{(1)} & K_{11,1}^{(2)} & \cdot & \cdot & K_{11,1}^{(11)} \\ K_{11,2}^{(1)} & K_{11,2}^{(2)} & \cdot & \cdot & K_{11,2}^{(11)} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ K_{11,11}^{(1)} & K_{11,11}^{(2)} & \cdot & \cdot & K_{11,11}^{(11)} \end{pmatrix} \begin{Bmatrix} C_1 \cos(\omega_1 t + \alpha_1) \\ C_2 \cos(\omega_2 t + \alpha_2) \\ C_3 \cos(\omega_3 t + \alpha_3) \\ \cdot \\ C_{11} \cos(\omega_{11} t + \alpha_{11}) \end{Bmatrix} \quad (3.184)$$

или у развијеном облику:

$$u_k(t) = \sum_{s=1}^{s=11} K_{11,k}^{(s)} C_s \cos(\omega_s t + \alpha_s), \quad k = 1, 2, 3, \dots, 11 \quad (3.185)$$

Да би смо одредили непознате интеграционе константе, - 11 непознатих амплитуда C_s , $s = 1, 2, 3, \dots, 11$ користећи претходно дефинисане матрице и одговарајуће детерминанте, у софтверском пакету за задате вредности материјалних константи и почетне брзине чворног молекула све ове матрице и њима одговарајуће детерминанте морамо исписати у развијеном облику а затим одређивати непознате и графички приказивати резултате нумеричких експеримената. Све матрице, детерминанте и нумерички резултати су приказани у Прилогу 2.

У наредним поглављима су коришћени резултати за анализу осцилаторног стања репрезентативног узорка дискретног модела сферне осцилаторне ZP мреже.

Како чворни молекули у тангенцијалној равни имају две компоненте у циркуларном и меридијалном правцу, та компонентна померања за сваки од четири чворна померања молекула се сада могу написати коришћењем решења (3.185). На основу тога, а за почетне услове имамо:

компонентна померања првог чворног молекула, (укрштање првог циркуларног и првог мердијалног ланца) за случај да сперматозооид импулсно дејствује на њега:

$$u_{1c,3(3)}(t) = \sum_{s=1}^{s=11} K_{11,3}^{(s)} C_s \cos(\omega_s t + \alpha_s) \quad v_{1m,3(3)}(t) = \sum_{s=1}^{s=11} K_{11,3}^{(s)} \tilde{C}_s \cos(\omega_s t + \alpha_s) \quad (3.186)$$

компонентна померања другог чворног молекула, (укрштање првог циркуларног и другог мердијалног ланца) за случај да сперматозооид импулсно дејствује на први чворни молекул:

$$u_{1c,9(3)}(t) = \sum_{s=1}^{s=11} K_{11,9}^{(s)} C_s \cos(\omega_s t + \alpha_s) \quad v_{2m,3(3)}(t) = 0 \quad (3.187)$$

компонентна померања трећег чворног молекула, (укрштање другог циркуларног и другог мердијалног ланца) за случај да сперматозооид импулсно дејствује на први чворни молекул:

$$u_{2c,9()}(t) = 0 \quad v_{2m,9(3)}(t) = 0 \quad (3.188)$$

компонентна померања четвртог чворног молекула, (укрштање другог циркуларног и првог мердијалног ланца) за случај да сперматозооид импулсно дејствује на први чворни молекул:

$$u_{2c,3(3)}(t) = 0 \quad v_{1m,9(3)}(t) = \sum_{s=1}^{s=11} K_{11,9}^{(s)} \tilde{C}_s \cos(\omega_s t + \alpha_s) \quad (3.189)$$

На основу овога се сада могу правити разне комбинације компонентних сопствених осцилаторних померања чворних молекула и суперпонирати компонентна померања чворних молекула зависно од тога да ли су и који чворни молекули добили почетне брзине у почетном тренутку и са којим интензитетима. Компонентне брзине једног чвора у једном правцу се суперпонирају као колинеарна осцилаторна померања, а у ортогоналним правцима ортогоналном суперпозицијом ортогоналних осцилација, када се добијају генералисане *Lissajous*-ове фигуре, као резултујуће путање, или компонентне путање у једној равни.

4. Нумеричка анализа осцилаторног понашања ZP

У овом поглављу испитивано је осцилаторно понашање чворних молекула у осцилаторном ZP моделу у односу на угао, брзину, распоред и број сперматозооида који дејствују на репрезентативни узорак осцилаторног ZP модела. Дат је предлог за двослојни вискоеластични осцилаторни модел ZP чија се осцилаторна динамика може описати помоћу нелинеарних диференцијалних једначина нецелог реда; предложен је квазистатички континуални модел ZP у виду шупље сфере и на квазистатичком моделу ZP разматран ефекат дејства сперматозооида на напон, деформације, запреминску дилатацију, специфичан деформациони рад у зависности од одговарајућих релевантних параметара.

4.1. Утицај угла под којим сперматозооид дејствује на површ mZP на осцилаторно понашање чворних молекула ZP миша

Према податцима из литературе сперматозооид, који продире кроз ZP то чини косом упадном путањом (*Bedford, 2006*). Сматрајући да је процес оплодње осцилаторни феномен, анализирали смо утицај угла под којим сперматозооид дејствује на површ mZP на осцилаторно понашање mZP користећи осцилаторни модел ZP миша. Као што је већ напоменуто, осцилаторни модел је дискретни механички модел који mZP посматра као дискретни континуум. Метода *Lussajous* –ових кривих је коришћена за параметријску фреквентну анализу осцилаторног понашања чворних молекула у осцилаторном моделу ZP .

Проучавање међусобног дејства јајне ћелије и сперматозооида је веома битно за разумевање процеса оплодње. Прецизни молекуларни механизам оплодње код сисара још увек није познат, али са биохемијског аспекта се сматра да процес оплодње пролази кроз неколико фаза: препознавање гамета и специфично рецепторско везивање сперматозооида за ZP , акрозомална реакција, пенетрација-

продирање главе сперматозоида кроз *ZP* (неки аутори сматрају да продира и реп сперматозоида) и кортикалне реакције (*Tipalski-Fišteš, 2005*).

У току процеса оплодње и јајна ћелија и сперматозоид пролазе кроз структурне и биохемијске промене (*Nixon et al, 2007*). У току процеса активације сперматозоида у репродуктивном тракту женске јединке долази до реорганизације плазма мембране сперматозоида, у циљу повећања способности за оплодњу јајне ћелије (*Flesch & Gadella, 2000*). Да би оплодња била успешна, неопходно је да постоји одређени број-количина сперматозоида који су прошли кроз процес акрозомалне реакције у време инсеминације. На основу фазно-контрасног микроскопа и посебног софтвера могуће је аутоматски класификовати појединачне сперматозоиде као акрозом интактне или акрозом реактивне са укупном грешком од 6.8% (*Alegre et al, 2008*). *Clark (Clark, 2011)* је дао алтернативну теорију о успешном везивању јајне ћелије и сперматозоида као и о постфертилизационој инхибицији везивања других сперматозоида –*polyspermy block*-у. Према његовој теорији садржај кортикалних гранула модификује *ZP2* гликопротеин, који затим тако модификован модификује *ZP3* гликопротеин. Модификовани *ZP3* нема способност везивања сперматозоида и не индукује акрозомалну реакцију. Модификовани *ZP2* и *ZP3* нису више погодни за везивање ни акрозом интактичних ни сперматозоида који су пришли кроз акрозомалну реакцију. Прецизни механизам како сперматозоид пролази кроз *ZP* још увек није јасан. Овај процес би морао да буде временски одређен с обзиром да *ZP* мења своја механичка својства током процеса сазревања, оплодње и преимплантационог развоја јајне ћелије и ембриона (*Sun et al, 2003, Murayama et al, 2006, Papi et al, 2009, 2010, Khalilian et al, 2010, 2011, Voccaccio et al, 2012*). Ултраструктурне анализе *ZP* сисара помоћу *ТЕМ*-а показују да сперматозоид пролази кроз *ZP* косом упадном путањом (*Bedford, 1998, 2006*) али се не зна под којим тачно углом.

In vivo као и *in vitro* услови за оплодњу нису увек успешни- повољни.

Bayesian-ски класификатори се могу користити за предвиђање подобности ембриона за успешну имплантацију (*Morales et al, 2008*). *Coranie et al (Corani et al, 2013)* су направили модел мреже којим предвиђају исход трудноће након *IVF*-а. У анализи података о *IVF* циклусима који су спроведени у репродуктивном

институту, аутори су поредили предложени модел са класификаторским алгоритмима.

Постоје неколико биомеханичких модела који описују међусобно дејство јајне ћелије и сперматозоида са биомеханичког аспекта (*Gefen, 2010, Kozlovsky & Gefen, 2012*).

Користећи модел који се заснива на контактної механици *Gefen (Gefen, 2010)* је моделовао однос између брзине сперматозоида и притиска, којим он дејствује на *ZP* за време ране фазе продора сперматозоида кроз *ZP*. Његове анализе су показале да брзина сперматозоида има већи утицај на притисак који он ствара на површини *ZP* него густина главе сперматозоида. Моделовање *Kozlovsky & Gefen-a (2012)* предвиђа да су за време ране фазе продора сперматозоида кроз *ZP*, биомеханичке везујуће силе које делују на сперматозоид мање него механичка пропулзивна сила.

Према моделу (*Kozlovsky & Gefen 2013*) међусобног дејства јајне ћелије и сперматозоида хиперактивација сперматозоида и облик главе сперматозоида су једини значајни фактори, који одређују успешни продор сперматозоида кроз *ZP*. Њихова анализа је показала да дебљина као и очвршћавање *ZP* имају занемарљив утицај на максимални контактни притисак и максималну пенетрацију главе сперматозоида. Они полазе од претпоставке да ће максимални притисак главе сперматозоида да обезбеди и максималну пенетрацију- али за то нема експерименталних доказа.

Биомеханички модели приказани у (*Nir, 2002, Hedrih & Ugrić, 2012*) предлажу да, у већини случајева дејство између сперматозоида и јајне ћелије пре пенетрације доводи до ротације јајне ћелије као резултат претходног нестабилног стања.

Према нашем сазнању нема експерименталних података о специфичном углу под којим сперматозоид дејствује на *ZP*, а који обезбеђује успешну оплодњу као ни података да ли величина тог специфичног угла зависи од акрозомане реакције. Могуће је да величина угла варира између врста, да варира са саставом *ZP* и обликом главе сперматозоида као и да је специфична за врсту.

Угао под којим сперматозоид дејствује на *ZP* је важан за процес разумевања оплодње код сисара, као и механичких својстава *ZP*.

Практични значај овог угла имао би примену у *intra cytoplasmic sperm injection (ICSI)* техници вештачке оподње што би могло да повећа њену ефикасност. Приликом *ICSI* технике, за време контакта микроињекционе игле и површине *ZP*, *ZP* почиње принудно да осцилује. Са становишта теорије осцилација, свака ћелија, сваки молекул показује осцилаторна кретања. Сопствене осцилације постоје у базалном стању ћелије. Принудне осцилације настају под дејством силе. Осцилаторно понашање ембриона за време микроињекционе технике приликом мерења еластичних својстава *ZP* ембриона су анализирана у (*Hedrih & Ugrcic, 2012*) помоћу методе коначних елемената. Поред тога, миротактилни сензор, који су користили у (*Murayama et al, 2006*) за мерење еластичних својстава *ZP* ради на бази пиезоелектричног ефекта – тј мери разлику у резонантној фреквенцији материјала са којим је сензор у контакту, што потврђује да осцилаторно понашање *ZP* постоји и да се његови кинетички параметри могу мерити (*Hedrih et al, 2015*).

У односу на претходна истраживања (*Hedrih, 2011, Hedrih, et al, 2013a, 2013b*) овде смо додали додатне варијабле – утицај угла дејства и брзине кретања сперматозоида на осцилаторно понашање *ZP*.

4.1.1. Основна идеја осцилаторне интеракције јајне ћелије и сперматозоида

Теорија осцилација се може применити, како на макро (биоритмови, осцилације крвног притиска, нивоа хормона у крви, активности нервног система) тако и на микро (ћелија) и нано нивоу (субћелијске структуре, -нпр. кретање молекула у репу сперматозоида). Да би обављали своје функције у ћелији и ван ње молекули се крећу-осцилују периодично (нпр. кретање миозина при мишићној контракцији) или аперидично. Свака ћелија и њене структуре испољавају осцилаторно кретање. Карактеристике осцилаторног кретања (сет осцилаторних фреквенција, амплитуда покрета итд) зависе од ћелије и њеног функционалног статуса (степен метаболичке активности, да ли је ћелија здрава или болесна), као и од типа ћелија (тип ћелије, величина, структура...). Осцилаторно кретање ћелије

зависи и од њеног контакта са другим ћелијама. Са биомеханичког и електричног становишта, рецепторско препознавање се базира на овоме. Јајна ћелија на чијој површини делују сперматозооиди се може сматрати осцилаторним системом који осцилује у принудном режиму под дејством спољне силе. Спољну силу у овом случају производе сперматозооиди (*Hedrih et al, 2015*).

Основни концепт је да је јајна ћелија једна осцилаторна структура, која мења своје осцилаторно стање како мења свој матурациони статус. Најспољашнија површина јајне ћелије је налик тродимензионалној мрежи на *SEM*-у (*Vanroose et al, 2000*) и мења своја механичка својства за време процеса сазревања (*Sun et al, 2003, Murayama et al, 2006, Papi et al, 2009, 2010, Khalilian et al, 2010, 2011, Voccaccio et al, 2012*), као и своје осцилаторно стање (*Hedrih, 2014*). Структура може да осцилује у слободном и принудном режиму и укључује вишефреквентне осцилације. У принудном режиму осциловања може да дође до резонанције. У резонантном стању, када се амплитуде повећавају, могуће је да дође до прекида у некој „слабој тачки“ *ZP*. Ова „слаба тачка“ би могла да буде место почетног продора „изабраног сперматозооида“. Према овој осцилаторној теорији оплодње, „изабрани сперматозооид“ би био онај који осцилује довољно дуго бар једном од сопствених фреквенција осциловања *ZP*. Утицај других сперматозооида на површину *ZP* би могао да допринесе настанку резонантног стања *ZP*.

Метода *Lussajous* – ових кривих је коришћена за параметарску фреквентну анализу осцилаторног понашања чворних молекула у осцилаторном моделу *ZP* миша. Разматран је утицај угла дејства сперматозооида на резултујуће померање одговарајућих чворних молекула осцилаторног модела, као и облике њихових резултујућих путања у равни. Могуће је одговарајућом комбинацијом углова под којим дејствују сперматозооиди добити различите вредности компонентних амплитуда 11 хармоника у једначинама померања за сваки чворни молекул у радијалном, циркуларном и меријалном правцу. У слободном (сопственом, аутономном) режиму осциловања у меријалном и циркуларном правцу чворни молекули у моделу осцилују са по 11 фреквенција у сваком од ова два правца, док у радијалном осцилују у једнофреквентном режиму. У принудном режиму када једнофреквентна принудна сила дејствује на чворни молекул у радијалном правцу ће померање бити двофреквентно. Слагање ортогоналних асинхроних осцилација

(ортогонална суперпозиција асинхроних и вишефреквентних осцилација) укључује 11 једно-фреквентних модова различитих сопствених кружних фреквенција, амплитуда и фаза. Скуп од 11 сопствених кружних фреквенција је својство система и његових инерционих и еластичних својстава и не мења се. Амплитуде и фазе сваког од 11 сопствених осцилаторних модова зависе од почетних услова, премећаја стања стабилне конфигурације када еластичне везе у моделу нису напрегнуте, и од кинетичке и потенцијалне енергије предате систему у почетном тренутку (преко промене почетних брзина и координата). На основу ове анализе можемо добити различите резултујуће путање за сваки чворни молекул. Резултујуће померање, као резултат сабирања компонентних померања у циркуларном и меридијалном правцу, без урачунавања компонентног померања у радијалном правцу сваког чворног молекула лежи у равни, која је тангентна на површину сферне мреже *ZP*. На основу облика генералисаних *Lissajous*-ових кривих, у тој равни, динамичко стање чворних молекула, може бити у пуној синхронизацији његових компонентних померања у меридијалном и циркуларном правцу, или асинхронизацији, налик синхронизацији или налик асинхронизацији, налик хаотичном или стохастичком кретању. Уколико, када се искључи компонентно померање у радијалном правцу, сви разматрани чворни молекули осцилују синхронно у равни тангентној на површину сфере, исход утицаја сперматозооида на површину *ZP*, се може предвидети (пројекција њихове резултујуће путање у тангентној равни је у виду праве линије). У случају синхронног компонентног кретања у меридијалном и циркуларном правцу чворних молекула, неки долазећи сперматозооид би могао да прође кроз *ZP* мрежу. Можемо закључити да компонентно померање чворног молекула у радијалном правцу не утиче на "отварање" или "затварање" области у тангентној равни кроз које треба да продире један сперматозооид до плазма мембране јајне ћелије. То радијално компонентно померање се може посматрати са аспекта дебљине дискретног модела *ZP* која се осцилаторно смањује и повећава деформацијом еластичне везе чворног молекула са јајном ћелијом у радијалном правцу. Ако је еластична веза у радијалном правцу сабијена, дебљина *ZP* је мања (тања), па је мањи пут за продор кроз *ZP* и обрнуто ако је истегнута еластична веза дебљина

ZP је већа, па је и пут продора дужи. С друге стране, компримована еластична веза повећава густину структуре а истегнута смањује густину *ZP*.

Сматраћемо да је ово синхроно компонентно осцилаторно стање *ZP* у циркуларном и меридиалном правцу повољно за пенетрацију и оплодњу. У случају да су пројекције резултујуће путање чворних молекула, на тангентну раван, налик хаотичном кретању или налик стохастичном кретању вероватноћа да један од многих сперматозооида који периодично „нападају“ *ZP*, прође кроз исту је веома ниска.

У овом делу ћемо разматрати да ли на осцилације *ZP* миша може да утиче угао под којим сперматозооиди делују на површину *ZP*.

Анализираћемо резултујућа померања чворних молекула који осцилују вишефреквентно под дејством спољашње побуде у виду сперматозоида који имају ефективну брзину, а дејствују под различитим угловима на површину *ZP*.

Биће приказани резултати квалитативне анализе утицаја различитих угла дејства сперматозоида на резултујуће померање чворних молекула у контексту повољног/неповољног стања за оплодњу.

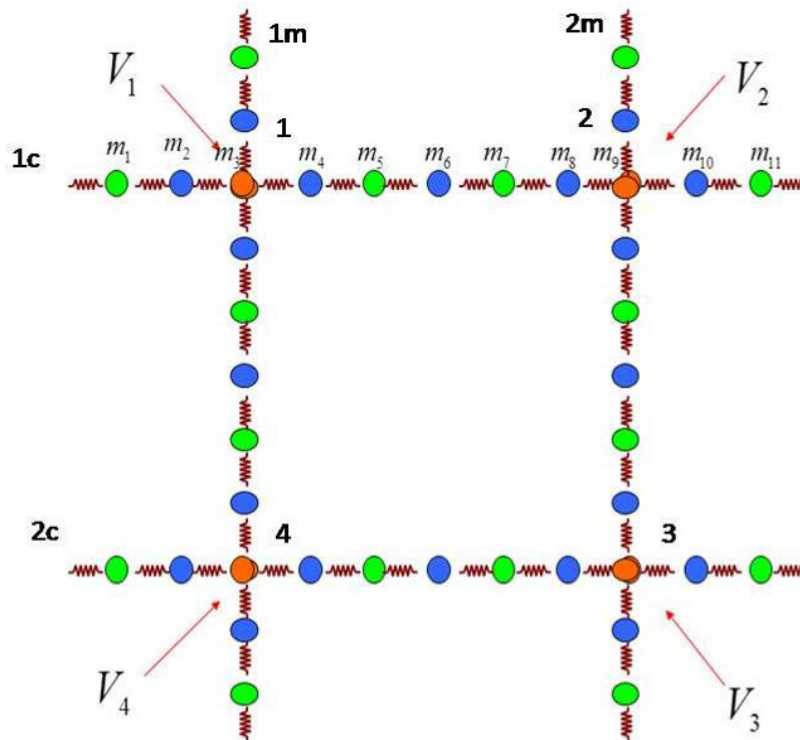
4.1.2.Анализа осцилаторног понашања чворних молекула ZP миша у дискретном моделу сферне осцилаторне мреже ZP кроз генералисане *Lussajous*-ове фигуре.

За анализу генералисаних *Lussajous*-ових фигура пројекција трајекторија чворних молекула осцилаторног модела ZP миша на тангентну раван на сферну површ јајне ћелије, када сперматозооиди са ефективним брзинама дејствују сваки на по један различити чворни молекул репрезентативног дела осцилаторног модела ZP миша, користили смо метод дискретног континуума (*Hedrih, 2012, Hedrih (Stevanovic), 2004, 2006*).

Периодична импулсна сила која представља дејство сперматозооида симултано делује на чворне молекуле у моделу. Интензитет импулсне силе варира у зависности од угла дејства и брзине сперматозооида. Локално дејство на један чворни молекул ће утицати и на померање два суседна молекула у ортогоналним ланцима, тако да ће резултујуће померање одређеног чворног молекула тангентној равни бити и под утицајем симетричног/асиметричног дејства суседних чворних молекула из два ортогонална ланца, али са различитим почетним условима (различити правци и интензитети почетних брзина предате појединим чворним молекулима).

Моделовали смо случај кој би одговарао *in vitro* условима. Модел не укључује ћелије *cumulus oophorus*-а јер је то додатни изазов у моделовању. У овом тренутку не постоји биомеханички модел интеракције јајне ћелије и сперматозооида, који укључује ћелије *cumulus oophorus*-а.

За анализу, узели смо само мали део сферне ZP мреже осцилаторног модела са минималним бројем молекула, који се периодично понављају у ланцима (11 молекула у сваком ланцу) тако да је задржан моларни однос ZP гликопротеина миша $ZP:(ZP2-ZP3)=1:5$ (види слику 4.1.). Тај мали део је минимални репрезентативни узорак на коме ћемо изучавати сопствене осцилаторне режиме чворних молекула побуђене одговарајућим почетним брзинама и у почетном тренутку из равнотежне конфигурације. Разматраћемо само компонентна померања чворних молекула у меридијалном и циркуларном правцу и пројекције резултујуће путање у тангентној равни.



Слика 4.1. Репрезентативни сегмент мреже осцилаторног дискретног модела *ZP* миша, која задржава моларни однос *ZP* гликопротеина миша. Наранџасто-*ZP1*, плаво-*ZP2*, зелено-*ZP3*. *V1-V4* сперматозоиди са одговарајућом ефективном брзином. Црвене стрелице означавају дејство сперматозооида на сваки појединачни молекул у репрезентативном делу *ZP* миша. *1m*-први ланац у меридијалном правцу, *2m*-други ланац у меридијалном правцу, *1c*-први ланац у циркулатном правцу, *2c*-други ланац у циркулатном правцу. 1-4 чворни молекули. Публиковано у (*Hedrih et al, 2015*).

Интересовала нас је динамика чворних молекула јер хемијске промене које се дешавају на *ZP1* молекулима су веома важне за процес оплодње (*Wasserman* по *D. Green, 1997; Sun et al, 2003; Murayama et al, 2006*).

Да би смо урадили фреквентну анализу осцилаторног понашања чворних молекула под дејством сперматозооида са ефективном брзином, а који делују под

различитим угловима на површину ZP примењујемо поступак који је детаљно описан у претходном поглављу. Укратко:

1. Дефинисање диференцијалних једначина којима описујемо динамику ланца са 11 материјалних тачака $A\{\ddot{u}\} + C\{u\} = \{0\}$ у којој су матрице дефинисане са (3.112), (3.113) и (3.114);
2. Апроксимација решења и одређивање система хомогених алгебарских једначина по амплитудама за материјалне тачке- молекуле (3.184)- (3.200);
3. Одређивање система детерминанти и карактеристичних функција и карактеристичних - фреквентних једначина система које описују осцилаторно понашање (3.181), (3.153).
4. Одређивање сета сопствених кружних фреквенција (њих 11) (3.181), (3.153)
5. Одређивање кофактора који одговарају свакој од 11 сопствених кружних фреквенција и одговарајућих сопствених амплитуда (3.190)- (197);
6. Одређивање аналитичких израза за померање сваке материјалне тачке-молекула у правцу ланца (3.199)-(3.201);
7. Одређивање интеграционих константи за одговарајуће појединачне и дефинисане почетне услове дефинисане почетним брзинама и почетним померањима (3,168)-(3.169) према формулама (3.182) за случај сопствених осцилаторних померања молекула према обрасцима (3.185)-(3.189)
8. Нумеричка вишепараметарска анализа за поједине почетне услове динамике система (нпр:дејство на чворни молекул –трећи молекул у ланцу). (види Прилог 2).

Сопствене кружне фреквенције су израчунате по формули $\omega_s(x_s) = \sqrt{10^{12} x_s} = 10^6 \sqrt{x_s}$, $s = 1, 2, 3, \dots, 11$, где је x_s редукована бездимензиона вредност квадрата сопствених кружних фреквенција прочитена са графика (Слика 3.11a), 10^{12} је корекциони фактор.

4.1.3. Утицај импулсних сила удара 4 сперматозооида са ефективним брзинама

Анализирали смо вишефреквентне сопствене (аутономне) осцилације чворних молекула када симултано на сваки од четири чворна молекула у почетном тренутку импулсно дејствује по један сперматозооид са ефективном брзином (Слика 4.1.). Симулирајући *in vitro* услове, када на јајну ћелију дејствује више сперматозооида (Nixon et al, 2007), разматрали смо мали сегмент *ZP* модела, (Слика 4.1) када су сви расположиви чворни молекули изложени дејству импулсне спољне силе, у почетном тренутку. Већи број сперматозооида на једну јајну ћелију има биомехничког оправдања, с обзиром да је маса јајне ћелија 10^7 реда величине, већа од масе појединачног сперматозооида. С обзиром на оваку велику разлику у маси између две ћелије, јајна ћелија се практично понаша као веома инертно тело. Сперматозооиди, који периодично дејствују на површину *ZP* јајне ћелије не би могли да произведу довољан притисак за продор кроз дебљину *ZP*. Сматрамо да би истовремено (симултано) дејство већег броја сперматозооида који покривају целу површину јајне ћелије, могло да произведе довољну силу, која би у одређеном тренутку ослабила *ZP* и омогућила пенетрацију једног сперматозооида. Такође, у оквиру теорије осцилација, која је и део теорије примене осцилаторног модела *ZP*, сматрамо да слаба тачка *ZP* настаје заправо када наступе стање резонанције, јер феноменолошки, тада долази до повећања амплитуде осцилација молекула у *ZP* мрежи, које могу довести до кидања веза између њих. С обзиром да су површина и структура *ZP*, као и површина главе сперматозооида и њене динамичке карактеристике, специфичне за врсту, то ће и минималан број сперматозооида неопходан за оплодњу зависити од врсте.

Вредности ефективних брзина сперматозооида миша V_{hp} узети су из (Goodson et al, 2011) и представљају средњу брзину праволинијског кретања хиперактивисаних сперматозооида $V_{hp}=171,1 \mu\text{m/s}$. Хиперактивисане сперматозооиде сматрамо сперматозооидима са ефективном брзином. Хиперактивација сперматозооида је неопходна за процес капацитације након које сперматозооиди постају компетентни – способни да оплоде јајну ћелију (Curtis et al, 2012). На основу података о маси сперматозооида бика ($1.82 \times 10^{-14} \text{kg}$ односно

$1.82 \times 10^{-11} \text{ g}$) (*Bahr & Zeitler, 1964*) процењена маса сперматозоида миша би била реда величине 10^{-24} kg односно 10^{-11} g . Брзина, коју сперматозоид преноси чворном молекулу у тренутку удара израчуната је по формули: $V = V_{hsp} M_{sp} / m_3$, где је M_{sp} процењена маса сперматозоида миша, m_3 је маса *ZP1* гликопротеина-чворног молекула. (*Hedrih et al, 2015*).

Када сперматозоид дејствује на раван, која је тангентна на сферну површину јајне ћелије, и ако правац кретања сперматозоида заклапа угао γ са тангентном равни, угао $\pi/2$ је угао који тангентна раван заклапа са радијалним правцем, а угао θ , угао који заклапа са меридијалним правцем, односно $90-\theta$, угао који заклапа са циркуларним правцем, брзина кретања сперматозоида се може раставити на три компоненте: циркуларну, меридијалну и радијалну према формулама:

$$V_{cir} = V \cos \gamma \sin \theta \quad (4.1)$$

$$V_{mer} = V \cos \gamma \cos \theta \quad (4.2)$$

$$V_{rad} = V \sin \gamma \quad (4.3)$$

Аналитички изрази за осцилаторна померања чворних молекула *ZP* у осцилаторном моделу *ZP* миша у циркуларном и меридијалном правцу се могу написати као суперпозиција 11 координатних асинхроних модова у следећем облику:

$$u_{1c,3}(t) = \sum_{s=1}^{s=11} K_{11,3}^{(s)} C_s \cos(\omega_s t + \alpha_s) \quad (4.4)$$

$$v_{1m,3}(t) = \sum_{s=1}^{s=11} K_{11,3}^{(s)} D_s \cos(\omega_s t + \beta_s) \quad (4.5)$$

$$w_{r,3}(t) = \frac{V}{\omega_{r,3}} \sin(\gamma) \sin(\omega_{r,3} t), \quad \omega_{r,3} = \sqrt{\frac{c_m}{m_3}} \quad (4.6)$$

Где су $u_{1c,3}(t)$ померања чворног молекула (трећег у ланцу) у првом циркуларном ланцу, када је тај молекул добије почетну брзину у циркуларном правцу, $v_{1m,3}(t)$ померања чворног молекула у првом меридијалном ланцу, када је тај молекул добије почетну брзину у меридијалном правцу и $w_{r,3}(t)$ померање чворног молекула у радијалном правцу у одговарајућем ланцу, види изразе (3.201)-(3.204) из претходног поглавља (за детаље види *Rašković, 1985*), ω_s , $k=1,2,3,\dots,11$ је скуп сопствених кружних фреквенција осциловања ланаца у циркуларном и меридијалном правцу, $\omega_{r,3}$ је сопствена кружна фреквенција осциловања чворне тачке у радијалном правцу; $K_{11,3}^{(s)}$ су кофактори елемента једанаесте врсте и одговарајуће колоне из фреквентне једначине, (за детаље види поглавље 3 и Прилог 2), C_s , и D_s као и α_s и β_s су интеграционе константе које се одређују из почетних услова за сваку брзину којом сперматозоид дејствује на одговарајући чворни молекул.

Како чворни молекули у тангентној равни имају две компоненте у циркуларном и меридијалном правцу, компонентна померања сва четири чворна молекула се сада могу написати коришћењем решења (3.201).

За случај када један сперматозоид дејствује на чворни молекул у позицији 1. (Види слику 4.1.) компонентна померања у циркуларном и у меридијалном правцу, у почетном тренутку, за побуђене једанаестифреквентне осцилације за овај чворни молекул су:

$$u_{1c,3}(t) = \sum_{s=1}^{s=11} K_{11,3}^{(s)} C_s \cos(\omega_s t + \alpha_s) \quad v_{1m,3}(t) = \sum_{s=1}^{s=11} K_{11,3}^{(s)} D_s \cos(\omega_s t + \beta_s) \quad (4.7)$$

компонентна померања у циркуларном и у меридионалном правцу, у почетном тренутку када један сперматозоид дејствује на чворни молекул у позицији 1 за побуђене једанаестифреквентне осцилације за чворни молекул у положају 2 су:

$$u_{1c,9}(t) = \sum_{s=1}^{s=11} K_{11,9}^{(s)} C_s \cos(\omega_s t + \alpha_s) \quad v_{2m,3}(t) = 0 \quad (4.8)$$

компонентна померања у циркуларном и у меридијалном правцу, у почетном тренутку када један сперматозооид дејствује на чворни молекул у позицији 1 за побуђене једанаестифреквентне осцилације за чворни молекул у положају 3 су:

$$u_{2c,9}(t) = 0 \quad v_{2m,9}(t) = 0 \quad (4.9)$$

компонентна померања у циркуларном и у меридијалном правцу, у почетном тренутку када један сперматозооид дејствује на чворни молекул у позицији 1 за побуђене једанаестифреквентне осцилације за чворни молекул у положају 4 су:

$$u_{2c,3}(t) = 0 \quad v_{1m,9}(t) = \sum_{s=1}^{s=11} K_{11,9}^{(s)} D_s \cos(\omega_s t + \beta_s) \quad (4.10)$$

Једначина 4.9 је последица ортогоналности ланаца у осцилаторном моделу *ZP*.

У питању једанаестофреквентна побуда. Једанаест нула (коренова) система карактеристичних фреквентних функција (једначина) одговарају квадратима 11 сопствених кружних фреквенција посматраног подсистема дискретног сфреног модела осцилаторне *ZP* мреже. Сваки молекул у ланцу осцилује са свих 11 кружних фреквенција. Ове фреквенције су карактеристика система и његове структуре и не зависе од почетних услова. Зависе једино од маса молекула и крутости опруга којима су молекули –матријалне тачке повезане у моделу.

За сваки чворни молекул израчунали смо резултујуће померање у тангентној равни настало суперпозицијом померања у циркуларном и меридијалном правцу када четири сперматозооида дејствују, сваки на по један од четири чворна молекула. Померања су рачуната за различите углове импулсног дејства сперматозооида у почетном тренутку. С обзиром да су ланци у

осцилаторном моделу ZP ортогонални, резултујуће померање чворних молекула у циркуларном $u(t)$ и меридијанлном $v(t)$ правцу, добијено је сабирањем ефеката иницијалног импулсног дејства три сперматозооида на суседне чворне молекуле. Пример једначина резултујућег померања у циркуларном и меридијанлном правцу за чворни молекул на позицији 1 за случај да 4 сперматозооида симултано дејствују сваки на по један чворни молекул је (слика 4.1) је:

$$u_1(t) = u_{3,N_1}(t) + u_{9,N_2}(t), \quad (4.11)$$

$$v_1(t) = v_{3,N_1}(t) + v_{9,N_4}(t), \quad (4.12)$$

где $N_1 - N_4$ означавају положај чворног молекула у одговарајућем ланцу у репрезентативном делу сферне осцилаторне мреже, са кога се дејство преноси на суседни чворни молекул, индекси 3 и 9 означавају редни број молекула у ланцу (Слика 4.1.). Ове ознаке смо увели да би могли да применимо различите почетне услове (угао импулсног дејства сперматозооида у почетном тренутку и брзине кретања сперматозооида) на сваки појединачни чворни молекул користећи аналитичка решења за 11 молекула у ланцу и одговарајућу цикличну пермутацију индекса, који означава редослед молекула у ланцу. На основу осцилаторног модела изрази за резултујућа померања другог, трећег и четвртог чворног молекула су слични и добијени су сумирањем ефеката почетних услова на суседним чворним молекулима.

Чворни молекул у положају 2:

$$u_2(t) = u_{9,N_1}(t) + u_{3,N_2}(t), \quad (4.13)$$

$$v_2(t) = v_{3,N_2}(t) + v_{9,N_3}(t), \quad (4.14)$$

Чворни молекул у положају 3:

$$u_3(t) = u_{3,N_3}(t) + u_{9,N_4}(t), \quad (4.15)$$

$$v_3(t) = v_{3,N_3}(t) + v_{9,N_2}(t), \quad (4.16)$$

Чворни молекул у положају 4:

$$u_4(t) = u_{9,N_3}(t) + u_{3,N_4}(t), \quad (4.17)$$

$$v_4(t) = v_{3,N_4}(t) + v_{9,N_1}(t), \quad (4.18)$$

Када један сперматозооид дејствује импулсно у почетном тренутку импулсном силом на први чворни молекул, тада се сви молекули у ланцу осцилаторно померају. Интересује нас резултујућа трајекторија чворног молекула (трећи и девети уланцу) у равни, која је тангентна на површину сферне осцилаторне мреже *ZP*. Померања чворних молекула у циркуларном и мердијалном правцу која потичу од импулсног дејства једног (првог) сперматозоида на чворни молекул у положају 1., у почетном тренутку, импулсном силом израчуната су по формулама:

$$u_{3,N_1}(t) = V_1 \sum_{s=1}^{11} K_{3s} C_{1s} \cos(\omega_s t + \alpha_{1s}) \quad (4.19)$$

$$v_{3,N_1}(t) = V_1 \sum_{s=1}^{11} K_{3s} D_{1s} \cos(\omega_s t + \beta_{1s}) \quad (4.20)$$

$$u_{9,N_1}(t) = V_1 \sum_{s=1}^{11} K_{9s} C_{1s} \cos(\omega_s t + \alpha_{1s}) \quad (4.21)$$

$$v_{9,N_1}(t) = V_1 \sum_{s=1}^{11} K_{9s} D_{1s} \cos(\omega_s t + \beta_{1s}) \quad (4.22)$$

Ове формуле су настале на основу теорије осцилација (*Rašković, 1985*), односно теорије осцилација ланчаних система (*Stevanović Hedrih & Hedrih, 2016*). Објашњење у претходном поглављу (за детаље видети реф (*Rašković, 1985*)). Закони померања чворних молекула која потичу од дејства сперматозоида у остала три положаја имају исти облик само различите индексе у зависности положаја дејства.

Изрази за померања суседних чворних молекула, који потичу од импулсног дејства једног (другог) сперматозоида на чворни молекул у положају 2 у почетном тренутку кретања:

$$u_{3,N_2}(t) = V_2 \sum_{s=1}^{11} K_{3s} C_{2s} \cos(\omega_s t + \alpha_{2s}) \quad (4.23)$$

$$v_{3,N_2}(t) = V_2 \sum_{s=1}^{11} K_{3s} D_{2s} \cos(\omega_s t + \beta_{2s}) \quad (4.24)$$

$$u_{9,N_2}(t) = V_2 \sum_{s=1}^{11} K_{9s} C_{2s} \cos(\omega_s t + \alpha_{2s}) \quad (4.25)$$

$$v_{9,N_2}(t) = V_2 \sum_{s=1}^{11} K_{9s} D_{2s} \cos(\omega_s t + \beta_{2s}) \quad (4.26)$$

Изрази за померања чворних молекула, који потичу од импулсног дејства једног (трећег) сперматозооида на чворни молекул у положају 3 у почетном тренутку кретања:

$$u_{3,N_3}(t) = V_3 \sum_{s=1}^{11} K_{3s} C_{3s} \cos(\omega_s t + \alpha_{3s}) \quad (4.27)$$

$$v_{3,N_3}(t) = V_3 \sum_{s=1}^{11} K_{3s} D_{3s} \cos(\omega_s t + \beta_{3s}) \quad (4.28)$$

$$u_{9,N_3}(t) = V_3 \sum_{s=1}^{11} K_{9s} C_{3s} \cos(\omega_s t + \alpha_{3s}) \quad (4.29)$$

$$v_{9,N_3}(t) = V_3 \sum_{s=1}^{11} K_{9s} D_{3s} \cos(\omega_s t + \beta_{3s}) \quad (4.30)$$

Једначине померања чворних молекула које потичу од иницијалног импулсног дејства једног (четвртог) сперматозооида на чворни молекул у положају 4 у почетном тренутку кретања:

$$u_{3,N_4}(t) = V_4 \sum_{s=1}^{11} K_{3s} C_{4s} \cos(\omega_s t + \alpha_{4s}) \quad (4.31)$$

$$v_{3,N_4}(t) = V_4 \sum_{s=1}^{11} K_{3s} D_{4s} \cos(\omega_s t + \beta_{4s}) \quad (4.32)$$

$$u_{9,N_4}(t) = V_4 \sum_{s=1}^{11} K_{9s} C_{4s} \cos(\omega_s t + \alpha_{4s}) \quad (4.33)$$

$$v_{9,N_4}(t) = V_4 \sum_{s=1}^{11} K_{9s} D_{4s} \cos(\omega_s t + \beta_{4s}) \quad (4.34)$$

$V_1 - V_4$ представљају однос ефективне брзине кретања сперматозоида (брзина хиперактивисаног сперматозоида миша преузета из (Goodson et al, 2011) и брзине сперматозоида миша коју смо користили при одређивању почетних услова. Како је при одређивању почетних услова узета брзина хиперактивисаних сперматозоида миша $V_{hip} = 171,1 \mu\text{m}/\text{s}$, то је однос $V_1 - V_4$ једнак 1.

За разматран случај интеграционе константе C_s и D_s и истовремено амплитуде главних сопствених осцилаторних модова са одговарајућом фреквенцијом из скупа сопствених кружних фреквенција ω_s , $s = 1, 2, \dots, 11$, када су почетни услови задати почетном брзином датом трећем чворном молекулу у ланцу, изражене помоћу одговарајућих детерминанти имају следећи облик (за теоријске доказе види претходно поглавље, а за детаље нумеричког експеримента види Прилог 2):

$$D_s = \frac{V}{L} |\Delta_s| \cos(\gamma) \sin(\theta) \quad (4.35)$$

$$C_s = \frac{V}{L} |\Delta_s| \cos(\gamma) \cos(\theta) \quad (4.36)$$

Где израз L има следећи облик:

$$L = \sum_{s=1}^{s=11} (-1)^{11+s} (\omega_s K_{11,s} |\Delta_s|) \quad (4.37)$$

ω_s , $s = 1, 2, \dots, 11$ су сопствене кружне фреквенције. За сваку од 11 интеграционих константи C_s , $s = 1, 2, \dots, 11$ – амплитуда 11 сопствених модова, сваки са одговарајућом сопственом кружном фреквенцијом, из скупа од 11 сопствених кружних фреквенција ω_s , $s = 1, 2, \dots, 11$, одредили смо детерминанте $|\Delta_s|$, $s = 1, 2, \dots, 11$. Детерминанта се добија тако што се одговарајућа ($s = 1, 2, \dots, 11$) колона у матрици замени колоном која садржи све нуле сем у трећој врсти, у којој је јединица (која одговара почетној брзини $u_{3,0}$, која је дата трећем молекулу у

ланцу, у почетном тренутку, импулсном силом сперматозоида брзином под одеђеним углом, а чији интензитет смо издвојили као посебан скалар $u_{3,o} = V \cos(\gamma) \cos(\theta)$ зависно да ли је у правцу циркуларног ланца или или $v_{3,o} = V \cos(\gamma) \sin(\theta)$ у правцу меридионалног ланца, који мењамо у нумеричком експерименту.

Детерминанта система $|\mathbf{K}|$ дата преко матрице (3.177), за нумерички експеримент поједностављено обележена са $|\Delta_g|$ нехомогених алгебарских једначина (3.176) по непознатима C_s , $s = 1, 2, \dots, 11$ или D_s , $s = 1, 2, \dots, 11$ амплитуда сопствених осцилаторних модова са одговарајућим фреквенцијама $C_s \cos(\omega_s t + \alpha_s) = C_s \sin(\omega_s t)$ односно $D_s \cos(\omega_s t + \beta_s) = D_s \sin s(\omega_s t)$ се дефинише у облику:

$$|\Delta_g| = \det(a_{ij}), |\Delta_g| = \det(\omega_j K i_j), \quad s = 1, 2, \dots, 11, \quad j = 1, 2, \dots, 11 \quad (4.38)$$

За рад у одговарајућем програмском пакету упростили смо ознаке, тако да за прву интеграциону константу C_1 , амплитуду првог основног сопственог мода осциловања $C_1 \cos(\omega_1 t + \alpha_1) = C_1 \sin(\omega_1 t)$ са првом фреквенцијом детерминанта $|\Delta_{g1}|$ има следећи облик:

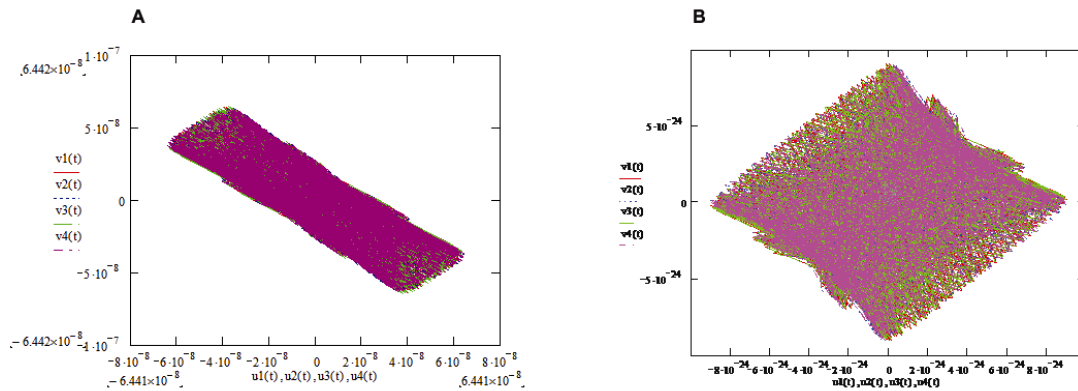
$$|\Delta_{g1}| = \det(a_{ij}), |\Delta_{g1}| = \det(\omega_j K i_j), \quad i = 1, 2, \dots, 10, \quad j = 1, 2, \dots, 10 \quad (4.39)$$

$|\Delta_{g1}|$ је добијена тако што је из детерминанте (4.38) система избрисана прва колона и трећа врста. Одговарајуће детерминанте $|\mathbf{K}_s|$ одређене изразима преко матрица од (3.178) до (3.181) у претходном поглављу, сада за нумерички експеримент поједностављено обележене са $|\Delta_{gs}|$, $s = 1, 2, 3, \dots, 10, 11$ остале непознате из скупа C_s , $s = 1, 2, \dots, 11$ се добијају практично одређивањем

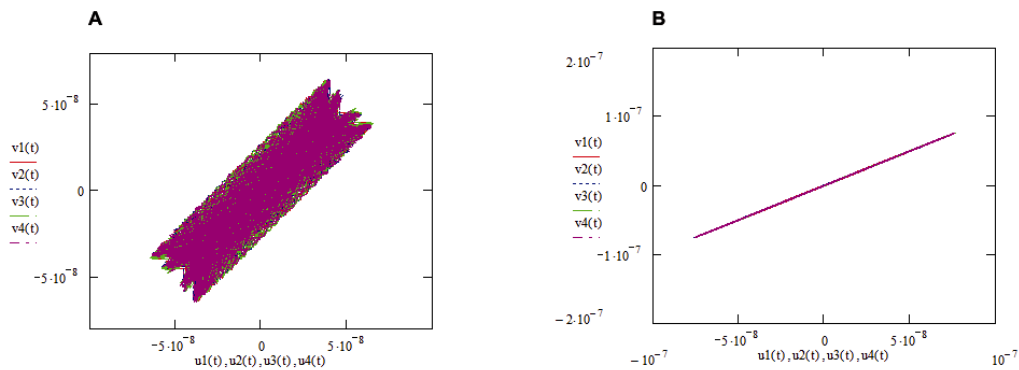
субдетерминанти елемента треће врсте и одговарајуће колоне главне детерминанте поједностављено обележене са $|\Delta_g|$ дефинисане изразом (4.38).

Ове детерминанте одређују интеграционе константе за почетне услове када сперматозооиди преносе брзину на чворни молекул-трећи молекул у ланцу, а остали молекули мирују. α_s и β_s , $s=1,2,\dots,11$ су фазне и интеграционе константе које смо одредили из почетних услова и све имају исту вредност $\pi/2$.

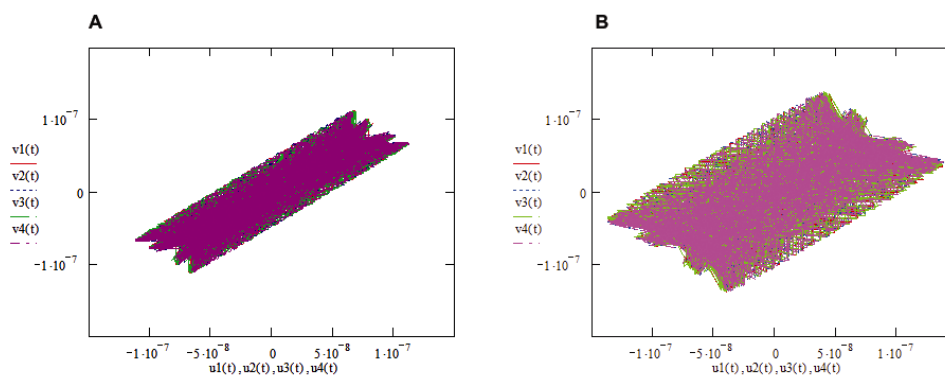
Узимајући да у сви сперматозооиди хиперактивисани и да имају брзину удара $V_{hip}=171,1 \mu m/s$, и да дејствују импулсним силама у почетном тренутку под истим упадним угловима на чворне молекуле $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4$, анализирали смо резултујуће трајекторије чворних молекула у тангентној равни на сферну површ јајне ћелије не узимајући у обзир треће компоненто померање, сваке од чворних тачака, у радијалном правцу. Резултујућа померања чворних молекула су одређена за поједине вредности упадних углова γ и θ ($\pi/12$, $\pi/6$, $\pi/4$, $\pi/3$, $\pi/2$, и $2/3\pi$). Варирали смо вредности упадних углова сперматозоида у почетном тренутку полазећи од случајева када су углови γ и θ једнаки и имају вредности $\pi/12$, $\pi/6$, $\pi/4$, $\pi/3$, $\pi/2$, и $2/3\pi$, па до случајева када γ и θ имају различите вредности. Приказана су резултујућа померања чворних молекула у тангентној равни за неке од комбинација упадних углова импулсног дејства сперматозоида, односно почетних брзина чворних молекула. Резултујућа вишефреквентна осцилаторна померања чворних молекула су у форми генералисаних *Lissajous*-ових фигура добијених сабирањем циркуларних и меридијалних компоненти две ортогоналне једанаестофреквентне осцилације. На основу облика *Lissajous*-ових фигура можемо извести закључке корисне за евалуацију диманичког стања *ZP*, која осцилује у вишефреквентном режиму. Различити случајеви када су углови γ и θ једнаки приказани су на сликама 4.2-4.4. На слици 4.2В генералисана *Lissajous*-ова фигура има облик сличан хаотичном кретању, указујући на то да угао $\pi/2$, није погодан за оплодњу. То је најнеповољнији угао ударног дејства сперматозоида, мада су амплитуде кретања молекула веома мале. Види слику 4.6А, 4.7В, и 4.8А.



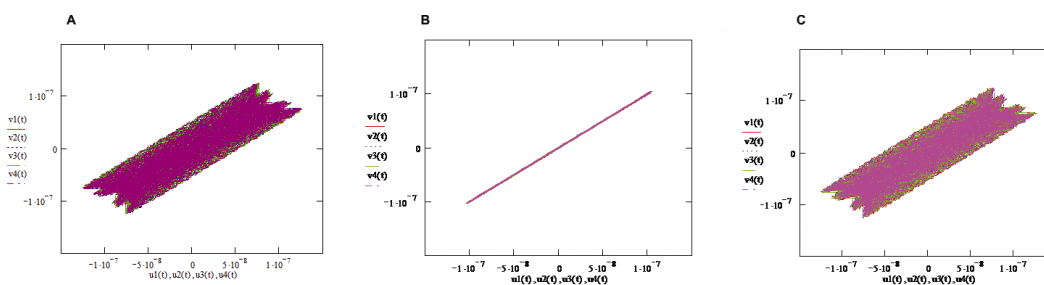
Слика 4.2. Резултујућа померања сва четири чворна молекула у тангентној равни на сферну површ јајне ћелије, када на сваки од њих, дејствује импулсном силом у почетном тренутку по један хиперактивисани сперматозоид, а када су упадни углови γ и ϑ једнаки $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4$ и имају вредност : А. $2/3\pi$. В. $\pi/2$. Публиковано у (Hedrih et al, 2015).



Слика 4.3. Резултујућа померања сва четири чворна молекула у тангентној равни када на сваки од њих дејствује импулсном силом у почетном тренутку по један хиперактивисани сперматозоид, а када су упадни углови γ и ϑ једнаки $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4$ и имају вредност: А. $\pi/3$. В. $\pi/4$. Публиковано у (Hedrih et al, 2015).

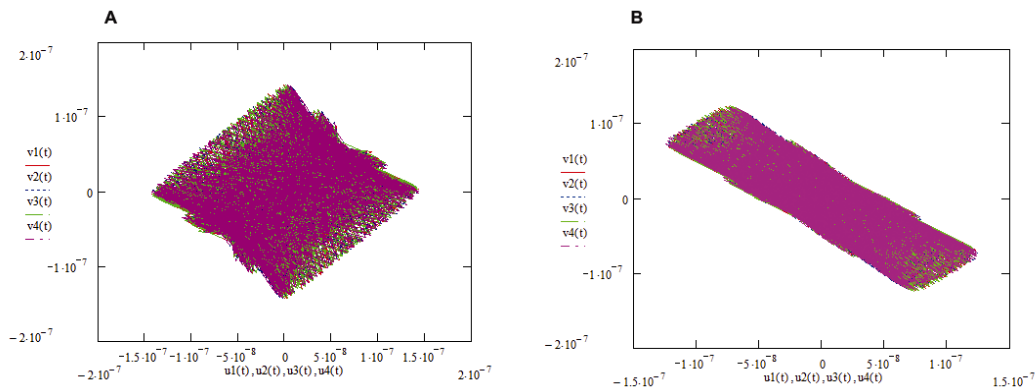


Слика 4.4. Резултујућа померања сва четири чворна молекула у тангентној равни када на сваки од њих дејствује импулсном силом у почетном тренутку по један хиперактивисани сперматозоид када су упадни углови γ и θ једнаки $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4$ и и мају вредност: А. $\pi/6$. В. $\pi/12$. Публиковано у (Hedrih et al, 2015).



Слика 4.5. Резултујућа померања сва четири чворна молекула у тангентној равни када на сваки од њих дејствује импулсном силом у почетном тренутку по један хиперактивисани сперматозоид када је упадни угао γ једнак $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/12$, а θ једнак $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4$ и мају вредност : А. $\pi/6$. В. $\pi/4$. С. $\pi/3$. Публиковано у (Hedrih et al, 2015).

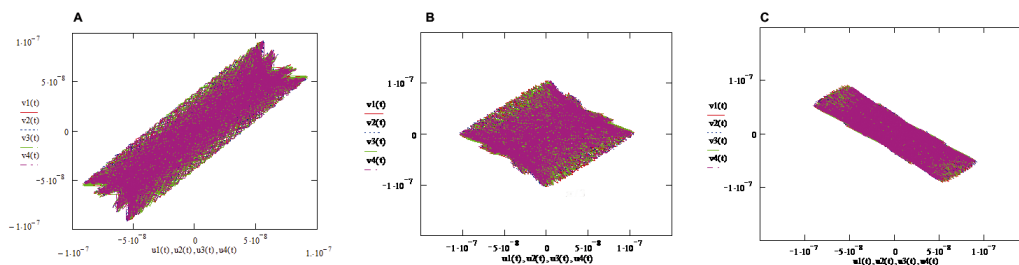
Bedford (Bedford, 2006) шпекулише да ако би сперматозоид дејствовао под углом $\pi/2$ на ZP , то би вероватно изазвало појаву рупа у ZP при њеном растезању за време раста ембриона. Угао $2/3\pi$ на основу форме генералисаних *Lissajous*-ових фигура доводи чворне молекуле у асинхроно стање. (види слике 4.2А, 4.6В, 4.7С и 4.8В, С).



Слика 4.6. Резултујућа померања сва четири чворна молекула у тангентној равни када на сваки од њих дејствује импулсном силом у почетном тренутку по један хиперактивисани сперматозоид када је упадни угао γ једнак $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/12$ а θ једнак $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4$ и мају вредност: А. $\pi/2$. В. $2/3\pi$. Публиковано у (*Hedrih et al, 2015*).

На слици 4. 3В сва четири чворна молекула осцилују синхроно - углови γ и θ су једнаки $\pi/4$. За веома мале вредности углова γ и θ ($\pi/12$) генералисане *Lissajous*-ове фигуре имају облик сличан хаотичном указујући да ова комбинација углова импулсних дејства сперматозоида у почетном тренутку доводи до поремећаја конфигурације репрезентативног дела дискретног модела сферне мреже *ZP* и вишефреквентног осциловања које није повољна за оплодњу.

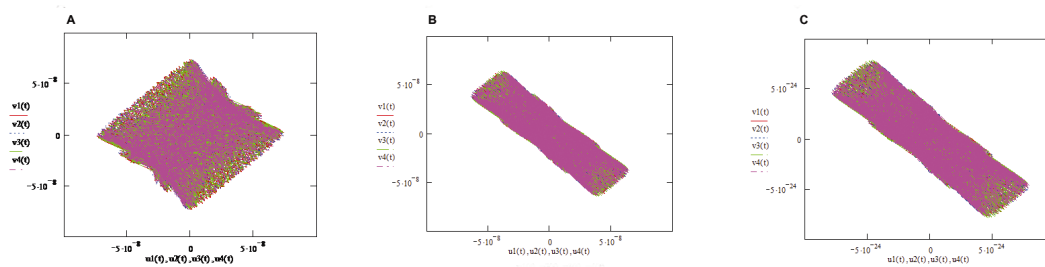
За исте почетне услове, када је угао γ једнак $\pi/12$, за различите вредности угла θ резултујућа вишефреквентна осцилаторна померања сва четри чворна молекула приказана су на сликама 4.5. и 4.6. Када угао γ има вредности $\pi/6$ а θ ($\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4$) вредности $\pi/4$ и $\pi/3$ добијају се исти графици као на сликама 4.5 В, и С. Када ϑ има вредности $\pi/2$ и $2/3\pi$ резултујућа померања чворних молекула у тангентној равни изгледају редом као на сликама 4.6А и В.



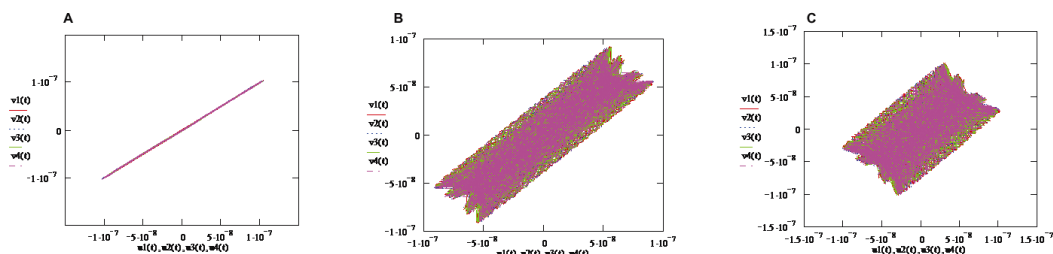
Слика 4.7. Резултујућа померања сва четири чворна молекула у тангентној равни када на сваки од њих дејствује импулсном силом у почетном тренутку по један хиперактивисани сперматозоид када је упадни угао γ једнак $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/4$, а θ једнак $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4$ и мају вредност: А. $\pi/3$. В. $\pi/2$. С. $2/3\pi$. Публиковано у (Hedrih et al, 2015).

Резултујућа померања чворних молекула као последица импулсног дејства сперматозоида у почетном тренутку, под упадним углом γ од $\pi/4$, а за различите вредности угла θ приказана су на слици 4.7. Резултујућа вишефреквентна померања чворних тачака у тангентној равни за упадни угао γ дејства од $\pi/3$ и велике вредности угла θ приказане су на слици 4.8. А и В. За комбинацију углова γ и θ , од $\pi/6$ и $\pi/4$ као и $\pi/12$ и $\pi/4$, добијамо пуну једнаестифреквентну синхронизацију појединачних једнаестифреквентних померња сва четири чворна молекула, али за обрнуту комбинацију углова γ и θ : $\pi/4$ и $\pi/6$ као и $\pi/4$ и $\pi/12$, (прва вредност је за угао γ а друга за угао θ), резултујућа једнаестифреквентна померања за сва четири чворна молекула имају кретање налик хаотичном (види слике 4.9. В и С). Овај нумерички експеримент указује на то да је упадни угао импулсног дејства сперматозоида у почетном тренутку на чворне молекуле репрезентативног дела осцилаторног ZP модела од $\pi/12$ повољан (види слике 4.5В и 4.9.А), што има потврду у репродуктивној биологији и истраживањима из области биофизике и неопходног ремоделовања ћелијске мембране сперматозоида, која претходи оплодњи (Ikawa et al, 2008, 2010, Gadella, 2008), а укључује липиде и протеине који се налазе на бочној страни главе сперматозоида и омогућавају сперматозоиду да се веже за површину ZP. На пример, када сваки од четири сперматозоида, дејствује под различитим углом на

површину ZP (Слика 4.10) сваки чворни молекул има различиту резултујућу путању-генералисане *Lissajous*- ове фигуре које имају облик налик стохастичком, тако да осцилаторно стање ZP није повољно за оплодњу. И најбољи механички модели оплодње, који за сада постоје у литератури (*Gefen, 2010, Kozlovsky & Gefen, 2012, 2013*) потврђују да брзина кретања сперматозоида има већи утицај на притисак који сперматозоид остварује на површину ZP приликом контакта него густина главе сперматозоида или пак биохемијске везујуће силе које се јављају између површине плазма мембране сперматозоида и ZP . Ови модели разматрају утицај само једног сперматозоида на површину ZP .

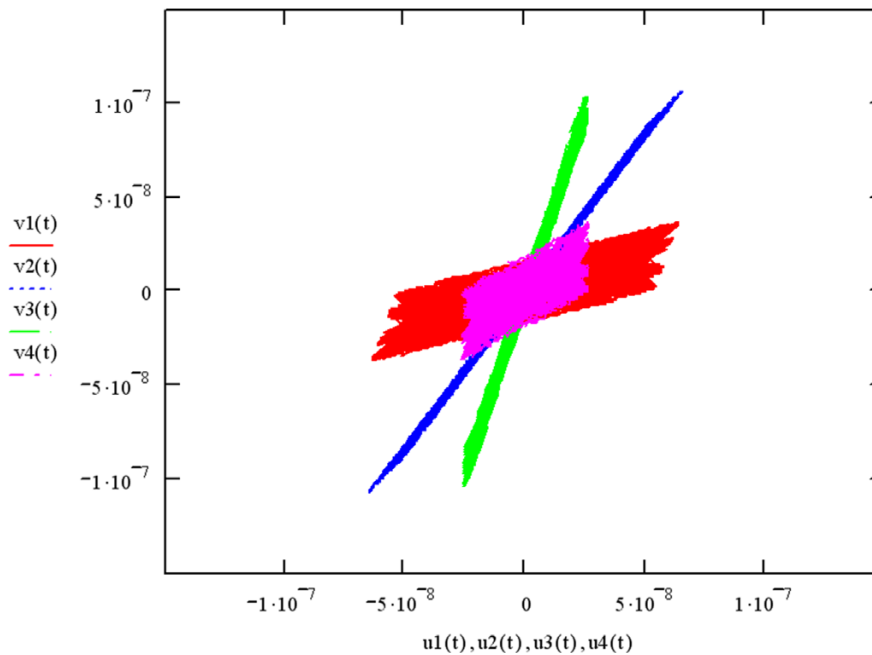


Слика 4.8. Резултујућа померања сва четири чворна молекула у тангентној равни када на сваки од њих дејствује по један хиперактивисани сперматозоид, импулсним силама у почетном тренутку, а када су упадни углови γ и θ , једнаки: А. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/3$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/2$, В. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/3$, $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = 2/3\pi$ С. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/2$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = 2/3\pi$.
 Публиковано у (*Hedrih et al, 2015*).



Слика 4.9. Резултујућа померања сва четири чворна молекула, у тангентној равни када на сваки од њих импулсно дејствује по један хиперактивисани

сперматозооид, а када су упадни углови γ и θ , једнаки: А. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/6$,
и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$, и $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/12$; $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$
В. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/4$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/6$; С. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/4$ и
 $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/12$ Публиковано у (*Hedrih et al, 2015*).



Слика 4.10. Резултујућа померања сва четири чворна молекула, у тангентној равни када на сваки од њих импулсно дејствује по један хиперактивисани сперматозооид под различитим упадним угловима γ и θ : $\gamma_1 = \pi/3$ и $\theta_1 = \pi/6$; $\gamma_2 = \pi/4$ и $\theta_2 = \pi/6$; $\gamma_3 = \pi/4$ и $\theta_3 = \pi/2$; $\gamma_4 = \pi/2$ и $\theta_4 = \pi/4$.

Дискретни модел осцилаторне сферне мреже *ZP* разматра утицај већег броја сперматозооида (као што је то случај у *in vitro* условима, а код већине сисара и у *in vivo* условима) на површину *ZP* што нам омогућава да анализирамо утицај дистрибуције ударне импулсне силе, угла дејства и брзине сперматозооида на осцилаторно понашања *ZP*. У односу на постојеће механичке моделе, модел осцилаторне сферне мреже *ZP* се разликује по томе што постојећи механички модели не узимају у разматрање угао дејства сперматозооида, чак ни као

потенцијални модификујући фактор кој би имао на силу којом сперматозооид делује на површину *ZP*. Претходни механички модели узимају *ad hoc* да је угао дејства сперматозооида 90° и анализирају силу којом сперматозооид делује на површину претпостављајући да ће најмања површина контакта дати и највећи притисак, а да је највећи притисак неопходан за пенетрацију *ZP*. Међутим, већи контактни притисак створиће и већи отпор у *ZP* (*Papi et al, 2013*), с обзиром да *ZP* показује вискоеластична својства и не понаша се као идеално еластично тело (*Papi et al, 2013*). Заправо, механизам продора сперматозооида кроз *ZP* још увек није познат, и заправо се не зна да ли максимални притисак који сперматозооид прави на површину *ZP* обезбеђује његову пенетрацију кроз *ZP* или заправо продире према механизму линије мањег отпора`-најлакше је проћи тамо где *ZP* прави најмањи отпор (*Papi et al, 2013*).

Постоје радови у којима се истиче да је трансферзална сила, коју генерише сперматозооид већа него пропулзивна сила (*Ishima, 2011, Hsiao et al, 2013*) указујући да би оштрији угао био погоднији за оподњу. Помоћу модела сферене осцилаторне мреже *ZP* миша у нашим нумеричким експерментима дошли смо до закључка да су оштрији углови повољнији за оплодњу, нарочито $\pi/4$ и комбинације $\pi/4$ и $\pi/12$ односно $\pi/4$ и $\pi/6$. При том, у складу са резултатима (*Ishima, 2011*) и нашим резултатима сматрамо да бочни контакт сперматозооида односно оштрији угао дејства обезбеђује већу контактну површину између сперматозооида и *ZP* што може да олакша рецепторско препознавање двају површина у контакту, што би водило потенцијално лакшој пенетрацији посредованој преодминантно биохемијским механизмима.

Могуће је применити већи дијапазон различитих брзина кретања сперматозооида за исти угао дејства, али би то променило само амплитуде кретања чворних тачака, облик трајекторија би осто исти. Уколико велик број сперматозооида периодично дејствује на површину *ZP* постоји безброј комбинација углова и брзина као на појединим деловима тако и на целој *ZP* површини. Тако да постоје комбинације, које нису разматране у овом делу рада а које би могле да доведу *ZP* у побуђено осцилаторно стање повољно за оплодњу.

Овим аналитичко нумеричким истраживањем указујемо на кинетичка осцилаторна стања ZP структуре значајна за исход оплодње а посебно да се ради о ударном дејству спетерматозооида и појави импулсних сила.

4.1.4. Ограничења модела

Главно ограничење је број елемената у моделу (4 ортогоналана ланца са по 11 молекула), модел је линеаран и ланци у моделу су ортогонални. Овај механички осцилаторни модел ZP се базира на структурном моделу ZP , коју је дао *Wasserman* 1988, а модификовао *Green* 1997 (*Green, 1997*). Главна разлика у односу на модификовани *Green*-ов модел је да је *Green*-ов модел структурни модел, док је наш осцилаторни модел дискретног континуума, где је ZP у виду сферне мреже, која окружује јајну ћелију. Мрежа се састоји од ланца гликопротеина, за које смо претпоставили да су ортогонални и да се састоје од гликопротеина распоређених на сличан начин као у *Wasserman*-овом моделу с том разликом што је распоред $ZP2$ и $ZP3$ гликопротеина изабран тако да и у најмањој јединци задржан моларни однос ZP молекула, као у ZP миша. За сада се заправо не зна колико је растојање у микронима/ангстремима између два $ZP1$ молекула.

Према теорији осцилација осцилаторно понашање система је дефинисано масом система (односно инерционим својствима) и његовим еластичним карактеристикама (у овом случају крутошћу опруга), које представљају основна својства система. Скуп сопствених кружних фреквенција је основно својство система, и не може га променити ни један спољашњи утицај дејством на систем. Дејством спољашњих утицаја могу се поред сопствених осцилаторних модова изазвати и принудни модови у интеракцији са сопственим који доводе до феномена резонанције или динамичке апсорпције, бифуркација и појава разних режима осциловања, различитих од оног којим се дејствује на систем. Карактеристике спољне принудне силе (наручито фреквенције) могу довести до појава поменутих специјалних феномена. Из тога следи да ће моларни однос утицати на осцилаторно понашање молекула у моделу. (*Hedrih et al, 2015*).

У режиму принудних осцилација, може доћи до динамичке апсорпције или до резонанције. У овим нумеричким експериментима смо хтели да покажемо феноменолошки, какво би било осцилаторно понашање чворних молекула у режиму вишефреквентних осцилација узимајући у обзир само мали сегмент – репрезентативни узорак дискретног осцилаторног модела ZP , који задржава моларни однос ZP молекула. Као меру дејства сперматозооида на ZP узели смо импулсну силу која симултано дејствује на чворне молекуле. Локално дејство на један чворни молекул, било да се ради о почетном поремећају положаја равнотеже или стања мировања, или пак о спољашњој принуди када сила дејствује продужено у времену, утицаће на померања, свих молекула у ланцу, као и друга два суседна чворна молекула у тим ланцима, који су спрегнути преко побуђеног чворног молекула. Анализирајући осцилаторно понашање коначног броја молекула у моделу ZP сферне осцилаторне мреже миша (11), добили смо коначан број сопствених кружних фреквенција. У реалној ZP постоји велики број ZP молекула и самим тим велики број сопствених кружних фреквенција. Могуће је укључити већи број молекула у анализу. Укључивањем већег броја молекула у анализу одговарајуће математичко израчунавање биће компликованије и захтеваће додатно програмирање, али се наће добити квалитативно различити резултати. Убацавањем додатних молекула у модел, модел ће постати робустнији, промениће се почетни услови, резултат би тада укључивао већи број сопствених кружних фреквенција, одговарајући број модова и непознатих интеграционих константи, и координате померања молекула би биле гломазнији изрази са већом бројем модова (*Hedrih et al, 2015*).

Нелинеарне карактеристике реалне ZP и ограничења која са собом носе аналитичке методе решавања одговарајућег система нелинеарних диференцијалних једначина, захтевају употребу нумеричких метода и апроксимација или примену осцилатора са нелинеарним еластичним и пригушним силама (*Cveticanin, 2011, 2012*) у моделовању осцилаторног понашања ZP . У много комплекснијем моделу, који укључује нелинеарне везе између молекула у суседним ланцима, резултати, који се односе на синхронизацију кретања чворних молекула, која укључују утицај угла дејства сперматозооида су слична (*Simonovic,*

Hedrih, 2014). Реална ZP је веома комплексан осцилаторни систем и веома селективан кад је у питању пенетрација сперматозооида. Селективност ZP обезбеђује константну количину генетског материјал у свакој генерацији.

Укратко, квалитативна анализа сопственог осцилаторног понашања чворних молекула је урађена на механичком моделу дискретне сферне осцилаторне мреже ZP миша у облику дискретног континуума.

На основу фреквентне анализе сопствених вишефреквентних осцилација чворних молекула узрокованих поремећајем стања стабилне равнотеже модела дискретног континуума у почетном тренутку импулсним дејством сперматозооида, којима су чворним молекулима предате почетне брзине, добијени су подаци квалитативне анализе помоћу којих добијамо одређени број корисних закључака о динамичком систему који смо изучавали у режиму сопствених осцилација.

Такође на основу аналитичке и нумеричке анализе понашања ланца од 11 молекула, као елементу модела дискретног континуума сферне мреже ZP под дејством једнофреквентних спољашњих сила које дејствују на по један (трећи или девети молекул у ланцу), а за које смо претпоставили да се јављају као периодични утицај скупа перматозооида у поновљеним налетима и у великом броју, сперматозооида који делују под одређеним углом и у одређеним интервалима времена уочили смо могућност појаве 11 резонантних стања и на скоро свакој амплитуди партикуларног решења која одговарају осцилацијама са принудном фреквенцијом могу јавити феномени динамичке апсорпције.

Фреквентне анализе и сопствених и принудних режима осциловања нам дају могућност да изведемо следеће закључке:

- Компонентна померања чворних молекула у циркуларном и мердијалном правцу и у режимима сопствених осцилација су у виду вишефреквентних осцилација
- У зависности од иницијалне пертурбације почетног равнотежног стања молекула у сферној мрежи, компонентна померања чворних молекула су у вишефреквентном осцилаторном режиму, а број фреквенција је једнак или мањи од броја сопствених кружних фреквенција система

- Резултујуће путање компонентних померања у циркуларном и мердијалном правцу у равни која је тангентна на површину сфере за посматране чворне молекуле у моделу су у форми генералисаних *Lissajous*-ових фигура, које могу бити у форми праве линије, периодичних, апериодичних трајекторија, трајектријама које су налик стохастичким или налик хаотичним и резултат су ортогоналне суперпозиције две вишефреквентне компонентне осцилације. Да би добили реалне просторне трајекторије требало би укључити радијалну компоненту померања молекула.
- Угао под којим правац брзине кретања сперматозоида, при импулсном дејству на површину ZP , предаје одговарајуће почетне брзине молекулу, у почетном тренутку, има утицаја на резултујућа померања чворних молекула у моделу.
- Углови импулног дејства сперматозоида и правца импулсне силе имају утицај на синхронизацију, односно асинхронизацију вишефреквентног осцилаторног кретања чворних молекула у моделу осцилаторне сферне мреже ZP
- Идентификовали смо неке углове импулног дејства сперматозоида, који су повољни односно неповољни за оплодњу.
- Веома мали као и веома велики углови су неповољни
- Потврдили смо претходне спекулације да су коси углови повољнији за оплодњу и предвидели смо њихове вредности

Синхронизовано кретање чворних молекула као резултат слагања две ортогоналне вишефреквентне осцилација би могло да доведе ZP у кинетичко стање, које је повољно, не за продор конкретног сперматозоида, већ можда неког наредног који би само успешно прошао између окца мреже.

Модел осцилаторне сферне мреже је повољан за моделовање симултаног утицаја већег броја сперматозоида на површину ZP у *in vitro* условима.

Комбиновањем техника микроскопије и механичког модела могло би да буде погодно за практичну валидацију резултата нашег нумеричког експеримента: 1)

да ли постоје углови који су повољни за успешну оплодњу и 2) да ли су исти или слични са измереним?

Верујемо да би овај осцилаторни приступ проблему могао да допринесе бољем разумевању процеса оплодње. Отаварају се и бројна друга питања:

Како јајна ћелија прави селекцију кроз *ZP* матрикс? Да ли је рецепторски посредована механизам препознавања гамета и оплодње у основи осцилаторни феномен, да ли је резонанција између осцилаторних режима *ZP* и изабраног сперматозооида неопходан услов за оплодњу?

Ова параметријска анализа утицаја угла сперматозооида на осцилаторно понашање чворних молекула у моделу сферне осцилаторне мреже *ZP* миша је један корак напред у разумевању динамичких услова и вибро-утицаја у процесу оплодње код сисара и *polyspermy block-a*.

4.2. Утицај почетне брзине кретања и распореда импулсних сила сперматозооида на осцилаторно понашање *ZP* миша

За успешну оплодњу потребна је одређена количина високо квалитетних сперматозооида. Квалитет сперматозооида је одређен њиховим морфолошким особинама и њиховом брзином. Брзина кретања сперматозооида је кључни параметар који одређује успех оплодње.

У овом делу ћемо разматрати утицај брзине кретања сперматозооида и њихов специфични распоред на површини *ZP* на осцилаторно понашање *ZP*. Одређивање оптималних параметара утицаја сперматозооида на *ZP*, који би индуковали осцилаторно стање *ZP* повољно за оплодњу отвара могућности за потпуније разумевање процеса оплодње.

За претходно одређене вредности углова правца дејства сперматозооида, који изазивају повољно осцилаторно стање *ZP*, радићемо параметријску фреквентну анализу осцилаторног понашања чворних молекула у осцилаторном *ZP* моделу. У циљу имитирања успешне оплодње у физиолошким условима, узели смо брзине прогресивно покретних и хиперактивисаних сперматозооида.

Резултујуће компонентне путање чворних молекула у осцилатрном дискретно континуалном моделу ZP сферне мреже, као резултат ортогоналне суперпозиције компонентних сопствених осцилаторних померања, у циркуларном и меридијалном правцу, изазваних почетним брзинама чворних молекула изазваних ударним импулсним силама, одређеног броја сперматозооида, појединачно на сваку од чворних тачака у почетном тренутку, под одређеним угловима и у одређеној комбинацији, су у форми генералисаних *Lissajous*-ових фигура у тангентним равнима.

Резултати фреквентне анализе осцилаторног понашања ZP миша отварају могућности биомеханичког приступа у третману суб(ин)фертилитета код мушкараца.

Претпостављамо да би брзина сперматозооида, као и њихов распоред импулсног дејства на површини ZP имали утицаја на осцилаторно понашање ZP . С обзиром да је брзина сперматозооида директно повезана са успехом оплодње, брзине прогресивног кретања сперматозооида, као и параметри који на њу утичу су разматране у овом делу рада.

Укратко ће бити објашњено зашто би распоред сперматозооида, брзина и правац њиховог импулног дејства у почетним тренуцима о ZP имао утицаја на успешност оплодње и продора једног јединственог сперматозооида кроз ZP до јајне ћелије у одређеном режиму кинетичког вишефреквентног осциловања ZP , изазваног скупом сперматозооида.

4.2.1. Значај брзине кретања и правца импулног дејства сперматозооида у ZP за успех оплодње

Сперматозооиди миша су веома осетљиве ћелије. Након ејакулације њихов животни век у женском репродуктивном тракту је ограничен. За време хемотаксе, реотаксе и термотаксе (*Miki & Clapham, 2013*) у репродуктивном тракту женске јединке, неки од сперматозооида пролазе кроз сложене процесе метаболичких и структурних промена, постајући способни за оплодњу (*Flesch & Gadella, 2000*).

Како ејакулат садржи сперматозооиде у различитим фазама сазревања, само мали проценат (отприлике 10%) је способно да одговори хемотактички и представља сперматозооиде, који су прошли кроз процес капацитације (зреле ћелије) (*Eisenbach, 1999*), чија је максимална количина у складу са гонадосоматским индексом мушке јединке одговарајуће врсте (*Pizzari, 2006*).

Компетиција сперматозооида фаворизује популацију сперматозооида који су компетентни да оплоде јајну ћелију, и сперматозооиде који су осетљивији на сигнале, које шаље јајна ћелија и код којих долази до акрозомалне реакције у процесу оплодње (*Gomendio et al, 2006*). Интересантно је да постоји тенденција опадања концентрације сперматозооида, укупног броја сперматозооида, укупног броја покретних сперматозооида у ејакулату хумане врсте здравих јединки, у десетогодишњем периоду и ако су демографски фактори и животни стил били непромењени или чак побољшани (*Centola et al, 2016*).

Процес капацитације се састоји од неколико биохемијских и функционалних модификација сперматозооида, који омогућавају и акрозомалну реакцију и хиперактивацију (ХА). Хиперактивација представља функционалне промене у начину кретања сперматозооида, у смислу прогресивнијег кретања са великим амплитудама кретања-савијања бича (*Katebi et al, 2005*). Код ХА сперматозооида амплитуда латералних покрета главe сперматозооида-фреквенција бочног осциловања главе, као и просечна таласна дужина постепено се мењају с временом (*Kinukawa et al, 2003*). Начин кретања хиперактивисаног сперматозооида даје директну механичку предност сперматозооиду омогућавајући му пенетрацију кроз вискозни медијум. Хиперактивација олакшава пенетрацију сперматозооида кроз *ZP* (*Katebi et al, 2005, Pizzari, 2006*). На хиперактивацију може утицати већи број фактора: ћелије *cumulus oophorus*-а (*Ho & Suarez, 2001*), прогестерон (даје дозно- зависну стимулацију хиперактивације) (*Katebi et al, 2005*). Акрозомална реакција мора бити временски прецизно одређена, јер и прерана и одложена акрозомалана реакција ће спречити пенетрацију сперматозооида, кроз ћелије *cumulus oophorus*-а и адхерирање за *ZP* (*Pizzari, 2006*).

Јајоводи као и ћелије *cumulus oophorus*-а утичу на особине екстрацелуларног матрикса сперматозоида, што је од значаја за интеракцију између *ZP*, ћелија *cumulus oophorus*-а и сперматозоида (*Gadella, 2012*).

Сперматозоид који први стигне до *ZP* имаће прилику да први интерагује са молекулима *ZP* и оплоди јајну ћелију. Кључни фактор у процени успешности оплодње, која зависи од параметара мушке јединке, је брзина кретања сперматозоида (*Malo et al, 2006*). Брзина кретања сперматозоида је у корелацији са способношћу сперматозоида да се споји са оооцитом (*Wolf et al, 1995, Dacheux and Dacheux, 2014*).

Многи фактори су у позитивној корелацији са максималном брзином кретања сперматозоида: стил парења, укупна дужина сперматозоида (*Gomendio & Roldan, 1991, Montoto et al, 2011, Tourmente et al, 2011*), релативна тежина тестиса и волумен средњег дела сперматозоида (*Anderson & Dixson, 2002*), повећање у дужини главе сперматозоида и хидродинамичком облику главе сперматозоида (*Montoto et al, 2011*), облика главе и пропорција између делова репа сперматозоида (*Malo et al, 2006*), садржај функционалних митохондрија (*Armal et al, 2013*), и дужина средњег дела сперматозоида (*Firman et al 2010*).

Однос између облика главе сперматозоида и покретљивости сперматозоида је одређен генетским факторима и изгледа полигенетски детерминисан. На основу хуманих и мишијих модела неплодности мушког пола откривени су многи гени, чија мутација има утицаја, како на покретљивост сперматозоида тако и на облик главе сперматозоида (*de Boer et al, 2015*).

Однос између укупне дужине главе сперматозоида и укупне дужине репа сперматозоида је значајно удружен са праволинијском брзином кретања сперматозоида тако да како однос дужине бича према дужини главе сперматозоида опада, опада и брзина кретања сперматозоида. Кинетички параметри сперматозоида се користе за процену фертилитета и разликују се код здравих ћелија и ћелија које то нису (*Malo et al, 2006*). Ротациона брзина сперматозоида код неплодних мушкараца је значајно мања него код контролне групе (*Subramni et al, 2014*). Третман хипербаричном оксигенацијом може да побољша покретљивост сперматозоида код субфертилних мушкараца (*Mitrović, 2002, Mitrović et al, 2002, 2004, 2011*) као и успех *IVF* протокола (*Mitrović et al*

2005, 2006a) побољшавајући оксигенацију јајника и утеруса (Mitrović & Jovanović, 2003, Mitrovic et al 2006b). Постоји разлика у начину покретљивости сперматозооида код различитих сојева исте врсте (нпр. мишева) (Godson et al, 2011).

У ранијим фазама капацитације, већина сперматозооида показује прогресивни начин кретања, али касније путање кретања постају много разноврсније укључујући и начин кретања типичан за хиперактивацију (Godson et al, 2011). За идентификацију параметара покретљивости сперматозооида кластерском анализом могу се користити и *Bayesian-ске мреже* (Anaya et al, 2015).

И ако су идентификовани многи молекули на површини сперматозооида, који су укључени у интеракцију сперматозооида и јајне ћелије прецизни молекуларни механизам оплодње, код сисара још увек је непознаница. Постоје неколико кандидата за комплементарне молекуле на површини мембране сперматозооида, а који су укључени у рану интеракцију са *ZP* (Brewis and Wong, 1999).

У осцилаторном моделу оплодње није од занчаја, који су појединачни молекули укључени у оплодњу, већ начин на који осцилује поједина структура са одређеним биомеханичким особинама, побуђена почетним импулсним контактима са групом сперматозооида.

На основу карактера кретања сперматозооида може се сматрати да спољна сила има периодични карактер (Woolley, 2003). Woolley (2003) је установио да кретање сперматозооида има осцилаторни карактер. На основу његових експеримената сперматозооиди миша имају таласасте тродимензионални облик кретања у виду увртања у равни, у смеру казаљке на сату, и кружења у смеру казаљке на сату. Осцилаторно кретање јајне ћелије ће такође зависити од карактеристика пертурбације њеног природног стања у почетном тренутку, као и континуалног дејства спољне принудне силе (пре свега фреквенције). С обзиром да је *ZP* прва структура јајне ћелије, која реагује са сперматозооидима (у *in vitro* условима), од значаја је да испитамо осцилаторно понашање *ZP* под импулсним дејством сперматозооида, са различитим брзинама. Под дејством спољне принудне силе или иницијалне пертурбације *ZP* под импулсним дејством

сперматозоида, молекули у ZP ће почети да се осцилаторно крећу на одређени начин. Као што је већ поменуто, ово кретање теоријски може бити са различитим облицима путање.

С обзиром да је праволинијско кретање предвидиво, претпостављамо да ако се велики број ZP молекула (или једна целина ZP) креће на овај начин то ће олакшати пенетрацију (са биомеханичког аспекта) сперматозоида кроз ZP и последичну оплодњу.

На основу сазнања теорије осцилација, претпостављамо да је за иницијалну пенетрацију сперматозоида кроз ZP неопходно да сперматозоид осцилује у вишефреквентном режиму са бар једним делом фреквенција из фреквентног опсега којим осцилује и јајна ћелија (или бар део ZP са којим је сперматозоид у импулсном или продуженом контакту). Тада постоје услови за резонанцију у временском интервалу, када структуре ZP и сперматозоида осцилују истим фреквенцијама из одређеног фреквентног опсега. У стањима резонанције амплитуде кретања молекула се временом увећавају и теже бесконачности-тј повећавају се за време резонантног режима, што би са биомеханичког аспекта могло да буде услов за прекид веза између ZP молекула и потенцијалне иницијалне пенетрације сперматозоида кроз ZP . Апериодчно или хаотично кретање је тешко предвидети, те стога сматрамо да не доприноси пенетрацији сперматозоида кроз мрежасту структуру ZP . Зато је важно под којим условима ће се ZP молекули кретати на предвидив начин компатибилан са оплодњом. Јајна ћелија је динамичка структура, која се мења у времену кроз све фазе сазревања, мењајући механичке особине (нпр ZP , цитоплазма) и структуру. Као што је већ поменуто ово изазива промене њеног осцилаторног стања (*Hedrih, 2014*).

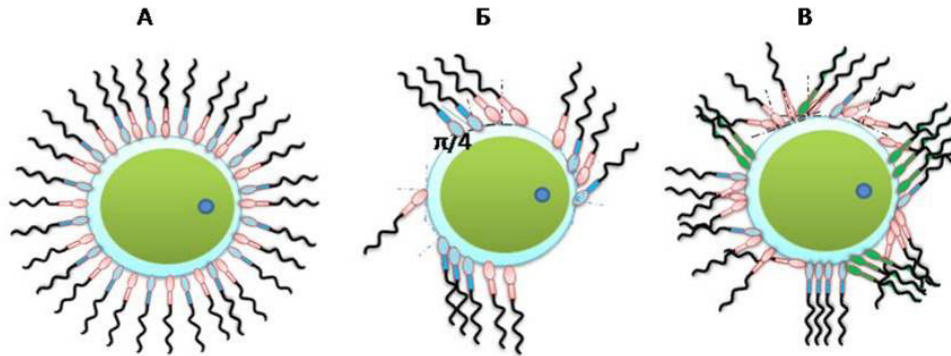
4.3. Дистрибуција (распоред) сперматозооида на површини *ZP* и осцилације *ZP*

У току процеса оплодње и у *in vivo* и у *in vitro* условима јајна ћелија је у контакту са сперматозооидима различитог квалитета (морфологије, брзина, акрозомалног статуса).

Дејствујући на површину *ZP* сви ови сперматозооиди, сваки на свој начин доприносе промени осцилаторног понашања *ZP* и јајне ћелије у целини. Њихова здружена акција доприноси крајњем исходу-оплодњи. Дејство сперматозооида са различитим карактеристикама се може сматрати, као дејство спољне периодичне силе различитих карактеристика. Различита дистрибуција сперматозооида са истим/различитим кинетичким параметрима даће различиту дистрибуцију спољне принудне силе, која дејствује на површину *ZP*. Сваки појединачни сперматозооид ствара одређену силу која дејствује на површину *ZP* (Hsiao et al, 2013), а њихова здружена акција даће специфичну дистрибуцију сила на површини *ZP*. На основу свега овог следи да ће симетрични односно асиметрични распоред сперматозооида на површини *ZP* изазвати различита осцилаторна стања *ZP*. Теоријски, постоје комбинације распореда сперматозооида, које ће узроковати исто или слично осцилаторно стање *ZP*. Примери различитих комбинација дистрибуције сперматозооида на површини *ZP* дати су на слици 4.11.А, Б и В. С обзиром да опште прихваћено мишљење да се успех оплодње мери квалитетом сперматозооида, првенствено процентом прогресивно покретних сперматозооида од значаја је испитати како брзина сперматозооида утиче на осцилаторно понашање *ZP*.

За анализу осцилаторног понашања *ZP* користили смо модел осцилаторне сферне мреже *ZP* миша. Детаљан опис модела дат је у претходним поглављима, као и у (Hedrih et al, 2015). Анализа је рађена на малом репрезентативном сегменту дискретно континуалном моделу сферне мреже *ZP*, који задржава моларни однос *ZP* гликопротеина (слика 4.1). Маса *ZP* гликопротеина су укључене у модел. Интересује нас осцилаторно понашање чворних молекула у

моделу- *ZP1* гликопротеина. Њих смо одабрали из два разлога-њихве масе су највеће, те ће њихов допринос осцилаторном понашању бити значајан, и јер након оплодне долази до формирања дисулфидних мостова између *ZP1* с једне стране и *ZP2* и *ZP3* молекула са друге стране, што је праћено променама *ZP* структуре, и повећањем *Young*-овог модула еластичности (*Kalilian et al, 2010*) и стварањем услова *zapoly spermy block*.



Слика 4.11. Хипотетички распоред сперматозоида на површини *ZP*. А. симетрични распоред сперматозоида, који имају две различите брзине. Б. Асиметрични распоред сперматозоида који имају две различите брзине али исте углове дејства. В. Асиметрични произвољни распоред сперматозоида, који имају различите брзине и различите углове дејства.

Поред тога према модификованом *Wasserman*-овом моделу *ZP* (*Green, 1997*), без *ZP1* везујућих молекула не би постојала мрежаста структура *ZP* (*Wasserman & Litscher, 2012, Huang et al, 2014*).

Осцилаторни модел *ZP* се заснива на методу дискретног континуума (*Hedrih, (Stevanovic), 2004, 2006, 2011, 2012*). Метод дискретизације се користи у решавању проблема у репродуктивној биологији. Метод временске дискретизације је коришћен у математичком моделу развоја ембриона једне врсте акваријумских рибица (*Chen and Zhang, 2011*). Детаљан опис модела дат је у (*Hedrih, 2011, 2012, Hedrih et al, 2013a, 2013b, 2013c, 2015*). Осцилаторни модел *ZP* омогућава анализу кретања *ZP* молекула са биомеханичког аспекта. На ово кретање ће утицати брзина сперматозоида, угао дејства сперматозоида, њихов распоред и положај

на површини ZP . Овим моделом можемо да испитамо у којој мери кретање ZP молекула зависи од горе поменутих фактора. Главни циљ овог дела рада је да испитамо да ли различите брзине сперматозооида утичу на резултујуће путање чворних молекула. Разматраћемо дејство сперматозооида са ефективним брзинама (прогресивно покретни и хиперактивисани сперматозооиди) на ZP мрежу под одређеним повољним угловима, које смо установили у претходним анализама (Hedrih *et al*, 2015). Разматраћемо компонентну путању резултујућег померања чворних молекула, ортогоналном суперпозицијом компонентних померања у циркуларном и меридијалном правцу у равни, која је тангентна на површину ZP модела, без узимања у обзир радијалних компонентних померања. Такве резултујуће компонентне путање чворних молекула су у форми генералисних *Lissajous*-ових кривих и имају циркуларну и меридијалну компоненту кретања. Ове путање одређују да ли ће сперматозооидима бити отворен или затворен пролаз кроз структуру ZP .

Други задатак је анализирати да ли распоред и број сперматозооида са ефективним брзинама утичу на резултујуће путање кретања ZP молекула.

Уколико је ово посматрано компонентно, а парцијално резултујуће померање чворних молекула синхронизовано, сперматозооидима ће бити лакше да прођу кроз ZP . Ово смо сматрали повољним осцилаторним стањем за оплодњу.

Уколико су резултујуће путање хаотичног или облика налик стохастичком, вероватноћа да један од сперматозооида продре кроз ZP мрежу је веома мала. Ово стање није повољно за оплодњу.

4.3.1. Методе

Аналитички метод, који смо користили за моделовање осцилаторног понашања ZP миша (Hedrih *et al*, 2013a, 2015) се заснива на теорији осцилација у механичким ланцима (Hedrih (Stevanović) & Hedrih, 2016). Импулсно дејство сперматозооида даје извесну почетну брзину чворним молекулима. Углове γ и ϑ смо узели да одговарају вредностима углова, које смо установили као повољне у претходним анализама (Hedrih *et al*, 2015).

Почетни услови: почетна померања свих молекула у моделу су узета да су једнака нули, (пре дејства сперматозооида); иницијалне брзине свих молекула су такође једнаке нули, осим чворних молекула (3. и 9. у ланцу), којима сперматозооиди дејствујући импулсним силама преносе иницијалну брзину у тренутку удара. Импулсне силе су силе великог интензитета, а кратког дејства. Да би смо установили дејство различите дистрибуције сперматозооида на резултујуће путање чворних молекула и покрили све чворне молекуле у репрезентативном делу *ZP* мреже разматрали смо следеће случајеве када 4 сперматозооида са ефективним брзинама дејствују истовремено на 4 различите а суседне чворне молекуле у моделу.

То смо разматрали за следеће комбинације дејства сперматозооида са ефективним брзинама:

- 4 хиперактивисана сперматозооида
- 4 прогресивна сперматозооида
- 3 хиперактивисана и један прогресиван сперматозооид
- 2 хиперактивисана и 2 прогресивна сперматозооида за случај када сперматозооиди са истим брзинама имају дијагоналан распоред
- 2 хиперактивисана и 2 прогресивна сперматозооида за случај када сперматозооиди са истим брзинама дејствују на два суседна чворна молекула и
- 1 хиперактивисани и 3 прогресивана сперматозооида

У последњем сличају смо варирали позицију хиперактивисаног сперматозооида да би проверили да ли то утиче на резултујуће путање чворних молекула.

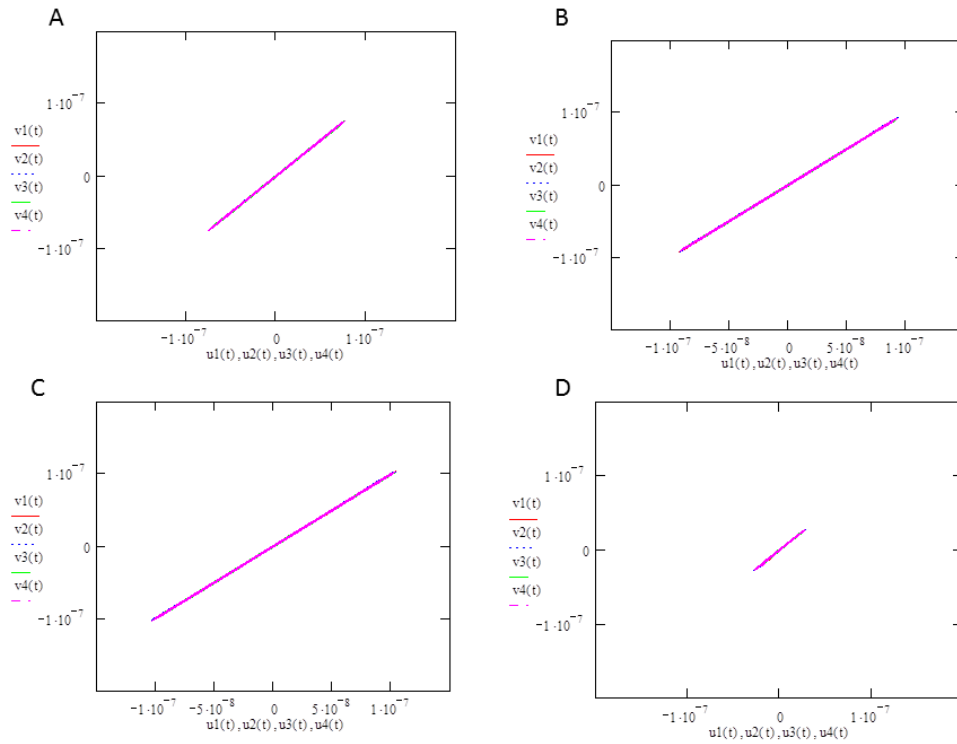
Анализирали смо вишефреквентне осцилације чворних молекула, када су изложени истовременом дејству сперматозооида са ефективним брзинама (на сваку чворну тачку делује по један сперматозооид са ефективном брзином). Слика 4.1.

4.3.2. Резултати

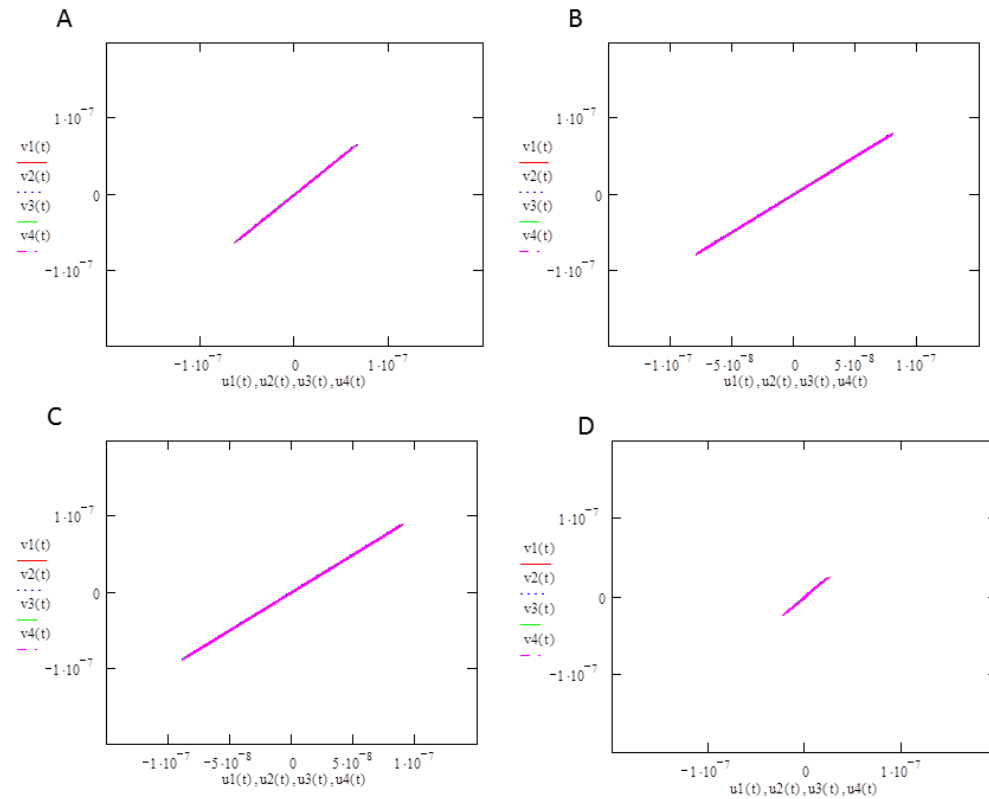
Чворни молекули репрезентативног сегмента ZP мреже ексцитирани под дејством сперматозооида осцилују у три правца: са по 11 сопствених фреквенција у циркуларном и меридијалном правцу и две у радијалном правцу – једна сопствена и једна принудна. Компонентна померања у циркуларном и меридијалном правцу су израчуната за сваку од комбинација углова. Резултујућа померања чворних молекула су приказана на истом графику у виду генерализаних *Lissajous*-ових фигура добијених комбинацијом две ортогоналне једнаестофреквентне осцилације, у равни која је тангентна на површину сфере осцилативног дискретно-континуалног модела сферне дискретне мреже ZP миша. Резултујућа померања чворних молекула у тангентној равни су рачуната у почетном тренутку, када долази до пертурбације равнотежног стања осцилаторне сферне мреже ZP инициране почетним брзинама сперматозооида.

Трајекторије чворних молекула за случај, када симултано дејствују 4 хиперактивисана сперматозооида $V_1 = V_2 = V_3 = V_4 = V_{hp}$ на 4 различита чворна молекула (сваки на по један) под различитим угловима γ и θ за које смо претходно установили да су повољни ($\pi/4$ and $\pi/4$, $\pi/6$ и $\pi/4$; $\pi/12$ и $\pi/4$ и $5/12\pi$ и $\pi/4$ респективно) (Hedrih et al, 2015) су приказана на слици 4.12. Можемо да видимо да су путање у виду праве линије. Овај случај одговара потпуној синхронизацији компонентних померања чворних молекула у циркуларном и меридијалном правцу.

Трајекторије осцилаторног кретања чворних молекула, у тангентној равни, за случај када симултано импулсно дејствују 4 прогресивно покретна сперматозооида $V_1 = V_2 = V_3 = V_4 = V_p$ у почетном тренутку, под различитим повољним угловима γ и θ ($\pi/4$ и $\pi/4$, $\pi/6$ и $\pi/4$ и $\pi/12$ и $\pi/4$, $5/12\pi$ и $\pi/4$ редом) су приказана на слици 4. 13. Слично претходном случају све трајекторије су у форми праве линије, али су амплитуде и нагиби крива нешто другачији у односу на претходни случај.



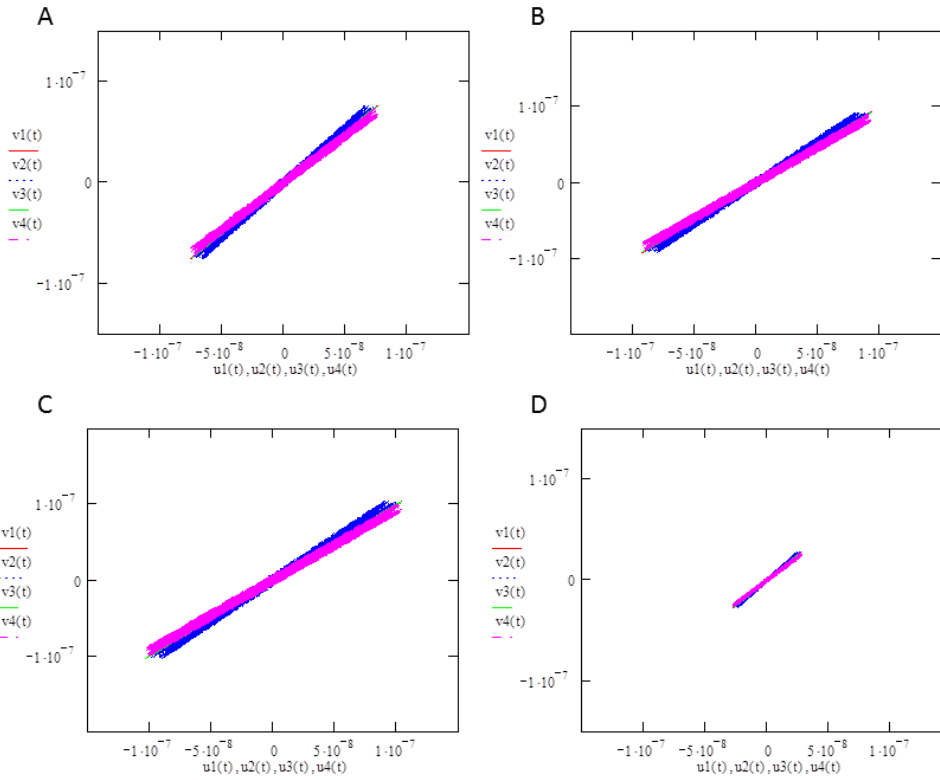
Слика 4.12. Резултујуће трајекторије осцилаторног кретања 4 чворна молекула у тангентној равни када 4 хиперактивисана сперматозооида у почетном тренутку импулсно дејствују на чворне молекуле брзином од $V_{hp} = 171.1 \mu\text{m} / \text{s}$ под угловима γ и θ : А. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/4$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$; В. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/6$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$. С. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/12$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$. D. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = 5/12\pi$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$.



Слика 4.13. Резултујуће трајекторије осцилаторног кретања 4 чворна молекула, у тангентној равни, када 4 прогресивно покретна сперматозооида у почетном тренутку импулсно дејствују на чворне молекуле брзином од $V_p = 146.9 \mu\text{m}/\text{s}$ под угловима γ и θ : А. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/4$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$; В. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/6$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$. С. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/12$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$. Д. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = 5/12\pi$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$.

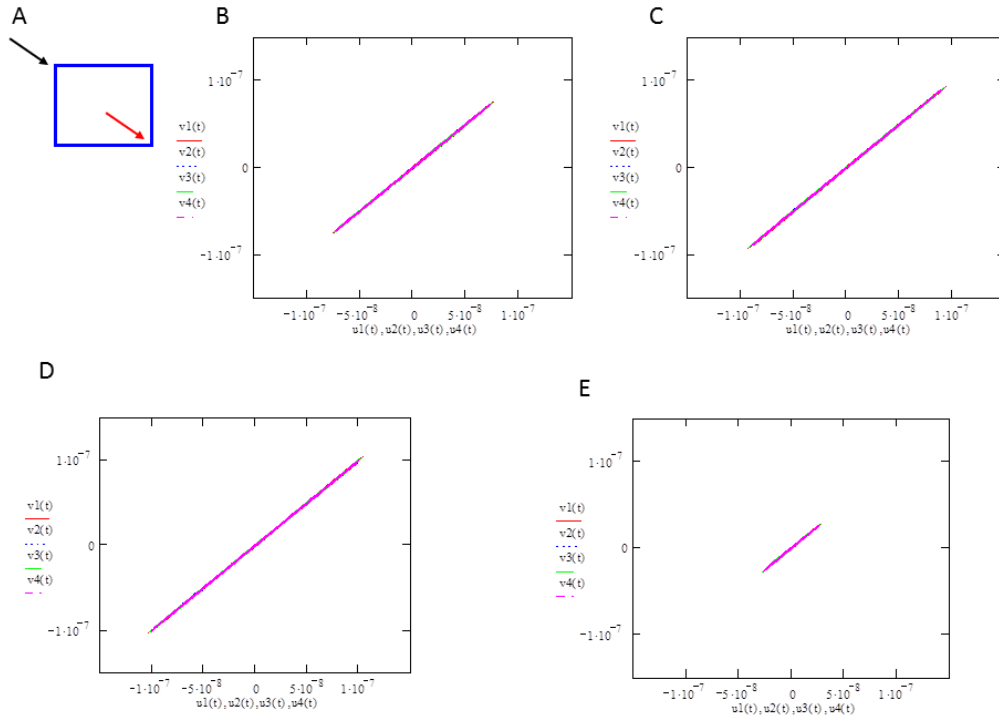
Резултујуће путање осцилаторног кретања чворних молекула, у тангентној равни, за случај када три хиперактивнисана и један прогресивно покретан сперматозооид у положају V1 (види слику 4.1.) у почетном тренутку импулсно дејствују на чворне молекуле под претходно поменутиим повољним угловима, приказане су на слици 4.14. Трајекторије у положају V1 и V3 су у форми праве линије, док су резултујуће трајекторије чворних молекула у позицијама V2 и V4

налик стохастичким. *Lissajous*-ове криве на сликама 4.14.C и D имају исти облик само мање амплитуде.



Слика 4.14. Резултујуће трајекторије осцилаторних померања, 4 чворна молекула у тангентној равни када 3 хиперактивисана сперматозооида у почетном тренутку импулсно дејствују на чворне молекуле брзином од $V_p = 146.9 \mu m/s$ и један прогресивно покретни сперматозооид $V_p = 146.9 \mu m/s$, који дејствује на чворни молекул у позицији 1 под угловима γ и θ : А. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/4$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$; В. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/6$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$. С. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/12$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$. D. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = 5/12\pi$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$.

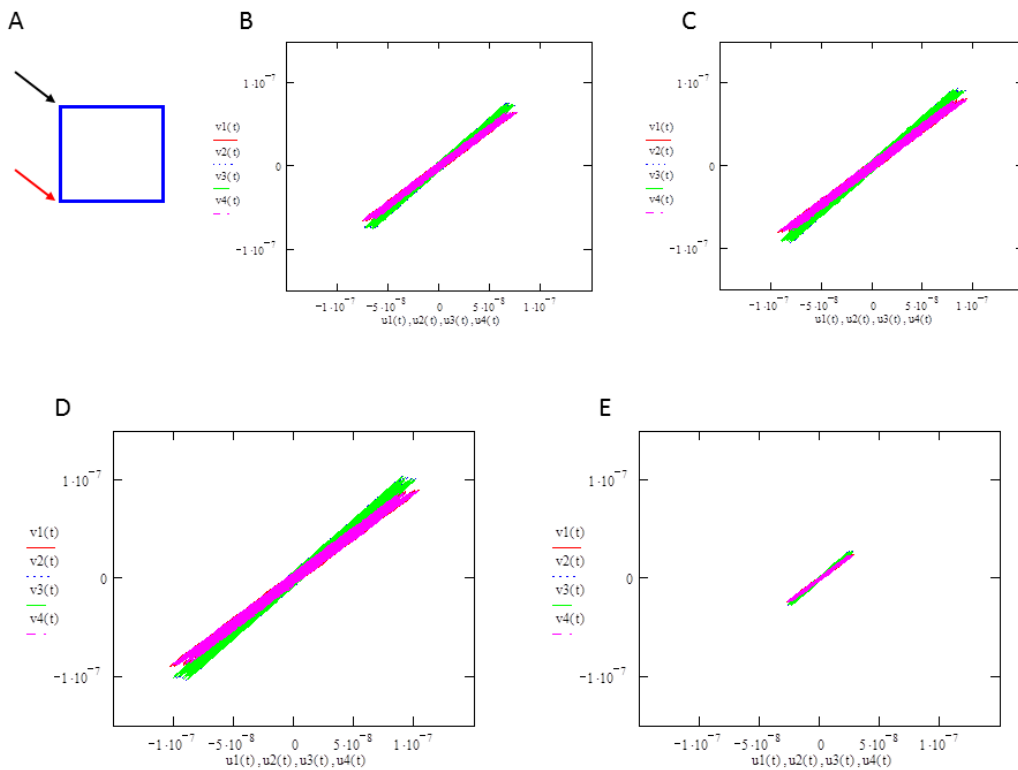
На слици 4.15 су приказане трајекторије осцилаторног кретања четири чворна молекула у тангентној равни, добијене за случај кад два хиперактивисана и два прогресивно покретна сперматозооида импулсно дејствују на дијагоналној позицији. За све комбинације повољних углова резултујуће путање су у форми праве линије само су различите амплитуде. Види се пуна синхронизација осцилаторног кретања чворних молекула.



Слика 4.15. Резултујуће трајекторије осцилаторних кретања 4 чворна молекула у тангентној равни када у почетном тренутку импулсно дејствују на чворне молекуле два хиперактивисана сперматозооида и два прогресивно покретна. Сперматозооиди који имају исте брзине су у дијагоналној позицији А. и дејствују под угловима γ и θ . В. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/4$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$; С. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/6$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$. Д. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/12$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$. Е. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = 5/12\pi$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$.

Резултујуће трајекторије осцилаторних кретања 4 чворна молекула у тангентној равни за случај кад два хиперактивисана ($V_1 = V_4 = V_{hp}$) и два

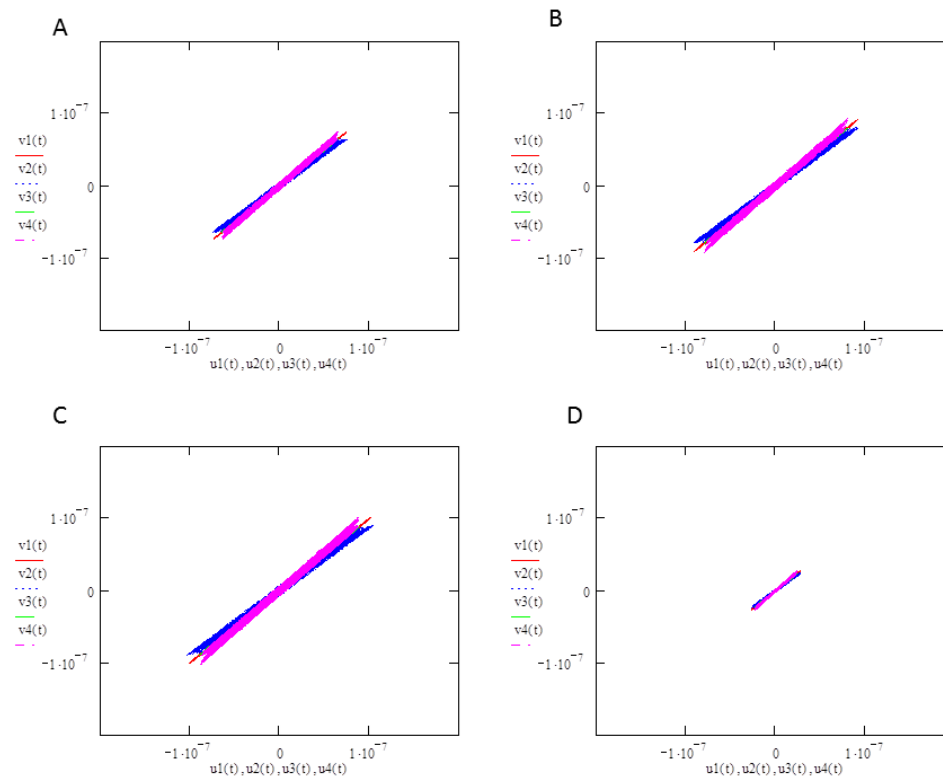
прогресивно покретна сперматозооида импулсно дејствују, у почетном тренутку, на *ZP* мрежу на чворне молекуле у истом ланцу приказана је на слици 4.16. Амплитуде *Lissajous*-ових фигура су најмање за случај када је $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = 5/12\pi$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$ (слика 4.16.). Резултујуће путање осцилаторног кретања чворних молекула у тангентној равни су налик стохастичким, што је мање повољно кинетичко стање него када је распоред такав да сперматозооиди који имају исте брзине импулсно дејствују, у почетном тренутку, по дијагонали (види слику 4.15). Ови резултати указују да специфичан распоред сперматозооида са ефективним брзинама који импулсно дејствују на површину *ZP* могу да изазову различита осцилаторна стања *ZP*.



Слика 4.16. Резултујуће трајекторије осцилаторног кретања 4 чворна молекула у тангентној равни, када у почетном тренутку импулсно дејствују на чворне молекуле два хиперактивисана (у положају *V1* и *V4*) два прогресивно покретна сперматозооида. Сперматозооиди који имају исте брзине импулсно дејствују на

чворне молекуле у истом ланцу под угловима γ и θ : В. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/4$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$; С. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/6$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$. Д. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/12$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$. Е. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = 5/12\pi$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$.

Резултујуће путање осцилаторног кретања чворних молекула, у тангентној равни, кад на њих у почетном тренутку импулсно дејствује један хиперактивисани сперматозоид (који дејствује на први чворни молекул) и три прогресивно покретна приказана су на слици 4.17. Можемо да видимо да су трајекторије чворних молекула у положају 1 и 3 у виду правих линија док *Lissajous*-ове криве за чворне молекуле у положају 2 и 4 су налик стохастичким.

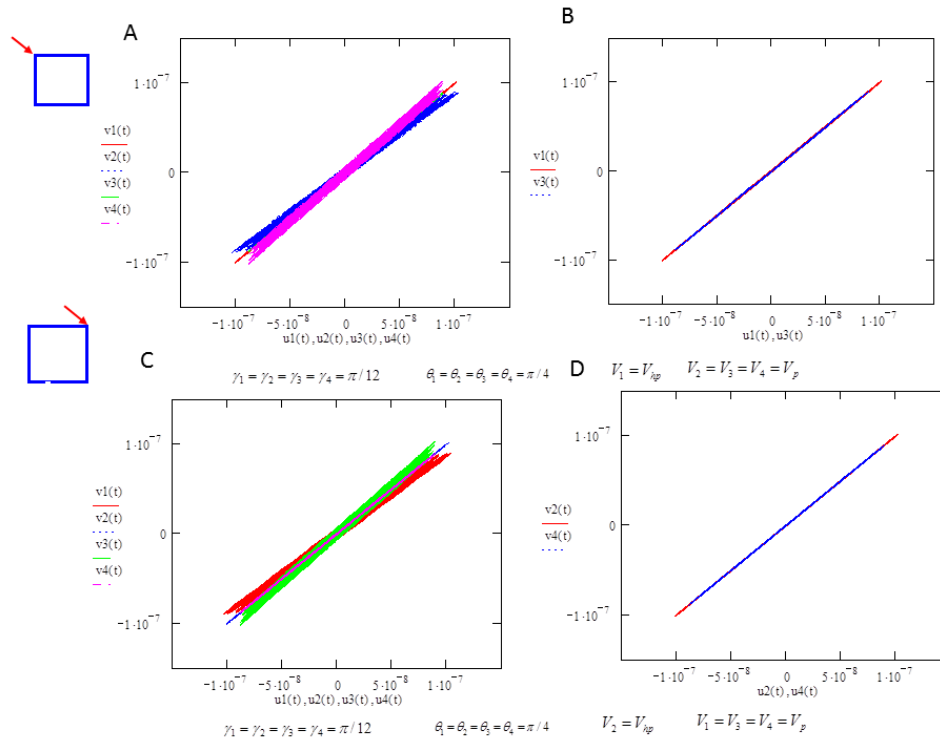


Слика 4.17. Резултујуће трајекторије осцилаторног кретања 4 чворна молекула у тангентној равни када у почетном тренутку импулсно дејствују на чворне молекуле један хиперактивисан (у положају VI и V4) и три прогресивно покретна сперматозоида. Сперматозоиди импулсно дејствују на чворне молекуле под угловима γ и θ : А. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/4$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$; В.

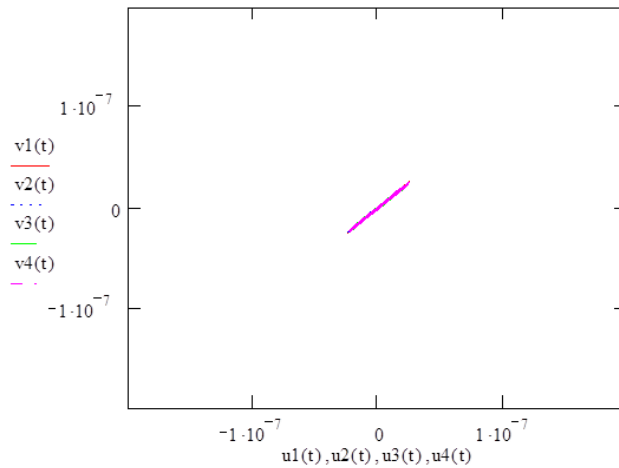
$\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/6$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$. С. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/12$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$. D. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = 5/12\pi$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$.

Да би смо установили да ли на резултујуће трајекторије осцилаторних кретања чворних молекула у тангентној равни, утиче положај нападне тачке и правац импулсног дејства хиперактивисаног сперматозоида, у почетном тренутку варирали смо његов положај, односно положај његове нападне тачке и правац импулсног дејства. Уколико хиперактивисани сперматозоид импулсно дејствује на молекул у положају 2 или 4, добијају се путање у виду праве линије, док уколико дејствује у положају 1 или 3 имају изглед налик стохастичком. Исто понашање се запажа за све испитиване комбинације повољних углова (Види слику 4.18.).

Може се видети да уколико сви сперматозооиди имају исту брзину сви посматрани чворни молекули осцилују праволинијски. Собзиром да се апсолутне вредности брзина хиперактивисаних и прогресивно покретних сперматозоида веома сличне, нема значајне квалитативне разике у амплитудама добијених *Lissajous*-ових кривих за ове две брзине кретања сперматозоида. Али ако посматрамо дејство слабо покретних сперматозоида $V_1 = V_2 = V_3 = V_4 = V_{sl} = 56.2 \mu/s$ (*Goodson et al, 2011*), за исти случај запажа се значајни пад у амплитуди резултујућих трајекторија чворних молекула. Слика 4.19.

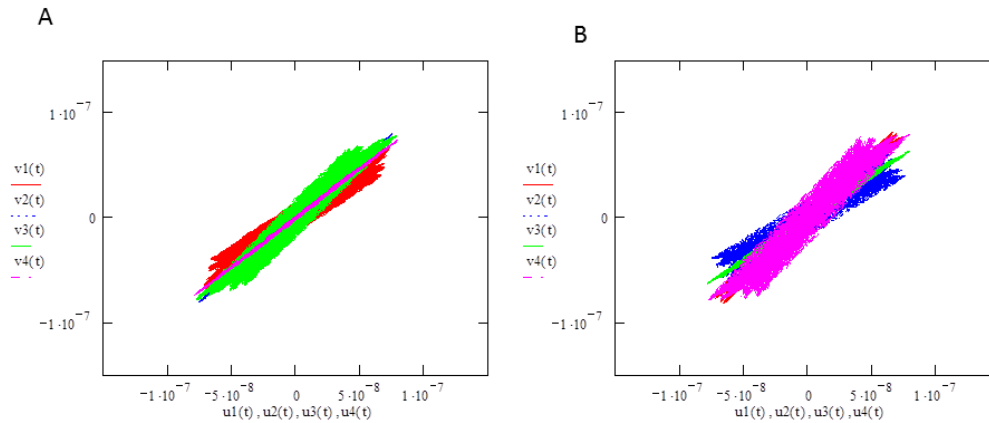


Слика 4.18. Резултујуће трајекторије осцилаторног кретања 4 чворна молекула у тангентној равни када у почетном тренутку на чворне молекуле под повољним угловима γ и θ : $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/12$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$ импулсно дејствују један хиперактивисани сперматозоид брзином $V_{hp} = 171.1 \mu m / s$ и три прогресивно покретна сперматозооида $V_p = 146.9 \mu m / s$: А. Резултујућа померања сва 4 чворна молекула када хиперактивисани сперматозоид дејствује у положају 1. В. Резултујуће путање чворних молекула у положају 1 и 3 када хиперактивисани сперматозоид дејствује у положају 1. С. Резултујућа померања сва 4 чворна молекула када хиперактивисани сперматозоид дејствује у положају 2. Д. Резултујуће путање чворних молекула у положају 2 и 4 када хиперактивисани сперматозоид дејствује у положају 2.



Слика 4.19. Резултујуће трајекторије осцилаторног кретања 4 чворна молекула у тангентној равни, када 4 слабо покретна сперматозооида у почетном тренутку импулсно дејствују на чворне молекуле брзином $V_{sl} = 56.2 \mu m / s$ под угловима γ и θ : $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi / 4$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi / 4$

Слика 4. 20 приказује трајекторије осцилаторног кретања четири чворна молекула у тангентној равни, када на њих, у почетном тренутку, импулсно дејствују сперматозооиди, који имају различите брзине и дејствују под упадним угловима $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi / 4$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi / 4$. Може се видети да распоред нападних тачака и позиција импулног дејства сперматозооида значајно утиче на облик резултујућих путања чворних молекула у тангентној равни.



Слика 4.20. Резултујуће трајекторије осцилаторног кретања 4 чворна молекула у тангентној равни, када 4 сперматозоида у почетном тренутку импулсно дејствују на чворне молекуле под угловима γ и θ : $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/4$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$, различитим брзинама А. хиперактивисани $V_1 = 171.1 \mu m/s$ прогресивни $V_2 = 146.9 \mu m/s$ средње брзине $V_3 = 183.3 \mu m/s$ и спори $V_4 = 85.2 \mu m/s$ В. хиперактивисани $V_1 = 171.1 \mu m/s$, прогресивни $V_2 = 146.9 \mu m/s$, спори $V_3 = 85.2 \mu m/s$ и средње брзине $V_4 = 183.3 \mu m/s$.

Уз апроксимацију да сперматозоиди који имају различите брзине импулсно дејствују под истим углом, са слике 4.20 се може видети да различити распоред нападних тачака импулног дејства сперматозоида са различитим брзинама утиче на облик резултујућих путања побуђеног осцилаторног кретања чворних молекула у тангентној равни.

На основу претходно изнетих резултата нумеричког експеримента може се закључити:

- Распоред нападних тачака импулсних сила ударног дејства сперматозоида са ефективним брзинама, који дејствују на површину ZP под одређеним повољним угловима су од значаја за синхронизацију резултујућих

вишефреквентних осцилација чворних молекула у сферном осцилаторном моделу дискретног континуума *ZP*.

- Симетрични распоред нападних тачака импулсних сила ударног дејства сперматозооида са ефективним брзинама, у почетном тренутку, је повољнији за постизање кинетичког вишефреквентног осцилаторног стања *ZP* које је повољно за оплодњу.

У физиолошким условима споро покретни сперматозооиди никада не би дошли до јајне ћелије, али у *IVF* условима могли би да допринесу настанку осцилаторног стања *ZP* које је повољно за оплодњу. За случајеве симетричног распореда нападних тачака импулсних сила ударног дејства сперматозооида са истим брзинама, резултујуће путање осцилаторног кретања чворних молекула у тангентној равни су у виду праве линије тј оне се крећу синхроно, само су амплитуде различите и зависе од упадног угла под којим сперматозооиди делују импулсно. Сlike 4.12, 4.13, 4.15. Веће амплитуде кретања молекула би, теоријски, узроковале веће деформације мреже и тиме створила услове за продор сперматозооида. За одређене почетне услове могуће је да се само поједини чворни молекули крећу у виду праве линије а други не. Сlike 4.17 и 4.18. Приказани су случајеви путања кретања чворних молекула у тангентној равни само за поједине почетне услове. У реалном биолошком систему постоји велики број различитих комбинација почетних услова, које би могле да дају осцилаторна стања *ZP* повољна за оплодњу, што указује да би процес оплодње могао да се сматра стохастичким процесом. С друге стране, могућност да се поједини молекули крећу синхроно, а други не указује на могућност да би феномен оплодње могао да има локални карактер, односно положај и иницијална пенетрација сперматозооида кроз *ZP* одређена је локалним почетним условима, који имају стохастички карактер, а структура и састав *ZP* су униформни.

Овај нумерички експеримент отвара нова питања:

- Да ли у реалности постоји веза између брзине сперматозооида и угла под којим дејствује на *ZP*?

Познато је да су сперматозооиди који су прошли кроз процес капацитације способни да се вежу за *ZP* (Gadella, 2012). Здрави сперматозооиди и сперматозооиди са морфолошким дефектима имају различити осцилаторно понашање (Woolly, 2003). Трансферзалана сила коју ствара покретни сперматозооид је већа од пропулзивне силе (Ishijima, 2011, Hsiao et al, 2013) указујући да би кинетички параметри кретања сперматозооида могли да буду у вези са њиховим углом дејства. Ово указује да амплитуде и начин кретања сперматозооида могу утицати на угао дејства.

- Који је однос хиперактивисаних сперматозооида неопходних за постизање осцилаторно повољног стања *ZP* за успешну оплодњу?

Према (Godson, 2011) отприлике 22% сперматозооида у ејакулату су хиперактивисани сперматозооиди. Тај проценат би одговарао анализи када један (од 4) хиперактивисана сперматозооида импулсно дејствује на репрезентативни сегмент *ZP* мреже (слика 4.18).

- Да ли сперматозооиди са ефективним брзинама имају стохастички распоред на површини *ZP* у реалним условима?

На основу параметара брзине сперматозооида за одређени сој мишева (Goodson et al, 2011) и резултата које смо овде приказали постоји могућност да хиперактивисани сперматозооиди, као и прогресивно покретни реагују (Goodson et al, 2011) под повољнијим угловима него спори и слабо покретни сперматозооиди у *in vitro* условима. Уколико је тако, слабо покретни сперматозооиди никад не би могли да дају *Lissajous*-ове криве у форми праве линије, као што је приказано на слици 4.19. *Lissajous*-ове фигуре би тада биле налик хаотичним и мање амплитуде у складу са моделом. Постоји могућност да у реалном систему специфичан распоред и организација сперматозооида који импулсно дејствују на површину *ZP* различитим брзинама доприноси постизању осцилаторног стања *ZP*, које је повољно за пенетрацију сперматозооида. Да би добили одговор на ово питање потребне су додатне анализе.

Lefievre et al (2007) сматрају да традиционалне вредности за процену квалитета сперме: концентрација сперматозооида, покретљивост и морфологија нису довољне за дијагнозу и прогнозу инфертилитета у мушкараца и да нема прогностичких параметара, који би адекватно третирали суб(ин)фертилитет у

мушкараца. На основу нашег осцилаторног дискретно континуалног модела, слободни смо да предложимо нови вид терапије субфертилитета у мушкараца: додавање додатне механичке осцилаторне стимулације одређене фреквенције из одређеног фреквентног опсега медијуму са здравом јајном ћелијом и адекватним бројем сперматозоида у циљу побољшања оплодње. Механичка стимулације би могла да буде у форми звука.

Основна идеја је да би додавање механичке осцилаторне стимулације одређених карактеристика (интензитет и сет осцилаторних фреквенција) могло да допринесе успешној оплодњи кроз настанак резонанције између јајне ћелије и сперматозоида. Овај метод би могао да буде користан код субфертилних случајева (када нема довољан број функционалних сперматозоида и оних са нормалном морфологијом да би дошло до оплодње у физиолошким условима). С обзиром да сперматозооиди испољавају висок степен пластичности и адаптабилности као одговор на догађаје који покрећу овулацију (*Lefievre et al, 2007*), могли би да одговоре и на механичку стимулацију. Додавање екстерне механичке стимулације би могло да утиче на процес хиперактивације. Претпостављамо да би параметри екстерне механичке стимулације били специфични за врсту.

Укратко, распоред и брзина сперматозоида, као и осцилаторни режими јајне ћелије су значајни фактори у разумевању механизма оплодње и оплодња се може побољшати применом спољне механичке стимулације.

4.3.3.Ограничења модела

Као и сваки теоријски модел и овај има извесна ограничења. Пре свега, с обзиром да је анализирано осцилаторно понашање ограниченог броја (11) молекула у ZP моделу, добили смо и ограничени број сопствених кружних фреквенција. У реалној ZP постоји велики број молекула и последично велики број сопствених кружних фреквенција осцилаторног система. Нелинеарне карактеристике реалне ZP и ограничења, која са собом носе коришћени аналитичко-нумерички методи за решавање нелинеарних диференцијалних једначина, захтевало би нумеричке методе решавања и апроксимације. Реална

ZP је веома комплексан осцилаторни систем и веома селективан када је у питању пенетрација сперматозоида. Селективност *ZP* обезбеђује константну количину генетског материјала у свакој генерацији. Можемо да претопставимо да у реалним биолошким условима сваки сперматозоид, који дејствује на *ZP* доприноси на посебан начин настанку осцилатоног стања *ZP*, које је повољно за оплодњу. Поред тога ово је једнослојан модел. Реална *ZP* је вишеслојна структура са јасним структурним и разликама у механичким особинама унутрашњег и спољашњег слоја (*Martinova et al, 2008*). У даљим моделирањима дискретних континуалних система *ZP* и нумеричким експериментима, могли би да применимо метод *Sigurdsson et al. (2013)* да проучавамо унутрашњу осцилаторну динамику *ZP*-кретање куплованих слојева *ZP*.

Наредни корак у развоју биомеханичког модела *ZP* који је сличнији реалној *ZP* био би развој динамике система комплексних хибридних структура које узимају у обзир спрегнута механичка, физико-хемијска, електро и термо везана поља (куплована поља). Са овим приступом било би могуће направити сферни, вишеслојни модел дискретног континуума који би био погоднији за проучавање механизма продора сперматозоида кроз целу дебљину *ZP*.

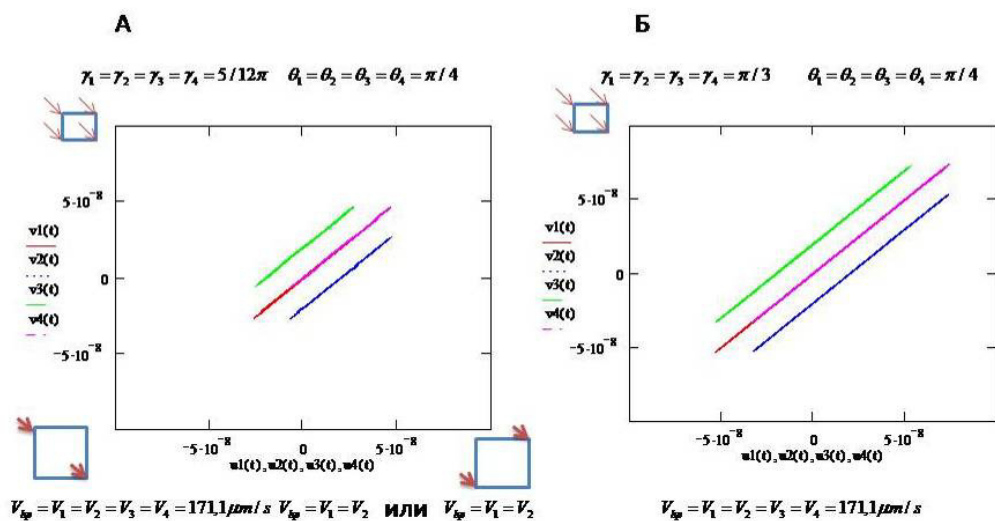
4.4. Значај броја хиперактивисаних сперматозоида за осцилаторно понашање *ZP* миша

Да бисмо испитали како број хиперактивисаних сперматозоида утиче на осцилаторно понашање *ZP* миша спровели смо нумерички експеримент према претходно описаној методологији на репрезентативном узорку (слика 4.1.) дискретно континуалног осцилаторног модела *ZP* миша. Различити број хиперактивисаних сперматозоида са истим кинетичким параметрима-брзине ($V_{hp} = V_2 = V_3 = V_4 = 171,1 \mu m / s$) и углови дејства γ и θ ($\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = 5/12\pi$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$) који импулсно дејствују на чворне молекуле може дати различите резултујуће трајекторије чворних млекула у тангентној равни (циркуларна и меридијална компонента кретања). Да бисмо уочили компонентна кретања чворних молекула у циркуларном и меридијалном правцу у тангентној

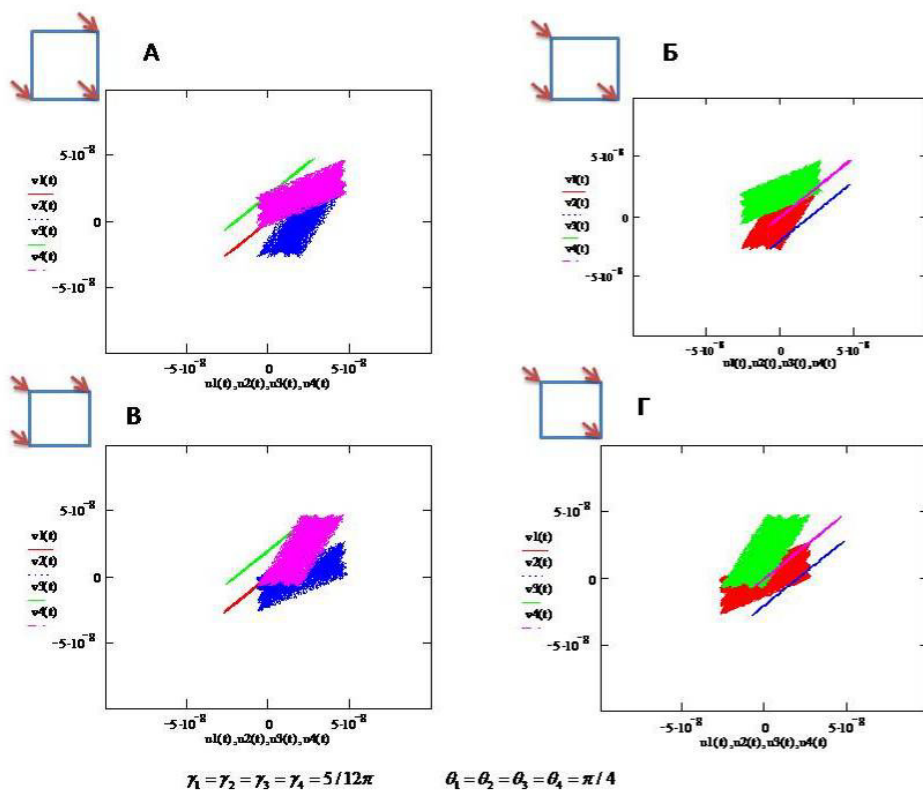
равни и избегли преклапање резултујућих путања, резултујуће трајекторије чворних молекула су померене за 2×10^{-8} и то у компонентним померањима u_2, v_3, u_4, v_4 .

Резултујућа померања чворних молекула у тангентној равни настала у након импулсног дејства 4 хиперактивисана сперматозооида (сваки дејствује на по један чворни молекул) у почетном тренутку за углове дејства γ и θ , $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = 5/12\pi$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$ односно $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/3$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$) приказане су на слици 4.21 А и Б. Видимо да су резултујуће путање у тангентној равни у форми праве линије као и да су амплитуде кретања веће када су γ и θ $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/3$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$. Кретање сва четири чворна молекула је синхроно и идентично као на слици 4.21 А и када на чворне молекуле импулсно дејствују и само 2 хиперактивисана сперматозооида под истим угловима али у дијагноалној позицији.

На слици 4.22. приказане су резултујуће путање сва четири чворна молекула када на њих импулсно дејствују 3 хиперактивисана сперматозооида (сваки на по један чворни молекул, један чворни молеку остаје без директног дејства сперматозооида) у различитим позицијама. Може се запазити да два чворна молекула увек имају синхроно кретање док друга два увек показују кретање налик стохастичком.



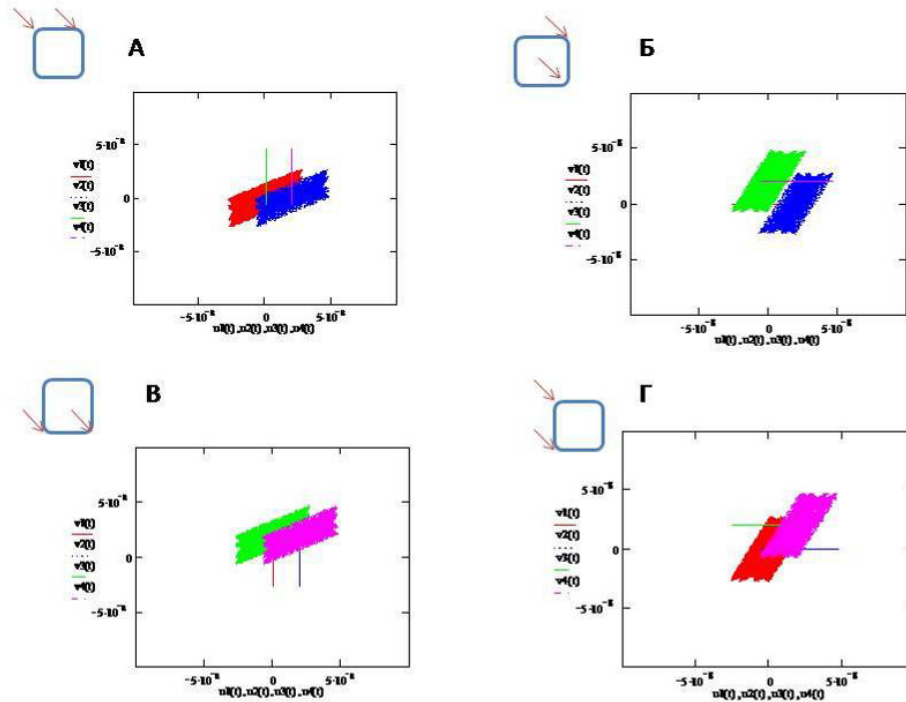
Слика 4.21. Резултујуће трајекторије осцилаторног кретања 4 чворна молекула у тангентној равни када у почетном тренутку импулсно дејствују на чворне молекуле 4 хиперактивисана сперматозооида под угловима γ и θ : А. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = 5/12\pi$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$. Б. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = \pi/3$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$. Исто осцилаторно понашање као на слици А се запажа и када импулсно дејствују два хиперактивисана сперматозооида у дијагоналним позицијама. Да би избегли преклапање резултујућих трајекторија чворних молекула, резултујуће трајекторије чворних молекула су померене за 2×10^{-8} и то u_2, v_3, u_4, v_4 .



Слика 4.22. Резултујуће трајекторије осцилаторног кретања 4 чворна молекула у тангентној равни када у почетном тренутку импулсно дејствују на чворне молекуле 3 хиперактивисана сперматозооида под угловима γ и θ : А. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = 5/12\pi$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$ на четврти чворни молекул не дејствује сперматозоид. Варирана је позиција чворног молекула на који не дејствује сперматозоид: А. У положају V1. Б. У положају V2. В. У положају V3. Г. У положају V4. Да би избегли преклапање резултујућих трајекторија чворних молекула, резултујуће трајекторије чворних молекула су померене за 2×10^{-8} и то u_2, v_3, u_4, v_4 .

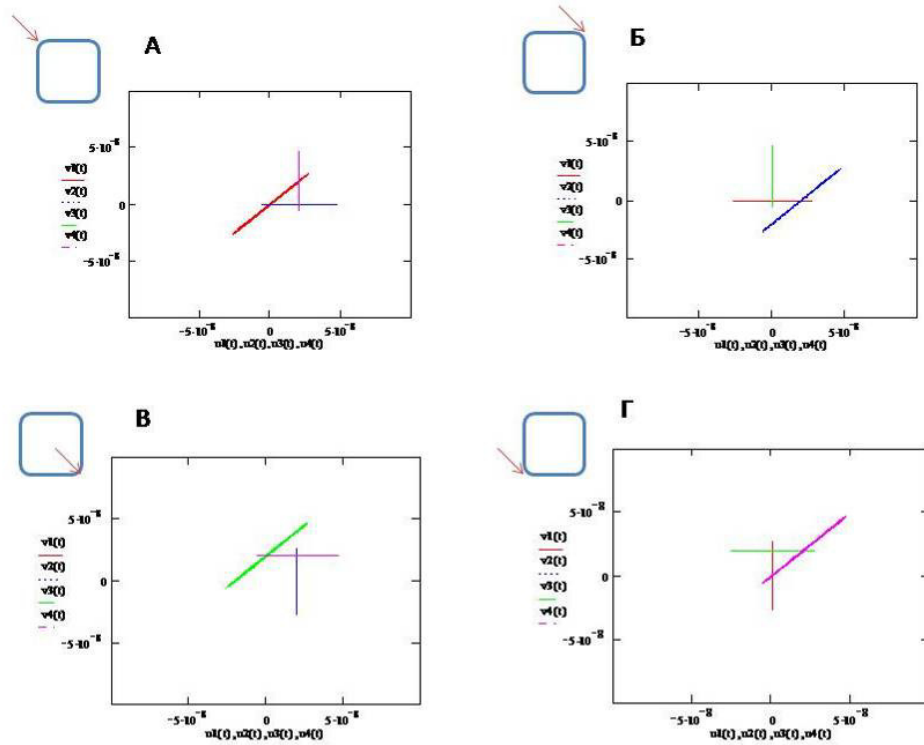
На слици 4.22. приказане су резултујуће трајекторије осцилаторног кретања 4 чворна молекула у тангентној равни када у почетном тренутку импулсно дејствују на два суседна чворна молекула 2 хиперактивисана сперматозооида под угловима γ и θ $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = 5/12\pi$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$ а на друга два чворна

молекула не дејствују сперматозооиди. Варирана је позиција два суседна чворна молекула на које дејствују сперматозооиди. Може се уочити, што је и очекивано собзиром да је осцилаторним модел такав да су ланци ортогонални, да два чворна молекула имају само једну компоненту кретања -меридијалну или циркуларну и да је она у форми праве линије, а резултујуће путање друга два молекула су налик стохастичким.



Слика 4.23. Резултујуће трајекторије осцилаторног кретања 4 чворна молекула у тангентној равни када у почетном тренутку импулсно дејствују на чворне молекуле 2 хиперактивисана сперматозооида под угловима γ и θ : А. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = 5/12\pi$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$ на друга два чворна молекула не дејствују сперматозооиди. Варирана је позиција два суседна чворна молекула на које дејствују сперматозооиди: А. У положају V1 и V2 Б. У положају V2 и V3 В. У положају V3 и V4. Г. У положају V4 и V1. Да би избегли преклапање резултујућих трајекторија чворних молекула, резултујуће трајекторије чворних молекула су померене за 2×10^{-8} и то u_2, v_3, u_4, v_4 .

Због ортогоналности ланаца у дискретном осцилаторном моделу ZP када импулсно дејствује један хиперактивисани сперматозоид на један чворни молекула тада његова резултујућа путања у тангентној равни има две компоненте кретања-мердијалну и циркуларну, док друга два суседна молекула имају само по једну компоненту кретања или меридијалну или циркуларну. Четврти чворни молекула мирује. Слика 4.24.



Слика 4.24. Резултујуће трајекторије осцилаторног кретања 4 чворна молекула у тангентној равни када у почетном тренутку импулсно дејствује на чворне молекуле један хиперактивисани сперматозоид под угловима γ и θ : А. $\gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = \gamma_4 = 5/12\pi$ и $\theta_1 = \theta_2 = \theta_3 = \theta_4 = \pi/4$ на остала три чворна молекула не дејствују сперматозоиди. Варирана је позиција чворног молекула на који импулсно дејствује сперматозоид: А. У положају $V1$. Б. У положају $V2$. В. У положају $V3$. Г. У положају $V4$. Да би избегли преклапање резултујућих трајекторија чворних молекула, резултујуће трајекторије чворних молекула су померене за 2×10^{-8} и то u_2, v_3, u_4, v_4 .

Наредни корак је одредити потенцијалну слабу тачку или област у систему модела сферне мреже *ZP-e* и услове под којима би дошло до вероватног продирања сперматозооида. За решавање овог задатка користићемо аналитички и нумерички приступ. *ZP* ћемо посматрати, као структуру у целини у којој се под дејством спољње силе и притиска развија напон и деформација. Места на којима је деформација највише изражена требало би да представљају потенцијално слабе тачке за продор сперматозооида. Проблем ћемо разматрати преко одређивања деформационог рада *ZP* у одговарајућем моделу.

4.5. Деформациони рад *Zona-e Pelucida-e* у процесу оплодње

ZP је високо специјализовани гликозилисани и сулфатисани полимерни гел који показује вискоелстична својства и промену дијаметра у различитим фазама сазревања јајне ћелије. У току процеса оплодње сперматозооиди, који дејствују на површини *ZP* предају извесну количину кинетичке енергије овој структури. Овде ће бити приказан могући апроксимативни модел *ZP* у форми еластичног тела шупље сфере ограничене двема концентричним сферним површима –унутрашњом и спољашњом на коју делују сперматозооиди, чија је дистрибуција дејства у виду дискретног хомогеног континуума у радијалном правцу. Применом теорије еластичности на овај апроксимативни модел, могуће је написати изразе за компонентне дилатације и напоне, и померања, као и изразе за специфични и укупни деформациони рад за деформацију модела под дејством константног спољњег притиска, једнако расподеђеног на спољашњој и унутрашњој сферној површи. Специфични деформациони рад би могао да се користи, као критеријум за одређивање области *ZP* где би могло да дође до продора сперматозооида. Тамо где је специфични деформациони рад најмањи тамо је већа вероватноћа да дође до пенетрације сперматозооида, те би то место-област сматрала “слабом тачком” односно облашћу за продор сперматозооида. Такође се може поставити питање критеријума за разраду модела *ZP* услед деформационог рада утрошеног на промену облика и промену

запремине *ZP* као и колики би био напон разарања *ZP* при одређеним деформацијама.

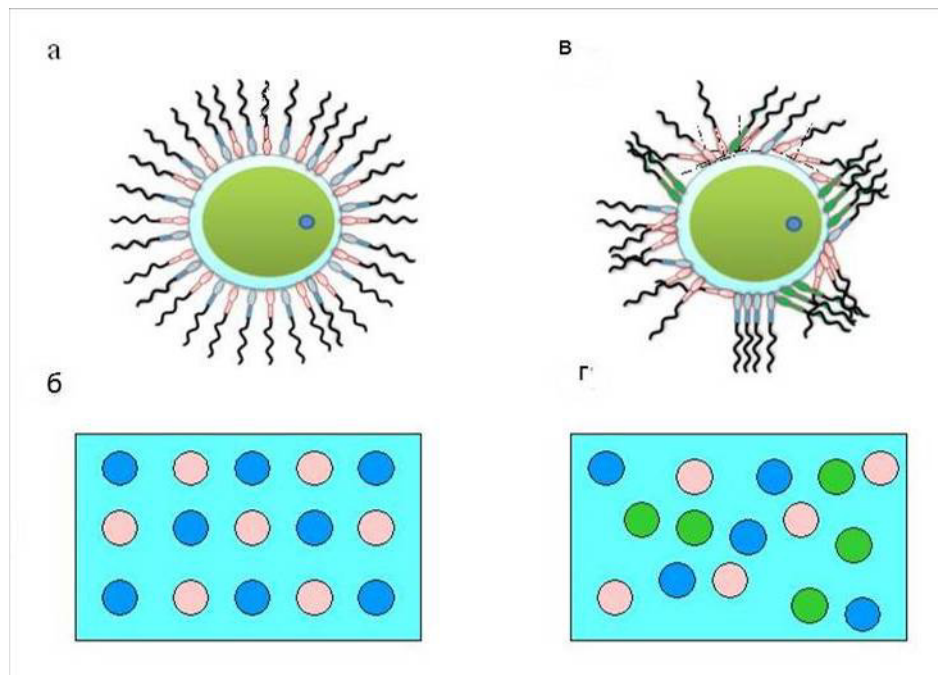
ZP ћемо сматрати хомогеном структуром с обзиром да разлике у механичким својствима, које постоје на површини нису значајне (*Murayama et al, 2004*) и ако дебљина *ZP* ембриона може бити различита на различитим местима (*Marco-Jiménez et al, 2012; Gabrielsen et al, 2000*). И ако постоје разлике у структурним (*Martinova et al, 2008*) и механичким својствима *ZP* између њеног унутрашњег и спољашњег слоја (*Papi et al, 2012, Voccaciuo et al, 2012*) због једноставности модела сматраћемо да је *ZP* кроз целу своју дебљину хомогена. *ZP* реагује на механичку стимулацију- механички респонсивна структура (*Murayama et al, 2006, Voccaciuo et al, 2014*). Употребом *AFM*-а и *Arruda-Boyce* осмоланчаног модела могуће је моделовати хипереластична својства *ZP* (*Voccancio et al, 2014*). Рачунарски модел који се бави утицајем једног сперматозооида на површину *ZP* је разматран у (*Kozlovsky & Gefen, 2013*). *ZP* се може сматрати осцилаторном структуром која показује транзицију у осцилаторном понашању пре и после оплодње (*Hedrih, 2014, Hedrih & (Stevanović) Hedrih, 2014b*). Долази до расипања енергије осциловања када *ZP* испољава вискоеластична својства (*Hedrih & (Stevanović) Hedrih, 2014b*).

4.5.1.Ефекат брзине сперматозооида и њиховог распореда на осцилаторно понашање *ZP* миша

У току процеса оплодње сперматозооиди остварују утицај на површину *ZP*. Сперматозооиди су покретне ћелије и у ејакулату их има на милионе. Само 10% је функционално способно да оплоди јајну ћелију.

Број прогресивно покретних сперматозооида је од кључног значаја за успех оплодње. Као што је већ поменуто различита дистрибуција сперматозооида са истим/различитим кинетичким параметрима даће различиту дистрибуцију/распоред сила, које дејствују на површину *ZP*. Сваки појединачни сперматозоид дејствује одређеном силом на површину *ZP* (*Hsiao et al, 2013*)

А њихова здружена акција даће специфичну дистрибуцију сила на површини *ZP*. Тренутно важеће мишљење у науци је да је дистрибуција сперматозооида на површини *ZP* стохастички процес. Хипотетички распоред сперматозооида на површини *ZP* приказан је шематски на слици 4.25. Централно симетрична и асиметрична дистрибуција сила, коју производе сперматозооиди дејствујући на површини *ZP* изазваће различита осцилаторна стања *ZP*. Дејство сперматозооида на површину *ZP* укључује рецепторско препознавање, али и механичко дејство.

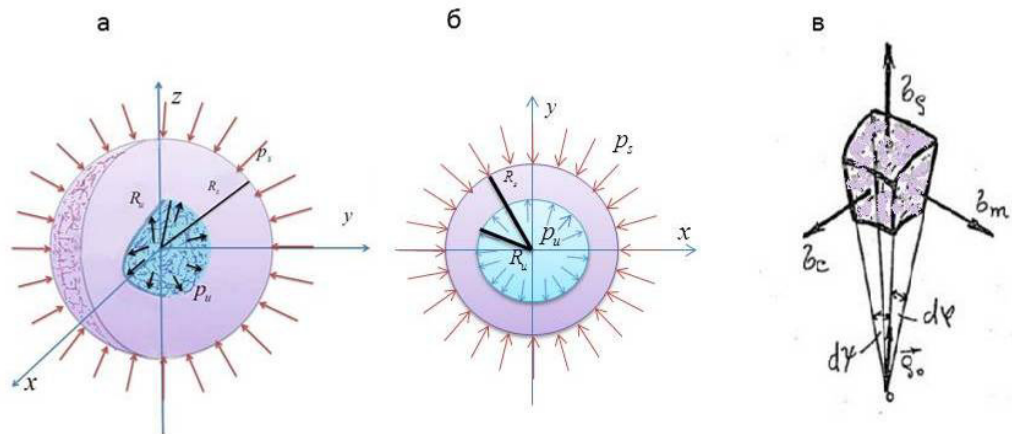


Слика. 4.25. Хипотетички распоред сперматозооида на површини *ZP*. а. Симетрични распоред сперматозооида који имају две различите брзине, а дејствују под истим углом. б. Симетрична дистрибуција поља са истим механо-хемијским утицајем на површину *ZP*. в. Асиметрични распоред сперматозооида са три различите брзине, који дејствују под различитим угловима арбитрарно изабраним и распоређеним. г. Асиметрична дистрибуција поља са истим механо-хемијским утицајем на површину *ZP*. Сперматозооиди, који имају различите брзине означени су различитом бојом (розе, плава и зелена) на сликама а и в. Различте боје на б и г означавају поља различитог механо-хемијског утицаја одговарајућег сперматозооида. Публиковано у (*Hedrih, Hedrih (Stevanvic), 2015*).

Приликом дејства на ZP сперматозооиди преносе извесну количину кинетичке енергије на ZP .

4.5.2. Напони и деформације у механичком моделу ZP као еластичног тела

При одређивању *Young*-овог модула еластичности јајне ћелије и ембриона миша помоћу микроаспирационе технике *Khalilian et al (2010)* су моделовали јајну ћелију као еластичну љуску одређене дебљине (*Khalilian et al 2010*).



Слика 4.26. Механички модел ZP у облику шупље сфере са централно симетричним распоредом притиска. Слика урађена према моделу шупље сфере оптерећене унутрашњим и спољашњим притиском из (*Rašković, 1985*).

Пре дејства бројних сперматозоида на површину ZP , ZP ћемо сматрати деформабилним идеално еластичним телом, које је у недеформисаном стању оивичено са две сферне површи -унутрашњом полупречника R_i и спољашњом полупречника R_o и дебљине $\delta = R_o - R_i$ у природном стању, без дејства сперматозоида. Увели смо следеће апроксимације у модел: сперматозооиди имају униформни распоред на површини ZP ; сви сперматозооиди имају исте импулсне силе ударног дејства и са истим брзинама кретања дејствују на

површину ZP под истим углом (у радијалном правцу, централно симетрично у односу на центар концентричних контурних површи), што резултује униформним распоредом спољњег притиска на површини ZP ; у одређеном временском тренутку утицај сперматозоида је у виду константног спољњег притиска, а то значи да уводимо претпоставку о квази-статичком стању напрезања модела шупље сфере спољашњим притиском $\vec{p}_o = -p_o \frac{\vec{r}}{r} = -p_o \vec{r}_0$ у радијалном правцу на спољњој контурној површи ZP . Притисак на унутрашњој контурној површи је константан и претпоставимо да износи $\vec{p}_i = p_i \frac{\vec{r}}{r} = p_i \vec{r}_0$, (види слике 4.26. а и б). У посебним случајевима можемо узети да је притисак на унутрашњој контурној површи ZP једнак нули $p_i = 0$; дебљина ZP $\delta = R_o - R_i$ је у непертурбованом стању униформна; модел као и спољњи притисак, који праве сперматозооиди, а који су распоређени у форми дискретно-континуалне дистрибуције по спољашњој контурној површи, су централно симетрични; након деформације ZP остаје симетрична; померања материјалних тачака на унутрашњој спољашњој површини ZP су централно симетрична и само у радијалном правцу; нема напона смицања. У овом моделу узели смо у разматрање само две статичке конфигурације: конфигурацију коју сматрамо природним недеформисаним стањем пре дејства сперматозоида и коначно деформисано стање ZP под (квази)статичким централно симетричним притиском. Модел сличан овом приказнаје на слици. 4. 26.

Узимајући у обзир претходне апроксимације, проблем се може третирати као квазистатички и према моделу (слика 4.26) из теорије еластичности, који је решен у (*Hedrih (Stevanović), 1988, Rašković, 1985*). Елемент ZP је у форми елемента у сферном координатном систему, са три главна нормална компонентна напона у радијалном σ_r , циркуларном σ_c и мердијалном σ_m правцу. Елементи тензора напона за напето стање у тачкама $N(r, \varphi, \vartheta)$ ZP су значи нормални напони у радијалном σ_r , циркуларном σ_c и мердијалном σ_m правцу и изражени су формулама које имају следећи облик (види *Hedrih (Stevanović), 1988, Rašković, 1985*):

$$\sigma_r = \frac{1}{1-\psi^3} \left[\psi^3 \left(1 - \frac{R_o^3}{r^3} \right) p_i - \left(1 - \psi^3 \frac{R_o^3}{r^3} \right) p_o \right], \quad (4.40)$$

$$\sigma_c = \sigma_m = \frac{1}{1-\psi^3} \left[\psi^3 \left(1 + \frac{R_o^3}{r^3} \right) p_i - \left(1 + \psi^3 \frac{R_o^3}{r^3} \right) p_o \right], \quad (4.41)$$

у којима су $\psi = \frac{R_i}{R_o}$, p_o притисак на спољашњој контурној сферној површи ZP , p_i - притисак на унутрашњој контурној сферној површи ZP . Тангентне компоненте напона су све једнаке нули.

За посебне случајеве када су специфичне деформације смицања једнаке нули $\gamma_{rc} = 0$, $\gamma_{rm} = 0$ и $\gamma_{cm} = 0$, напон-дилатација (специфична деформација) јединичног елемента у радијаном ε_r , циркуларном ε_c и меридијаном ε_m правцу, као елементи тензора деформације, су дефинисане следећим изразима (види *Hedrih (Stevanović), 1988, Rašković, 1985*):

$$\varepsilon_r = \frac{1}{G(1-\psi^3)} \left[\frac{\psi^3 p_i - p_o}{2(1+3\mu k)} - \psi^3 \frac{p_i - p_o}{2} \frac{R_o^3}{r^3} \right], \quad (4.42)$$

$$\varepsilon_c = \varepsilon_m = \frac{1}{2G(1-\psi^3)} \left[\frac{\psi^3 p_i - p_o}{(1+3\mu k)} + \psi^3 \frac{p_i - p_o}{2} \frac{R_o^3}{r^3} \right], \quad (4.43)$$

где је G - модул смицања, μ - *Poisson*-ов коефицијент попречне контракције, а $k = \frac{1}{1-2\mu}$. Претходна компоненте дилатације представља елементе тензора деформације за специфични линијски елемент у тачки $N(r, \varphi, \vartheta)$ елементат у ZP поменутог модела.

Запреминска дилатација ε_v јединичног запреминског елемента око $N(r, \varphi, \vartheta)$ тачке ZP на растојању r од центра сфере има следећи облик:

$$\varepsilon_v = \varepsilon_r + \varepsilon_c + \varepsilon_m = \frac{3}{2(1+3\mu k)} \frac{\psi^3 p_i - p_o}{1-\psi^3}, \quad (4.44)$$

Запремина елементарног дела ZP (слика 4.22 в) изражена у сферним координатама са страницама dr , $r \cos \psi d\varphi$ и $rd\psi$ је : $dV = r^2 \cos \psi dr d\varphi d\psi$.

На основу претходних израза (4.40-4.44) могуће је анализирати квазистатички напон и деформацију, око сваке тачке унутар ZP укључујући и тачке, које се налазе на контурним површима предложеног модела ZP за случај када на спољну површину дејствују сперматозооиди у виду сила чији распоред има особине дискретно-континуалне дистрибуције по спољашњој контурној површи.

Интензитет вектора померања тачке $N(r, \varphi, \vartheta)$ у радијалном правцу, одређен је

следећим изразом:

$$s(r) = \frac{1}{2G(1-\psi^3)} \left[\frac{\psi^3 p_i - p_o}{(1+3\mu k)} r + \psi^3 \frac{p_i - p_o}{2} \frac{R_o^3}{r^2} \right], \quad (4.45)$$

Интензитет вектора померања тачке $N(R_o, \varphi, \vartheta)$, на спољашњој контурној површи, у радијалном правцу, одређен је следећим изразом:

$$s(R_o) = \frac{R_o}{2G(1-\psi^3)} \left[\frac{\psi^3 p_i - p_o}{(1+3\mu k)} + \psi^3 \frac{p_i - p_o}{2} \right], \quad (4.46)$$

Интензитет вектора померања тачке $N(R_i, \varphi, \vartheta)$, на унутрашњој контурној површи, у радијалном правцу, одређен је следећим изразом:

$$s(R_i) = \frac{1}{2G(1-\psi^3)} \left[\frac{\psi^3 p_i - p_o}{(1+3\mu k)} R_i + \psi^3 \frac{p_i - p_o}{2} \frac{R_o^3}{R_i^2} \right] \quad (4.47)$$

Промена дебљине ZP деформацијом централно симетричним притисцима по унутрашњој и спољашњој контурној сферним површима је:

$$s(R_o) = \frac{R_o}{2G(1-\psi^3)} \left[\frac{\psi^3 p_i - p_o}{(1+3\mu k)} + \psi^3 \frac{p_i - p_o}{2} \right], \quad (4.48)$$

Промена дебљине ZP под дејством спољашњег и унутрашње притиска је:

$$\delta_d = R_0 - R_i + s(R_0) - s(R_i) \quad (4.49)$$

или у развијеном облику:

$$\delta_d = R_0 - R_i + \frac{R_0}{2G(1-\psi^3)} \left[\frac{\psi^3 p_i - p_o}{(1+3\mu k)} (1-\psi) + \psi^2 \frac{p_i - p_o}{2} (\psi^2 - 1) \right] \quad (4.50)$$

4.5.3. Деформациони рад континуалног модела ZP

Деформациони рад запреминске јединице ZP се може одредити помоћу компонентних напона и деформација. Најпре треба одредити специфични деформациони рад (еластични потенцијал) запреминског елемента претходно дефинисаног механичког модела ZP у деформисаном стању. Специфични деформациони рад запреминског елемента ZP око тачке $N(r, \varphi, \vartheta)$ има следећи облик:

$$\mathbf{A}'_{def} = \mathbf{G} \left[(\varepsilon_r^2 + \varepsilon_c^2 + \varepsilon_m^2) + \mu k \varepsilon_r^2 + \frac{1}{2} (\gamma_{rc}^2 + \gamma_{rm}^2 + \gamma_{cm}^2) \right], \quad (4.51)$$

и изражен је преко елемената тензора деформације. Узимајћи у обзир случај када су деформације смицања једнаке нули, $\gamma_{rc} = 0$, $\gamma_{rm} = 0$ и $\gamma_{cm} = 0$, као и да су смичући напони једнаки нули, специфични деформациони рад је могуће написати као:

$$\mathbf{A}'_{def} = \mathbf{G} \left[(\varepsilon_r^2 + \varepsilon_c^2 + \varepsilon_m^2) + \mu k \varepsilon_r^2 \right] \quad (4.52)$$

Кад уведемо следеће ознаке:

$$a = \frac{1}{\mathbf{G}(1-\psi^3)}, b = \frac{\psi^3 p_i - p_o}{2(1+3\mu k)}, c = \psi^3 \frac{p_i - p_o}{2}, \quad (4.53)$$

израз за специфични деформациони рад у тачки $N(r, \varphi, \vartheta)$ ZP ће имати следећи облик:

$$\mathbf{A}'_{def} = \mathbf{G} \left[a^2 \left(b - \frac{c}{r^3} \right)^2 + 2 \frac{a^2}{4} \left(2b + \frac{c}{r^3} \right)^2 + \mu k (3ab)^2 \right], \quad (4.54)$$

И у коначном облику:

$$\mathbf{A}'_{def} = \mathbf{G} \frac{3a^2}{2} \left[(2+3\mu k)b^2 + \frac{c^2}{r^6} \right], \quad (4.55)$$

Претходни изрази за специфични деформациони рад се могу изразити и преко притисака, којим су изложене спољашња и унутрашња контурна површина:

$$\mathbf{A}'_{def} = \frac{3}{2\mathbf{G}(1-\psi^3)^2} \left[\frac{(2+3\mu k)}{4(1+3\mu k)^2} (\psi^3 p_i - p_o)^2 + \psi^6 \frac{(p_i - p_o)^2}{4} \frac{1}{r^6} \right], \quad (4.56)$$

Видимо да је специфични деформациони рад –еластични потенцијал деформисане конфигурације ZP модела у некој тачки $N(r, \varphi, \vartheta)$ зависи од полупречника контурних површина, унутрашње и спољашње контурне површи, квадрата континуираног притиска на спољашњој и унутрашњој контурној површи. Такође, обрнуто је пропорционалан шестом степену од растојања тачке од центра сфере r^{-6} пропорционалан је шестом степену односа ψ^6 полупречника унутрашње и спољашње контурне сферне површи ZP .

Могуће је направити аналогију између деформације и настанка деформационог рада, који се јавља у ZP под дејством спољњег притиска, који проузрокују сперматозооиди. Ако претпоставимо да минималне и максималне вредности

специфичног деформационог рада ZP у некој области доприносе продору сперматозоида након деформације ZP настале услед утицаја великог броја сперматозоида на површину ZP у виду дискретног континуума.

Да би добили укупан деформациони рад за целу структуру ZP требало би сумирати (интегралити) специфичне деформационе радове свих запреминских елемената:

$$\mathbf{A}_{def} = \iiint_V \mathbf{A}'_{def} dV = \int_{R_i}^{R_o} \int_0^{2\pi} \int_{\frac{\pi}{2}}^{\frac{\pi}{2}} \mathbf{G} \frac{3a^2}{2} \left[(2+3\mu k)b^2 + \frac{c^2}{r^6} \right] r^2 \cos \psi dr d\varphi d\psi, \quad (4.57)$$

и у коначном облику:

$$\mathbf{A}_{def} = -6\mathbf{G}a^2 \left[(2+3\mu k)b^2 R_i^3 \frac{1-\psi^3}{3} - 3c^2 \frac{\psi^2-1}{R_o^2} \right], \quad (4.58)$$

Укупан деформациони рад-еластични потенцијал целокупоне ZP изражен преко геометријских и параметарских утицаја је:

$$\mathbf{A}_{def} = -\frac{6}{\mathbf{G}(1-\psi^3)^2} \left[\frac{(2+3\mu k)}{12(1+3\mu k)^2} (1-\psi^3)(\psi^3 p_i - p_o)^2 R_o^3 - \frac{3}{4} \psi^6 (\psi^2-1)(p_i - p_o)^2 \frac{1}{R_i^2} \right], \quad (4.59)$$

За случај да је притисак распоређен само на спољашњој контурној површи укупан деформациони рад има следећи облик:

$$\mathbf{A}_{def} = -\frac{6}{\mathbf{G}(1-\psi^3)^2} \left[\frac{(2+3\mu k)}{12(1+3\mu k)^2} (1-\psi^3)(p_o)^2 R_o^3 - \frac{3}{4} \psi^6 (\psi^2-1)(p_o)^2 \frac{1}{R_i^2} \right], \quad (4.60)$$

4.5.4. Динамички континуални модел ZP

Сада ћемо разматрати случај динамике континуалног модела ZP када ударни притисци (у радијаном правцу) на контурним површинама ZP модела у почетном тренутку врше централно симетрични поремећај природног ненапрегнутог стања ZP тј. посматраћемо утицај сперматозооида који импулсно дејствују на повшину ZP. Тада ће материјалне тачке ZP осциловати у радијалном правцу централно симетрично. Парцијалне диференцијалне једначине осциловања материјалних тачака ZP континуалног модела (модел шупље сфере) у радијалном правцу је:

$$\mathbf{G}(\Delta\vec{s} + kgr\text{div}\vec{s}) + \vec{F}_v = \rho \frac{\partial^2 \vec{s}}{\partial t^2}, \quad (4.61)$$

Где је $\vec{s}(r,t) = s(r,t)\frac{\vec{r}}{r}$ померање материјалне тачке континуума у радијалном правцу, \mathbf{G} је модул смицања \vec{F}_v , специфична запреминска сила која се може занемарити, $\rho \frac{\partial^2 \vec{s}}{\partial t^2}$ специфична сила инерције масе ZP, ρ - густина ZP као биоматеријала, $\frac{\partial^2 \vec{s}}{\partial t^2}$ убрзање јединичне масе ZP, $k = \frac{1}{1-2\mu}$, μ је Poisson-ов коефицијент попречне контракције, $grad$ - $gradient$ диференцијални вектор оператор, div - скаларни диференцијални оператор, Δ - $Laplace$ -ов диференцијални оператор у сферном координатном систему и има облик:

$$\Delta = \frac{\partial^2}{\partial r^2} + \frac{1}{r^2 \cos^2 \psi} \frac{\partial^2}{\partial \varphi^2} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2}{\partial \psi^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial}{\partial r} - \frac{\text{tg} \psi}{r^2} \frac{\partial}{\partial \psi}, \quad (4.62)$$

Претпоставили смо да је померање материјалне тачке у ZP моделу производ две функције $\tilde{s}(r)$ и $T(t)$ и решење парцијалне диференцијалне једначине (4.61) је могуће претпоставити у облику:

$$\vec{s}(r,t) = s(r,t) \frac{\vec{r}}{r} = \tilde{s}(r) T(t) \frac{\vec{r}}{r}, \quad (4.63)$$

Када израз (4.63) заменимо у (4.61) добијемо:

$$T(t) \mathbf{G}(1+k) \text{grad div} \left[\tilde{s}(r) \frac{\vec{r}}{r} \right] = \rho \ddot{T}(t) \tilde{s}(r) \frac{\vec{r}}{r}, \quad (4.64)$$

Или као:

$$\mathbf{G}(1+k) \text{grad div} \left[\tilde{s}(r) \frac{\vec{r}}{r} \right] = \rho \frac{\ddot{T}(t)}{T(t)} \tilde{s}(r) \frac{\vec{r}}{r}, \quad (4.65)$$

Или као:

$$\frac{\mathbf{G}(1+k)}{\rho} \frac{d}{dr} \left\langle \tilde{s}(r) + 2 \frac{\tilde{s}(r)}{r} \right\rangle = \frac{\ddot{T}(t)}{T(t)} = \mp \omega^2, \quad (4.66)$$

Где смо увели непознати параметар $\mp \omega^2$ који је константан. Ако уведемо да је:

$$\omega^2 = \lambda^2 \frac{\mathbf{G}(1+k)}{\rho}, \quad (4.67)$$

Из једначине (4.66) добијамо две обичне диференцијалне једначине свака са по једном варијаблом-координатом и временом у следећем облику:

$$\ddot{T}(t) + \omega^2 T(t) = 0, \quad (4.68)$$

$$\frac{d}{dr} \left\langle \tilde{s}(r) + 2 \frac{\tilde{s}(r)}{r} \right\rangle + \lambda^2 \tilde{s}(r) = 0, \quad (4.69)$$

Или у облику:

$$\ddot{T}(t) + \omega^2 T(t) = 0, \quad (4.70)$$

$$\tilde{s}''(r) + 2\frac{\tilde{s}'(r)}{r} + \left(\lambda^2 - \frac{2}{r^2}\right)\tilde{s}(r) = 0 \quad (4.71)$$

Прва обична диференцијална једначина (4.70) је позната и има решење у облику:

$$T(t) = A \cos \omega t + B \sin \omega t, \quad (4.72)$$

Где је ω сопствена кружна фреквенција слободних осцилација а, A и B су интеграционе константе одређене почетним условима. Проблем је решити другу нелинеарну диференцијалну једначину, (4.71). Решење $\tilde{s}(r)$ представља сопствену амплитудну функцију на граничној сферној контурној површи. Обична диференцијална једначина (4.71) је слична *Bessel*-овој диференцијалној једначини и неопходно је наћи неку заменску варијаблу да би се решила ова нелинеарна диференцијална једначина. Ова диференцијална једначина се може решити нумеричком методом и употребом компјутерског софтверског алата. Што се тиче аналитичког решења оно остаје отворено.

Можемо да закључимо да специфични деформациони рад – еластичи потенцијал квазистатичког модела *ZP* у одређеној тачки зависи од полупречника сферних контурних површина, квадрата спољашњег и унутрашњег континуираног притиска, растојања тачке од центра сфере r са односом r^{-6} , од односа спољашњег и унутрашњег полупречника сфере ψ^6 .

Специфични деформациони рад целе *ZP* у моделу је обрнуто пропорционалан модулу смицања. Имајући у виду да је разматрани модел статички, специфични деформациони рад *ZP* у одговарајућој тачки у току процеса оплодње се може сматрати еластичним потенцијалом, који може да одбије неки од долазећих сперматозооида или пак омогући продор сперматозооида у тачки са минималним специфичним деформационим радом. Може се направити аналогија са хипотезама о критичним вредностима специфичног деформационог рада који преази границу издржљивости материјала у некој од области *ZP*. Хипотезе би се односиле или на укупан специфични деформациони рад, могуће деформације у некој области или тачки модела шупље сфере *ZP*, или на делове који се троше само на промену

облика, или пак само на делове који се односе на промену облика деформацијом и помоћу достигнуте минималне вредности неког од тих делова специфичног деформационог рада у одговарајућој тачки.

Критеријуми издржљивости материјала модела се могу везати и за максимални дозвољени нормални напон у радијалном правцу при коме долази до "оштећења" услед импулсног дејства сперматозоида. Била би неопходна и експериментална истраживања издржљивости материјала ZP на истезање или друге врсте простих напрезања (увијање, смицање, извијање, савијање) и одређивање напона разарања материјала. Хипотезе о издржљивости материјала су аналог хипотезама о пластичном течењу материјала.

Ако се ради о издржљивости материјала говоримо о највећим дозвољеним напонима и највећем специфичном деформационом раду који не доводе до оштећења материјала у некој тачки за крте материјале или не доведе до пластичног течења за вискоеластичне материјале.

Ако пак, говоримо о хипотезама о пластичном деформисању и течењу, онда тражимо најмање напоне и најмањи специфични деформациони рад који ће у некој тачки довести до оштећења материјала ако је материјал крт, или пластичног течења ако је материјал вискоеластичан, као материјал ZP .

На основу ових хипотеза о издржљивости материјала доводимо у вези способност импулсног дејства сперматозоида да изазове критичну деформацију материјала ZP у нападној тачки при критичном нормалном напону и критичном специфичном деформационом раду који се при том јавља у ZP .

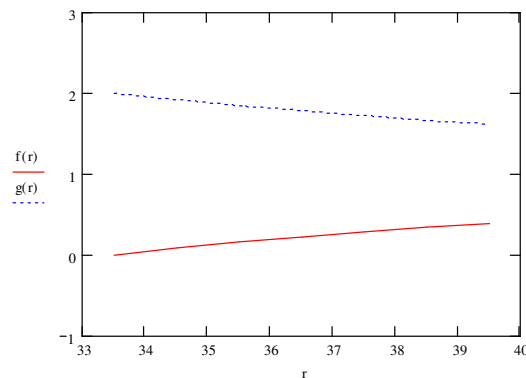
Критични деформациони рад у одређеној тачки би могао да доведе до слабења материјала ZP и њеног пластичног течења, да иницира процес пластичне деформације.

Сада нас интересује нумеричка анализа како напон, дилатација, запреминска дилатација и специфични деформациони рад зависе од: растојања тачке у ZP од центра сфере, дебљине ZP , односа унутрашњег и спољашњег полупречника, спољњег притиска- броја сперматозоида, који дејствују на спољашњу контурну површину континуалног модела ZP .

Користићемо параметре, који се односе на својства материјала позната из литературе за јајну ћелију миша. Димензије јајне ћелије миша и дебљина ZP узети

су из (Wassarman & Litscher, 2012). $R_s = 40\mu\text{m}$, $R_i = 33.5\mu\text{m}$, односно дебљина ZP у недеформисаном стању износи $\delta = R_0 - R_i = 6,5\mu\text{m}$. Вредности за модул смицања узет је из (Glozman & Azhari, 2010) и одговарају агарозно-желатинским геловима и има вредност $7,1 \pm 2,1 \text{ kPa}$. За μ -Poisson-ов коефицијент попречне контракције узета је вредност 0.45. С обзиром да не постоје експерименталне вредности притиска, коју један сперматозоид генерише на врху главе при импулсном удару (постоје подаци колики је рад по ћелији $4,6 \times 10^{-16} \text{ J}$ по пулсу, амплитуда $9,8 \pm 2,6 \text{ Nn}$, фреквенција $3,5\text{-}19,5 \text{ Hz}$, али немамо површину контакта, коју глава сперматозоида остварује при судару са ZP и упитању су вредности које се односе на сперматозоид говечета) (Allen et al, 2010), притисак који стварају сперматозоиди на спољњу контурну површи ZP узет је арбитарно као $100 \text{ pN} / \mu\text{m}^2$.

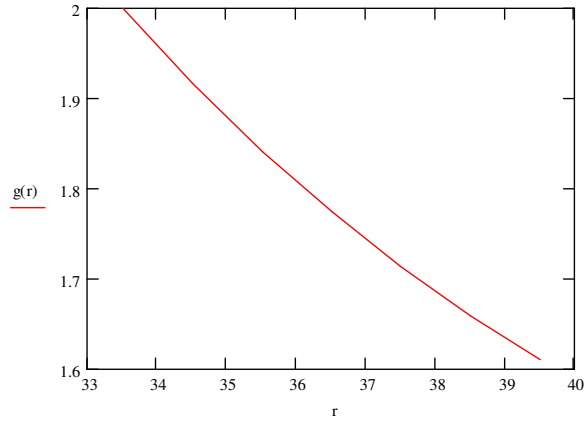
Компонентни нормални напони у радијалном (σ_r), $f(r)$ односно циркуларном (σ_c) и меридијалном (σ_m) правцу $g(r)$ као функције растојања тачке од центра сфере r су приказани на слици 4.27.



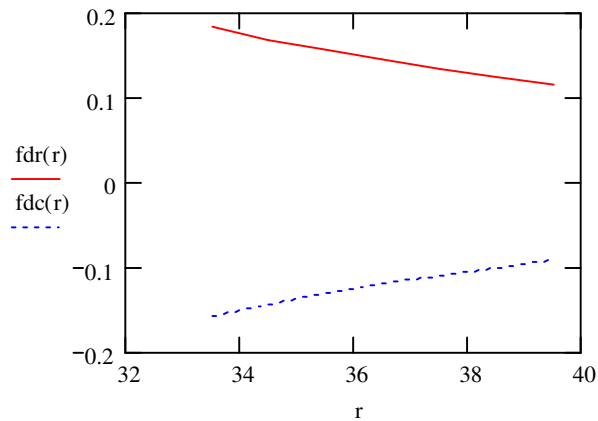
Слика 4.27. График нормалних компонентних напона у радијалном $f(r)$ односно циркуларном и меридијалном правцу $g(r)$ као функције растојања тачке од центра сфере r .

Што је растојање од центра сфере веће то је радијална компонента нормалног напона σ_r већа, а циркуларна и меридијална нормалног напона $\sigma_c = \sigma_m$

се смањују. (слика 4.28.). Радијална компонента напона је већа у тачкама при спољњој контурној површи.

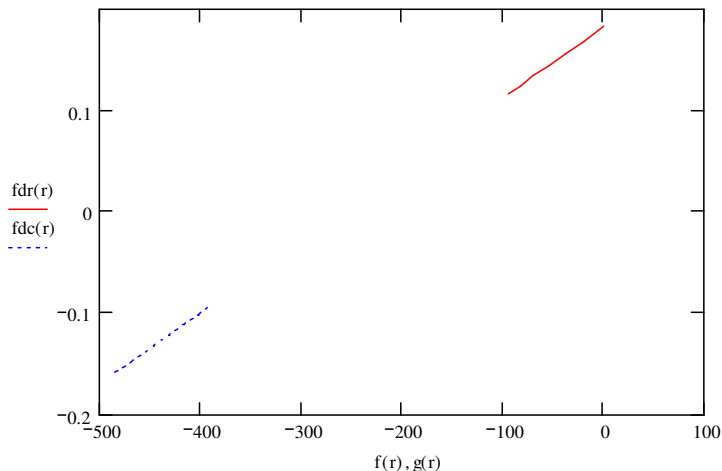


Слика 4.28. График нормалног напона $\sigma_c = \sigma_m$ у циркуларном и мердијалном правцу, као функција $g(r)$ у зависности од растојања тачке од центра сфере r .



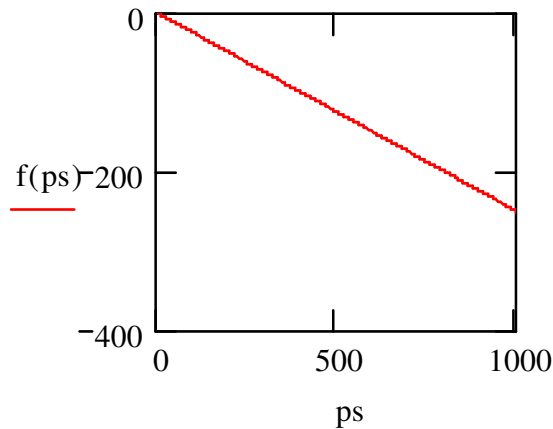
Слика 4.29. График функције специфичне деформације ϵ_r у радијалном $fdr(r)$ односно $\epsilon_c = \epsilon_m$ у циркуларном и мердијалном правцу $fdc(r)$ у зависности растојања тачке од центра сфере r за вредности модула смицања 710Pa. из (Glozman & Azhari, 2010) и арбитрарно узете вредности за притисак од 100pN/ μm^2 .

Крива напон деформација $\sigma_r(\varepsilon_r)$ и $\sigma_c(\varepsilon_c = \varepsilon_m) = \sigma_m(\varepsilon_c = \varepsilon_m)$ за поменуте услове приказана је на слици 4.30.



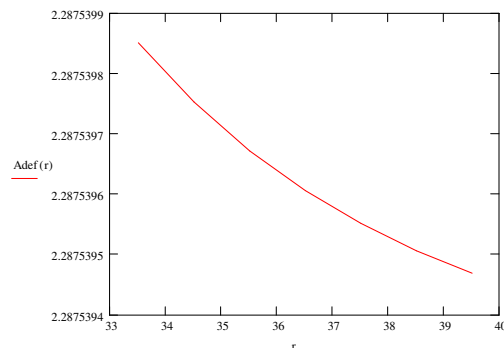
Слика 4.30. Криве напон деформација $\sigma_r(\varepsilon_r)$ и у радијалном $f(r)/fdr(r)$ односно $\sigma_c(\varepsilon_c = \varepsilon_m) = \sigma_m(\varepsilon_c = \varepsilon_m)$ циркуларном и меридијаном правцу $g(r)/fdc(r)$.

Како запреминска дилатација ε_v зависи од вредности спољњег притиска (0-1000 pN/ μm^2) приказано је на слици 4.31. Видимо да се са повећањем спољњег притиска повећава апсолутна вредност запреминске дилатације, као и да је она негативна јер се ради о компресији запремине. У *ZP* долази до већих запреминских негативних дилатација-компресија, када велики број сперматозоида импулсним силама удара на *ZP* доводећи до њене компресије.



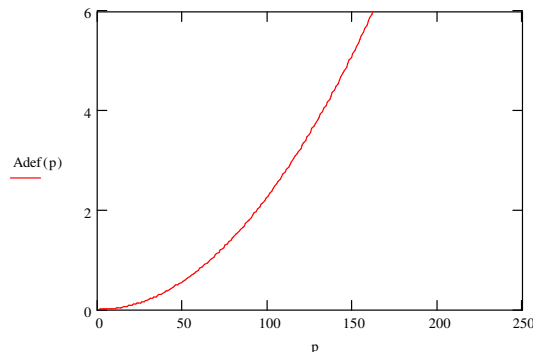
Слика 4.31. Запреминска дилатација $\varepsilon_v(p_s)$ - $f(ps)$ у зависности од спољњег притиска p_s расподељеног по спољашњој контурној сферној површи. Са повећањем спољњег притиска тј броја сперматозооида који врше притисак на спољњу контуру ZP повећава се апсолутна вредност интензитета запреминске дилатације- компресије. (негативане вредности на графику).

Специфични деформациони рад A'_{def} у зависности од растојања r тачке $N(r, \varphi, \vartheta)$ од центра сфере приказан је на слици. 4.32. Притисак арбитарно узет као $100 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$. На основу графика закључујемо да што је тачка $N(r, \varphi, \vartheta)$ ближе површини јајне ћелије специфични деформациони рад $A'_{def}(r)$ је мањи.

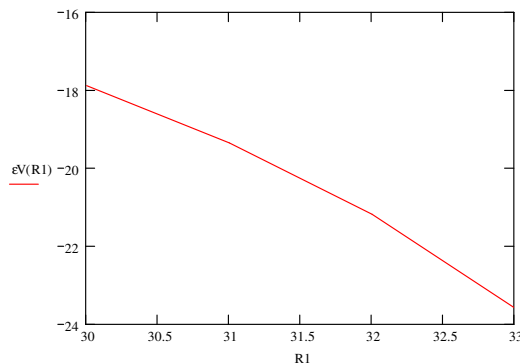


Слика 4.32. График специфичног деформационог рада $A'_{def}(r)$ у зависности од растојања r тачке $N(r, \varphi, \vartheta)$ од центра сфере.

Како специфични деформациони рад $\mathbf{A}'_{def}(p_0, r)$ зависи и од притиска p_0 на растојању $r = 36\mu m$ од центра сфере приказано је на слици 4.33. Што је спољњи притисак p_0 већи већи је и деформациони рад. Зависност није линеарна већ је у виду параболое. У свим тачкама $N(r = const, \varphi, \vartheta)$ на сферној површи $R_{i \leq} r = const \leq R_0$ специфични деформациони рад $\mathbf{A}'_{def}(p_0, r = const) = const1$, што је последица централне симетрије модела и претпостављеног оптерећења притиском.



Слика 4.33. График специфичног деформационог рада $\mathbf{A}_{def}(p_0)$ у зависности од притиска p_0 у тачкама $N(r, \varphi, \vartheta)$ на растојању $r = 36\mu m$ од центра сфере.



Слика 4.34. График запреминска дилатација $\varepsilon_V(R_i)$ - $sV(R_1)$ у зависности од величине унутршњег полупречника јајне ћелије миша

На основу дијаграма са слике 4.34 видимо да што је ZP дебља то је већа запреминска дилатација $\varepsilon_V(R_i)$ уколико су остале вредности параметара модела константне.

4.6. Вишеслојни дискретно континуални модел осцилаторне сферне мреже ZP миша

Модел осцилаторне сферне мреже ZP миша о коме је до сада било речи је једнослојни модел и погодан је за објашњење иницијалне пенетрације сперматозооида. Да би смо проучавали процес продора сперматозооида морали бисмо да узмемо у обзир да се у ZP могу издвојити два структурно и биомеханички различита слоја - унутрашњи и спољашњи. Стога ће укратко бити изложена идеја мало напреднијег, двослојног модела осцилаторне сферне мреже ZP миша. Због вискоеластичних својстава ZP двослојни модел има својства фракционог реда што даје основа да се елементи фракционог рачуна (*Lazarević, 2015, Lazarević & Bućanović, 2012, Rapajić et al, 2015*) примене на овај биомеханички систем. Укратко ће бити разматрана осцилаторна својства двослојног модела.

За време процеса сазревања оба слоја ZP показују фину филаментозну структуру. Како се дужина филамената повећава, смањује се њихова дебљина. Након оплодње филаменти делимично враћају особине, које су имали када је ZP била незрела, постајући поново краћи и дебљи. (*Papi et al, 2013, 2012*). На SEM -у и TEM -у могу се разликовати два слоја ZP : спољњи, са грубим сунђерастим изгледом и унутрашњи са мањим фенестрацијама и глатком фиброзном мрежом. Оваква структура ZP зреле јајне ћелије спремне за оплодњу постоји скоро код свих сисара (*Martinova et al, 2008, Familiari et al, 2006*) иако постоје варијације у њеном саставу код различитих врста (*Familiari et al, 2006*).

De facto, ZP је екстрацелуларни матрикс (ECM), који се састоји од дугих међусобно повезаних филамената, који граде $3D$ структуру налик мрежи, која се формира у току раста јајне ћелије. Код миша у периоду од 2-3 недеље, јајна

ћелија, која расте синтетички и секретује *ZP* гликопротеине који се затим ван јајне ћелије повезују у *ECM*- тј *Zona-у pelucida-у* (Jovine et al, 2007). И ако начин повезивања *ZP* гликопротеина није још увек познат до детаља, Jovine et al (2007) су открили, који део *ZP* молекула је одговоран за повезивање *ZP* и регулацију процеса полимеризације насцентних *ZP* гликопротеина. Истраживања показују да *ZP* домен ради као полимеризациони модул. Општи механизам повезивања свих протеина, који поседују *ZP* домен је комбинација протеолизе и полимеризације (Jovine et al, 2007). Постојање разлике у структури унутрашњег и спољашњег слоја *ZP* је највероватније повезано са њеним различитим механичким својствима (Papi et al, 2012) и највероватније има утицај на механизам продора сперматозооида кроз дебљину *ZP* као и на феномен *polyspermy block*-а (Papi et al, 2013).

Осцилаторни модел оплодње полази од претпоставке да до оплодње долази када се *ZP* нађе у погодном осцилаторном стању за оплодњу- стање када већи број молекула *ZP* осцилује у вишефреквентном режиму без губитка енергије (у линеарно еластичном моделу) или са дисипацијом енергије фракционог реда (у моделу *ZP* фракционог реда) (Hedrih (Stevanović) & Hedrih, 2014a, Hedrih (Stevanović) & Machado, 2014) периодично по правилној путањи.

Ни досадашњи механички модели, који полазе од претпоставке да се *ZP* понаша као идеално еластично тело, као ни једнослојни осцилаторни модел (Hedrih et al, 2013a, 2015) који укључује идеално еластичне везе између молекула *ZP* не може да објасни вискоеластична својства *ZP* у одговору на механички притисак која су добијена у експериментима (Papi et al, 2013, 2012).

Коришћењем метода коначних елемената могуће је моделовати *ZP* и јајну ћелију као *3D* објекте. (Hedrih & Ugrcic, 2012, Hedrih & Banic, 2016). Нумерички експерименти (Hedrih & Banic, 2016) су показали да се *ZP* у иницијалној интеракцији са сперматозооидом понаша као вискоеластично тело и предложили као могући механизам продора осцилације релаксације. У теоријском разматрању енергије веза између молекула *ZP* као и механичке силе, коју може да генерише један сперматозооид (Green & Purves, 1984) долазе на идеју да је могући механизам продора сперматозооида у том случају напонска релаксација или да *ZP* мора да се налази у течном стању. „Израчуната сила коју може да генерише

појединачни сперматозоид је сувише мала да би изазвала руптуру било које осим најслабијих секундарних хемијских веза. Механичко напредовање сперматозоида кроз *ZP* би онда морало да се заснива на напонској релаксацији кроз вискоеластични медијум. Познате особине *ZP* су у складу са оваквим механизмом пенетрације” (*Green & Purves, 1984, као и Hedrih and Banić 2016*).

Претпостављамо да постоје разлике у понашању једнослојене и вишеслојене дискретно континуалне структуре-да ће вишеслојна структура другачије реаговати када кроз њу продире сперматозоид; да ће неки сперматозоиди остати закачени-заробљени у спољњем слоју, а да ће само један сперматозоид продрети у доњи слој; да механизам продора није најјачи притисак који потенцијално може да поцепи структуру *ZP* већ је могуће да је то најмања сила отпора, која се ствара у одговору на механичко дејство сперматозоида, које је еквивалентно спољној принудној сили (*Hedrih & Banic, 2016, Papi et al, 2013*).

Циљ наредних истраживања је креирање сложенијег вишеслојог модела *ZP* који би боље описао структуру и осцилаторно понашање реалног биолошког система. Основна идеја је да се помоћу двослојног модела објасни продор сперматозоида кроз дебљину *ZP* са биомеханичког становишта. То је за сада само отворени правац комплексног мултидисциплинарног истраживања за већи истраживачки тим. Ми ћемо овде само приказати основне структуре вишеслојног модела.

4.6.1. Основни концепт двослојног осцилаторног дискретно континуалног сферног модела *ZP*

Двослојни осцилаторни дискретно континуални модел *ZP* је побољшани једнослојни осцилаторни дискретно континуални модел *ZP* (*Hedrih et al, 2013a, 2013b, 2013c, 2015*). У двослојни модел смо унели две нове варијабле-мрежу у два слоја и виско-еластични тип веза између молекула *ZP*.

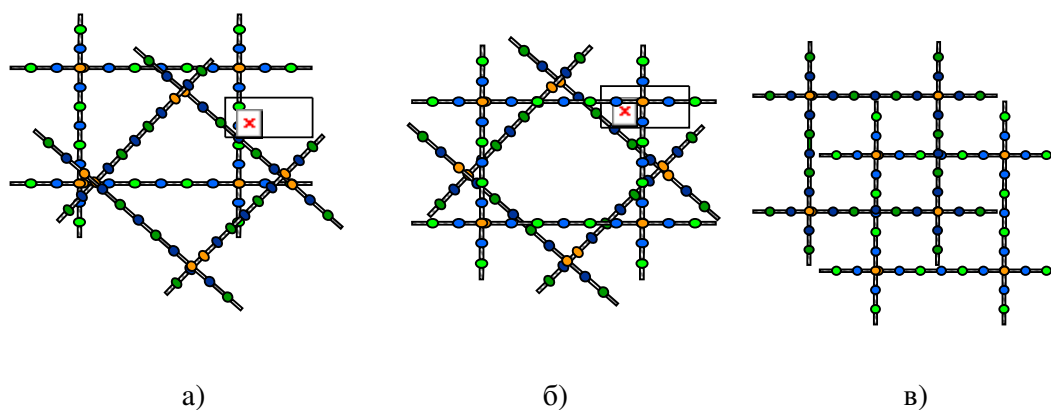
У двослојном осцилаторном моделу *ZP*, везе између *ZP* гликопротеина су моделоване као везе са виско-еластичним својствима коришћењем фракционог рачуна чиме се покрива осцилаторно понашање овог система од идеално

еластичног до вискозног. То представља напредак у односу на једнослојни модел, јер модел са везама које имају фракциона својства (*Lazarević, 2012, 2013, 2014a, 2014b*) може да објасни промену у механичким својствима пре, у току и после полодње (*Papi et al, 2012, 2013*).

Друга предност је што је модел двослојан: у реалном систему *ZP* је вишеслојна (*Martinova et al, 2008, Familiari et al, 2006*) у којој се на *SEM*-у јасно могу идентификовати два слоја - спољни са већим фенестрацијама-крупнија окца мреже и унутрашњи компактнији са мањим фенестрацијама - синтнијим окцима мреже.

С обзиром да не знамо на који начин су филаменти уређени по слојевима, као и какав је однос филамената по слојевима предложи смо више различитих варијанти односа два слоја у мрежи.

Две идентичне мреже које могу бити постављене једна у односу на другу на различите начине. Види слику 4.35.

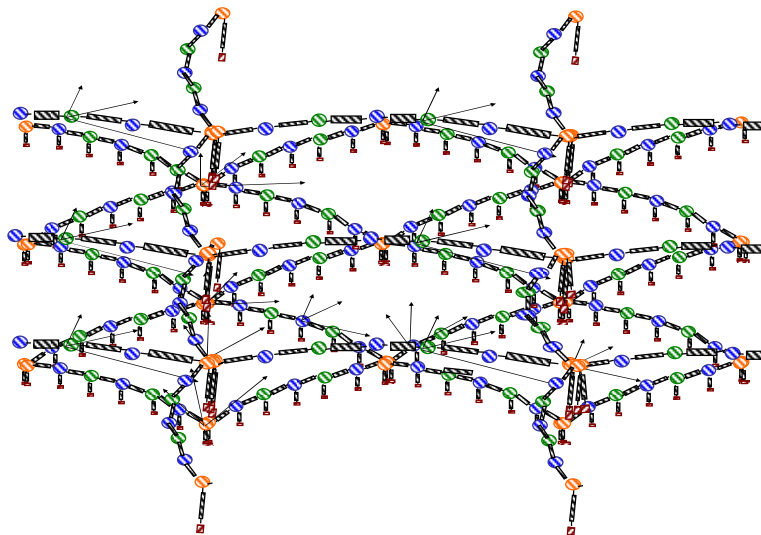


Слика 4.35. Неке варијанте могућих начина преклапања две мреже у двослојном осцилаторном моделу *ZP* са својствима фракционог реда-репрезентативни сегмент. Публиковано у (*Hedrih & Lazarević, 2015*).

Под претпоставком да су оба слоја идентичног састава и геометрије, а да је њихово уређење правилно, дати су примери изгледа двослојне мреже на слици 4.35. Сваки молекул је повезан за два суседна молекула у ланцу и за површину

јајне ћелије вискоеластичним везама. Поред тога на неким местима, где се горњи и доњи слој мреже преклапају (чворне тачке или пак *ZP2* гликопротеин у случају као на Слици 4.35в, мреже су међусобно повезане преко тих молекула.

Случај када је састав горњег и доњег слоја мреже идентичан, а доња мрежа ротирана у односу на горњу под углом од 45° , тако да се поклапају по чворним тачкама по дијагонали, приказан је на сликама (4.36 и 4.37). Мрежа чије су странице дијагонале квадрата је горња мрежа и њена окца су већег дијаметра од доње мреже што би одговарало експерименталним резултатима (*Martinova et al, 2008, Familiari et al, 2006*). У осцилаторном стању ове релације зависе од померања чворних молекула у двослојној осцилатроној мрежи. Сваки слој се састоји од ортогоналних циркуларних и меридијалних ланаца. У анализи осцилаторног понашања двослојне осцилаторне *ZP* мреже користићемо већ поменути репрезентативни део мреже (Слике 4.36. и 4.37). Двослојни *ZP* сегмент се састоји од два идентична сегмента –сваки има два циркуларна и два меридијална ланца, али су они постављени под углом од 45° горњи у односу на доњи сегмент. Сваки ланац се састоји од по 11 молекула распоређених на специфичан начин (*Hedrih et al, 2013a, 2015*) и повезаних помоћу стандардног лаког елемента фракционог реда. Ланци у горњој мрежи који повезују чворне молекуле дуж радијалних праваца се могу сматрати исто као и ланци у радијалном правцу са два степена слободe. Осцилаторно понашање сваког ланца са по 11 степени слободe се описује помоћу система обичних диференцијалних једначина фракционог реда изражених помоћу померања молекула у правцу ланца. За померање сваког молекула у радијалном правцу могу се написати по две диференцијалне једначине фракционог реда. За померање чворних молекула постоји трокомпонентно померање у циркуларном, меридијалном и радијалном правцу.

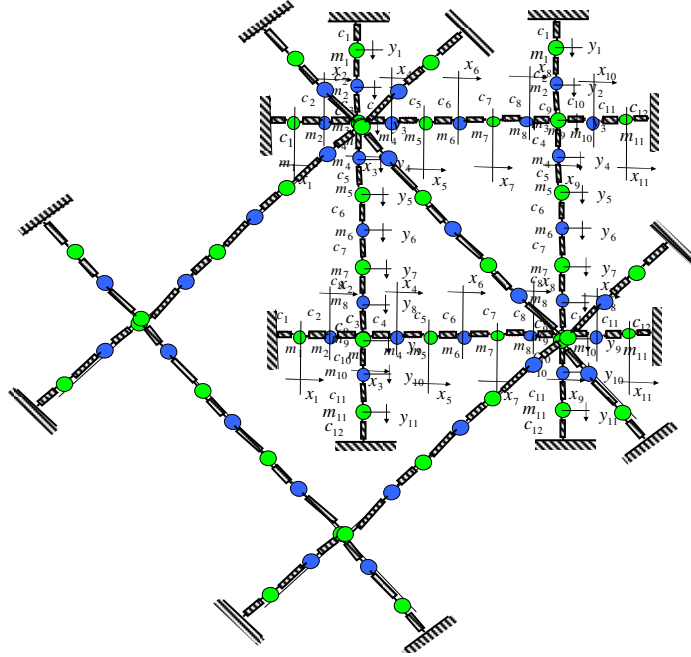


Слика 4. 36. Репрезентативни део двослојне дискретно-континуалне мреже у моделу дискретно-континуалне осцилатроне сферне мреже *ZP*. Публиковано у (Hedrih & Lazarević, 2015).

Приликом израчунавања резултујућег померања чворних молекула који повезују две мреже, мора се узети у обзир да су ланци у горњој и доњој мрежи под углом од 45° једни у односу на друге.

Ортогонални ланци припадају двома концентричним сферним површима - омотачима око сфере јајне ћелије, у којима су ланци међусобно ортогонално постављени. Сферене мреже су централно симетрично постављене у односу на центар сферне површи јајне ћелије. Могуће је направити општи модел ланаца и анализирати кинетичке параметре сопствених осцилација фракционог реда. Узимајући у обзир положај компонентног померања сваког молекула у простору могуће је израчунати резултујућа вишефреквентна осцилаторна померања.

Систем обичних диференцијалних једначина фракционог реда који описује осцилације ланаца са 11 молекула за репрезентативни сегмент доње (унутрашње) мреже (слика 4.37) је:



Слика 4.37. Репрезентативни део двослојне мреже у двослојном дискретно-комтинуалном осцилаторном моделу ZP са фракционим својствима. Публиковано у (Hedrih & Lazarević, 2015).

- за молекуле у циркуларним ланцима:

$$m_{k,j} \ddot{u}_{k,j}(t) + c_{0(k-1,k),j} [u_{k,j}(t) - u_{k-1,j}(t)] - c_{0(k,k+1),j} [u_{k+1,j}(t) - u_{k,j}(t)] + c_{0 \leq \alpha \leq 1(k-1,k),j} D_t^\alpha [u_{k,j}(t) - u_{k-1,j}(t)] - c_{0 \leq \alpha \leq 1(k,k+1),j} D_t^\alpha [u_{k+1,j}(t) - u_{k,j}(t)] = 0$$

$$k = 1, 2, 3, \dots, 11, j = 1, 3, \quad 0 \leq \alpha \leq 1 \quad (4.73)$$

- за молекуле у мердијалним ланцима:

$$m_{k,j} \ddot{v}_{k,j}(t) + c_{0(k-1,k),j} [v_{k,j}(t) - v_{k-1,j}(t)] - c_{0(k,k+1),j} [v_{k+1,j}(t) - v_{k,j}(t)] + c_{0 \leq \alpha \leq 1(k-1,k),j} D_t^\alpha [v_{k,j}(t) - v_{k-1,j}(t)] - c_{0 \leq \alpha \leq 1(k,k+1),j} D_t^\alpha [v_{k+1,j}(t) - v_{k,j}(t)] = 0$$

$$k = 1, 2, 3, \dots, 11, j = 2, 4, \quad 0 \leq \alpha \leq 1 \quad (4.74)$$

- за радијална померања за све молекуле у унутрашњој мрежи изузев чворних молекула преко којих је унутрашња мрежа повезана са чворним молекулима спољашње мреже:

$$\tilde{m}_{k,j} \ddot{w}_{k,j}(t) + \tilde{c}_{0(k,j),j} w_{k,j}(t) + c_{0 \leq \alpha \leq 1(k,j)} D_t^\alpha [w_{k,j}(t)] = 0 \quad k, j = 1, 2, 3, \dots, 11, \quad k \neq 3, \quad k \neq 9, \quad 0 \leq \alpha \leq 1 \quad (4.75)$$

- За радијална померања за чворне молекуле који повезују унутрашњу и спољашњу мрежу и повезују ZP са површином јајне ћелије помоћу стандардног лаког елемента фракционог реда:

$$\begin{aligned} \tilde{m}_{k,j} \ddot{w}_{k,j}(t) + \tilde{c}_{00(k,j),j} w_{k,j}(t) - \tilde{c}_{0(k,j),j} [\tilde{w}_{k,j}(t) - w_{k,j}(t)] - \tilde{c}_{0 \leq \alpha \leq 1(k,j)} D_t^\alpha [\tilde{w}_{k,j}(t) - w_{k,j}(t)] + \\ + \tilde{c}_{0,0 \leq \alpha \leq 1(k,j)} D_t^\alpha [w_{k,j}(t)] = 0 \\ k = 3, \quad u / или \quad k = 9, \quad j = 3, \quad u / или \quad j = 9, \quad 0 \leq \alpha \leq 1 \end{aligned} \quad (4.76)$$

$$\begin{aligned} \tilde{m}_{k,j} \ddot{w}_{k,j}(t) + \tilde{c}_{0(k,j),j} [\tilde{w}_{k,j}(t) - w_{k,j}(t)] + \tilde{c}_{0 \leq \alpha \leq 1(k,j)} D_t^\alpha [\tilde{w}_{k,j}(t) - w_{k,j}(t)] = 0 \\ k = 3, \quad u / или \quad k = 9, \quad j = 3, \quad u / или \quad j = 9, \quad 0 \leq \alpha \leq 1 \end{aligned} \quad (4.77)$$

Систем обичних диференцијалних једначина фракционог реда који описује осцилације ланца са 11 молекула за репрезентативни сегмент горње (спољашње) мреже је:

- за молекуле у циркуларним ланцима (под углом од 45° у односу на циркуларне ланце у унутрашњој мрежи):

•

$$\begin{aligned} m_{k,j} \ddot{u}_{k,j}(t) + c_{0(k-1,k),j} [\tilde{u}_{k,j}(t) - \tilde{u}_{k-1,j}(t)] - c_{0(k,k+1),j} [\tilde{u}_{k+1,j}(t) - \tilde{u}_{k,j}(t)] + c_{0 \leq \alpha \leq 1(k-1,k),j} D_t^\alpha [\tilde{u}_{k,j}(t) - \tilde{u}_{k-1,j}(t)] - \\ - c_{0 \leq \alpha \leq 1(k,k+1),j} D_t^\alpha [\tilde{u}_{k+1,j}(t) - \tilde{u}_{k,j}(t)] = 0 \end{aligned}$$

$$k = 1, 2, 3, \dots, 11, \quad j = 1, 3, \quad 0 \leq \alpha \leq 1 \quad (4.78)$$

- за молекуле у меридијалним правцима (под углом од 45° у односу на меридијалне ланце у унутрашњој мрежи):

$$\begin{aligned}
& m_{k,j} \ddot{\tilde{v}}_{k,j}(t) + c_{0(k-1,k),j} [\tilde{v}_{k,j}(t) - \tilde{v}_{k-1,j}(t)] - c_{0(k,k+1),j} [\tilde{v}_{k+1,j}(t) - \tilde{v}_{k,j}(t)] + c_{0 \leq \alpha \leq 1(k-1,k),j} D_t^\alpha [\tilde{v}_{k,j}(t) - \tilde{v}_{k-1,j}(t)] - \\
& - c_{0 \leq \alpha \leq 1(k,k+1),j} D_t^\alpha [\tilde{v}_{k+1,j}(t) - \tilde{v}_{k,j}(t)] = 0 \\
& k = 1, 2, 3, \dots, 11, j = 2, 4, \quad 0 \leq \alpha \leq 1
\end{aligned} \tag{4.79}$$

где $u_{k,j}(t)$, $v_{k,j}(t)$ и $w_{k,j}(t)$ представљају редом компонентна померања у циркуларном, меридијалном и радијалном правцу молекула репрезентативног сегмента унутрашње мреже а, $\tilde{u}_{k,j}(t)$, $\tilde{v}_{k,j}(t)$ и $\tilde{w}_{k,j}(t)$ компонентна померања молекула у циркуларном, меридијалном и радијалном правцу репрезентативног сегмента спољне, $D_t^\alpha[\bullet]$ је диференцијални оператор фракционог реда α^{th} , у зависности од времена t и има следећи облик:

$$D_t^\alpha[\bullet] = \frac{d^\alpha[\bullet]}{dt^\alpha} = \frac{1}{\Gamma(1-\alpha)} \frac{d}{dt} \int_0^t \frac{[\bullet]}{(t-\tau)^\alpha} d\tau \tag{4.80}$$

$\Gamma(1-\alpha)$ је *Euler Gamma* функција, а $c_{0(k,k+1)}$ и $c_{\alpha(k,k+1)}$ су коефицијенти крутости – тренутни (изражава идеално еластична својства матерјала) и одложени (изражава дисипациона својства фракционог реда). α рационални број између 0 и 1, $0 < \alpha < 1$, који изражава еластична својства и дисипациона својства фракционог реда стандардног лаког елемента фракционог реда.

Сви молекули у двослојној осцилаторној мрежи су повезани са површином јајне ћелије у радијалном правцу.

Диференцијалне једначине фракционог реда, које описују осцилације молекула у спољашњој и унутрашњој мрежи у радијалном правцу су исте као и у једначинама (4.75), (4.76) и (4.77).

Молекули у двослојној осцилаторној мрежи *ZP* осцилују у режиму фракционог реда са по 11 модова фракционог реда након иницијалне пертурбације изазване импулсним дејством сперматозоида на одређени молекул. То се дешава када се саопште почетне брзине молекулима у спољњој/унутрашњој мрежи двослојне осцилаторне мреже *ZP* фракционог реда у циркуларниом односно меридијалном правцу. Компонентни сопствени осцилаторни модови фракционог реда за молекуле у осцилатроном режиму фракционог реда су у

форми партикуларних решења, која имају форму налик синусној $T_{s,\sin}(t, \alpha)$ односно налик косинусној $T_{s,\cos}(t, \alpha)$ (Hedrih (Stevanović) & Hedrih, 2014, Hedrih (Stevanović) & Machado, 2014, Bačlić & Atanacković, 2000, Lazarevic 2013, 2014b, 2015) су:

$$T_{s,\cos}(t, \alpha) = \sum_{k=0}^{\infty} (-1)^k \omega_{(\alpha)s}^{2k} t^{2k} \sum_{m=0}^k \binom{k}{m} \frac{\omega_{(\alpha)s}^{-2m} t^{-\alpha m}}{\omega_s^{2m} \Gamma(2k+1-\alpha m)}, \quad s=1,2,3,\dots,11, 0 < \alpha < 1 \quad (4.81)$$

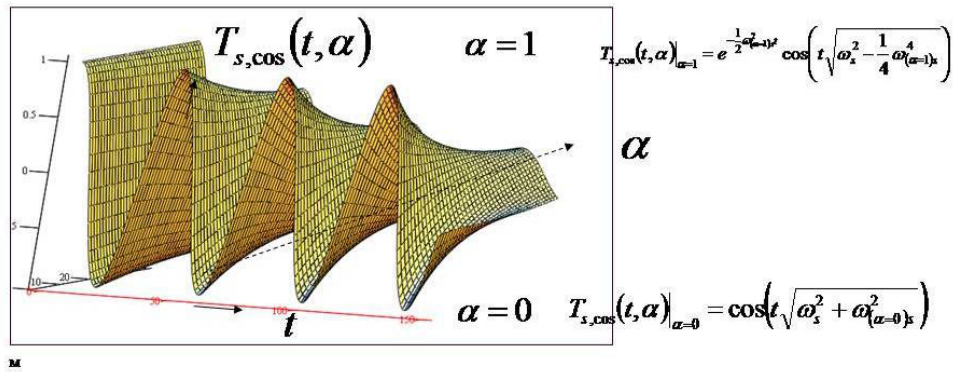
$$T_{s,\sin}(t, \alpha) = \sum_{k=0}^{\infty} (-1)^k \omega_{(\alpha)s}^{2k} t^{2k+1} \sum_{m=0}^k \binom{k}{m} \frac{\omega_{(\alpha)s}^{-2m} t^{-\alpha m}}{\omega_s^{2m} \Gamma(2k+2-\alpha m)}, \quad s=1,2,3,\dots,11, 0 < \alpha < 1 \quad (4.82)$$

где су ω_s , $s=1,2,3,\dots,11$ и $\omega_{(\alpha)s}$, $s=1,2,3,\dots,11$, $0 < \alpha < 1$ сопствени карактеристични бројеви ланца фракционог реда, ω_s , $s=1,2,3,\dots,11$ су једнаке сопственим кружним фреквенцијама одговарајућег линеарног еластичног ланца са истим степеном слободe.

Излед једног од главних сопствених модова фракционог реда $T_{s,\cos}(t, \alpha)$ сопствених осцилација фракционог реда за ланчане системе, који је сличан форми косинуса приказан је на слици 4.38, у функцији времена t (апсциса) и промене коефицијената фракционог реда α ($0 < \alpha \leq 1$). За $\alpha = 0$ је случај конзервативног система - идељано еластичне везе између молекула и са графика се види да је мод косинусна функција $T_{s,\cos}(t, \alpha)|_{\alpha=0} = \cos\left(t\sqrt{\omega_s^2 + \omega_{(\alpha=0)s}^2}\right)$, предња контурна линија површи графика са слике. За $\alpha = 1$ је случај неконзервативног система - идељано виско-еластичне везе и са графика се види да је мод опадајућа функција са експоненцијално опадајућом амплитудом облика

$$T_{s,\cos}(t, \alpha)|_{\alpha=1} = e^{-\frac{1}{2}\omega_{(\alpha=1)s}^2 t} \cos\left(t\sqrt{\omega_s^2 - \frac{1}{4}\omega_{(\alpha=1)s}^4}\right). \text{-на графику задња контурна линија површи.}$$

За α у интервалу $0 < \alpha \leq 1$ криве су уцртане по површи графика.



Слика 4.38. Главни сопствени модови фракционог реда у форми косинуса $T_{s,cos}(t, \alpha)$ (ордината) по времену t (апсциса) α ($0 < \alpha \leq 1$). Публиковано у *Hedrih & Hedrih (Stevanović, 2014)*.

У оваквим системима фракционог реда, који су неконзервативни, долази током динамике (опадајућих осцилација фракционог реда) до опадања укупне механичке енергије система. То опадање укупне механичке енергије система је дисипација енергије фракционог реда. Јављају се неконзервативне силе отпора-дисипације које врше негативан рад. Генералисана *Rayleigh*-јева функција дисипације механичке енергије фракционог реда за све елементе у једном ланцу Φ_{chain} репрезентативног узорка дискретног модела *mZP* мреже је облика (види *Hedrih & Hedrih (Stevanović, 2014)*):

$$\Phi_{chain, 0 < \alpha < 1} = \sum_{k=0}^{k=12} \frac{1}{2} c_{0 < \alpha < 1(k, k+1)} \left\langle D_t^\alpha [x_{k+1}(t) - x_k(t)] \right\rangle^2, \quad x_0(t) = 0 \text{ и } x_{12}(t) = 0, \quad k = 0, 1, 2, 3, \dots, 11, 12. \quad (4.83)$$

Применом претходног израза за генералисану *Rayleigh*-јеву функцију дисипације механичке енергије фракционог реда за све елементе у једном ланцу Φ_{chain} на цело репрезентативни узорак добијамо израз за генералисану *Rayleigh*-јеву функцију дисипације укупне механичке енергије фракционог реда за цело репрезентативни узорак дискретног модела *mZP* мреже у облику (види *Hedrih & Hedrih (Stevanović, 2014)*):

$$\begin{aligned}
\Phi_{\text{Ref. Part. } 0 < \alpha < 1} &= \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq 2}}^{j=3} \sum_{k=0}^{k=12} \frac{1}{2} c_{0 < \alpha < 1(k, k+1), j} \langle D_t^\alpha [u_{k+1, j}(t) - u_{k, j}(t)] \rangle^2 + \sum_{\substack{j=2 \\ j \neq 3}}^{j=4} \sum_{k=0}^{k=12} \frac{1}{2} c_{0 < \alpha < 1(k, k+1), j} \langle D_t^\alpha [v_{k+1, j}(t) - v_{k, j}(t)] \rangle^2 + \\
&+ \sum_{k=1}^{k=11} \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq 3 \\ j \neq 9}}^{j=11} \tilde{c}_{0 < \alpha < 1(k, k), j} \langle D_t^\alpha [w_{k, k}(t)] \rangle^2
\end{aligned} \tag{4.84}$$

Уколико желимо да прикажемо компонентна померања чворних молекула унутрашње и спољашње мреже у истом координатном систему треба узети у обзир да су унутрашња и спољашња мрежа под углом од 45° . Уколико за референтни координатни систем узмемо померања чворних молекула репрезентативног дела унутрашње мреже у радијалном и циркуларном правцу, тада ће компонентна померања чворних молекула у циркуларном и меридијалном правцу бити:

- за чворни молекул масе $\tilde{m}_{k, j}$ унутрашњег дела двослојне осцилаторне *ZP* мреже фракционог реда:

$$- \text{померање у циркуларном правцу: } u_{k, j, in}(t) = u_{k, j}(t) \quad \text{и} \tag{4.85}$$

$$- \text{померање у мердијалном правцу: } v_{k, j, in}(t) = v_{k, j}(t) \tag{4.86}$$

- за чворни молекул масе $\tilde{m}_{k, j}$ спољашњег дела двослојне осцилаторне *ZP* мреже фракционог реда:

-померање у циркуларном правцу (у референтном координатном систему) је:

$$\tilde{u}_{k, j, out}(t) = \frac{\sqrt{2}}{2} [\tilde{u}_{k, j}(t) + \tilde{v}_{k, j}(t)] \tag{4.87}$$

- померање у мердијалном правцу у референтном координатном систему је:

$$\tilde{v}_{k,j,spolj}(t) = \frac{\sqrt{2}}{2} [\tilde{u}_{k,j}(t) - \tilde{v}_{k,j}(t)] \quad (4.88)$$

За за $k = 3$ и/или $k = 9$, $j = 3$ и/или $j = 9$, $0 \leq \alpha \leq 1$ јер је $\cos 45^\circ = \sin 45^\circ = \frac{\sqrt{2}}{2}$.

Помоћу двослојног дискретно-континуалног модела сферне осцилаторне мреже ZP могуће је објаснити механизам продора сперматозоида кроз ZP . Сперматозоиди имају много захтевнији задатак да прођу кроз гушћу средину него у случају једнослојне мреже. *In vitro* (Bedford, 2006) и нумерички експерименти (Hedrih et al, 2015) указују да сперматозоиди пролазе кроз ZP косом путањом. Модел двослојне осцилаторне мреже ZP фракционог реда даје основу за могући механизам продора сперматозоида кроз мрежу у виду осцилација релаксације. Двослојни осцилаторни модел ZP може да буде и основа за сложенији модел ZP миша, који посматра ZP као осцилаторни гел. Уколико ZP посматрамо као осцилаторни гел било би могуће проучити нелинеарне динамичке феномене који настају као последица повезивања механичке и хемијске енергије (Yashin & Balazs, 2015).

5. Примена методе коначних елемената у моделовању осцилаторног понашања *Zona-e Pelucida-e* миша пре и после оплодње

У овом поглављу биће речи о примени методе коначних елемената и комерцијалног софтверског пакета *ANSIS* у циљу одређивања споствених кружних фреквенција ембриона и проучавању динамике локалног контакта јајне ћелије и сперматозоида као и напона и деформација, који се јављају у *ZP* приликом дејства једног сперматозоида на њену површину.

Метода коначних елемената (МКЕ) је првобитно намењена нумеричком решавању инжењерских проблема и проблема математичке физике. Заснива се на примени матричне алгебре за дискретизацију произвољног деформабилног тела на одговарајуће коначне елементе за које користимо одговарајуће једначине еластомеханике. “МКЕ је метода дискретне анализе, која се заснива на физичкој дискретизацији посматраног деформабилног тела. У МКЕ се разматра део домена коначних димензија, подомен или коначни елемент“ (*Hedrih (Stevanović), 1988b*).

Метода се користи за испитивање стања напона и стања деформација у линијским, равним и просторним деформабилним телима, за решавање проблема преноса топлоте, електростатичког потенцијала, механике флуида, вибрациону анализу итд. Једни спадају у структуралне, а други у неструктуралне проблеме. Метода је нашла велику примену у архитектури, машинству, али и у стоматологији (*Prasad & Tarannum, 2012*) и медицини као део биомеханике за моделовање напона и деформација у ткивима, као што су кости (*Sundar u cap, 2012*), срчани залисци (*Verhey u cap, 2006*) мекоткивни органи (*Yue u cap, 2013*) тумори (*Dong u cap, 2015, Djukic u cap, 2015, Kojic u cap, 2015*). МКЕ се користи и у симулацији морфогенетских кретања поједностављеног елипсоидног модела ембриона винске мушице (*Allena et al, 2010*). За параметризацију деформација налик љуски унутар мембрана ембриона винске мушице може се користити техника описана у (*Allena & Aubry, 2011*).

Предност методе је што се може наћи нумеричко решење за сложене проблеме у инжењерству, када имамо сложене геометријске структуре или пак сложено оптерећење. Недостатак методе је што је увек у питању приближно решење, које се односи на одређене тачке структуре. Али и приближно решење је врло често прихватљиво у решавању практичних задатака. Поред тога, у савременим софтверским пакетима нумеричким алатима, које користе МКЕ постоји и могућност провере тачности апроксимације и конвергенције решења.

МКЕ деформабилно тело, као континуум са бесконачно много степени слободне кретања, се преводи у дискретни модел међусобно повезаних коначних елемената са коначним бројем степени слободне. Једначине којима описујемо стање напона и деформације у појединим елементима, а помоћу којих се формулише проблем у целини су обичне алгебарске једначине (*Hedrih (Stevanović), 1988*).

Како је број дискретних модела за једно деформабилно напрегнуто тело неограничено велики, основни задатак је да се изабере онај модел, којим најбоље апроксимирамо стање напона и деформација, као и граничне услове на површи контуре тела.

Нема егзактних критеријума, који обезбеђују избор најбољег дискретног модела.

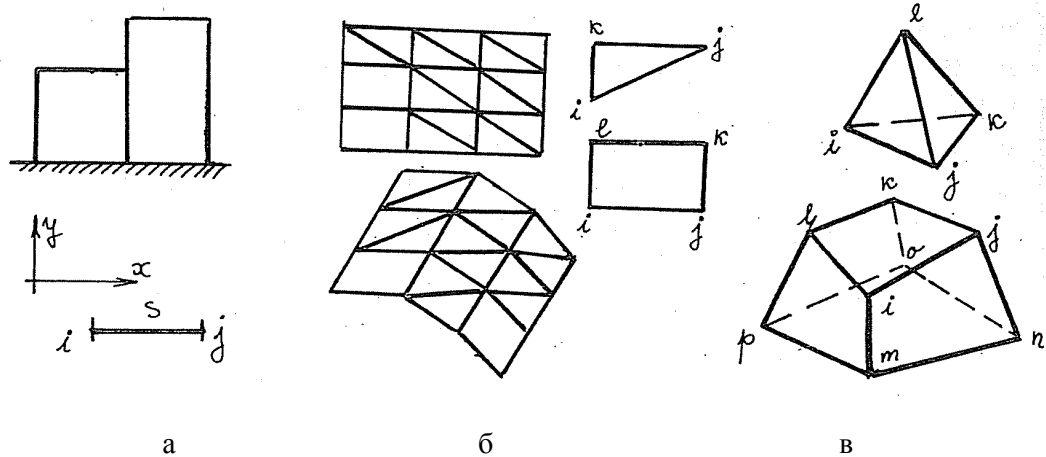
Деформабилно тело се дискретизује на коначни број елемената, који могу бити истог или различитих типова. За линијске конструкције коначне елементе бирамо у виду линијских елемената или штапова. За површинске и раванске конструкције коначни елемент је у облику плочица: троугластих, правоугаоних односно четвороугаоних плочица (Види слику 5.1.). За просторне конструкције коначни елемент може бити у облику тетраедра или хексаедра (Види слику 5.2.).

Сви коначни елементи без обзира каквог су типа помоћу чворова коначних елемената повезани су међусобом у једну целину, тако да чине првобитну конструкцију, коју смо дискретизацијом разделили на разне и/или исте типове коначних елемената. Коначни елементи на које смо разделили конструкцију морају да буду компатибилни пре и после деформације услед дејства спољашњег оптерећења.

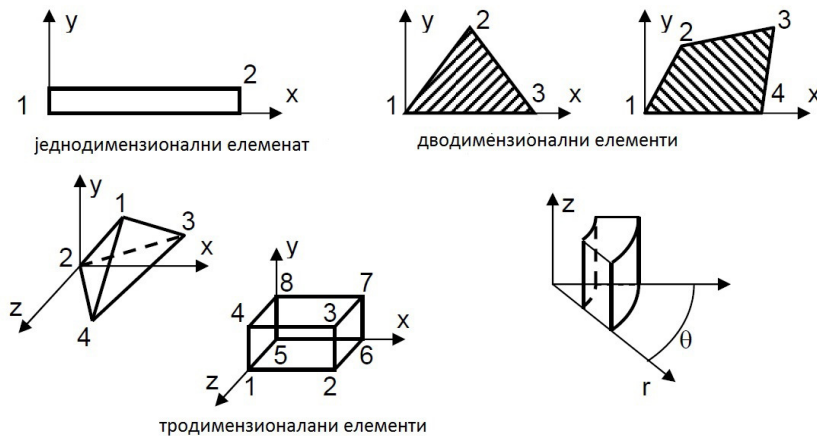
Методом коначних елемената дискретизујемо-апроксимујемо континуум-апроксимујемо стање напона и стање деформација. Мрежа коначних елемената је

скуп коначних елемената за цео домен континуума тј деформабилног тела. МКЕ уводи претпоставку да су коначни елементи међусобно повезани у коначном броју тачака-чворова које се усвајају, на контури коначних елемената.

Основне непознате величине у МКЕ су стање напона, стање деформације, поље померања, поље температуре и одређују се у сваком коначном елементу. Ови параметри се описују помоћу интерполационих функција и коначног броја параметара у чворовима. За анализу поменутих параметара важе: теорија напона, теорија деформација, веза између стања напона и стања деформација, као и сви принципи и поступци који важе за класичне дискретне системе.



Слика 5.1. Неке врсте коначних елемената. а. Лينيјски. б, равански (троугласти, правоугаони). в. просторни (тетраедарски, хексагонални). Преузето из (Hedrih (Stevanović), 1988).



Слика 5.2. Неке врсте коначних елемената. Преузето са

<http://am.unze.ba/mkpr/MKE%201.pdf> приступљено дана 09.02.2016.

Методом коначних елемената одређујемо везе између померања у пољу елемената и померања у чворовима, који одговарају посматраном елементу. То радимо помоћу једначина еластомеханике. Тако добијамо основну једначину коначног елемента чија су чворна померања непознате. Даље се групишу једначине појединачних коначних елемената у једначину конструкције у матричном облику која даје систем линеарних једначина из којих, уз узимање у рачун чворних оптерећења и граничних услова, можемо да израчунамо тражене непознате-чворна померања, специфичне деформације и компонентне напоне. За детаље поступка види Прилог 3. Поступак одређивања матрице поља и интерполационе матрице коначног елемента као и једначине коначних елемената и дефинисање граничних услова дате су у Прилогу 3. Постоје различите методе коначних елемената: деформацијска метода, метода силе, хибридна метода (мешовита метода- метода која комбинује деформацијску методу и методу силе).

„Према начину на који се изводе и дефинишу основне једначине коначних елемената МКЕ се дели на: директну методу, варијациону методу, методу остатка, методу енергетског баланса" (*Hedrih (Stevanović), 1988*).

Што се тиче примене МКЕ у репродуктивној биомеханици, *Vossaccio* и сар (2012) су развили хибридную процедуру да би проучавали понашање изоловане *ZP* зреле и оплођене јајне ћелије говечета као одговор на структурну реорганизацију *ZP* комбинујући *AFM* и наноиндентациона мерења, нелинеарну анализу помоћу

МКЕ и нелинеарне оптимизационе алгоритме. Мерили су посебно механики одговор унутрашњег, посебно спољашњег дела *ZP*. *ZP* је посматрана као хипереластична греда дужине 60 μm и дебљине 10 μm , која поседује геометријску нелинеарност, користили су четворонодалну мрежу, а контакт између *AFM* игле и *ZP* сматрали су за африкциони тврди контакт. Брзина кретања *AFM* игле је симулирана, као брзина кретања сперматозооида говечета *in vitro* експериментима -3 $\mu\text{m/s}$. Варирали су дубину индентације: у првом кораку од 0-100nm, а у другом кораку од 100-200nm. Деформација нестишљиве *ZP* мембране у односу на дејство спољне силе (*AFM* игле) анализирана је кроз *Arruda-Boyce*-ов осмоланчани модел полимера. Хипереластична својства *ZP* разматрана су кроз две константе: модул смицања и растегљивост (*Vossaccio и сар, 2012*). *ZP* слој је моделован као композитна мембрана, која садржи 5 слојева, а одређивани параметри се односе на прва два слоја. *Vossaccio и сар (2012)* су претпоставили хетерогену дистрибуцију еластичних карактеристика кроз дебљину *ZP* на основу резултата других истраживача. Користећи исту хибридную процедуру *Vossaccio и сар. (2014)* су развили оптимизациони алгоритам, који екстрахује виско-хипереластична својства *ZP* из експерименталних *AFM* мерења на *ZP* зреле јајне ћелије свиње, одређујући модул смицања, растегљивост, *Prony*-јеву константу и константу времена релаксације. Овде је варирана брзина кретања *AFM* игле (од 0,5 до 10 $\mu\text{m/s}$) симулирајући дејство сперматозооида који имају различите брзине. Метод коначних елемената се у репродуктивној биологији може применити за проучавање вибрационих карактеристика ембриона при контакту са ињекционом микроиглом (*Hedrih & Ugrcic, 2012*) или пак за проучавање локалног напона и деформација, које се јављају у јајној ћелији при контакту са сперматозооидом и његовој иницијалној пенетрацији кроз *ZP* (*Hedrih & Banic, 2016*).

5.1. Вибрационе карактеристике ембриона миша приликом микроињекције

"Вибрационе карактеристике ембриона могу бити од значаја за процену његове виталности. Да би одредили сопствене учесталости и облике модова осциловања ембриона миша током микроињекције стакленом иглом користили

смо МКЕ у оквиру модалне анализе помоћу ANSYS софтвера. Ембрион миша дијаметра 60 μm моделован је као еластична биоструктура са коначним бројем елемената, која се састоји од биомембране дебљине 6 μm и једра дијаметра 38 μm . У раду је приказано првих шест модова сопствених учесталости ембриона миша и расподеле брзине осциловања ембриона. "(Hedrih &Ugrcic, 2012).

"Иако има радова који се баве проучавањем механичких особина јајне ћелије (Liu et al, 2010) и ембриона (Murayama et al, 2008, 2006), према нашем сазнању нема пуно радова који посматрају ембрион миша као осцилаторну структуру (Hedrih, 2011). Вибрационе карактеристике ембриона су веома важне за потенцијалну процену његове виталности (Ladjaly et al, 2011)." Један од приступа у одрживању вибрационих карактеристика (сопствених фреквенција и облика модова) је модална анализа. Резултати модалне анализе могу се користити, као део динамичке анализе у поступку инсеминације. Сопствене фреквенције осциловања и облици модова су важни параметри при изради микророботских система за манипулацију ћелијама за испитивање одговора на динамичко оптерећење (Ladjaly et al, 2011). С обзиром на природу модалне анализе, свака нелинеарност је занемарена. Могу да се користе ортотропне и особине материјала које зависе од температуре. Најпре треба дефинисати крутост и облик масе. Крутост се може одредити преко изотропних и ортотропних еластичних модела материјала (Young-ов модул и Poisson-ов коефицијена попречне контракције) или помоћу хипереластичних модела материјала (они су линеаризовани преко еквивалентне комбинације модула смицања и почетног запреминског модула) уз помоћ константи опруга. Маса се може добити из густине материјала или из удаљених маса."

У овом раду је направљен модел ембриона миша помоћу МКЕ, као и пипете носача и микроињекционе игле. Цео систем се налази у течности, која одговара медијуму --human tubal fluid-(HTF). Одређени су контакти и гранични услови који утичу на вибрационе карактеристике ембриона миша, затим модална анализа, која симулира вибрационе карактеристике ембриона појединачно и у оквиру целог система са микропипетом и микроињекционом иглом. Одређене вибрационе карактеристике ембриона миша за сопствене осцилације и осцилације које су под утицајем граничних услова.

Моделовање ембриона и модална анализа су урађене на основу МКЕ и модалне анализе помоћу *ANSYS WORKBENCH*[®] софтверског пакета (*ANSYS AUTODYN, 2010*).

Матрична диференцијална једначина (5.26) (види Прилог 3) осциловања система, са новим ознакама које се користе упутству софтверског пакета *ANSYS WORKBENCH*[®] са додатим чланом који одговара отпорним силама пригушења имају облик:

$$[M]\{\ddot{u}\} + [C]\{\dot{u}\} + [K]\{u\} = \{0\} \quad (5.1)$$

где је $[M]$ - структурна матрица маса, тј. матрица инерционих коефицијената система. $[C]$ - структурна матрица пригушења $[K]$ -структурна матрица крутости, $\{\ddot{u}\}$ - вектор убрзања чворних тачака коначних елемата конструкције ембриона миша, $\{\dot{u}\}$ - вектор брзине чворних тачака коначних елемата конструкције ембриона миша и $\{u\}$ - вектор померања чворних тачака коначних елемата конструкције ембриона миша.

Диференцијална једначина којом описујемо кретања у систему сопствених главних координата (у модалном подпростору) је :

$$[I]\{\ddot{y}\} + [\Phi]^T [C][\Phi]\{\dot{y}\} + \left([\Lambda^2] + [\Phi]^T [K_{asym}] [\Phi] \right) \{y\} = \{0\} \quad (5.3)$$

где је $[\Lambda^2]$ - дијагонална матрица, која садржи на главној дијагонали квадрате сопствених кружних фреквенција $\omega_s, s = 1, 2, 3, \dots, n$, за непригушени систем, који одговара систему (5.3), односно то је трансформисана матрица крутости система сопствених нормалних координата одговарајућег линеарног конзервативног система. У овим изучавањима, систем је посматран, као неконзервативан асиметричан систем са пригушењем. $[\Phi]^T [C][\Phi]$ је модификована матрица пригушења, односно матрица пригушења трансформисана на систем главних сопствених координата одговарајућег линеарног конзервативног система, $[\Phi]$ и је модална матрица $[\Phi]^T$ њој одговарајућа транспонована матрица за линеарни,

конзервативни систем (за детаље види (3. 96), где је коришћена ознака за модалну матрицу \mathbf{R}), и $[\mathbf{K}_{\text{asym}}]$ асиметрична матрица крутости.

У прорачунима модалне анализе коришћен је QR алгоритам (*Press u cap, 1993*) и инверзни итерациони метод (*Wilkinson & Reinsch, 1971*) за израчунавање сложених модалних сопствених вектора подпростора.

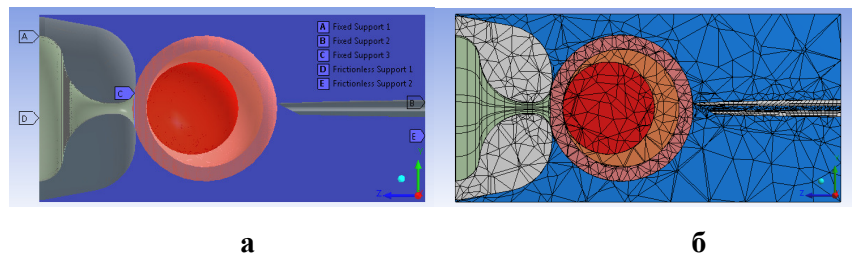
Комплетан скуп генералисаних координата $\{\psi\}$ се помоћу модалне матрице $[\Phi]$ може изразити преко сопствених главних координата $\{z\}$ у облику:

$$\{\psi\} = [\Phi]\{z\} \quad (5.4)$$

овај израз је идентичан са изразом (3.97) само са другим ознакама

$$\begin{Bmatrix} u_1 \\ u_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ u_{10} \end{Bmatrix} = \mathbf{R} \begin{Bmatrix} C_1 \cos(\omega_1 t + \alpha_1) \\ C_2 \cos(\omega_2 t + \alpha_2) \\ \cdot \\ \cdot \\ C_{10} \cos(\omega_{10} t + \alpha_{10}) \end{Bmatrix} = \mathbf{R} \begin{Bmatrix} \xi_1 \\ \xi_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \xi_{10} \end{Bmatrix} \quad (5.5)$$

Модел ембриона је посматран као тродимензионални оносиметрични проблем. Модел ембриона са вакуум пипетом и микроињекционом иглом описан у раду (*Sun u cap, 2003*) приказан је на Слици 5.3. Вакуум пипета обезбеђује подршку ембриона и држи га фиксираног у позицији независно од силе гравитације. Симетрично са друге стране налази се стаклена микроињекциона игла. Гранични услови за тачке ослоња ембриона приказани су на слици 5.3.а Мрежа коначних елемената модела ембриона са вакуум пипетом и микроињекционом иглом приказана је на слици слици 5.1.б. Модел ембриона се састоји од мембране -ZP и једра са цитоплазмом, а све је то окружено течним медијумом - HTF.



Слика 5.3.а. Детаљи граничних услова ослоња. б. Детаљи мреже коначних елеманата у уздужном пресеку модела. Публиковано у (*Hedrih &Ugrcic, 2012*).

Број чворова варира од 685 за једру до 7409 за микромембрану. Симулација је одрађена у вакууму и у течности. Број чворова коришћен за моделовање понашања система у вакууму је 276, а у течности 3824. Све контактне регије (медијум са микромембраном, вакуум пипетом и микропипетом) су сматране фриксионим контактом. За ову врсту –такозваног мокрог конатакта узет је коефицијенат трења од 0,1. Исти услови контакта су узети и за контакт између цитоплазме и једра с једне стране и микромембране с друге стране. Тачке ослоња су узете да буду без трења. Величина модела (цео правоугаоник приказан на слици 5.1б је $1.6E-4 \times 7.7E-5 \times 7.7E-5$ m) утиче на сопствене фреквенције осциловања ембриона. Вакуум пипета и микроињекциона игла су фиксиране тако да нема померања дуж z осе (*Hedrih & Ugrcic, 2012*).

И микропипета и микроињекциона игла су учвршћене на носачима *A* и *B* за кретање у аксијалном правцу.

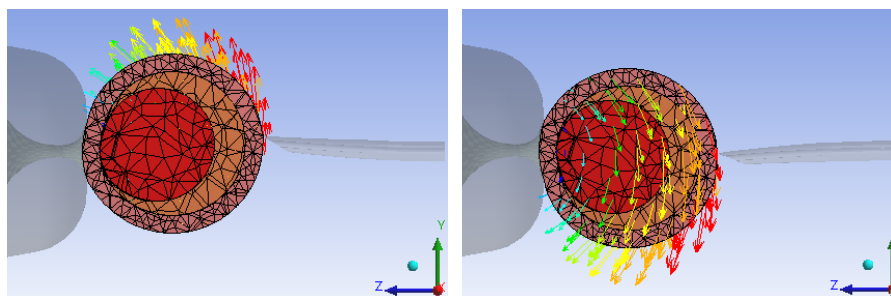
Спољне силе, које делују на ембрион су сила гравитације и површинска сила од 733.1 Pa, коју производи вакуум на контакту ваздух микромембрана, али је у модалној анализи подешено да су спољне силе једнаке нули тако да је ембрион повезан са вакуум пипетом дуж почетне контактне ивице (*C*). (*Hedrih &Ugrcic, 2012*). Сви матерјали (биомембрана, једру са цитоплазмом, медијум, ваздух, стаклена микропипета) су сматрани изотропним еластичним материјалима. Анализа је рађена за температуру тела миша - 37 °C. С обзиром да је температура константна не утиче на модалну анализу. Механичке особине материјала коришћене у модалној анализи приказане су у табели 5.1. (*Hedrih &Ugrcic, 2012*).

Табела 5.1. Механичке карактеристике материјала. Преузето из (*Hedrih &Ugrcic, 2012*).

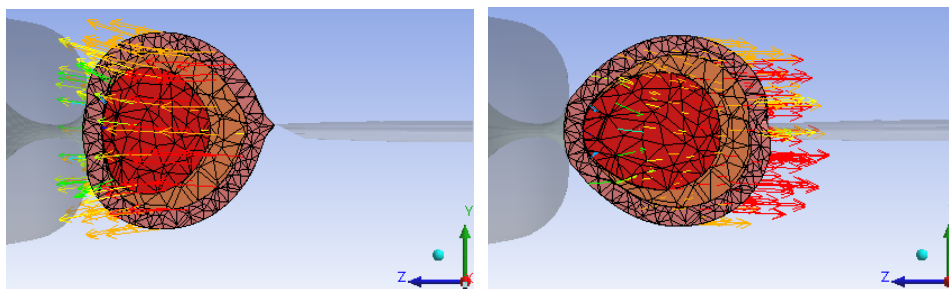
Материјал	Густина	Референтна температура у келвинима	<i>Young</i> -ов модул еластичности	<i>Poisson</i> -ов Коефицијент попречне контракције	Запремински модул	Модул Смицања
-	kg /m ³	К	Pa	-	Pa	Pa
Биомембрана	1005	310	42400	0.499	7.067E+6	14143
Једро	1040	310	7200	0.250	4800	2880
Цитоплазма	1013	310	17200	0.490	2.867E+5	5771,8
Медијум НТФ	1013	310	1.32E+8	0.490	2.20e+9	4.430E+7
Ваздух (вакуум)	1.225	310	3.102E+6 ¹	0.490*	5.17E+7*	1.041E+6*
Стакло	2530	310	5.448E+7	0.300	4.54E+7	2.095E+7

Анализа је показала да су фреквенције сопствених осцилација ембриона веће у течности него у вакууму (*Hedrih &Ugrcic, 2012*) и да су реда величине од око 52kHz (за први мод) до око 55kHz (за 6. мод). Анализа показује да осцилације слободног ембриона у вакууму практично нису могуће ($\omega_i = 0$).

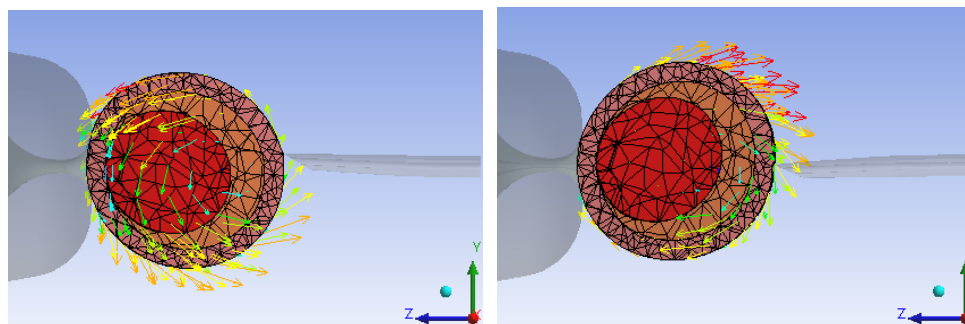
Сопствене осцилације ембриона се постепено повећавају како се укључује сваки следећи гранични услов (од ембриона у течном медијуму до емриона у течном медијуму повезаног са вакуум микропипетом и микроињекционом пипетом). На основу 3D анимација кретања ембриона у одговарајућим модовима је: Мод 1: перпендикуларне осцилације дуж у осе -изгледа као котрљање у уз равни. Мод 2. перпендикуларне осцилације дуж x осе -изгледа као котрљање у xz равни. Мод 3. ротација тј. торзија око z осе. Мод 4. -лонгитудиналне осцилације дуж z осе. Мод 5. ротација у уз равни. Мод 6. -ротација у xz равни (*Hedrih & Ugrcic, 2012*). Изглед скалираних облика и дистрибуција партикуларних (фиктивних) брзина ембриона у екстремним тачкама за модове 1, 4 и 5 приказани су на сликама 5.4-5.6.



Слика 5.4. Облик и дистрибуција партикуларних брзина ембриона у екстремним тачкама за мод 1. Публиковано у (Hedrih & Ugrcic, 2012).



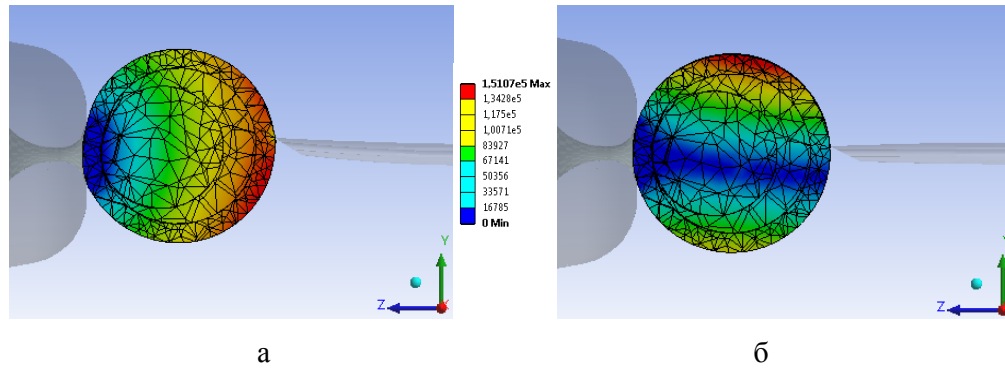
Слика 5.5. Облик и дистрибуција партикуларних брзина ембриона у екстремним тачкама за мод 4. Публиковано у (Hedrih & Ugrcic, 2012).



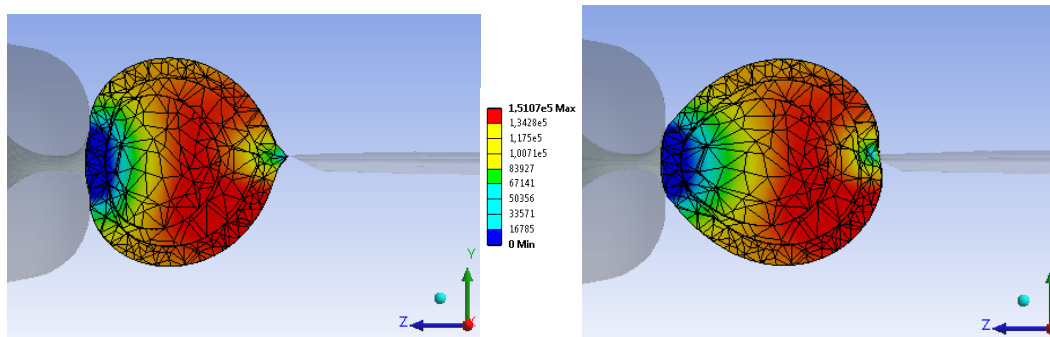
Слика 5.6. Облик и дистрибуција партикуларних брзина ембриона у екстремним тачкама за мод 5. Публиковано у (Hedrih & Ugrcic, 2012).

- Изглед скалираног облика и фиктивних деформација за свих 6 модова слободних осцилација приказани су у (Hedrih & Ugrcic, 2012). Овде

приказујемо само неке од карактеристичних деформација по модовима (мод 1, 3, 4, и мод 5).



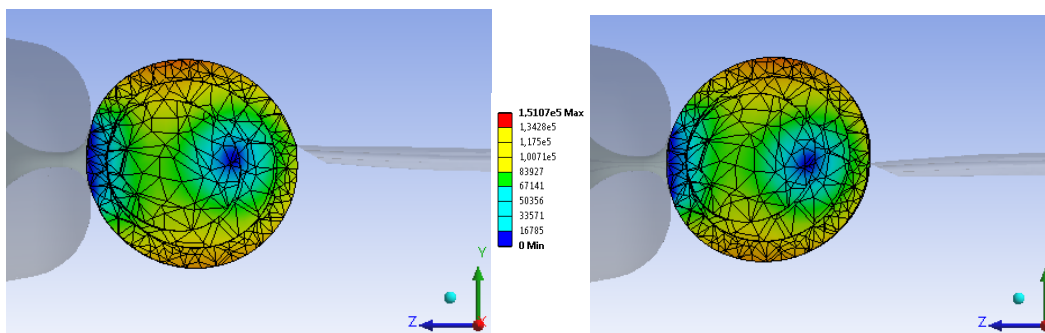
Слика 5.7. Тотална деформација ембриона у екстремним тачкама при осциловању а. моду 1. ($\times 1.65E-11$ m). б. у моду 3 ($\times 1.40E-11$ m). Публиковано у (*Hedrih & Ugrcic, 2012*).



Слика 5.8. Тотална деформација ембриона у екстремним тачкама при осциловању у моду 4. ($\times 2.15E-11$ m). Публиковано у (*Hedrih & Ugrcic, 2012*).

Најизраженија деформација је у моду 4 и износи до $3.348 \mu\text{m}$ (*Hedrih & Ugrcic, 2012*). Метод коначних елемената се примењује у асистираној ћелијског ињекционој техници. *Ladjaly u cap (2011)* су посматрали ћелију као униформну целину, док су у раду (*Hedrih & Ugrcic, 2012*) ћелију посматрали као структуру која се састоји из три слоја-биомембране, цитоплазме и једра. Подаци за једро узети су из (*Rowat u cap, 2008*) и односе се на једра фибробласта миша и из (*Schaöpe et al, 2009*) и односе се на једро јајне ћелије водоземца. Описани метод

може да се користи за анализу вибрационих карактеристика ембриона миша, али и хумане врсте, како у физиолошким, тако и у патолошким условима-нпр. када је вештачка инсеминација неуспешна или кад не долази до имплантације ембриона. Модел подржава осцилаторну теорију оплодње.

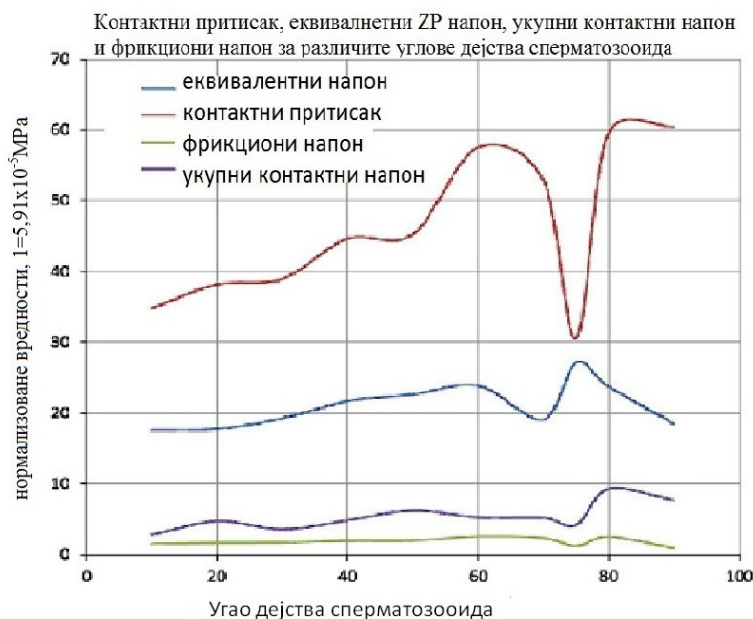


Слика 5.9. Тотална деформација ембриона у екстремним тачкама при осциловању у моду 5. ($\times 2.15E-11$ m). Публиковано у (*Hedrih & Ugrcic*, 2012).

5.2. Динамика нелинеарног фрикционог контакта између сперматозоида и јајне ћелије миша

Hedrih & Banic (2016) су користили МКЕ у проучавању динамике нелинеарног фрикционог контакта између сперматозоида и јајне ћелије миша у односу на угао дејства сперматозоида. Примењена је транзитorna структурна анализа помоћу МКЕ и *ANSYS WORKBENCH* version 14.5, десетонодална (десеточворна) мрежа, константна температура од 37 °C, сви материјали су узети као да су линеарно еластични. Број еламената у чвору је различит за различите углове и варира од 55,813 до 62,092. На месту контакта мрежа има финију структуру - већи број коначних елемената. Симулација је урађена у два корака: у првом сперматозоид путује до контакта са јајном ћелијом константном брзином од 100 μ m/s, а у другом кораку почиње да делује пенетрациона сила линеарно повећавајући своју вредност до максимума у трајању од 25 $\times 10^{-3}$ s. Анализа је урађена у фиксном временском кораку од 5 $\times 10^{-4}$ s.

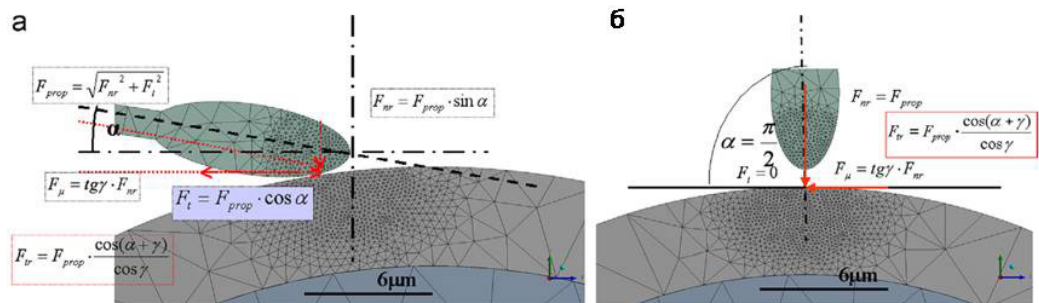
Разматрани су контактни притисак, максимални еквивалентни напон у ZP , укупни контактни напон и напон настао услед трења за различите углове дејства сперматозоида на јајну ћелију при фрикцијном контакту и константној брзини сперматозоида. Види слику 5.10. Уочљиво је, да сви поменути параметри показују више локалних минимума и максимума. Контактни притисак, максимални еквивалентни напон у ZP , укупни контактни напон и напон настао услед трења зависе од угла под којим сперматозоид дејствује на јајну ћелију и показују нелинеарну зависност. Деформације које се јављају при нелинеарном фрикцијном кантакту између јајне ћелије и сперматозоида су локалног карактера и захватају само површинске делове ZP . Различити углови под којим сперматозоид дејствује на јајну ћелију изазивају различити напон и деформацију у ZP . Највећи локални максимум максималног еквивалентног напона у ZP се јавља при углу од 75° а тада је контактни притисак најмањи.



Слика 5.10. Контактни притисак, максимални еквивалентни напон у ZP , укупни контактни напон и напон настао услед трења за различите углове дејства сперматозоида на јајну ћелију при фрикцијном контакту и константној брзини сперматозоида. Публиковано у (*Hedrih & Banic, 2016*).

Максимални еквивалентни напон није при углу дејства сперматозооида од 90° већ при углу од 75° што се може објаснити слагањем сила које дејствују на јајну ћелију: пропулзивне силе (састоји се од радијалне и тангентне компоненте-тангентна компонента зависи од угла дејства сперматозооида) и силе трења, која се мења по закону $F_{tr}=F_{prop}\cos(\alpha+\gamma)/\cos\gamma$. Где је α угао дејства сперматозооида, γ угао трења, а F_{prop} пропулзивна сила. Види слику 5.11. Максимални еквивалентни напон за посматране угове (10° , 30° , 60° , 90°) нелинеарно расте са временом трајања симулације (Hedrih & Banic, 2016).

Што је угао мањи то је већа контактна површина између јајне ћелије и сперматозооида с обзиром на специфичност облика главе сперматозооида (Hedrih & Banic, 2016). Евидентиран је и "slip-stick" феномен, који је израженији што је угао дејства сперматозооида мањи, а јавља се више пута у току времена симулације (већи број пута за мање угове дејства сперматозооида). Што је угао већи, дистанца клизања сперматозооида по површини јајне ћелије је мања (Hedrih & Banic, 2016). "Slip-stick" феномен се може објаснити осцилацијама релаксације на бази енергије релаксације помоћу аналогије Van der Pol-овим осцилатором кроз пример масе на опрузи која се креће по покретној траци. Слика 5.12.



Слика 5.11. Шематски приказ сила које делују при контакту јајне ћелије и сперматозооида за угао дејства сперматозооида од: а. 10° .б. 90° Публиковано у (Hedrih & Banic, 2016).

У тренутку контакта сперматозооида са ZP сперматозооид предаје део механичке енергије ZP . У следећем тренутку акумулирана механичка енергија се претвара у енергију која омогућава осцилаторно клизање по површини ZP

узрокујући само-индукујуће осцилације релаксације код обе контактне површине - како код сперматозоида тако и локално код *ZP*. У случају самоиндукујућих осцилација релаксације, осцилације се шире како се помера површина *ZP*. Релаксације осцилације би могле да буду од значаја за међусобно дејство биомеханичких и физико-хемијских процеса. С обзиром на разлике у маси између сперматозоида и јајне ћелије сперматозоид се може сматрати као тачкасто тело, које осцилује као материјална тачка изводећи осцилације релаксације при продору кроз *ZP*.

Диференцијална једначина осцилација релаксације је дата у облику:

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \varepsilon \left[\frac{dx}{dt} - \frac{1}{3} \left(\frac{dx}{dt} \right)^3 \right] + x = 0 \quad (5.6)$$

и описује осцилације релаксације материјалне тачке на храпавој покретној траци, при чему је материјална тачка везана еластичном опругом за непокретни зид.

Специфична сила отпора, која настаје приликом кретања сперматозоида односно у овој аналозији масе на опрузи по покретној траци је:

$$-F \left(\frac{dx}{dt} \right) = \varepsilon \left[\frac{dx}{dt} - \frac{1}{3} \left(\frac{dx}{dt} \right)^3 \right] \quad (5.7)$$

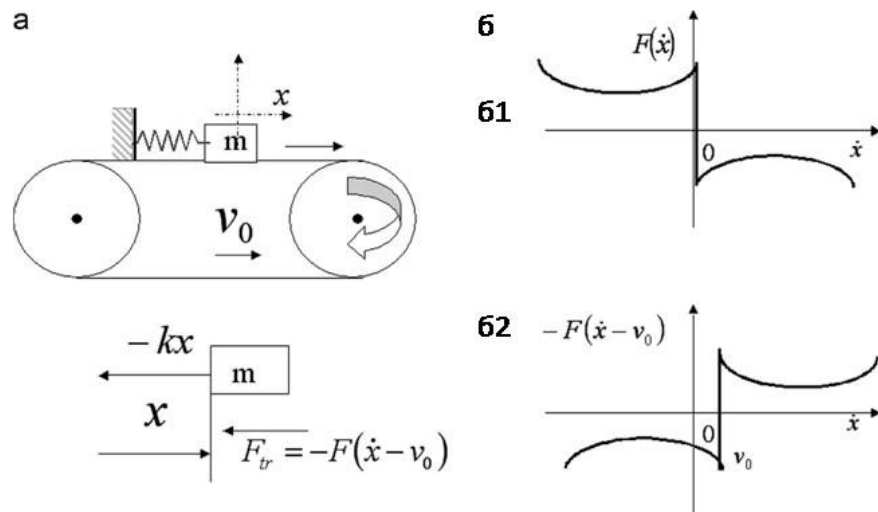
представља нелинеарну функцију брзине кретања сперматозоида, и зависи од трећег степена брзине. Што значи да, уколико се повећа брзина кретања сперматозоида, сила отпора ће порастати три пута што је у складу са резултатима, које су добили *Pari* и сар. (2013) при већој брзини кретања *AFM* игле и већој примењеној сили на површину *ZP*, *ZP* пружа већи отпор и показује вискоеластична својства.

За време симулације долази до промене брзине кретања сперматозоида. Види слику 5.13. Брзина показује осцилације у току времена симулације и зупчасто опада за све посматране углове, али на крају симулације за угао од 10° и има највећу вредност указујући да се на крају симулације сперматозоид и даље

клиза по површини ZP . Ове осцилације у брзини су карактеристичне за "Slip-stick" и у складу су са претходно датим објашњењем осцилација релаксације. „Изгледа да маљи угао дејства сперматозооида боље чува енергију сперматозооида“ (Hedrih & Banic, 2016).

Како кинетичка енергија сперматозооида зависи од брзине са слике 5.13. и математичке аналогије са слике 5.12. изгледа као да сперматозооид акумулира потенцијалну енергију кад му падне кинетичка-смањење брзине, а онда почне да се креће већом брзином –повћава се кинетичка а смањује потенцијална енергија. Криве промене брзина изгледају као криве осцилација са пригушењем.

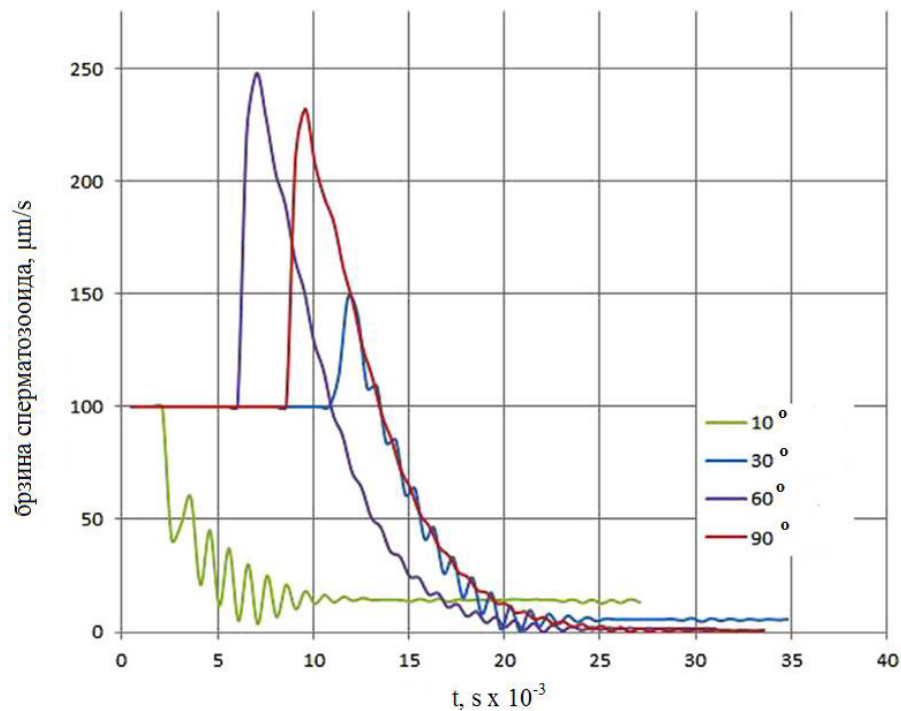
„Већа контактна површина, мања брзина кретања сперматозооида и мања фреквенција осциловања сперматозооида (Ishijima, 2011, Gadella, 2013) за угао од 10° би могли да допринесу рецепторском препознавању између сперматозооида и јајане ћелије“ (Hedrih & Banic, 2016).



Слика 5.12.а) Сила отпора која се јавља када се тело масе m причвршћено опругом креће на покретној траци храпаве површине. б) Графичко представљање зависности силе трења и брзине кретања масе m када: (б1) када трака мирује (б2) када се трака креће брзином v_0 Публиковано у (Hedrih & Banic, 2016).

Максимална пенетрација и максимална деформација, која се јавља у ZP такође показује локалне минимуме и локалне максимуме, а највећи максимум је за угао

од 10° . За угао од 75° јавља се максимална вредност максималног еквивалентног напона, локални максимум за контактну површину са ZP и локални минимум за фрикциони напон, укупни контактни напон, контактни притисак, тоталну деформацију и максималну пенетрацију. Ова комбинација наведених параметара би могла да буде повољна за пенетрацију посебно у светлу осцилација релаксације, али није и једина повољна комбинација (Hedrih & Banic, 2016).



Слика 5.13. Промена брзине кретања сперматозоида у току симулације у зависности од угла. Публиковано у (Hedrih & Banic, 2016).

Такође површина контакта зависи од угла и то нелинеарно и показује минимуме и максимуме (вероватно због облика главе сперматозоида). Сперматозоид, који дејствује под углом од 10° остварује максималну тоталну деформацију, напон трења и клизајућу дистанцу.

„Даљи развој модела интеракције сперматозоида и јајне ћелије и пенетрације сперматозоида кроз ZP би требао да укључи нелинеарна својства и вишеслојну структуру ZP .“ (Hedrih & Banic, 2016).

Кад би упоредили моделе *ZP* у којима је коришћена *MKE*, *Voccaccio et al.* (2012, 2014) су користили асиметрични модел *MKE* са 4 чвора по еламенту за моделовање *ZP*, а у раду (*Hedrih & Banic, 2016*) коришћен је *3D* десеточворни модел јајне ћелије и сперматозоида. Друга разлика између ова два модела је у врсти контакта између јајне ћелије и сперматозоида *Voccaccio et al.* (2012, 2014) разматрају африкциони контакт и *ZP* као виско-хипереластично тело, док (*Hedrih & Banic, 2016*) разматрају нелинеарни фрикциони контакт, а *ZP* сматрају еластичним телом. Ова два модела *ZP*, која користе *MKE* у својој анализи не могу да се упореде у потпуности, јер разматрају различите поставке проблема. У једном случају је у питању изолована *ZP* на плочици и ефекти, које индентациони експерименти имају на механику *ZP*, а у другом случају је у питању *3D* модел интеракције јајне ћелије и сперматозоида. Оба приступа су одговарјућа за проблематику којом се баве.

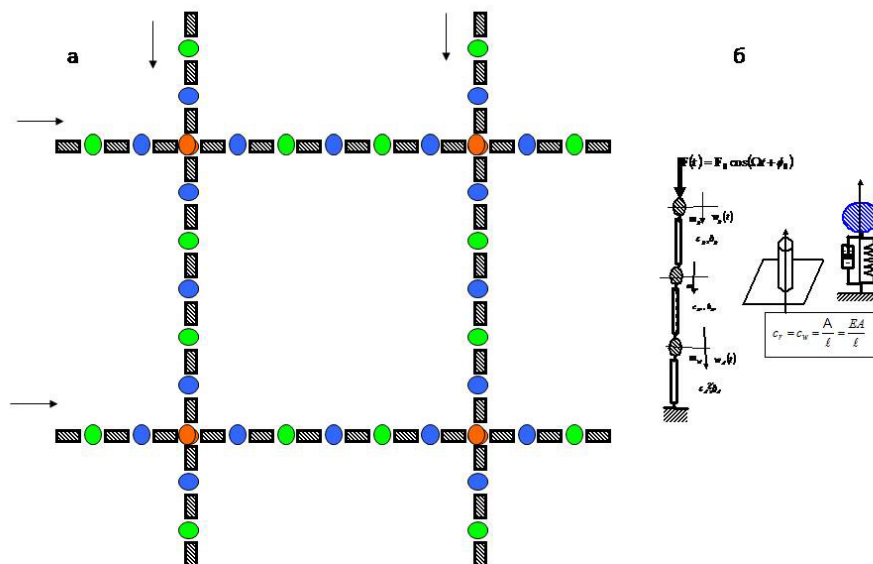
Модел приказан у (*Hedrih & Banic, 2016*) је еластичан модел и разматра утицај само једног сперматозоида на *ZP*, због једноставности модела искључује ротационо кретање сперматозоида и утицај ове компоненте на динамику контакта са *ZP*. У том смислу би требао радити на побољшању модела. Поред тога постојање куплованих поља (механичког, електро-хемијског) не би требало занемарити. Овај комплексни приступ проблему и ако не нов, постаје интересантан за истраживаче. *Allena & Aubry* (2011) су применили овај приступ за купловања електричних, геометријских и механичких утицаја у циљу параметризације деформација налик љусци унутар биолошких мембрана, тачније за моделовање деформација мембране ембриона винске мушице. Могуће је повезати вискоеластична и електрична својства материјала (*Spasić & Lazarević, 2005, Spasić et al, 2006, 2009*).

„Такође *ZP* би могла да се третира као респонсивни гел, који реагује на спољњу механичку стимулацију осцилацијама у хемијским реакцијама по сличном принципу, као у раду (*Yashin et al, 2012*), (*Hedrih & Banic, 2016*).

6. Осцилаторно понашање *ZP* миша након оплодње

Осцилаторно понашање *ZP* миша након оплодње биће разматрано на моделу осцилаторне сферне мреже *ZP* миша о којем је било речи у поглављу 3 и 4 (Hedrih, 2011, Hedrih et al, 2013a, б) с том разликом што ћемо овде користити нелинеарни вишепараметарски модел у коме су *ZP* молекули међусобно повезани виско-нелинеарно еластичним везама и изложени дејству сперматозооида у виду спољне принудне силе. Вискоеластичне везе су у виду модификованог вискоеластичног елемента *Kelvin-Voigt*-овог типа са нелинеарно еластичним својствима. За нумеричку вишепараметарску анализу узет је репрезентативни сегмент вискоеластичног нелинеарног модела осцилаторне сферне мреже *ZP* (Simonovic & Hedrih, 2014). Слика 6.1.

За анализу под којим условима је могућа синхронизација молекула у моделу *ZP* ембрана миша користили смо нелинеарни дискретни модел (Hedrih (Stevanović), 2004).

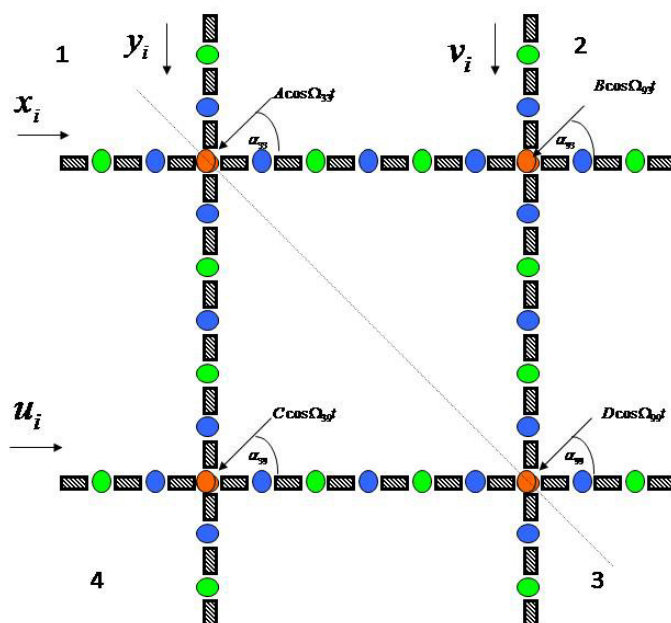


Слика 6.1. а. Репрезентативни сегмент осцилаторног модела *ZP* миша у коме су молекули повезани вискоеластичним везама. Наранчасто- *ZP1*, плаво- *ZP2*, зелено-*ZP3*. б. Као модел вискоеластичне везе узет је *Kelvin-Voigt* -ов модел.

Од параметара у модел су уведени, поред угла под којим сперматозооиди дејствују и остварују своје осцилаторно ударно дејство на чворне ZP молекуле, фреквенција спољне принудне силе (фреквенција осцилаторног дејства сперматозоида), амплитуда спољашње принудне силе на сваком од разматраних молекула, коефицијент пригушења, коефицијент линеарне и нелинерне крутости и време.

Интересовали су нас услови под којима се два чворна молекула осцилаторно крећу синхронно у дијагоналној позицији (1 и 3) за случај

када 4 сперматозоида, као спољашње периодичне принудне силе одређене фреквенције, амплитуде и правца дејства, дејствују на четири различита чворна молекула у репрезентативном сегменту осцилаторног дискретно-континуалног модела ZP ембриона миша (Слика 6.2) и то у зависности од следећих параметара: коефицијента пригушења, коефицијента линеарне и нелинеарне крутости, фреквенције принудне силе и времена.



Слика 6.2. Репрезентативни сегмент осцилаторног модела ZP миша у коме су молекули повезани вискоеластичним везама. Наранчасто- $ZP1$, плаво- $ZP2$,

зелено-ZP3. Косе стрелице показују да сперматозооиди -спољна принудна сила дејствују на чворне молекуле- ZP1 под одређеним углом и одређеном амплитудом. x_i, y_i, u_i, v_i су ортогонални правци кретања молекула у ланцима у осцилатрном моделу ZP миша. Проучаваћемо услове под којима долази до синхронизацију између чворних молекула постављених по дијагонали у репрезентативном сегменту модела (молекули означени бројевима 1 и 3) за случај да сперматозооиди дејствују у виду спољне принудне силе на чворне-ZP1 молекуле као што је приказано на слици. Могуће је посебно задати вредности амплитуде и угла дејства спољне принудне силе за сваки чворни молекул.

Нелинеарни дискретни модел ZP осцилатроне мреже сматрамо нелинеарним неконзервативним системом, који још неко кратко време (прелазни период) осцилује под принудном силом, а везе између молекула су вискоеластичног типа и осцилаторно понашање молекула у моделу се може описати помоћу диференцијалних једначина *Duffing*-овог типа са нелинеарношћу трећег степена.

$$\dot{w}_{ij}(t) + 2\delta_{(w)0} \dot{w}_{ij} + \omega_{(w)0}^2 w_{ij}(t) = -\tilde{\omega}_{(w)}^2 w_{ij}^3(t) + h_{i,j} \cos(\Omega_{ij}t + \alpha_{ij}) + \tilde{h}_{i,j} \cos(\tilde{\Omega}_{ij}t + \tilde{\alpha}_{ij}). \quad (6.1)$$

$$\begin{aligned} \ddot{u}_{ij} + \omega_{(u)0}^2 (-u_{i-1,j} + 2u_{i,j} - u_{i+1,j}) + 2\delta_{(u)i,j} (-\dot{u}_{i-1,j} + 2\dot{u}_{i,j} - \dot{u}_{i+1,j}) = \\ = +\tilde{\omega}_{(u)}^2 (u_{i+1,j} - u_{i,j})^3 - \tilde{\omega}_{(u)}^2 (u_{i,j} - u_{i-1,j})^3 + h_{i,j} \cos(\Omega_{ij}t + \alpha_{ij}) \end{aligned} \quad (6.2)$$

$$\begin{aligned} \ddot{v}_{ij} + \omega_{(v)0}^2 (-v_{i,j-1} + 2v_{i,j} - v_{i,j+1}) + 2\delta_{(v)i,j} (-\dot{v}_{i,j-1} + 2\dot{v}_{i,j} - \dot{v}_{i,j+1}) = \\ = +\tilde{\omega}_{(v)}^2 (v_{i,j+1} - v_{i,j})^3 - \tilde{\omega}_{(v)}^2 (v_{i,j} - v_{i,j-1})^3 + \tilde{h}_{i,j} \cos(\Omega_{ij}t + \tilde{\alpha}_{ij}) \end{aligned} \quad (6.3)$$

у којима су $2\delta_{(u)i,j}$, и $2\delta_{(v)i,j}$ редуковани коефициент пригушења (дисипације) вискоеластичних елемената спрезања ланаца у циркуларном односно меридијалном правцу, $h_{i,j} \cos(\Omega_{ij}t + \alpha_{ij})$ редукована периодична једнофреквентна сила, фреквенције Ω_{ij} , фазе α_{ij} и редуковане амплитуде $h_{i,j} = \frac{F_{0,i,j}}{m_{i,j}}$ која дејствује

у циркуларном правцу на сваки молекул у ланцу у циркуларном правцу, док је $\tilde{h}_{i,j} \cos(\Omega_{ij}t + \tilde{\alpha}_{ij})$ редукована периодична једнофреквентна сила, фреквенције Ω_{ij} , фазе $\tilde{\alpha}_{ij}$ и редуковане амплитуде $\tilde{h}_{i,j} = \frac{\tilde{F}_{0,i,j}}{m_{i,j}}$ која дејствује у меридијалном правцу на сваки молекул у ланцу у меридијалном правцу. У анализама, зависно од утицаја сперматозооида на молекуле у ланцима, ове редуковане амплитуде $h_{i,j}$ и $\tilde{h}_{i,j}$ сила узимаћемо једнаке нули за сваки молекул на који не дејствује сперматозоид, а различите од нуле за оне чворне молекуле или изабране молекуле у ланцу на које дејствују сперматозоид те амплитуде биће различите од нуле.

Услов за потпуну синхронизацију чворних молекула у положају 1 и 3:

$$x_3(t) + y_3(t) = u_9(t) + v_9(t) \quad (6.4)$$

За анализу појаве синхронизације и асинхронизације путем вишепараметарске анализе користимо софтверски алат *Mathematica*. Укуцавамо систем нехомогених нелинеарних диференцијалних једначина (44 једначине) и одговарајућим наредбама, као резултат добијамо графичке прилоге, које анализирамо нумеричким експериментом променом и подешавањем једног или групе параметара. Можемо да пратимо једно или вишепараметарску трансформацију графика кривих у фазном простору осцилаторног стања кинетике једног или више молекула користећи комбинације осцилаторних померања једног или више молекула у радијалном и/или циркуларном правцу. Користимо нумеричке податке и/или податке параметара у одређеним параметарским опсезима.

Вредности параметара: масе молекула у хетерогеним ланцима модела осцилаторне ZP мреже узете су из (*Green, 1997*):

$$m_1 = m_5 = m_7 = m_{11} = 137.8248 \cdot 10^{-24} \text{ kg} \quad m_2 = m_4 = m_6 = m_8 = m_{10} = 199.2648 \cdot 10^{-24} \text{ kg}$$

$m_3 = m_9 = 332.1080 \cdot 10^{-24} \text{ kg}$ (Моларне масе ZP₁, ZP₂ и ZP₃ гликопротеина су преведене из далтона : (MrZP1): (200 000 Da, MrZP2): 120 000 Da и (MrZP3): 83,000 у kg).

линеарна крутост је рачуната по формули:

$$c = \frac{E(R^2 - r^2)\pi}{2R} \quad (6.5)$$

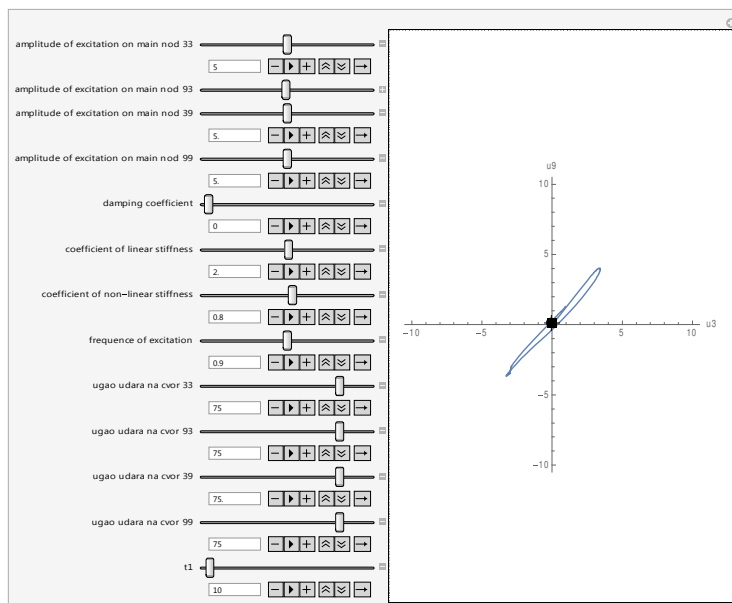
Са подацима који се односе на *ZP* ембриона миша: $E_e=42.2\text{kPa}$, $2R_e=61\ \mu\text{m}$ -средњи дијаметар ембриона миша из (*Sun et al, 2003*), $\delta_e=5.34\ \mu\text{m}$ -процењена дебљина *ZP* ембриона миша и коефицијент крутости израчунат по формули (6.5) - $c_e=0.646\text{N/m}$.

Коефицијенти испред једначина у *Mathematica* софтверском пакету су добијени тако што су дељени са масом m_1 и сведени на бездимензионе вредности.

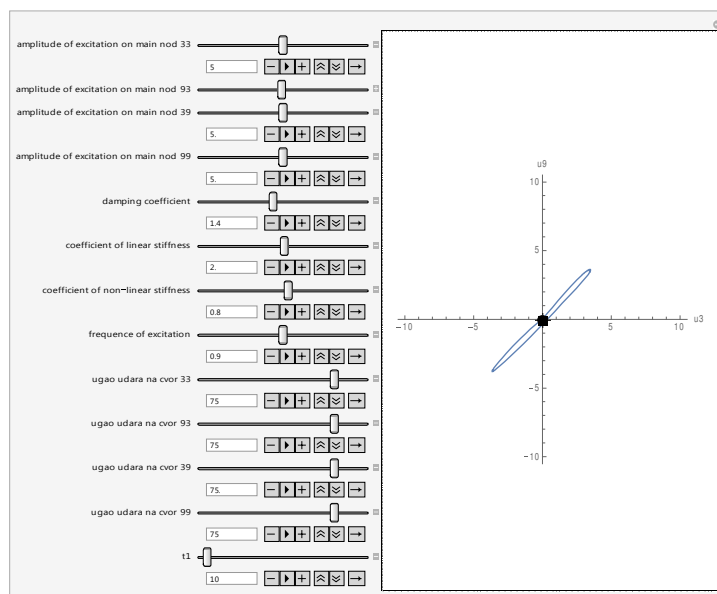
Амплитуде принудне силе на сваки чворни молекул су узете да буду арбитарно од 0-10; коефицијент линеарне крутости *ZP* ембриона миша је 0.646 (од 0,3-3,65) коефицијент нелинеарне крутости узет је арбитарно 0,1 (0-1,5), угао дејства сперматозоида на сваки чворни молекул има вредности на скали од 0-90°, време (5-650).

Утицај коефицијента пригушења на синхронизацију чворних молекула у моделу у позицији 1 и 3:

За случај кад сперматозоди дејствују на сва 4 чворна молекула под истим углом од 75°, вредности коефицијената линеарне и нелинеарне крутости као и вредности фреквенције принудне силе су на средини скале, а коефицијент пригушења једнак 0 у првих 10s од посматрања приказан је на Слици 6.3.

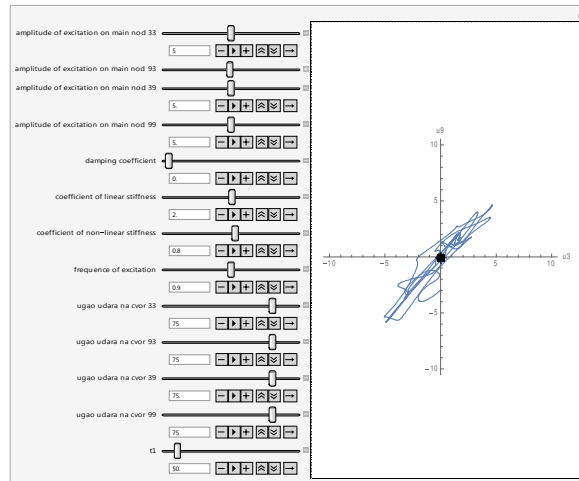


Слика 6.3. Синхронизација молекула у позицији 1 и 3 у првих 10s за случај да осцилују без пригушења. Вредности амплитуда принудне силе су једнаке као и углови дејства.

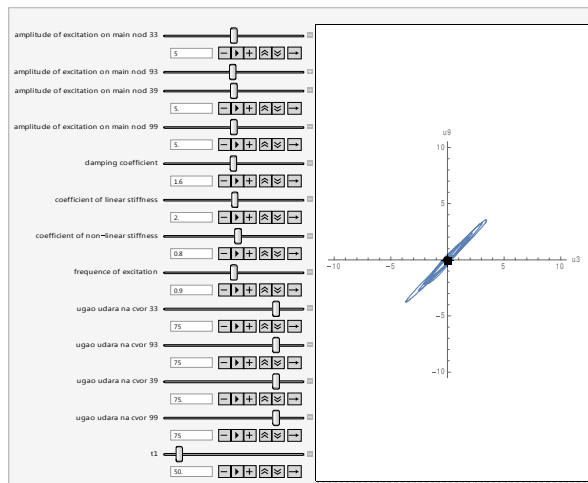


Слика 6.4. Синхронизација молекула у позицији 1 и 3 у првих 10s за случај да је вредност коефицијента пригушења отприлике на средини скале (1,4) пригушења. Вредности амплитуда принудне силе су једнаке као и углови дејства. Атрактор синхронизације сада има облик елипсе.

Како време одмиче (нпр у 50с) за исте вредности коефицијента пригушења видимо да ови молекули испадају из синхронизације да би се са повећањем коефицијента пригушења поново приближили синхронном кретању. Слика 6.5-6.6.



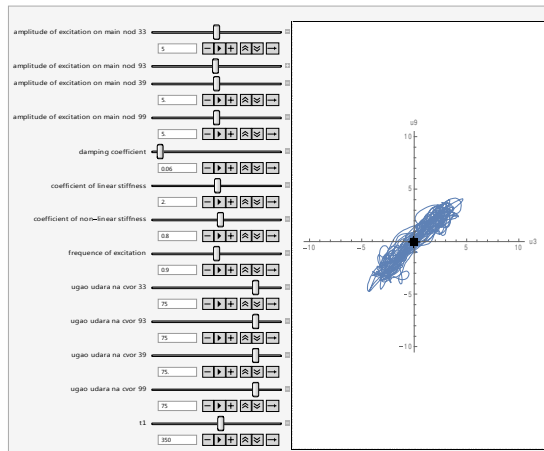
Слика 6.5 .Синхронизација молекула у позицији 1 и 3 у првих 50с за случај да осцилују без пригушења Вредности амплитуда принудне силе су једнаке као и углови дејства. Кретање молекула није синхронизовано-у питању је хотично кретање посматраних чворних молекула.



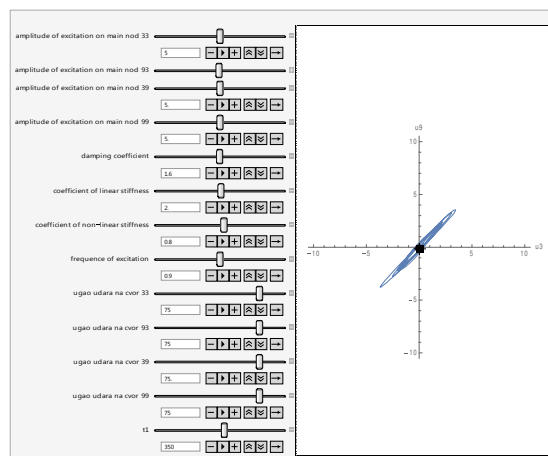
Слика 6.6. Синхронизација молекула у позицији 1 и 3 у првих 50с за случај да је вредност коефицијента пригушења отприлике на средини скале (1,6) пригушења. Вредности амплитуда принудне силе су једнаке као и углови дејства. Појављује се атрактор синхронизације налик елипси.

У 350с од посматрања график синхронизације кретања чворних молекула у позицији 1 и 3 у зависности од коефицијента пригушења приказани су на слици 6.7а,б,в. (мало пригушење-0,06, средње 1,6 и 3,22). Такође се запажа да се са порастом коефицијента пригушења молекули синхронизују. Овај ефекат је још израженији на крају посматраног периода. Слика 6.8.

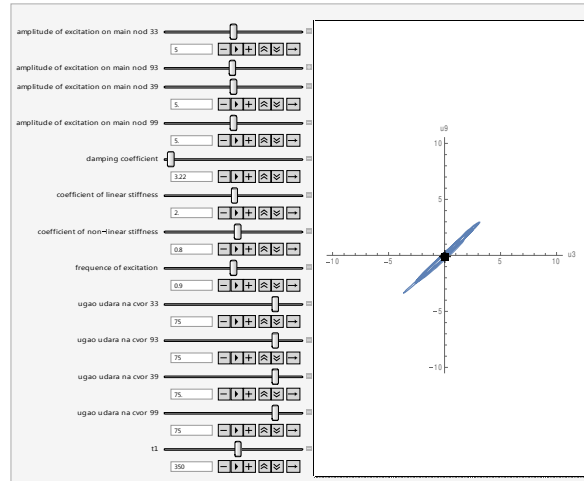
а



б

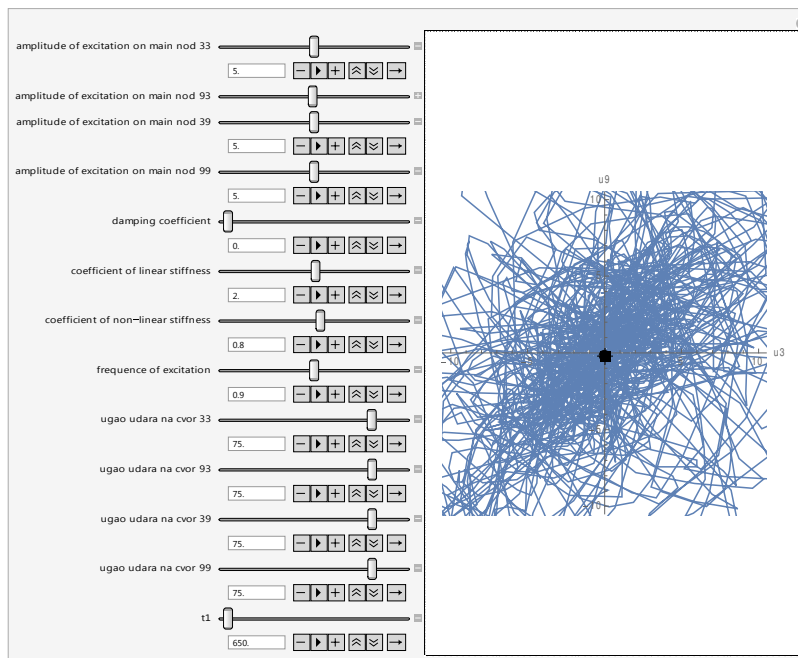


B

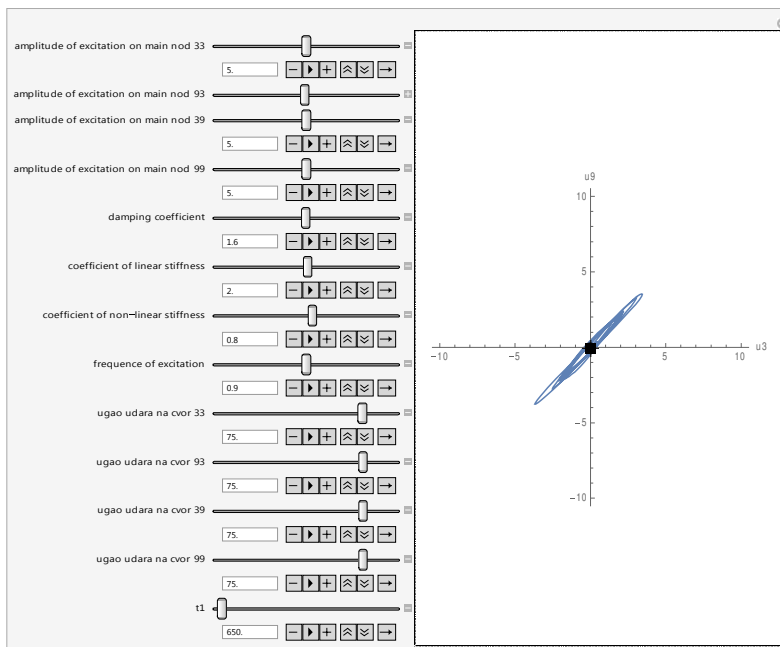


Слика 6. 7. Синхронизација молекула у позицији 1 и 3 у првих 350с за случај да је вредност коефицијента пригушења: а. 0 б. 1,6 в. 3.22. Вредности амплитуда принудне силе су једнаке као и углови дејства. Са повећањем вредности коефицијента пригушења молекули теже синхронизацији.

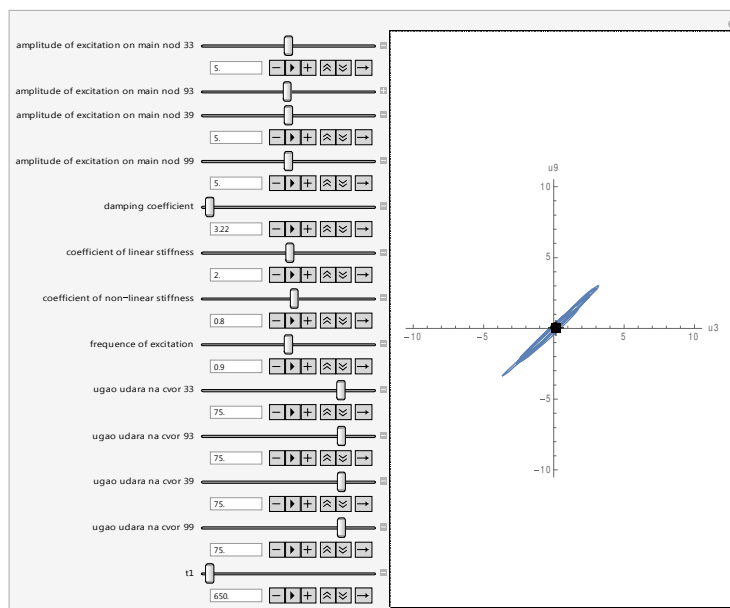
а



б



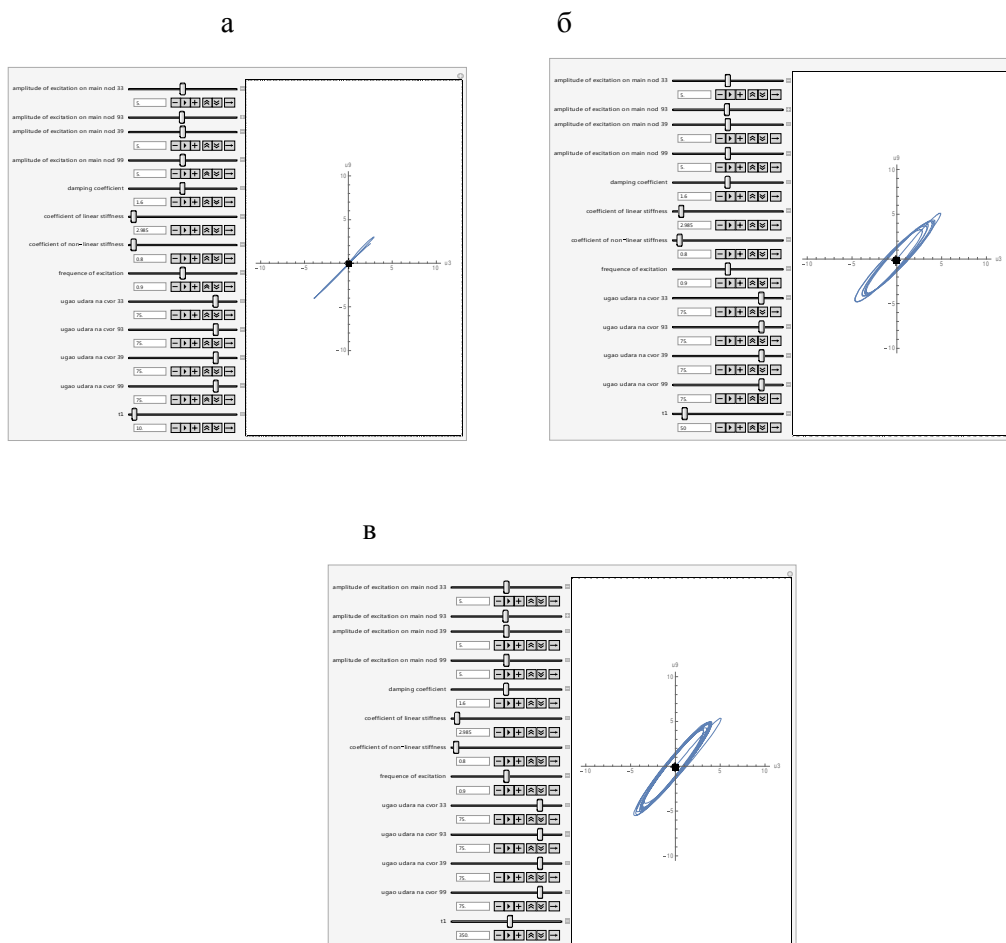
в



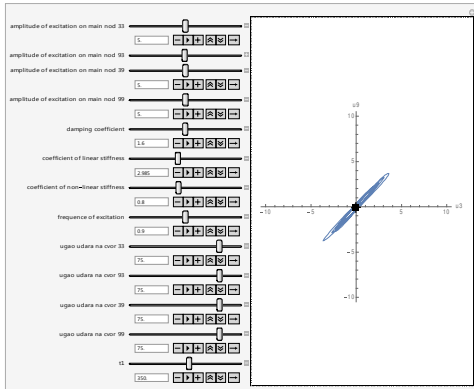
Слика 6. 8. Синхронизација молекула у позицији 1 и 3 на крају посматраног периода од 650с за случај да је вредност коефицијента пригушења: а. 0 б. 1,6 в. 3.22. Вредности амплитуда принудне силе су једнаке као и углови дејства. Са повећањем вредности коефицијента пригушења молекули теже синхронизацији.

Утицај **кофицијента линеарне и нелинеарне крутости** када је вредност коефицијента пригушења, амплитуде и фреквенција принудне силе на половини скале а углови дејства спољне принудне силе 75, приказан је на слици 6.9. Са одмицањем времена атрактор синхронизације има облик елипсе.

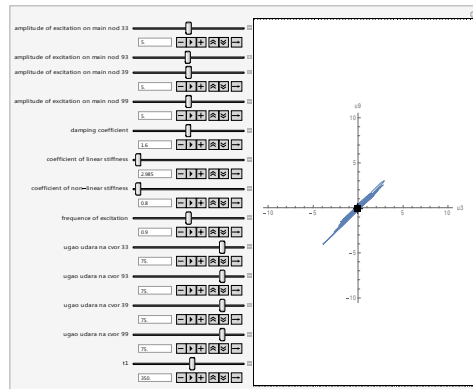
Са повећањем вредности ових коефицијената посматрани чворни молекули у дијагоналној позицији теже синхронизацији. Слика 6.10.



Слика 6.9. Синхронизација молекула у позицији 1 и 3 за мале вредности коефицијената линеарне и нелинеарне крутости а. У 10с б у 50с и в. у 350с. Вредности амплитуда принудне силе су једнаке као и углови правца дејства.



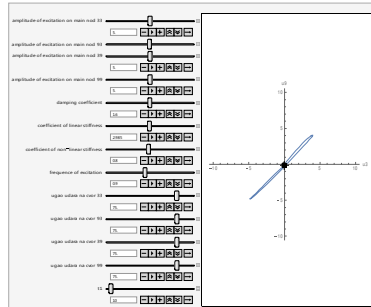
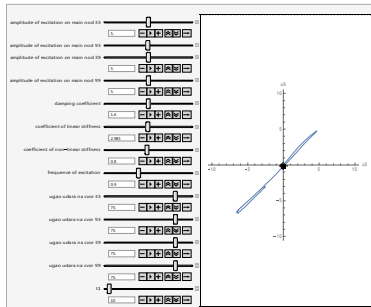
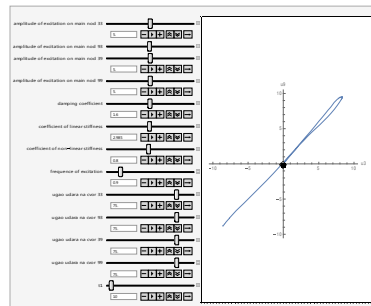
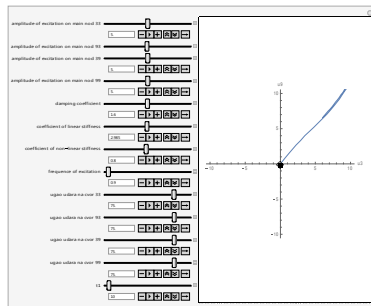
а



б

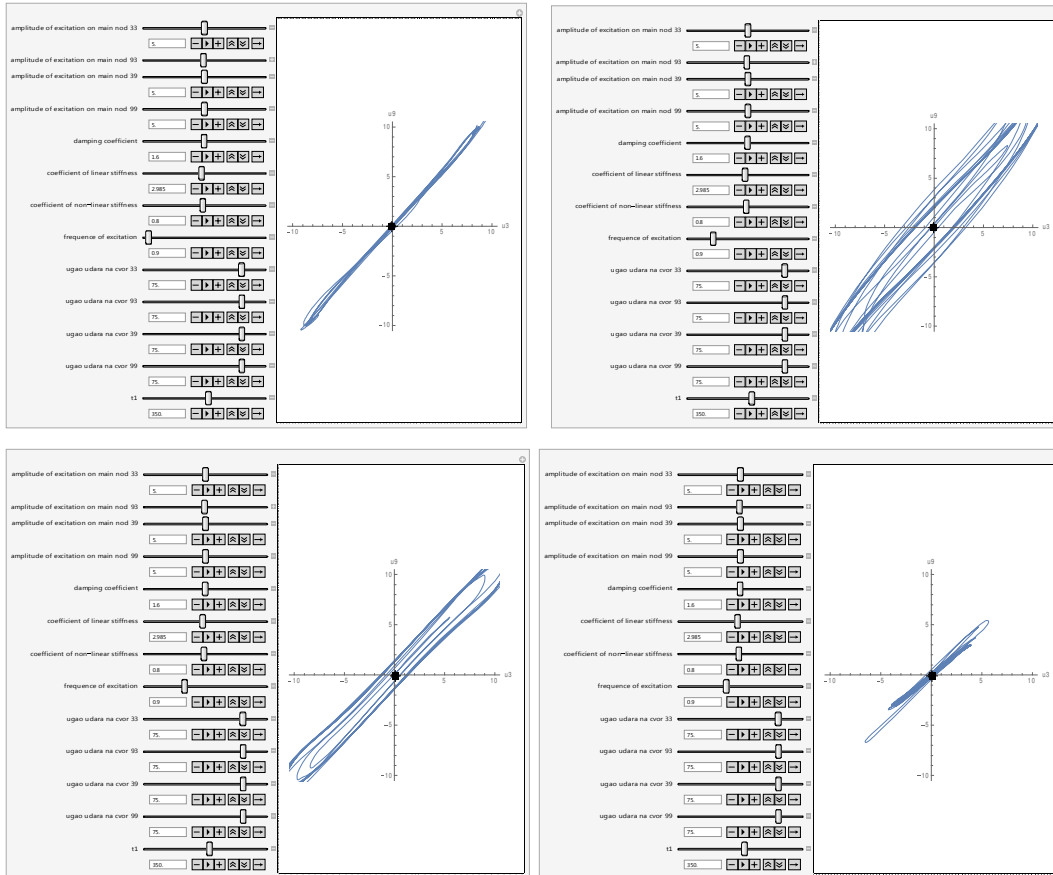
Слика 6.10. Са повећањем коефицијента линеарне и нелинеарне крутости посматрани чворни молекули теже синхронизацији. Вредности амплитуда принудне силе су једнаке као и углови правца дејства. Време - 350с.

Са повећањем **вредности фреквенција принудне силе** посматрани чворни молекули показују феномен транзиторне синхронизације. Слика 6. 11.



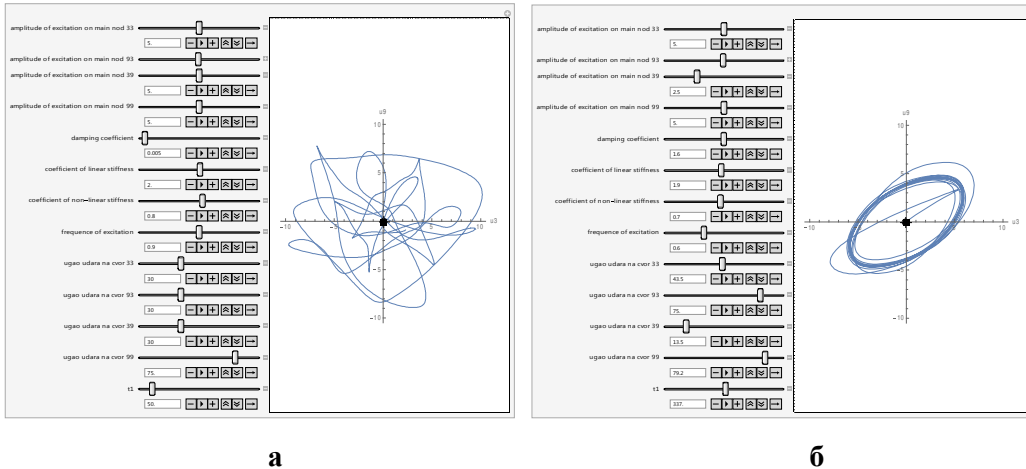
Слика 6.11. Са повећањем вредности фреквенција принудне силе посматрани чворни молекули показују феномен транзиторне синхронизације. Време-10с.

Са одмицањем времена транзиторни синхронизациони феномени су још израженији. Слика 6.12.



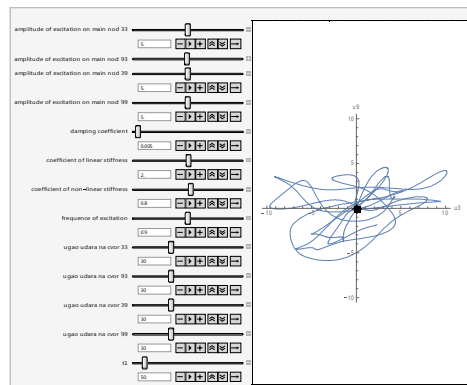
Слика 6.12. Са повећањем вредности фреквенција принудне силе посматрани чворни молекули показују феномен транзиторне синхронизације. Време- 350с.

Уколико дистрибуција принудне силе није симетрична а њена вредност на средини посматране скале, могуће је потпуно хаотично кретање посматраних молекула (нпр 3 угла дејства сперматозооида су 30^0 , а један 75^0), али и појава атрактора синхронизације у виду елипсе (сви углови различити) у другој половини посматраног временског периода. Слика 6. 13.



Слика 6. 13. а. Потпуно хаотично кретање чворних молекула у позицији 1 и 3 када спољна принудна сила има вредности на средини скале дејствује асиметрично на 4 чворна молекула -3 угла дејства сперматозооида су 30° , а један 75° б. У другој половини посматраног периода дејства за различите углове дејства и средњу вредност фреквенције спољне принудне силе могуће је постојање атрактора синхронизације у виду елипсе.

За мале вредности коефицијенат пригушења и углове дејства од 30 степени, остали параметри на половини скале у 50 с имамо хаотично кретање ова два молекула. Слика 6. 14.



Слика 6. 14. За мале вредности коефицијента пригушења и углове дејства од 30 степени, остали параметри на половини скале у 50 с запажа се хаотично кретање чворних молекула у позицијама 1 и 3.

Синхронизација се може дефинисати као подешавање ритмова осциловања осцилујућих објеката због њихове слабе интеракције. „Синхронизација је сложен динамички процес а не стање.“ (*Pikovsky et al, 2001*)

Постоје различити облици синхронизације: идентична или потпуна синхронизација, општа синхронизација, синхронизација фаза, очекивана и синхронизација са кашњењем, синхронизација мера, пројективна синхронизација, синхронизација редукованог реда, адаптивна синхронизација, глобална синхронизација (код нелинеарно спрегнутих осцилатора- идентичних или неидентичних) (*Pikovsky et al, 2001*), што се дефинише критеријумима синхронизације, а метаматички изражава одређеним функцијама.

Сви наведени облици синхронизације имају заједничко својство асимптотске стабилности. То значи, да када се постигне синхронизација, мале пертурбације које ометају синхронизацију бивају брзо пригушене и поново се успоставља синхронизација. Математички се асимптотска стабилност карактерише позитивним *Lyapunov*-им експонентом система који се састоји од два спрегнута осцилатора. Уколико је синхронизација хаотична *Lyapunov* експонент постаје негативан.

С обзиом да у нелинеарним динамичким системима, није могуће достићи идеалне синхронизације, већ само синхронитације са грешкама, када те грешке асимптотски теже нули, такву синхронизацију називамо асимптотска синхронизација. Ако се у биосистему не могу успоставити такве асимптотске синхронизације, онда се то може остварити управљањем таквим системом. (*Блекхман, 1971, Blekhtman et al, 1997*).

Наручито је интересантна и од практичног значаја екстерна контрола синхронизације која се може остварити кроз различите моделе (*Yu et al, 2012*). Постоје различите контролне шеме помоћу којих могу да се синхронзују нелинеарни системи: адаптивна контрола, фази контрола, контрола која се заснива на посматрачу, импулсивна контрола, интермитентна контрола, периодична нелинеарна интермитентна *feedback* контрола, нелинеарна контрола типа "*backstepping*", управљање у клизном режиму, управљање путем повратне спреге, метод активне контроле (*Olusola et al, 2011, Rega & Lenci, 2008, Yu et al, 2012*). Неки системи омогућавају чвршћу контролу хаоса.

Динамички феномени који се могу јавити у присуству спољне периодичне силе у (спрегнутим) осцилаторним системима су хармонијске, суб- и суперхармонијске осцилације, закључавање фреквенција, хаотично понашање у области када је контролни параметар мали, периодичне и квазипериодичне осцилације у основном региону резонанције.

Синхронизација осцилаторних система има велику примену пре свега у електротехници (електрична кола, телекомуникације), биомедицини (неуронауке (*Pikovsky & Rosenblum, 2015, Freitas et al, 2015, Krishnan et al, 2013*) - електроенцефалографија (ЕЕГ), електрокардиографији, програмирању *pacemaker*-а, синхронизацији кардиореспираторних сигнала (*Kralemann et al, 2013*), физичкој хемији (моделовање динамике физичко-хемијских процеса ензим-супстрат (*Olusola et al, 2011*), проучавању динамике Белоусов-Жаботински реакције која представља један нелинеарни хемијски осцилатор).

„Синхронизација спрегнутих осцилатора (комплексних мрежа) је једно од честих кохерентних понашања које све више привлачи пажњу у физици, биологији, комуникацијама и другим областима науке и технике.“ (*Jia et al, 2012*). Проучавани су различити феномени синхронизације у комплексним мрежама помоћу различитих модела сложених осцилатора повезани нелинеарним везама (*Hodgin-Huxley*-ов модел, *Moang-Buzsaki*- модел, *Kuramoto* модел и модели изведени из њега: *Kuramoto-Sakaguchi, Deserter Hubs.*), као што је глобална синхронизација, парцијална синхронизација и кластер синхронизација.

У сложеним системима нелинеарно спрегнутих идентичних осцилатора могуће је да поједини делови система остварују синхронизацију, те је у питању парцијална (*Freitas et al, 2015*) или пак кластер синхронизација. (*Burylko & Pikovsky, 2011*). У сложеним осцилаторним системима могућа је и глобална синхронизација (*Jia et al, 2012*).

Модална или кластер структура је честа структура у природним комплексним системима. Кластер синхронизација (одређени кластер унутар мреже показује изохроне синхронизације) је од значаја за биолошке науке, ласерске технологије комуникациони инжењеринг.

Групна синхронизација је генерализација кластер синхронизације где се локална динамика чворова у свакој групи разликује (групе могу и не морају да

буду повезане); осцилатори могу да буду спрегнути везама са задршком. Групна синхронизације се може постићи повећањем јачине спољашње спрегнутости (*Jia et al, 2012*).

Осцилатори могу имати аутономни и неаутономни режим, да показују феномене биритмичности у аутономном режиму, различите транзиције из синхронизације у хаотично стање и из хаотичног у синхронизовано стање.

Стабилност синхронизације зависи пре свега од јачине веза између спрегнутих осцилатора односно шеме повезивања, интензитета динамике дејства спољне принудне силе (*Krishnan et al, 2013*)), тако да у таквим случајевима можемо говорити о степену синхронизације. Да ли долази до синхронизације или асинхронизације, (односно који од ова два процеса је стабилан) зависи од јачине интеракције сваког од пара спрегнутих осцилатора у оквиру сложеног глобалног осцилатора и колико се елементи међусобно разликују. Ова шема се најчешће користи за моделе простирања и међузависности можданих таласа (*Pikovsky et al, 2001*).

Међуоднос интензитета спрегнутости осцилатора и дистрибуције сопствених кружних фреквенција одређује колико ће осцилатора у сложеним осцилатроним системима бити синхронизовано (*Pikovsky et al, 2001*).

У нашем нумеричком експерименту добили смо да се повећањем вредности коефицијента пригушења синхронизација јавља и при мањим вредностима коефицијента линеарне и нелинеарне крутости.

За настанак комплетне синхронизације од значаја је фреквенција спољне принудне силе као и нападна тачка њеног дејства- на који молекул дејствује и да ли дејствује симетрично, али су од значаја и јачина повезаности молекула – коефицијенти линеарне и нелинеарне крутости: што је већа вискозност и еластичност и коефицијент пригушења, то је боља синхронизација између осцилативног кретања *ZP* молекула.

Експериментални подаци указују да након оплодње *ZP* повећава свој модул еластичности тј. испољава вискоеластична својства. Већа крутост *ZP* после оплодње повезана је са ефикаснијим механизмом *polyspermy block-a*.

ZP ембриона миша је „чвршћа“ од *ZP* јајне ћелије (*Papi et al, 2013, Sun et al, 2003*).

Према овом осцилаторном моделу *ZP*, након оплодње, повећање вискозности и пригушења које би пратило овај неконзервативни нелинеарни систем, побољшава синхронизацију осцилаторног понашања чворних молекула.

Експериментални подаци указују да је механизам *polyspermy block*-а ефикаснији када *ZP* има вискоеластична својства тј што је „чвршћа“ (Yanez et al, 2016) (мада ти подаци нису конзистентни за *in vitro* услове). Већа вискозност са своје стране даје ефикаснији *polyspermy block*, што би значило да што су молекули *ZP* синхронизованији у свом осцилаторном кретању то је ефикаснији *polyspermy block*.

Добијени нумерички резултати би квалитативно могли да послуже за објашњење феномена *polyspermy block*-а.

Претпостављамо да уколико молекули *ZP* осцилују синхроно може да настане такво осцилаторно стање *ZP* оплођене јајне ћелије које не може да се синхронизује ни са једним новодолазећим сперматозооидом или осцилаторно стање које чини да *ZP* постане непробојна осцилаторна баријера.

Како су јајна ћелија и ембрион у различитом осцилаторном стању (Hedrih, 2014) претпоставка је да способност синхронизације молекула *ZP* ембронна миша може допринети *polyspermy block*-у.

Претпоставка је да би комплетна синхронизација *ZP* молекула пре блокирала пенетрацију новог сперматозооида и да на тај начин доприноси *polyspermy block*-у.

У ланчаним системима где су везе између елемената нелинеарне, постоји експоненцијална дивергенција трајекторија која почиње од веома блиских тачака у фазном простору (González-Miranda, 2004, Simonović J, 2013).

Синхронизација молекула *ZP* је боља уколико је већа вискозност, и пригушење као и фреквенција принудне силе.

У наставку биће наведена досадашња сазнања о још недовољно испитаном феномену *polyspermy block*-а код сисара.

Појам *Polyspermy block*-а. Код неких животињских врста (морски јеж, водоземци) утврђени су електрични феномени који обухватају брзи блок-деполаризацију плазма мембране уз учешће јона калцијума и натријума и спори блок који подразумева ослобађање кортикалних гранула, реакцију *ZP*

(тзв.кортикална реакција) и последичну повећану отпорност на разлагање ензимима али и на спољашњи механички утицај што се објашњава структурном реорганизацијом спољашњег и унутрашњег слоја *ZP* која је праћена и биохемијским променама њених гликопротеина. Последица тога је, као што је већ поменуто да се сперматозооиди не могу закачити за, нити продрети кроз *ZP* а већ закачени бивају одбијени (*Tsaadon et al, 2006, Avella et al, 2013*). Прецизан механизам *polyspermy block*-а се још увек не зна. Једна од теорија је да долази до модификације *ZP2* и *ZP3* гликопротеина који се сматрају примарним односно секундарним рецепторима за везивање сперматозооида за *ZP* (*Clark, 2011*). С обзиром да су гликопротеини *ZP* веома негативно наелектрисани продором једног сперматозооида могуће је да долази до смањења тог негативног потенцијала и цела *ZP* постаје мало позитивнија (тачније мање негативна) те се наелектрисује по површини јајне ћелије (округла ћелија) -сфери шири по површини сфере и онда одбије остале позитивно наелектрисане сперматозооиде-теорија биоелектричних феномена који су укључени у полисперми блок. *Polyspermy block (PSB)* је механизам који обезбеђује константност генетског материјала у свакој генерацији. Према до скоро важећој биохемијској теорији *PSB* почетни контакт сперматозооида и *ZP* индукује акрозомалну реакцију, олакшавајући излагање и везивање секундарних рецептора за везивање сперматозооида. Након секундарног везивања, сперматозооид пролази кроз *ZP*, пролази узак перивителински простор и долази у контакт са оолемом. На крају, као резултат фузије две плазма мембране – јајне ћелије и сперматозооида, ензим који потиче од сперматозооида специфична фосфолипаза *C*-зета (*spermspecific phospholipase C-zeta (PLC-zeta)*) окида сигнализацију зависну од Ca^{2+} у цитоплазми јајне ћелије. (*Saunders et al, 2002; Swann et al, 2006* по (*Coy & Aviles, 2010*)). Ca^{2+} зависна сигнализација се сматра одговорном за промене које доводе до *PSB* (*Gardner & Evans, 2006*) као и за ослобађање кортикалних гранула које модификују биохемијска и биолошка својства *ZP* доводећи до кортикалне реакције. Специфичне гликозидазе и протеазе које представљају садржај кортикалних гранула уклањају угљене хидрате који су укључени у везивање сперматозооида и јајне ћелије и секу *ZP* гликопротеине доводећи до "очвршћавања *ZP*" и сперчавања продора сперматозооида (*Coy & Aviles, 2010*).

На основу *time-lapse cinematography*-је Mio и сар, (2012) су установили да унутар 10s од тренутка кад хумани сперматозоид продре кроз *ZP* и дотакне плазма мембрану долази до престанка даље пенетрације било ког другог сперматозоида и њиховог одбијања од *ZP* и предложили да је ово механизам *PSB* -а који се дешава одмах након оплодње јајне ћелије хумане врсте и независтан је од кортикалне реакције. Просечно време везивања сперматозоида за мембрану јајне ћелије је 96 мин након инсеминације, а глава сперматозоида нестаје у просеку 37 мин након везивања сперматозоида. Званично постоје два механизма *polyspermy block*-а: блок мембране јајне ћелије-брзи и кортикална реакција-спори блок који зависи од ослобађања ензима из кортикалних гранула –механизам који се активира 5-8 мин након активације јајне ћелије и који се сматра главним механизмом *PSB* а код хумане врсте. До тада се сматрало да брзи *PSB* не постоји код хумане врсте. Овај брзи блок Mio *et al.* (2012) су запазили код три различите јајне ћелије. „Процес оплодње је веома деликатан и прецизан и без сумње постоје више нивоа сигуросних механизма који обезбеђују да дође до нормалне оплодње“ (Mio *et al.*, 2012). Сам процес *polyspermy block*-а није довољно јасан ни детаљно проучен. (нап: можда кортикалне грануле поред већ описане уоге, мењају *pH* средине што доводи до конформационих промена *ZP* гликопротеина, што резултује структурном реорганизацијом и стварањем нових веза између *ZP* гликопротеина).

Ефикасност *PSB* се разликује од врсте до врсте и већа је у *in vivo* условима. Највећи проценат полиспермије се запажа код свиње. Јајне ћелије ове врсте су веома осетљиве на промену услова и постоји могућност да је ово последица неоптималних протокола *IFV*-а код ове врсте (нпр. неоптимални *pH* медијума).

Jaffe *et al.*, (1983) су испитивали могућност постојања *PSB* -а код миша на јајној ћелији којој је уклоњена *ZP*. Мерили су мембрански потенцијал јајне ћелије пре оплодње (-41 ± 4 mV (SD)), и 7 ± 5 мин након оплодње и установили да мембрански потенцијал оплођене јајне ћелије показује варијације од 4 ± 1 mV које трају отприлике 1 минут. Осим ових малих варијација мембрански потенцијал оплођене јајне ћелије остаје константан 60мин након оплодње (просечне

вредности (11 ± 4 mV) што не представља значајну разлику у односу на неоплођену јајну ћелију у трајању од 60мин. *Jaffe et al*, (1983) су закључили да резултати указују да, у посматраном периоду, *PSB* није електрични феномен. Смањење јона натријума и калцијума у медијуму не индукује полиспермију. Као последица оплодне отпор плазма мембране пада од 96 ± 34 на 44 ± 15 MΩ. Ове промене отпорности прате осцилације напона (*Jaffe et al*, 1983).

Други догађај у оквиру *PSB* је ослобађање садржаја кортикалних гранула у перивителински простор. Код кортикалне реакције коју индукује везивање сперматозоида долази до ослобађања-егзоцитозе лектина из кортикалних гранула, дифузије и везивања лектина за лиганд који је удружен са *ZP* и спречавање везивања сперматозоида и *ZP* преко лектин-лиганд реакције што доводи до *polyspermy block*-а (*Hedrick*, 2007). Експерименти са реинсеминацијом јајних ћелија којима је уклоњена *ZP* указују да је плазма мембрана јајне ћелије промењена тако да је блокирано везивање сперматозоида за плазмамембрану јајне ћелије осим у нивоу секундарног поларног тела.

Вештачка активација јајне ћелије помоћу етанола или стронцијум хлорида не доводе до *PSB* -а. (понашају се исто као и неактивирани контролни јајне ћелије). Присуство/одсуство *ZP* не утиче на пенетрабилност активисаних јајних ћелија током процеса активације. Бојење садржаја кортикалних гранула лецитином указује да је активација довела до егзоцитозе кортикалних гранула, али су активирани јајне ћелије и даље биле пенетрабилне за сперматозоиде (*Sun*, 2003). Из чега је изведен закључак да способности плазмамембране јајне ћелије да веже сперматозоиде доводи до *polyspermy block*-а; за *polyspermy block* је неопходно присуство сперматозоида с обзиром да вештачка активација не доводи до *polyspermy block*-а, да садржај кортикалних гранула не игра улогу у настанку одговора плазма мембране оплођене јајне ћелије у смислу *polyspermy block*-а. (*Sun*, 2003). Да „очвршћавање“ *ZP* изазвано вештачким путем није ефикасно у изазивању *PSB*.

Иако постоје бројне публикације у којима се очвршћавање *ZP* наводи као постфертилизациони феномен, настао као последица ослобађања кортикалних гранула, показало се да излагње *ZP* и јајне ћелије различитим крослинкерима пре оплодне (*Canovas et al*, 2009) доводи до "очвршћавања" *ZP*. Поред

постфертилизационог „очвршћавања“ ZP, откривено је да у *in vivo* условима постоји и префертилизационо „очвршћавање“ ZP. Префертилизационо "очвршћавање" ZP се дешава у јајоводу модификацијом ZP помоћу специфичног гликопротеина јајовода (*oviductal-specific glycoprotein (OVGP1)*) који луче епителне ћелије јајовода у време овулације и гликозаминогликани налик хепарину (*heparin-like glycosaminoglycans (S-GAGs)*) који су присутни у течности јајовода (Coy & Aviles, 2010). Кортикална реакција је слична у *in vivo* и у *in vitro* условима за зреле јајне ћелије у одговарајућим условима култивације. Уколико се у IVF протоколима смањи број сперматозооида који се користе за оплодњу, смањује се учесталост полиспермије (код свиње је не елиминише у потпуности). Један од предложених механизма којим би могла да се објасни повећана инциденца полиспермије је одложено ослобађање кортикалних гранула код јајних ћелија сазрелих у *in vitro* условима (Wang, Hosoe & Shioya, 1997 по Coy & Aviles, 2010). Coy & Aviles, (2010) сматрају да је овај механизам префертилизационог "очвршћавања" ZP у *in vivo* условима независан од кортикалних гранула и да доприноси ефикаснијем *polyspermy block*-у.

Поред тога исти аутори доводе у питање да је механизам *polyspermy block*-а и „очвршћавања,, ZP идентичан за све сисаре, собзиром да је највећи број података добијен за миша односно пацова. Повећана отпорност на ензимску дигестију се јавља и код зрелих и код незрелих јајних ћелија (Smorag & Katska, 1988 по Coy & Aviles, 2010). Не постоји разлика у времену дигестије ZP јајних ћелија миша изолованих из фоликула јајника и изолованих из јајовода (Coy & Aviles, 2010).

Tsaadon *et al* (2006) сматрају да се механизам ослобађања садржаја кортикалних гранула смештених у цитоплазми непосредно испод плазмамембране јајне ћелије која се налази у метафази II развио као еволутивни механизам који спречава продор додатних сперматозооида, успешну активацију јајне ћелије и развој ембриона. Интеракција између јајне ћелије и сперматозооида доводи до активације јајне ћелије која укључује ослобађање садржаја кортикалних гранула у перивителински простор и модификацију ZP (Tsaadon *et al*, 2006).

Различити механизми могу допринети повећању полиспермије код различитих врста нпр.: парење мало након овулације или у другом делу еструсног циклуса. Код миша, хрчка и зеца не запажа се значајнија деполаризација мембране јајне

ћелије након оплодње. Блок плазма мембране јајне ћелије сисара настаје отприлике у исто време кад и *ZP* блок (0.5-1 h). Старије јајне ћелије (после термина овулације) спорије реагују на егзоцитозу садржаја кортикалних гранула и показују спонтани губитак кортикалних гранула као и абнормални одговор варијације Ca^{2+} јона у односу на оне јајне ћелије које су у термину овулације (1.5 h од оплодње се максималан број сперматозоида закачи за огољену плазма мембрану јајне ћелије а онда настаје плато и број сперматозоида који се могу закачити за плазма мембрану јајне ћелије се даље не повећава). *ICSI* техника не индукује *polyspermy block*- јајне ћелије миша -оплођене *ICSI* техником и неоплођене јајне ћелије миша везују исти проценат сперматозоида. *Gardner & Evans* (2006) претпостављају да након оплодње долази до ремоделовања кортикалног цитоскелета оплођене јајне ћелије настале као последица интеракције мембрана јајне ћелије и сперматозоида или до оплодњом индукованих промена мембранских липида зигота (*Gardner & Evans, 2006*).

„Полиспермија се често дешава у оквиру *IVF* протокола говечета, али није познато њено порекло. Иако не долази до биохемијског очвршћавања након оплодње крутост спољњег слоја *ZP* је значајно повећана (биохемијско очвршћавање не прати и биомеханичку промену еластичности *ZP*). Постоји могућност да полиспермија повезана са непотпуном или недовољним очвршћавањем *ZP*., И у спољашњем и у унутрашњем слоју *ZP* са сазревањем јајне ћелије долази до смањења крутости, и повећања након оплодње. „Код *ZP* оплођене јајне ћелије, сила неопходна да помери *ZP* филаменте је скоро слична сили коју производи бич сперматозоида говечета“ (*Papi et al, 2012*).

Израчуната енергија неопходна за пластичну транзицију *ZP*- иреверзибилну деформацију филамената у спољашњем слоју *ZP* зреле јајне ћелије је $3,8 \pm 0.7 \cdot 10^{16} \text{J}$, а оплођене јајне ћелије $6,46 \pm 0.6 \cdot 10^{16} \text{J}$. Распоред филамената је различит у спољашњем и унутрашњем слоју *ZP* у различитим фазама сазревања јајне ћелији као и после оплодње. (*Papi et al, 2012*)

И ако је до сада у већини радова аутори узимају апроксимацију да је *ZP* има идеално еластична својства, (*Papi et al, 2013*) сматрају да се њена дисипативна својства не могу занемарти. Повећање брзине кретања сперматозоида (у овом случају *AFM* игле) доводи до механичког одговора *ZP* у смислу повећања чврстоће

или вискоеластичног одговора." (*Papi et al, 2013*). Резултати нашег нумеричког експеримента показују да са повећањем фреквенције принудне силе и коефицијента линеарне и нелинеарне крутости, чворни молекули у моделу се боље синхронизују за случај да спољна принуда дејствује на чворне молекуле.

Према најновије објављеним истраживањима на основу вискоеластичних својства *ZP* зигота (аутори су користили *Zener*-ов модел) може се предвидети настанак бластоцисте како код миша тако и код хумане врсте неколико сати након оплодње са 90% прецизности, 95% специфичности и 75% сензитивности. (*Yanez et al, 2016*). Исти аутори указују на везу између зрелости јајне ћелије у тренутку оплодње, генске експресије, ослобађања кортикалних гранула при оплодњи, степена постфертилизационог очвршћавања *ZP*, квалитета ембриона и способности рађања живог потомства (*Yanez et al, 2016*). Постоје значајне разлике у транскриптомима вијабилних и невијабилних зигота, посебно у експресији гена који су одговорни за сазревање јајне ћелије. Јајне ћелије слабијег квалитета могу да ослобађају недовољну количину кортикалних гранула и самим тим недовољно очвршћавање *ZP* узрокујући промењена механичка својства након оплодње наводе *Yanez et al (2016)*. Резултати *Yanez и сар (2016)*, указују да је потенцијал ембриона за развитак већим делом одређен квалитетом и зрелошћу јајне ћелије пре оплодње и може се предвидети на основу механичких особина *ZP* зигота минимално инвазивном техником аспирационе микрпипете (*Yanez et al, 2016*).

„Постоји диференцијална експресија гена који су важни за процес оплодње код вијабилних и невијабилних јајних ћелија (нпр. *CD9, ZP3, и ZP4* код хумане врсте-ови гени могу да инхибирају везивање сперматозоида за јајну ћелију уколико нису експримирани на прави начин). Код невијабилних зигота постоје снижени нивои *PLCZI*, и *iRNA* (кодирају протеине сперматозоида), *IP3* рецептора (*ITPRI*) (важан за започињање осцилација Ca^{2+} кој доводи до ослобађања кортикалних гранула и „очвршћавања“ *ZP* (*Yanez et al, 2016*).

Када се на ћелију примени механичка сила, може да се повећа експресија гена, индукује полимеризација (*Davies & Tripathi, 1993, Komuro, & Yazakistress, 1993*) по (*Yanez et al, 2016*) и утиче на вијабилност ћелије (*Stupack & Cheresch, 2002* по *Yanez et al, 2016*). Криопрезервација утиче на механичка својства ембриона – чврстоћу

ZP и ослобађање кортикалних гранула. Криопрезервација повећава чврстоћу ембриона али се овај ефекат губи након 3 сата отапања у одговарајућем медијуму (хумани ембриони) (нису имали податке о методу замрзавања као ни о поступку који је коришћен *ICSI* или *IVF*) (*Yanez et al, 2016*).

На основу резултата нумеричког експеримента на вискоеластичном осцилаторном моделу *ZP* миша након оплодње запажамо да чворни молекули синхронно осцилују када су везе међу њима чвршће (веће вредности коефицијената линеарне и нелинеарне крутости) као и кад је пригушење система израженије. Као што је већ наведено, експериментални подаци показују да је већа вискозност *ZP* након оплодње удружена са ефикаснијим *PSB* и преживљавањем ембриона. На основу ових података можемо да претпоставимо везу између синхронизације осцилаторног кретања молекула *ZP* и *PSB*: - боља синхронизација би могла да значи и ефикаснији *PSB*.

У хибридним системима, какав је *ZP*, спреге нелинеарних осцилатора са спрегнутим пољима, механичким, физико-хемијским, електро-хемијским, због нелинеарности својства може постојати велико разилажење трајекторија за два скоро идентична система који полазе из веома блиских почетних услова, а кинетички параметри им се занемарљиво разликују. То уочавамо и у овој вишепараметраској анализи осцилација молекула у репрезентативном узорку дискретно континуалне сферне мреже *ZP*.

Закључак

Zona pelucida (ZP) представља ацелуларни омотач јајне ћелије сисара налик ирегуларној тродимензионалној, вишеслојној мрежи који има веома важну улогу у оогенези, оплодњи и преимплантационом периоду. То је последња структура кроз коју сперматозоид треба да прође у процесу оплодње. ZP је веома динамичка структура која се синтетише у току сазревања јајне ћелије, показује биохемијске, структурне и промене механичких својстава током сазревања јајне ћелије али и после оплодње.

Механички одговор ZP на примењену механичку силу могуће је мерити различитим техникама (помоћу атомик форс микроскопа, атомик форс спектроскопије, дво-осовинског сензора и микророботског система, техником аспирационе микропипете у комбинацији са микротактилним сензором) уз примену различитих теоријских модела (модификовани *Point-Load Model* биомембране, модификовани *Hertz*-ов модел, модел полулопте, модел слоја, модел шупље сфере, модел хипереластичне греде у комбинацији са *Arruda-Boyce*-овим моделом полимера, *Zener*-ов модел). На основу емпиријског искуства, теоријски развој биомеханичких модела ZP се кретао од идеално еластичног модела до виско-еластичног модела. Експериментално је утврђено да ZP има вискоеластична својства и да су вискозна својства израженија након оплодње.

На основу вискоеластичних својства ZP зигота применом *Zener*-овог модела може се предвидети квалитет настале бластоцисте како код миша тако и код хумане врсте неколико сати након оплодње. Постоји међусобна веза између зрелости јајне ћелије у тренутку оплодње, њене генске експресије, ослобађања кортикалних гранула при оплодњи, степена постфертилизационог очвршћавања ZP, квалитета ембриона и способности рађања живог потомства.

Процес оплодње је делимично објашњен са биохемијског становишта иако многе карике у ланцу још увек недостају.

Основна идеја ове докторске дисертације је да би процес оплодње могао да се посматра као осцилаторни феномен и сходно томе општи научни циљ дисертације је постављање биомеханичког осцилаторног модела ZP миша и испитивање

његовог осцилаторног понашања у слободном и принудном режиму. Оригинални научни допринос ове дисертације се огледа у креирању осцилаторног модела *ZP* с обзиром да такав модел, према нашим сазнањима није постојао до сада у литератури. Модел је типа дискретног континуума и базира се на осциловању у ланчаним сиситемима и структурној сличности са *Wasserman*-овом моделом *ZP* миша. Коришћењем знања из теорије осцилација, аналитичке механике и нелинеарне динамике примењене на биолошке системе, методе дискретног континуума и матричног рачуна као и теорије еластичности, реологије и науке о наследним материјалима, аналитичких метода решавања система диференцијалних једначина, као и методе одређивања аналитичких апроксимација решења, постављен је једнослојни модел осцилаторне сферне мреже *ZP* миша са одговарајућим кинетичким параметрима, и апроксимацијама уз дефинисање ограничења примене модела, одређен минимални скуп сопствених кружних фреквенција осциловања *ZP*-е, урађена фреквентна анализа. Нумеричком анализом одређени су услови под којима долази до резонанције између режима осциловања *ZP*-е и сперматозооида који импулсно дејствују на *ZP* мрежу као и део сета сопствених кружних фреквенција, затим фреквенција на којима долази до динамичке апсорпције односно до резонанције у случају принудних осцилација, за *ZP* јајне ћелије и *ZP* ембриона миша. Да бисмо испитали да ли, и како угао дејства, распоред и број сперматозооида са ефективним брзинама који импулсно дејствују на *ZP*, утичу на осцилаторно понашање чворних молекула у репрезентативном узорку дискретно континуалног осцилаторног модела *ZP* миша, спровели смо нумерички експеримент користећи методу генералисаних *Lussajous*-ових фигура у одговарајућем софтверском пакету;

У циљу одређивања потенцијално слабе тачке или области у моделу *ZP*-е и услова где би дошло до вероватног продирања сперматозооида током њиховог импулног дејства у процесу оплодње, постављен је квазистатички централно симетрични апроксимативни модел *ZP* у виду шупље сфере, дати су аналитички изрази за напоне и деформације као и специфичан деформациони рад који се јављају у *ZP* у току процеса оплодње приликом дејства сперматозооида на спољашњу површину континуалног модела *ZP* а чија је дистрибуција дејства у виду дискретног хомогеног континуума у радијалном правцу; дати су и

аналитички изрази за динамички континуални модел ZP . У овом моделу је узета апроксимација да сперматозооиди врше равномерни, симетрични и континуирани притисак на спољњу површину ZP . На основу аналитичких израза за квазистатички апроксимативни модел ZP у виду шупље сфере урађена је нумеричка анализа како напон, дилатација, запреминска дилатација и специфични деформациони рад зависе од: растојања тачке у ZP од центра сфере, дебљине ZP , односа унутрашњег и спољашњег полупречника, спољњег притиска- односно броја сперматозооида, који дејствују на спољашњу контурну површину континуалног модела ZP ; применом метода нецелих извода дате су основне поставке двослојног вискоеластичног модела осцилаторне сферне мреже ZP миша.

С обзиром да вибрационе карактеристике ембриона могу бити од значаја за процену његове виталности, да би одредили сопствене учестаности и облике модела осциловања ембриона миша током микроинјекције стакленом иглом користили смо методе коначних елемената (МКЕ) у оквиру модалне анализе помоћу ANSYS софтвера. Употребом МКЕ и транзиторне структурне анализе на моделу континуалног слоја ZP -е коришћењем комерцијалног софтверског пакета ANSYS проучавана је динамике нелинеарног фрикционог контакта између сперматозооида и јајне ћелије миша у односу на угао дејства сперматозооида. Разматрани су контактни притисак, максимални еквивалентни напон у ZP , укупни контактни напон и напон настао услед трења за различите углове дејства сперматозооида на јајну ћелију при фрикционом контакту и константној брзини сперматозооида.

Осцилаторно понашање ZP миша након оплодње разматрано је на нелинеарном вишепараметарском моделу осцилаторне сферне мреже ZP у коме су ZP молекули међусобно повезани виско-нелинеарно еластичним везама и изложени дејству сперматозооида у виду спољне принудне силе. Вискоеластичне везе су у виду модификованог вискоеластичног елемента *Kelvin-Voigt*-овог типа са нелинеарно еластичним својствима. За нумеричку вишепараметарску анализу узет је репрезентативни сегмент вискоеластичног нелинеарног модела осцилаторне сферне мреже ZP , а од параметара у модел су уведени, поред угла под којим сперматозооиди импулсно дејствују на чворне ZP молекуле, фреквенција спољне

принудне силе (фреквенција осцилаторног дејства сперматозоида), амплитуда спољашње принудне силе на сваком од разматраних молекула, коефицијент пригушења, коефицијент линеарне и нелинеарне крутости и време. Нелинеарни дискретни модел ZP осцилаторне мреже сматрамо нелинеарним неконзервативним системом, који још неко кратко време (прелазни период) осцилује под принудном силом са пригушењем, а везе између молекула су вискоеластичног типа и осцилаторно понашање молекула у моделу се може описати помоћу диференцијалних једначина *Duffing*-овог типа са нелинеарношћу трећег степена. На овом нелинеарном вишепараметарском моделу разматрани су услови синхронизације појединих чворних молекула у моделу.

ZP миша смо моделовали као осцилаторни систем у виду сферне једнослојне мреже која се састоји од нехомогених међусобно ортогоналних ланаца распоређених у меридијалном и циркуларном правцу који су међусобно повезани чворним молекулима. Сферична мрежа има иста својства у циркуларном и меридијалном правцу и причвршћена је за површину јајне ћелије еластичним односно вискоеластичним везама. Јајна ћелија је сферично ригидно тело одговарајућих димензија. Материјалне тачке у систему сферичне осцилаторне мреже ZP миша одговарају молекулима који сачињавају ZP миша и распоређене су на специфичан начин у односу који одговара моларном односу три гликопротеина који сачињавају ZP миша. Карактер веза између молекула у осцилаторном ZP моделу се разликује пре и после оплодње. Пре оплодње везе смо сматрали идеално еластичним; после оплодње вискоеластичним. Молекули у осцилаторном моделу ZP миша имају три степена слободе кретања (у циркуларном, меридијалном и радијалном правцу). Систем сферичне мреже ZP миша осцилује у слободном и принудном мултифреквентном режиму. Принудни мултифреквентни режим је последица спољашњег утицаја већег броја сперматозоида на површину ZP миша. Претпоставка је да сперматозоид који осцилује у резонанци са системом/делом система сферичне мреже ZP миша има највећу вероватноћу да продре у ZP . Употребом методе *Lissajus*-ових кривих и атрактора синхронизације трајекторија чворних молекула модела могуће је одредити услове синхронизације компонентних кретања чворних молекула осцилаторног модела ZP миша.

На основу облика генералисаних *Lussajous*-ових фигура можемо закључити да динамичко стање чворних молекула, може бити у пуној синхронизацији његових компонентних померања у меридијалном и циркуларном правцу, или асинхронизацији, налик синхронизацији или налик асинхронизацији, налик хаотичном или стохастичком кретању. Синхроно кретање смо сматрали повољним осцилаторним стањем за оплодњу.

ZP и јајну ћелију, смо посматрали као биомеханички дискретни осцилатор са коначним бројем степени слободе осциловања. Овај приступ је иновативан и погодан за проучавање промена биомеханичких, односно биокинетичких параметара *ZP* током процеса сазревања и оплодње. Намера нам је била да покушамо да објаснимо са становишта теорије осцилација, биомеханичке промене и идентификујемо биокинетичке линеарне и нелинеарне феномене и могуће режиме осцилаторних кретања *ZP* које су последица биохемијских и структурних промена *ZP* које се дешавају током појединих сукцесивних фаза оплодње. *ZP* миша је моделована као дискретна једнослојна сферна осцилаторна мрежа, која пролази кроз три различите фазе до оплодње, и кроз најмање три од више могућих различитих осцилаторних стања од овулације до оплодње. Дали смо различите системе линеарних и нелинеарних диференцијалних једначина кретања молекула у дискретној сферној *ZP* мрежи, зависно од претпостављених својстава дискретног модела *ZP* сферне мреже и његових материјалних параметара, за свако стање и типове кретања молекула одредили аналитичка решења, тачна или апроксимативна, где су сазнања математике то дозвољавала или користећи аналогне графике из литературе добијене нумеричким путем, и разматрали њихову могућу биолошку улогу.

Крајњи положаји и крајње брзине молекула у моделу из претходне фазе су узети као почетне позиције и почетна кинетичка стања за наредно осцилаторно стање *ZP* мреже. Осцилаторни модел *ZP* мреже сматрамо након овулације конзервативним, хомогеним и нелинеарим и он социлује у слободном режиму. Везе између материјалних тачака –молекула су идеално еластичне и *ZP* мрежа има идеално еластична својства. Да би смо математички описали слободне линеарне (3.21-3.23) односно нелинеарне осцилације (3.27-3.29) чворних молекула инициране овулацијом користимо одговарајуће системе диференцијалних

једначна. Сматрамо да овулација изазива иницијалну пертурбацију молекула ZP мењајући им стање мировања и положаје стабилне равнотеже природног стационарног стања премештањем у почетни положај саопштавајући им почетну брзину. У овом стању, очекујемо да су резултујућа померања ZP молекула могу бити у форми периодичних атрактора али такође, и кретање молекула може бити налик хаотичном или налик стохастичком. Резултујуће путање кретања чворних молекула су у форми генерализаних просторних *Lissajus*-ових кривих. Пенетрација сперматозооида кроз ZP мрежу је могућа једино када молекули осцилују периодично. У случају вишефреквентних принудних осцилација могућност за периодично кретање је мање и могућности да већи број сперматозооида пенетрира ZP мрежу се такође смањују.

Када је ZP изложена сперматозооидима, који дејствују на њену површину у форми дисконтинураног поновљеног еластичног удара, ZP мрежа осцилује у принудном вишефреквентном режиму. Тада сматрамо да је ZP линеаран, конзервативни систем. Везе између елемената ZP меже су и даље идеално еластичне.

Да би смо математички описали принудне линеарне (3.24-3.26) односно принудне нелинеарне осцилације (3.30-3.32) чворних молекула инициране дисконтинуираним периодичним дејством сперматозооида на спољну површину ZP мреже, користимо одговарајуће диференцијалне једначне.

Након што један сперматозооид успешно продре кроз ZP настаје кортикална реакција ZP и остали сперматозооиди бивају одбијени и спречен њихов продор кроз ZP – тзв. „*polyspermy block*„ Сад је систем ZP нелинеаран и осцилује у принудном режиму још кратко време. Након ове транзиторне фазе, ZP систем није више под утицајем сперматозооида и има следеће карактеристике: систем је нелинеаран, хомогени неконзервативан, анизохоран и осцилује у слободном режиму са пригушењем. ZP мрежа сада има вискоеластична својства.

На основу претходних анализа могућих комбинација померања чворних молекула ZP мреже у сва три ортогонална правца као и померања нечворних молекула у два правца, можемо да закључимо да су пре оплодне могући различити типови мултифреквентних режима осциловања-од чисто периодичних до налик хаотичним и налик случајним. Такође је могуће да се јавља

синхронизација и асинхронизација. Синхронизовано кретање молекула у ZP межи сматрамо повољним осцилаторним стањем за пенетрацију сперматозооида и оплодњу. Када се ZP молекули крећу на начин, који личи хаотичном кретању, то представља кинетички неповољно стање за продор сперматозооида.

Када је један молекул у ZP мрежи побуђен дво- или вишефреквентном спољном побудом у радијалном правцу, може да дође до интеракције између нелинеарних модова, а у резонантном режиму могућа је и појава више резонантних скокова.

Имајући у виду, да се при нелинеарним принудним осцилацијама у резонантном фреквентном опсегу могу јавити три стационарне амплитуде, од чега су две стабилне а једна између њих нестабилна, те три вредности заједно чине један тригер спрегнутих стационарних амплитуда у резонантном фреквентном опсегу. На крајевима тог тригера спрегнутих стационарних амплитуда јављају се резонантни скокови амплитуда са више на нижу стабилну, или обрнуто са ниже на вишу стабилну стационарну амплитуду. То се може уочити са амплитудно – фреквентне криве стационарног резонантног стања са слике 3.5б. Такав тригер спрегнуте три стационарне фазе је могуће уочити и на фазно-фреквентним графицима нелинеарних система у резонантним фреквентним интервалима. И на фазно-фреквентним графицима на крајевима са скупом тригера спрегнутих сингуларитета за једнофреквентне осцилације јављају се резонантни скокови фаза.

Модел дискретне осцилаторне мреже ZP је осцилаторни модел и омогућава нам да апроксимативно одредимо сет сопствених кружних фреквенција ZP мреже. Модел може да објасни осцилаторно понашање ZP у процесу оплодње, промену њеног дијаметра и конзистенције. Предложени осцилаторни модел ZP представља нови приступ у објашњењу структурних промена ZP пре и у току процеса оплодње, услове за пенетрацију сперматозооида и „*polyspermy block*„. Осцилаторни модел ZP може да објасни зашто је могуће да само један сперматозооид продире кроз ZP у процесу оплодње-то би био онај који осцилује у резонанцији са ZP мрежом односно сету фреквенција које одговарају делу сета сопствених фреквенција осциловања ZP мреже.

У зависности од иницијалне пертурбације почетног равнотежног стања молекула у сферној мрежи, компонентна померања чворних молекула су у вишефреквентном осцилаторном режиму, а број фреквенција је једнак или мањи од броја сопствених кружних фреквенција система, које су својство система, јер зависе искључиво од инерционих и еластичних својстава система, и не могу се променити спољашњим дејством. На облик генералисаних *Lussajous*-ових кривих утичу угао, брзине, распоред и број дејствујућих сперматозоида. Угао под којим сперматозоид импулсно дејствује на површину *ZP* у почетном тренутку има утицаја на резултујућа померања, синхронизацију, односно асинхронизацију вишефреквентног осцилаторног кретања чворних молекула у моделу сферне осцилаторне *ZP* мреже; идентификовали смо неке углове импулног дејства сперматозоида који су повољни односно неповољни за оплодњу; веома мали као и веома велики углови су неповољни; потврдили смо претходне спекулације да су коси углови повољнији за оплодњу и предвидели смо њихове вредности; идентификовани су неке комбинације повољних углова за оплодњу (γ - угао који правац кретања сперматозоида заклапа са тангентном равни и угао θ , угао који заклапа са меридијалним правцем): $\pi/4$ и $\pi/4$, $\pi/6$ и $\pi/4$, $\pi/12$ и $\pi/4$, $5/12 \pi$ и $\pi/4$. Веома мали и веома велики углови нису повољни јер дају осцилаторна стања која су налик хаотичним. Угао од 90° и $2/3\pi$ дају осцилаторна стања налик хаотичним и сматрамо их неповољним осцилаторним стањем за оплодњу; видели смо да феномен резонанције принудним осцилацијама чворних молекула може да доведе до великих амплитуда осциловања; уочена могућност појаве динамичке апсорпције на амплитудама партикуларног решења принудних осцилација за поједине чворне молекуле што отвара могућност за потенцијално повољна осцилаторна стања *ZP* мреже; симетрична дистрибуција сперматозоида са истим кинетичким параметрима даће синхронизовано кретање чворних молекула.

За успешну оплодњу потребна је одређена количина високо квалитетних сперматозоида. Квалитет сперматозоида је одређен њиховим морфолошким особинама и њиховом брзином. Брзина кретања сперматозоида је кључни параметар, који одређује успех оплодње. За претходно одређене вредности углова и правца дејства сперматозоида, који изазивају повољно осцилаторно стање *ZP*, урађена је параметријска фреквентна анализа осцилаторног понашања чворних

молекула у осцилатрном *ZP* моделу. У циљу имитирања успешне оплодне у физиолошким условима, узели смо брзине прогресивно покретних и хиперактивисаних сперматозоида.

Резултати фреквентне анализе осцилаторног понашања *ZP* миша отварају могућности биомеханичког приступа у третману суб(ин)фертилитета код мушкараца.

Претпостављамо да би брзина сперматозоида, као и њихов распоред ударног импулсног дејства импулсних сила на површини *ZP* имали утицаја на осцилаторно понашање *ZP*. У физиолошким условима споро покретни сперматозоиди никада не би дошли до јајне ћелије, али у *IVF* условима могли би да допринесу настанку осцилаторног стања *ZP* које је повољно за оплодњу. За случајеве симетричног распоред импулсног дејства сперматозоида са истим брзинама, резултујуће путање осцилаторног кретања чворних молекула у тангентној равни су у виду праве линије тј оне се крећу синхроно, само су амплитуде различите и зависе од упадног угла под којим импулсно дејствују сперматозоиди. Веће амплитуде кретања молекула би, теоријски узроковале веће деформације мреже и тиме створиле услове за продор сперматозоида. За одређене почетне услове могуће је да се само поједини чворни молекули крећу у виду праве линије а други не. У реалном биолошком систему постоји велики број различитих комбинација почетних услова, које би могле да дају осцилаторна стања *ZP* повољна за оплодњу, што указује да би процес оплодне могао да се сматра стохастичким процесом. С друге стране, могућност да се поједини молекули крећу синхроно, а други не указује на могућност да би феномен оплодне могао да има локални карактер, односно положај и иницијална пенетрација сперматозоида кроз *ZP* одређена је локалним почетним условима, који имају стохастички карактер, а структура и састав *ZP* су униформни.

Познато је да су сперматозоиди који су прошли кроз процес капацитације способни да се вежу за *ZP* (*Gadella, 2012*). Здравих сперматозоида и сперматозоида са морфолошким дефектима имају различито осцилаторно понашање (*Woolly, 2003*). Трансферзалана сила коју ствара покретни сперматозоид је већа од пропулзивне силе (*Ishijima, 2011, Hsiao et al, 2013*) указујући да би кинетички параметри кретања сперматозоида могли да буду у

вези са њиховим углом дејства. Ово указује да амплитуде и начин кретања сперматозоида могу утицати на угао дејства. Према (Godson, 2011) отприлике 22% сперматозоида у ејакулату су хиперактивисани сперматозоиди. Тај проценат би одговарао анализи када један (од 4) хиперактивисана сперматозоида импулсно дејствује на репрезентативни сегмент *ZP* мреже (слике 4.18 и 4.19). Постоји могућност да у реалном систему специфичан распоред и организација сперматозоида који импулсно дејствују на површину *ZP* различитим брзинама доприноси постизању осцилаторног стања *ZP*, које је повољно за пенетрацију сперматозоида. Да би добили одговор на ово питање потребне су додатне анализе.

Lefievre et al (2007) доводе у питање да традиционалне вредности, које служе за процену квалитета сперме: концентрација сперматозоида, покретљивост и морфологија нису довољне за дијагнозу и прогнозу инфертилитета у мушкараца и да нема прогностичких параметара, који би адекватно третирали суб(ин)фертилитет у мушкараца. На основу нашег осцилаторног дискретно континуалног модела, слободни смо да предложимо нови вид терапије субфертилитета у мушкараца: додавање додатне механичке осцилаторне стимулације одређене фреквенције или фреквенције из одређеног фреквентног опсега медијуму са здравом јајном ћелијом и адекватним бројем сперматозоида би могло да побољша оплодњу. Механичка стимулација би могла да буде у форми звука. Основна идеја је да би додавање механичке осцилаторне стимулације одређених карактеристика (интензитет и сет осцилаторних фреквенција) могло да допринесе успешној оплодњи кроз настајак резонанције између јајне ћелије и сперматозоида. Овај метод би могао да буде користан код субфертилних случајева (када нема довољан број функционалних сперматозоида и оних са нормалном морфологијом да би дошло до оплодње у физиолошким условима). С обзиром да сперматозоиди испољавају висок степен пластичности и адаптабилности као одговор на догађаје који покрећу овулацију (*Lefievre et al*, 2007), могли би да одговоре и на механичку стимулацију. Додавање екстерне механичке стимулације би могло да утиче на процес хиперактивације. Претпостављамо да би параметри екстерне механичке стимулације били специфични за врсту.

Young-ов модул еластичности *ZP* зреле јајне ћелије миша има 2.5 веће вредности у поређењу са *ZP* ембриона миша (*Sun и cap, 2003*). Сперматозооиди у нормалним физиолошким условима не могу да продру кроз *ZP* ембриона. Након оплодње долази до *polyspermy block*-а кад други сперматозооиди не могу да се закаче за површину *ZP* а он већ закачени бивају одбијени. Процес је рецепторски и ензимски посредован и укључује одбијање наелектрисања између *ZP* и мембрне сперматозооида. Покушали смо да објаснимо овај процес са становишта теорије осцилација користећи модел осцилаторне сферне мреже *ZP* јајне ћелије и ембриона миша. Када сперматозооиди принудно дејствују на чворни молекулу у репрезентативном узорку осцилаторног модела *ZP*, нумеричке анализе показују да су вредности за сопствене кружне фреквенције *ZP* ембриона миша веће у поређењу са вредностима за сопствене кружне фреквенције *ZP* јајне ћелије миша. Ово указује да ће за потенцијалну пенетрацију кроз *ZP* ембриона сперматозооидима требати више енергије. У живом систему то није могуће с обзиром да током времена долази до губитка енергије потребне за кретње сперматозооида. Након оплодње нема сперматозооида који би могли да одговоре на ове повећане захтеве. На амлитудно фреквентним графицима нуле одговарају местима динамичке апсорпције. За исте молекуле динамичка апсорпција наступа на вишим фреквенцијама у моделу *ZP* ембриона миша у односу на *ZP* јајне ћелије миша (*Hedrih, 2014*). Ови резултати указују да се *ZP* јајне ћелије и ембриона налази у различитим осцилаторним стањима и да би то могло да има биолошку улогу. Ова транзиција из јајне ћелије у ембрион је иреверзибилан процес.

Када је у питању међузависност напона који се јавља у *ZP* према квазистатичком моделу *ZP* у виду шупље сфере, што је растојање од центра сфере веће то је радијална компонента нормалног напона већа, док се циркуларна и меридијална компонента нормалног напона смањују. Радијална компонента напона је већа у тачкама при спољњој контурној површи. Са повећањем спољњег притиска на *ZP* повећава се деформациони рад и апсолутна вредност запреминске дилатације, која је негативна јер се ради о компресији запремине. Тачке *ZP* које су ближе површини јајне ћелије трпе мањи специфични деформациони рад. Зависност специфичног деформационог рада од спољњег притиска није линеарна

већ је у виду параболе. Што је ZP дебља то је већа запреминска дилатација уколико су остале вредности параметара модела константне.

Специфични деформациони рад – еластични потенцијал квазистатичког модела ZP у одређеној тачки зависи од полупречника сферних контурних површина, квадрата спољашњег и унутрашњег континуираног притиска, растојања тачке од центра сфере r са односом r^{-6} , од односа спољашњег и унутрашњег полупречника сфере ψ^6 , обрнуто је пропорционалан модулу смицања. Имајући у виду да је разматрани модел статички, специфични деформациони рад ZP у одговарајућој тачки у току процеса оплодње се може сматрати еластичним потенцијалом, који може да одбије неки од долазећих сперматозоида или пак омогући продор сперматозоида у тачки са минималним специфичним деформационим радом. Може се направити аналогија са хипотезама о критичним вредностима специфичног деформационог рада који прелази границу издржљивости материјала у некој од области ZP . Критеријуми издржљивости материјала модела се могу везати и за максимални дозвољени нормални напон у радијалном правцу при коме долази до "оштећења" услед импулсног дејства сперматозоида. Била би неопходна и експериментална истраживања издржљивости материјала ZP на истезање или друге врсте простих напрезања (увијање, смицање, извијање, савијање) и одређивање напона разарања материјала. Хипотезе о издржљивости материјала су аналог хипотезама о пластичном течењу материјала. Ако пак, говоримо о хипотезама о пластичном деформисању и течењу, онда тражимо најмање напоне и најмањи специфични деформациони рад који ће у некој тачки довести до оштећења материјала ако је материјал крт, или пластичног течења ако је материјал вискоеластичан, као материјал ZP .

На основу ових хипотеза о издржљивости материјала доводимо у вези способност импулсног дејства сперматозоида да изазове критичну деформацију материјала ZP у нападној тачки при критичном нормалном напону и критичном специфичном деформационом раду који се при том јавља у ZP . Критични деформациони рад у одређеној тачки би могао да доведе до слабљења материјала ZP и њеног пластичног течења, да иницира процес пластичне деформације.

Помоћу двослојног дискретно-континуалног модела сферне осцилаторне мреже ZP могуће је објаснити механизам продора сперматозоида кроз ZP . Модел двослојне осцилаторне мреже ZP фракционог реда даје основу за могући механизам продора сперматозоида кроз мрежу у виду осцилација релаксације. Двослојни осцилаторни модел ZP може да буде и основа за сложенији модел ZP миша, који посматра ZP као осцилаторни гел.

Употребом методе коначних елемената разматрана су прва шест осцилаторна мода ембриона при дејству микроињекционе игле. Анализа је показала да су фреквенције сопствених осцилација ембриона веће у течности него у вакууму и да су реда величине од око 52kHz (за први мод) до око 55kHz (за 6. мод). Анализа показује да осцилације слободног ембриона у вакууму практично нису могуће. Сопствене осцилације ембриона се постепено повећавају како се укључује сваки следећи гранични услов (од ембриона у течном медијуму до ембриона у течном медијуму повезаног са вакуум микропипетом и микроињекционом пипетом). На основу 3D анимација кретања ембриона у одговарајућим модовима је: Мод 1: перпендикуларне осцилације дуж y осе - изгледа као котрљање у yz равни. Мод 2. перпендикуларне осцилације дуж x осе - изгледа као котрљање у xz равни. Мод 3. ротација тј. торзија око z осе. Мод 4. лонгитудиналне осцилације дуж z осе. Мод 5. ротација у yz равни. Мод 6. ротација у xz равни. Описани метод може да се користи за анализу вибрационих карактеристика ембриона миша, али и хумне врсте, како у физиолошким, тако и у патолошким условима-нпр. када је вештачка инсеминација неуспешна или кад не долази до имплантације ембриона. Модел подржава осцилаторну теорију оплодње.

Анализа динамике нелинеарног фрикционог контакта јајне ћелије и сперматозоида за различите углове дејства сперматозоида показује да брзина сперматозоида осцилује у току времена симулације и зупчасто опада за све посматране углове, али на крају симулације за угао од 10^0 има највећу вредност указујући да се на крају симулације сперматозоид и даље клиза по површини ZP . Идентификован је „*slip-stick*“ феномен при фрикционом контакту сперматозоида и јајне ћелије који се може објаснити осцилацијама релаксације. Изгледа да мањи угао дејства сперматозоида боље чува енергију сперматозоида. Контактни

притисак, максимални еквивалентни напон у ZP , укупни контактни напон и напон настао услед трења, максимална пенетрација сперматозоида кроз ZP , максимална деформација ZP , као и површина контакта зависе од угла под којим сперматозоид дејствује на јајну ћелију и показују нелинеарну зависност, локалне минимуме и максимуме. Деформације које се јављају при нелинеарном фриксионом контакту између јајне ћелије и сперматозоида су локалног карактера и захватају само површинске делове ZP . Различити углови под којим сперматозоид дејствује на јајну ћелију изазивају различите напоне и деформације у ZP . Највећи локални максимум максималног еквивалентног напона у ZP се јавља при углу од 75° а тада је контактни притисак најмањи. Сперматозоид, који дејствује под углом од 10° остварује максималну тоталну деформацију, напон трења и клизајућу дистанцу. Предности модела приказаног у (*Hedrih & Banic, 2016*) су нелинеарни фриксиони контакт између јајне ћелије и сперматозоида, $3D$ десеточворни модел јајне ћелије и сперматозоида, а ограничења модела су: да модел разматра утицај само једног сперматозоида на ZP , да је ZP моделована као еластично тело, због једноставности модалне анализе није укључено ротационо кретање сперматозоида и утицај ове компоненте на динамику контакта са ZP . У том смислу би требао радити на побољшању модела. Поред тога постојање куплованих поља (механичког, електро-хемијског) не би требало занемарити.

На основу више параметарске анализе синхронизације кретања два чворна молекула на репрезентативном узорку нелинеарног вискоеластичног модела ZP ембриона миша моделу ZP запажамо да се са повећањем степена пригушења, коефицијента линеарне и нелинеарне крутости (односно повећањем степена спрегнутости између молекула) посматрани чворни молекули раније синхронизују. За исте вредности коефицијената пригушења видимо да ови молекули испадају из синхронизације да би се са повећањем коефицијента пригушења поново приближили синхронном кретању. Са одмицањем времена атрактор синхронизације показује различите облике (осмица, елипсе).

Са повећањем вредности ових коефицијената посматрани чворни молекули у дијагоналној позицији теже синхронизацији. Са повећањем вредности

фреквенција принудне силе посматрани чворни молекули показују феномен транзиторне синхронизације.

Синхронизација молекула *ZP* је боља уколико је већа вискозности и пригушење као и фреквенција принудне силе.

Експериментални подаци указују да након оплодње *ZP* повећава свој модул еластичности тј. испољава вискоеластична својства. Већа крутост *ZP* после оплодње повезана је са ефикаснијим механизмом *polyspermy block*-а. Према овом осцилаторном моделу *ZP*, након оплодње, повећање вискозности и пригушења које би пратило овај неконзервативни нелинеарни систем, побољшава синхронизацију осцилаторног понашања чворних молекула, чиме би могао да се тумачи ефикаснији *polyspermy block*.

Претпостављамо да уколико молекули *ZP* осцилују синхроно може да настане такво осцилаторно стање *ZP* оплођене јајне ћелије које не може да се синхронизује ни са једним ново долазећим сперматозооидом или осцилаторно стање које чини да *ZP* постане непробојна осцилаторна баријера. Како су јајна ћелија и ембрион у различитом осцилаторном стању (*Hedrih, 2015*) претпоставка је да способност синхронизације молекула *ZP* ембрина миша може допринети *polyspermy block*-у. Претпоставка је да би комплетна синхронизација *ZP* молекула пре блокирала пенетрацију новог сперматозооида и да на тај начин доприноси *polyspermy block*-у.

Уз одговарајућа ограничења и адаптације сферични осцилаторни модел *ZP* миша могуће је применити на *ZP*-у других сисара.

Мултидисциплинарни карактер ове дисертације огледа се у примени и тесној повезаности неколико научних дисциплина у циљу целовитијег разјашњавања и разумевања сложене нелинеарне динамике процеса оплодње, који се одвија у условима спрегнутих механичких, физико- и биохемијских поља и промене структуре *Zona-e Pelucida-e* пре и после оплодње, као и повезивање биохемијског и биомеханичког модела оплодње. У истраживању су заступљене следеће научне области: наука о биоматеријалима, механика биолошких система, реологија, теорија линеарних и нелинеарних осцилација, нелинеарна динамика,

молекуларна биологија и биологија репродукције, као и неки елементи рачуна са нецелим изводима.

Ова дисертација отавара и бројна друга питања за даља истраживања:

- Како јајна ћелија прави селекцију кроз *ZP* матрикс?
- Да ли је рецепторски посредован механизам препознавања гамета и оплодње у основи осцилаторни феномен и да ли је резонанција између осцилаторних режима *ZP* и изабраног сперматозооида неопходан услов за оплодњу?
- Да ли у реалности постоји веза између брзине сперматозооида и угла под којим импулсно дејствује на *ZP*?
- Који је однос хиперактивисаних сперматозооида неопходних за постизање осцилаторно повољног стања *ZP* за успешну оплодњу?
- Да ли сперматозооиди са ефективним брзинама имају стохастички распоред на површини *ZP* у реалним условима?
- Како би изгледао динамички модел којим разматрамо деформациони рад у *ZP* када сперматозооиди имају асиметричан распоред на површини *ZP* и када њихово дејство није константно већ периодично?
- Као унапредити квазистатички и динамички континуални модел *ZP* у виду шупље сфере узимајући у обзир нелеинеарност и неуниформност структуре *ZP* (тј . разлике између спољашњег и унутрашњег слоја *ZP*) и испитати промену деформационог рада у зависности од дебљине *ZP* и броја сперматозооида који дејствују на њену површину?
- Да ли у реалности постоји веза између брзине кретања сперматозооида и угла дејства?
- С обзиром да *ZP* показује структурну различитост унутрашњег и спољашњег слоја да ли постоји нелеинеарност и неуниформност по површини када је у питању дистрибуција електричног потенцијала с обзиром да он зависи од хемијских група (шећерних и сулфатних група)?

- Уколико се потврди претпоставка о неунифомности дистрибуције површинског електричног потенцијала *ZP* као целине, да ли би *ZP* могла да се посматра као нелинеарни хемијски осцилатор у коме је могућа Белоусов-Жаботински реакција у којој су каталитички јони Ca^{2+} ? Уколико се покаже да оваква хипоктеза има основа то би дало нову димензију тумачењу механизма оплодње код сисара, собзиром да се наука тренутно "заглавила" у класичној методологији.
- Када би се МКЕ разматрао контакт једног сперматозоида а *ZP* третирао уместо као идеално еластична или хипереластична структура, као вискоеластична, да ли би динамика промене деформација и напона који се јављају у *ZP* била иста?
- Да ли би *ZP* могла да се посматра као целина која има особине респонсивног гела –гела који одговара променом запремине на екстерну механичку и хемијску стимулацију или који реагује на механичку стимулацију променом интензитета биохемијских реакција?

НАУЧНИ ДОПРИНОС

С обзиром да се подаци о вредности модула еластичности *Zona-ePelucida-e* зреле јајне ћелије и оплођене јајне ћелије разликују за исту врсту у зависности од примењене технике и коришћеног механичког модела за експериментална мерења, научни допринос ове дисертације је у проучавању *ZP-e* са становишта осцилаторног система, дефинисању услова под којима долази до стварања повољних кинетичких параметара и услова вероватне оплодње са биомеханичког становишта.

То доприноси бољем сагледавању процеса промене кинетичких параметара и механичких својстава *ZP- e* током и после оплодње, услова удара и судара сперматозоида са *ZP*-ом и употпуњава биохемијски модел оплодње, дајући му нову димензију. Формирана је комплексна основа методологије истраживања осцилаторних својстава *ZP* миша на дискретно континуалном осцилаторном моделу. Развијена методологија би могла да се користи и за изучавање осцилаторних феномена у сложеним биоосцилаторима типа мрежа. Модел

осцилаторне сфрене мреже је повољан за моделовање симултаног утицаја већег броја сперматозоида на површину ZP у *in vitro* условима.

Комбиновање техника микроскопије и механичког модела могло би да буде погодно за практичну валидацију резултата нашег нумеричког експеримента: 1) да ли постоје углови који су повољни за успешну оплодњу и 2) да ли су исти или слични са измереним.

Верујемо да би овај осцилаторни приступ проблему могао да допринесе бољем разумевању процеса оплодње.

Резултати који су нови и оригинални допринос докторске дисертације су публиковани у часописима *Journal of Theoretical Biology (M21)*, *Journal of Vibration and Control (M21)*, *Computers in Biology and Medicine (M22)*, *Theoretical and Applied Mechanics (M24)*, у оквиру тематског зборника издавача *Springer International Publishing*. Такође, један број резултата је приказан и на међународним научним скуповима, међу којима наводимо следеће: *IUTAM IURAM ICTAM Pejing 2012*, у категорији кратког предавања, као и *DSTA Lodz 2013* и *2015* и другим:

1. Hedrih A. 2012. Frequency analysis of knot mass particles in oscillatory spherical net model of mouse zona pellucida. Lecture Session, Short Paper, Abstract book of 23rd International Congress of Theoretical and Applied Mechanics, (IUTAM ICTAM Beijing 2012), 19-24 August 2012, Beijing, China, SM01-049 Biomechanics and biomaterials, pp. 209. ISBN 978-988-16022-3-7.
2. Hedrih A. 2014. Transition in oscillatory behaviour in mouse oocyte and mouse embryo through oscillatory spherical net model of mouse Zona Pellucida" in *Applied Non-Linear Dynamical Systems*, Springer Proceedings in Mathematics & Statistics 93, J. Awrejcewicz (ed.), 93 295-303. Springer International Publishing Switzerland 2014 ISBN 978-3-319-08265-3; DOI 10.1007/978-3-319-08266-0__21.
3. Hedrih A & Ugrić M. 2012. Vibrational properties characterization of mouse embryo during microinjection. *Theor. App. Mech.*, 40:(S1), 189-202. UDC 519.673:531:01. doi:10.2298/TAM1301189H
4. Hedrih N.A, Lazarević M. 2015. Multi-layer oscillatory spherical net model of mouse zona pelucida. *Proceedings of 5th International Congress of Serbian Society*

of Mechanics, Jun15-17th 2015, Arandjelovac, Serbia. Published by Serbian Society of Mechanics and Faculty of Technical Sciences Novi Sad, Editors: Spasić T.D, Lazarević M, Grahovac N, Žigić M, ISBN 978-86-7892-715-7, COBISS.SR-ID 296997639. Electronic USB Proceedings. 1-8 pp.

5. Hedrih A. & Banic M. 2016. The effect of friction and impact angle on the spermatozoa - oocyte local contact dynamics. *Journal of Theoretical Biology*. *Journal of Theoretical Biology* 393:32–42.
6. Hedrih A, (Stevanovic) Hedrih K & Bugarski B. 2013a. Oscillatory Spherical net model of Mouse Zona Pellucida. *J App Math bioinform* 4, 3 225-268.
7. Hedrih A, Lazarevic M & Mitrovic-Jovanovic A. 2013b. Parametric Frequency Analysis of Oscillatory Behaviour of Mouse Zona Pellucida Spherical Net Model: Case Successful and Unsuccessful Fertilization. 84th Annual Meeting of the International Association of Applied Mathematics and Mechanics- GAMM 2013 (Gesellschaft für Angewandte Mathematik und Mechanik), Novi Sad, Serbia, March 18-22, 2013, *Proceedings in Applied Mathematics and Mechanics / PAMM*, 13 (1) 53 – 54. doi: 10.1002/pamm.201310022: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pamm.v13.1/issuetoc> ISSN 1617-7061.
8. Hedrih A, Lazarevic M, Mitrovic-Jovanovic A. 2013c. Fertilization as a biomechanical oscillatory phenomenon in mammals. *Proceedings of 4th International Congress of Serbian Society of Mechanics*, 4-7th June 2013 Vrnjačka Banja, Serbia, Editors: Maksimović S, Igić T, Trišović N. –Belgrade: Serbian Society of Mechanics, 2013 (Beograd: Beotele Prom), D-01 pp. 579-584. ISBN 978-86-909973-5-0.
9. Hedrih NA, and (Stevanović) Hedrih RK. 2014a. Modeling Double DNA Helix Main Chains of the Free and Forced Fractional Order Vibrations. Ch 7 In: *Advanced Topics on Applications of Fractional Calculus on Control Problems, System Stability and Modeling* (eds: Mihailo Lazarevic, Nikos Mastorakis. (2014), pp. 145-183. and Appendix E pp. 192-200. WSEAS Press. ISBN: 978-960-474-348-3
10. Hedrih NA, and (Stevanović) Hedrih, RK. 2014b.. Analysis of energy state of discrete fractional order spherical net of mouse zona pellucida before and after fertilization. *International Journal of Mechanics SI*, 8: 371-376.

11. Hedrih A, Lazarevic M, Mitrovic-Jovanovic A. 2015. Influence of sperm impact angle on successful fertilization through mZP oscillatory spherical net model. *Computers in Biology and Medicine* 59:19–29.
12. Hedrih NA, Hedrih (Stevanovic) RK. 2015. Deformation work of Zona Pelucida in process of fertilization. 13th International Conference on Dynamical Systems – Theory and Applications, Proceedings-Mechatronics and Life Sciences, DSTA Lody 2015, Edited by J.A. Awrejcewicy, M. Kazmierczak, J. Mrozowski, P. Olejnik, Lodz, December 7-10, 2015, Poland, ISBN 978-83-7283-707-3, Department of Automation, Biomechanics and Mechatronics, Lodz, , pp. 217-226.
13. Hedrih (Stevanović) RK & Hedrih AN. 2016. Phenomenological mapping and dynamical absorptions in chain systems with multiple degrees of freedom. *J VibContr* 22:18-36. (online first – March 19, 2014) doi:10.1177/ 1077546314525984

Литература:

1. Alegre E, Biehl M, Petkov N, Sánchez L. 2008. Automatic classification of the acrosome status of boar spermatozoa using digital image processing and LVQ, *Comput. Biol. Med.* 38:461–468.
2. Allena R, Mouronval A-S, Aubry D. 2010. Simulation of multiple morphogenetic movements in the *Drosophila* embryo by a single 3D finite element model. *JMBBM* 3:313–323.
3. Allen MJ, Rudd RE, McElfresh MW, Balhorn R. 2010. Time-dependent measure of a nanoscale force-pulse driven by the axonemal dynein motors in individual live sperm cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 6:510–515.
4. Allena R, Aubry D. 2011. A novel technique to parametrize shell-like deformations inside biological membranes. *Comput. Mech.* 47:409–423. <http://dx.doi.org/10.1007/s00466-010-0551-8>.
5. Anaya GMC, Calle F, Perez CJ, Martín-Hidalgo D, Fallola C, Bragado MJ, García-Marín LJ & Oropesa AL. 2015. A new Bayesian network-based approach to the analysis of sperm motility: application in the study of tench (*Tinca tinca*) semen. *Androl* 3, 956–966.
6. Anderson MJ & Dixson AF. 2002. Sperm competition, Motility and the midpiece in primates. *NATURE brief communications* 416, 496.
7. ANSYS AUTODYN. 2010. User's Manual Theory manual, ANSYS Inc. Southpointe, 275 Technology Drive, Canonsburg, PA, USA.
8. Armal A, Lourenco B, Marques M & Ramalho-Santos J. 2013. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* 146, R163–R174.
9. Arruda EM, Boyce MC. 1993 A three dimensional constitutive model for the large stretch behavior of rubber elastic materials. *J. Mech. Phys. Solids* 41, 389–412. (doi:10.1016/0022-5096(93)90013-6)
10. Avella MA, Xiong B, Dean J. 2013. The molecular basis of gamete recognition in mice and humans. *Mol Hum Reprod.* 19 (5):279-89. doi: 10.1093/molehr/gat004.

11. Avilés M; Jaber L; Castells M.T; Kan F.W.K; Ballesta J. 1996. Modifications of the lectin binding pattern in the zona pellucida of rat after fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 44, 370–381.
12. Avilés M, Jaber L; Castells M.T, Ballesta J, Kan F. W.K. 1997. Modifications of carbohydrate residues in ZP2 and ZP3 in the mouse zona pellucida glycoproteins after fertilization. *Biol. Reprod.* 57:1155–1163.
13. Avilés M, El-Mestrah M, Jaber L, Castells MT, Ballesta J, Kan FW. 2000. Cytochemical demonstration of modification of carbohydrates in the mouse zona pellucida during folliculogenesis. *Histochem Cell Biol.* 113(3):207-19.
14. Bačlić B.S, Atanacković T. 2000. Stability and creep of a fractional derivative order viscoelastic Rod, *Bulletin T, CXXI de L'Academie Serbe des Sciences et de Arts - 2000, Class des Sciences mathematiques et naturelles Sciences mathematiques*, 25, 115-131.
15. Baibakov B, Gauthier L, Talbot P, Rankin TL, Dean J. 2007. Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development* 134:933–943.
16. Bahr GF & Zeitler E. 1964. Study of bull spermatozoa. *J Cell Biol* 21, 175–189.
17. Bleil D.J. & Wassarman M.P. 1986. Autoradiographic Visualization of the Mouse Egg's Sperm Receptor Bound to Sperm. *The Journal of Cell Biology*, 102:1363-1371.
18. Bansal P. & Gupta SK. 2009. Binding characteristics of sperm with recombinant human zona pellucida glycoprotein-3 coated beads. *Indian J Med Res*, 130: 37-43.
19. Bedford JM. 1998. Mammalian Fertilization Misread? Sperm Penetration of the Eutherian Zona Pellucida Is Unlikely to be a Lytic Event. *Biol. Reprod.* 59: 1275–1287.
20. Bedford JM. 2006. Why do penetrating sperm create an oblique path in the zona pellucida? *Reproduction* 131: 23–25.
21. Bertrand E, Van den Bergh M, Englert Y. 1995. Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate? *Hum Reprod.* 10(5):1189-93
22. Bleil JD, Wassarman PM. 1980. Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77(2):1029-33.

23. Блекхман, И.И., Синхронизация динамических систем, Москва: Наука, 1971
24. Blekhman, I.I, Fradkov, A.L, Nijmeijer, H, et al., 1997. On Self-Synchronization and Controlled Synchronization, Syst. ControlLett. 31.: 299-305.
25. Brewis I & Wong C-H. 1999. Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. Rev Rep 4: 135–142.
26. Boccaccio A, Frassanito M.C, Lamberti L, Brunelli R, Maulucci G, Monaci M, et al. 2012. Nanoscale characterization of the biomechanical hardening of bovine zona pellucida. J. R. Soc. Interface 9:2871–2882. doi:10.1098/rsif.2012.0269.
27. Boccaccio A, Lamberti L, Papi M, De Spirito M, Douet C, Goudet G, Pappalitere C. 2014. A hybrid characterization framework to determine the visco-hyperelastic properties of a porcine zona pellucida. Interface Focus 4:20130066. <http://dx.doi.org/10.1098/rsfs.2013.0066>.
28. Burylko O, Pikovsky A. 2011. Desynchronization transitions in nonlinearly coupled phase oscillators. Physica D 240 1352–1361
29. Canovas S, Romar R, Grullon LA, Aviles M and Coy P. 2009. Pre-fertilization zona pellucida hardening by different cross-linkers affects IVF in pigs and cattle and improves embryo production in pigs. Reproduction, 137:803–812.
30. Centola MG, Blanchard A, Demick J, Li S & Eisenberg LM. 2016. Decline in sperm count and motility in young adult men from 2003 to 2013: observations from a U.S. Andrl, doi: 10.1111/andr.12149 pp 1-7. in press Article first published online: 20 JAN 2016.
31. Chen S, & Zhang Y-T. 2011. Krylov implicit integration factor methods for spatial discretization on high dimensional unstructured meshes: Application to discontinuous Galerkin methods. J Com Phys 230, 4336–4352.
32. Chiu CNP, Wong STB, Chung MK, Lam KKW, Pang RTK, Lee KF, Sumitro SB, Gupta SK, and Yeung SBW. 2008a. Effects of Native Human Zona Pellucida Glycoproteins 3 and 4 on Acrosome Reaction and Zona Pellucida Binding of Human Spermatozoa. Biology of reproduction 79:869–877.
33. Chiu C.N.P, WongS.T.B, LeeC.L. PangT.KR, LeeK-F, SumitroS.B., GuptaS.K. and Yeung S.B.W. 2008b. Native human zona pellucida glycoproteins: purification and binding properties. Human Reproduction 23 (6):1385–1393.

34. Clark GF. 2011. The molecular basis of mouse sperm–zona pellucida binding: a still unresolved issue in developmental biology. *Rep* 142, 377–381.
35. Corani G. et al. 2013. A Bayesian network model for predicting pregnancy after in vitro fertilization, *Comput. Biol. Med.* 43:1783–1792.
36. Coy P, Grullon L, Canovas S, Romar R, Matas C, Aviles M. 2008. Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction.* 135(1):19-27.
37. Coy P and Avilés M. 2010. What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biol. Rev.* 85:593–605. 593. doi: 10.1111/j.1469-185X.2009.00117.x
38. Curtis M.P. et al. 2012. Modelling atethered mammalian sperm cell undergoing hyperactivation, *J. Theor. Biol.* 294:139–143.
39. Cveticanin L. 2011. Oscillators with nonlinear elastic and damping forces, *Comput. Mathemat. Applicat.* 62:1745–1757.
40. Cveticanin L. 2012. Forced pure nonlinear symmetrical oscillators, *Math. Comput Modell.* 55:1580–1593.
41. Dacheux JL & Dacheux F. 2014. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Rep* 147, R27–R42.
42. de Boer P, de Vries M and Ramos L. 2015. A mutation study of sperm head shape and motility in the mouse: lessons for the clinic. *Androl* 3, 174–202.
43. Dean J. 2004. Reassessing the molecular biology of sperm-egg recognition with mouse genetics. *Bioessays.* 26(1):29-38.
44. Dickmann Z. 1965. Sperm penetration into and through the zona pellucida of the mammalian egg. In: *Ciba Foundation Symposium, Preimplantation Stages of Pregnancy*, ed. G.E.W. Wolstenholme and M. O'Connor, Boston, MA: Little, Brown, and Co. 169–182.
45. Djukic T, Topalovic M, Filipovic N. 2015. Numerical simulation of isolation of cancer cells in a microfluidic chip. *J. Micromech. Microeng.* 25: 084012 (9pp).
46. Dong S, Yan Y, Tang L, Meng J, Jiang Y. 2015. Simulation of 3D tumor cell growth using nonlinear finite element method. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 27:1-12.

47. Drobnis EZ, Andrew JB and Katz DF. 1988. Biophysical properties of the zona pellucida measured by capillary suction: is zona hardening a mechanical phenomenon? *Journal of Experimental Zoology*, 245:206–219
48. Ducibella T, Anderson E, Albertini DF, Aalberg J, Rangarajan S. 1988. Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Dev Biol*. 130(1):184-97.
49. Eisenbach M. 1999. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Dev Gen* 25 (2):87-94.
50. Familiari G, Nottola SA, Macchiarelli G, Micara G, Aragona C, Motta PM, 1992. Human zona pellucida during in vitro fertilization: an ultrastructural study using saponin, ruthenium red, and osmium-thiocarbohydrazide, *Mol Reprod Dev* 32(1):51-61,
51. Familiari G, Relucenti M, Heyn R, Micara G, Correr S. 2006. Three-Dimensional Structure of the Zona Pellucida at Ovulation, *Microscopy Reseach And Technique*, 69:415–426.
52. Familiari G, Heyn R, Relucen M., Sathananthan H. 2008. "Structural changes of the zona pellucida during fertilization and embryo development," *Frontiers in Bioscience*, 13:6730-51.
53. Firman RC, & Simmons LW. 2010. Sperm midpiece length predicts sperm swimming velocity in house mice. *Biol Lett* 6: 513–516.
54. Flesch FM & Gadella MB. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Bioch Biophys Ac*, 1469:197-235.
55. Freitas C, Macau E, Pikovsky A. 2015. Partial synchronization in networks of non-linearly coupled oscillators: The Deserter Hubs Model. *CHAOS* 25, 043119
56. Gabrielsen A, Bhatnager R.P, Petersen K, and Lindenberg S. 2000. Influence of Zona Pellucida Thickness of Human Embryos on Clinical Pregnancy Outcome Following In Vitro Fertilization Treatment. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 17(6):323-8.
57. Gadella BM. 2008. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization, *Anim. Reprod. Sci.* 107:229–236.
58. Gadella BM. 2012. Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida prior to and after fertilisation. *Rep Fer Dev* 25:26-37.

59. Gadella B.M. 2013. Dynamic regulation of sperm interactions with the zona pellucida prior to and after fertilisation. *Reprod. Fertil. Dev.* 25(1):26–37.
60. Ganguly A, Bansal P, Gupta T, Gupta SK. 2010. ZP domain' of human zona pellucida glycoprotein-1 binds to human spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8:110.
61. Gardner J.A. and Evans P. Janice. Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilization by multiple sperm..*Reproduction , Fertility and Development*, 2006,18:53-61.
62. Gefen A. 2010. The relationship between sperm velocity and pressures applied to the zona pellucida during early sperm–oocyte penetration. *J Biomech Eng* 132:124501–124501-4.
63. Glozman T, Azhari H. 2010. A Method for Characterization of Tissue Elastic Properties Combining Ultrasonic Computed Tomography With Elastography. *J Ultrasound Med* 29:387–398.
64. Gomendio M & Roldan E. 1991. Sperm competition influences sperm size in animals. *Proc Roy Soc B Biol Sci* 243: 1308. 181-5 DOI: [10.1098/rspb.1991.0029](https://doi.org/10.1098/rspb.1991.0029)
65. Gomendio M, Martin-Coello J, Crespo C, Magana C and Roldan ERS. 2006. Sperm competition enhances functional capacity of mammalian spermatozoa. *PNAS* 103, 41:15113–15117.
66. González-Miranda, J. M. 2004. Synchronization and Control of Chaos. An introduction for scientists and engineers. *Imperial College Press*. ISBN 1-86094-488-4.
67. Goodson SG, Zhang Z, Tsuruta JK, Wang W, & O'Brien DA. 2011. Classification of Mouse Sperm Motility Patterns Using an Automated Multiclass Support Vector Machines Model. *Biol Rep* 84(6):1207–1215.
68. Green D. 1997. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev Rep* 2:147–156.
69. Green DPL, & Purves R.D. 1984. Mechanical Hypothesis Of Sperm Penetration. *Biophysical Journal* 45:659-662.
70. Grzesikiewicz W, Zbiciak A. 2012. Study of generalized Prandtl rheological model for constitutive description of elastoplastic properties of materials, *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering* 55(2):504-510.

71. Goroško O.A. and Hedrih (Stevanović), K. 2001. Analitička dinamika (mehanika) diskretnih naslednih sistema, (Analytical Dynamics (Mechanics) of Discrete Hereditary Systems)" University of Niš, 2001, Monograph, p. 426, YU ISBN 86-7181-054.
72. Greve JM, Wassarman PM. 1985. Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol.* 181(2):253-64.
73. Griffin J, Emery B.R, Huang I, Peterson C.M and Carrell D.T. 2006. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction* 3:2 doi:10.1186/1743-1050-3-2. Pp1-9.
74. Gupta K.S, Bansal P, Ganguly A, Bhandari B, Chakrabarti K. 2009. Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization. *Journal of Reproductive Immunology* 83: 50–55.
75. Han L, Monne´ M, Okumura H, Schwend T, Cherry LA, Flot D, Matsuda T, and Jovine L. 2010. Insights into Egg Coat Assembly and Egg-Sperm Interaction from the X-Ray Structure of Full-Length ZP3 .*Cell* 143:404–415.
76. Hatanaka T.Y, Tobita T.N. and Nakano M. 1992. Changes in the properties and composition of zona pellucida of pigs during fertilization in vitro. *J. Reprod. Fert.* 95: 431-440.
77. Hedrick JL. 2007. A comparative analysis of molecular mechanisms for blocking polyspermy: identification of a lectin-ligand binding reaction in mammalian eggs. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 63:409-19.
78. Hedrih A. 2011. Modeling oscillations of zona pelucida before and after fertilization. ENOC Young Scientist Prize Paper. *EUROMECH Newsletter* 40, European Mechanics Society, 40:6-14.
79. Hedrih A. 2012. Frequency analysis of knot mass particles in oscillatory spherical net model of mouse zona pellucida. Lecture Session, Short Paper, Abstract book of 23rd International Congress of Theoretical and Applied Mechanics, (IUTAM ICTAM Beijing 2012), 19-24 August 2012, Beijing, China, SM01-049 Biomechanics and biomaterials, pp. 209. ISBN 978-988-16022-3-7.
80. Hedrih A. 2014. Transition in oscillatory behaviour in mouse oocyte and mouse embryo through oscillatory spherical net model of mouse Zona Pellucida" in

- Applied Non-Linear Dynamical Systems, Springer Proceedings in Mathematics & Statistics 93, J. Awrejcewicz (ed.), 93 295-303. Springer International Publishing Switzerland 2014 ISBN 978-3-319-08265-3; DOI 10.1007/978-3-319-08266-0__21.
81. Hedrih A & Ugrcic M. 2012. Vibrational properties characterization of mouse embryo during microinjection. *Theor. App. Mech*, 40:(S1), 189-202. UDC 519.673:531:01. doi:10.2298/TAM1301189H
 82. Hedrih A, (Stevanovic) Hedrih K & Bugarski B. 2013a. Oscillatory Spherical net model of Mouse Zona Pellucida. *J App Math bioinform* 4(3):225-268.
 83. Hedrih A, Lazarevic M & Mitrovic-Jovanovic A. 2013b. Parametric Frequency Analysis of Oscillatory Behaviour of Mouse Zona Pellucida Spherical Net Model: Case Successful and Unsuccessful Fertilization. 84th Annual Meeting of the International Association of Applied Mathematics and Mechanics- GAMM 2013 (Gesellschaft für Angewandte Mathematik und Mechanik), Novi Sad, Serbia, March 18-22, 2013, *Proceedings in Applied Mathematics and Mechanics / PAMM*, 13 (1) 53 – 54. doi: 10.1002/pamm.201310022: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pamm.v13.1/issuetoc> ISSN 1617-7061.
 84. Hedrih A, Lazarevic M, Mitrovic-Jovanovic A. 2013c. Fertilization as a Biomechanical oscillatory phenomenon in mammals. *Proceedings of 4th International Congress of Serbian Society of Mechanics*, 4-7th June 2013 Vrnjačka Banja, Serbia, Editors: Maksimović S, Igić T, Trišović N. –Belgrade: Serbian Society of Mechanics, 2013 (Beograd: Beotele Prom), D-01 pp. 579-584. ISBN 978-86-909973-5-0.
 85. Hedrih NA, and (Stevanović) Hedrih RK. 2014a. Modeling Double DNA Helix Main Chains of the Free and Forced Fractional Order Vibrations. Ch 7 In: *Advanced Topics on Applications of Fractional Calculus on Control Problems, System Stability and Modeling* (eds: Mihailo Lazarevic, Nikos Mastorakis. (2014), pp. 145-183. and Appendix E pp. 192-200. WSEAS Press. ISBN: 978-960-474-348-3
 86. Hedrih NA, and (Stevanović) Hedrih, RK. 2014.b. Analysis of energy state of discrete fractional order spherical net of mouse zona pellucida before and after fertilization. *International Journal of Mechanics SI*, 8:371-376.

87. Hedrih N.A, Lazarević M. 2015. Multi-layer oscillatory spherical net model of mouse zona pelucida. Proceedings of 5th International Congress of Serbian Society of Mechanics, Jun15-17th 2015, Arandjelovac, Serbia. Published by Serbian Society of Mechanics and Faculty of Technical Sciences Novi Sad, Editors: Spasić T.D, Lazarević M, Grahovac N, Žigić M, ISBN 978-86-7892-715-7, COBISS.SR-ID 296997639. Electronic USB Proceedings. 1-8 pp.
88. Hedrih A, Lazarevic M, Mitrovic-Jovanovic A. 2015. Influence of sperm impact angle on successful fertilization through mZP oscillatory spherical net model. Computers in Biology and Medicine 59:19–29.
89. Hedrih NA, Hedrih (Stevanovic) RK. 2015. Deformation work of Zona Pelucida in process of fertilization. 13th International Conference on Dynamical Systems – Theory and Applications, Proceedings-Mechatronics and Life Sciences, DSTA Lody 2015, Edited by J.A. Awrejcewicy, M. Kazmierczak, J. Mrozowski, P. Olejnik, Lodz, December 7-10, 2015, Poland, ISBN 978-83-7283-707-3, Department of Automation, Biomechanics and Mechatronics, Lodz, pp. 217-226.
90. Hedrih A. & Banic M. 2016. The effect of friction and impact angle on the spermatozoa - oocyte local contact dynamics. Journal of Theoretical Biology. Journal of Theoretical Biology 393:32–42.
91. Hedrih (Stevanović) K. 1975. Izabrana poglavlja teorije nelinearnih oscilacija, Univerzitet u Nišu, (Niš, 1975) ;<http://elibrary.matf.bg.ac.rs/http://elibrary.matf.bg.ac.rs/handle/123456789/3767>
92. Hedrih (Stevanović) R.K. 1988a. Izabrana poglavlja Teorije elastičnosti, Masinski fakultet Univerziteta u Nisu.str. 424.
93. Hedrih (Stevanović) K. 1988b. Osnovne metode konačnih elemenata u Hedrih (Stevanović) K. Izabrana poglavlja teorije elastičnosti. chVIII-295-313. II izdanje. Mašinski fakultet Univerziteta u Nišu, Katedra za mehaniku i automatiku, Štamparija "Vuk Karadžić", Niš, 1988.
94. Hedrih (Stevanović) R. K. 1991. Rešeni zadaci iz Teorije elastičnosti, Naučna knjiga, Beograd. str. 392.
95. Hedrih (Stevanović) K. 2002a. "Discrete Continuum Method, Symposium, Recent Advances in Analytical Dynamics Control, Stability and Differential Geometry",

- Proceedings Mathematical institute SANU Edited by Vladan Djordjević, p.151, pp.30-57, ISBN 86-80593-32-X. <http://www.mi.sanu.ac.yu/publications.htm>
96. Hedrih (Stevanović) K. 2002b. The Dissipation Function of a Nonconservative System of Mass Particles, *Tensor*, N.S. 63(2):176-186. Tensor Society, Japan.
 97. Hedrih (Stevanovic) K. 2004. Discrete Continuum Method, Computational Mechanics, WCCM VI in conjunction with APCOM 04, Sept. 5-10, 2004, Beijing, China, 2004 Tsinghua University Press & Springer-Verlag, pp. 1-11, CD. IACAM International Association for Computational Mechanics – www.iacm.info
 98. Hedrih (Stevanović) K. 2005. Partial Fractional Order Differential Equations of Transversal Vibrations of Creep-connected Double Plate Systems," in Monograph - Fractional Differentiation and its Applications, Edited by Alain Le Mahaute, J. A. Tenreiro Machado, Jean Claude Trigeassou and Jocelyn Sabatier, p. 780, U-Book, Printed in Germany, pp. 289-302.
 99. Hedrih (Stevanovic) K. 2006. Modes of the Homogeneous Chain Dynamics. *Sig Process* 86:2678- 2702.
 100. Hedrih (Stevanović) K. 2008a. Dynamics of coupled systems. *Nonlinear Analysis: Hybrid Systems*, 2:310-334.
 101. Hedrih (Stevanović) K. 2008b. "Dynamics of multipendulum systems with fractional order creep elements," Special Issue Vibration and Chaos, *Journal of Theoretical and Applied Mechanics*, 46(3):483-509.
 102. Hedrih (Stevanović) K. 2008c. The fractional order hybrid system vibrations," Monograph, *Advances in Nonlinear Sciences, ANN*, 2:226-326.
 103. Hedrih (Stevanović) K. 2009a. Main chains and eigen modes of the fractional order hybrid multipendulum system dynamics," *Physica Scripta*, T136, 2009, 014038, (12pp). doi:10.1088/0031-8949/2009/T136/014038
 104. Hedrih (Stevanović) K. 2009b. Considering Transfer of Signals through Hybrid Fractional Order Homogeneous Structure," Keynote Lecture, AAS-09, Ohrid, Makedonija, Special session, Applied Automatic Systems, Proceedings of selected AAS 2009 Papers. Edited by G. Dimirovski, Skopje –Istambul , 2009, ISBN -13-978-9989-2175-6-2, National Library of R. Makedonia, Authors and ETAI Society, pp. 19-24. 2009.

105. Hedrih (Stevanović) K. 2011. Analytical mechanics of fractional order discrete system vibrations. In *Advances in nonlinear sciences*, 3, JANN, Belgrade, 101-148 ISSN: 978-86-905633-3-3
106. Hedrih (Stevanović) K. 2012. *Advances in classical and analytical mechanics: a reviews of author's results*, Special Issue, *Th App Mech*, 40, S1, 293- 383. DOI: 10.2298/TAM12S1293H
107. Hedrih (Stevanović) R.K. 2014. Generalized function of fractional order dissipation of system energy and extended Lagrange differential Lagrange equation in matrix form, Dedicated to 86th Anniversary of Radu MIRON'S Birth.,*Tensor*,Vol. 75, No. 1. pp. 35-51. Tensor Society (Tokyo), c/o Kawaguchi Inst. of Math. Soc. Japan. ISSN 0040-3604.
108. Hedrih (Stevanović) R.K, Hedrih N.A. 2009a. Considering vibrations of the double DNA main chains via model with hereditary properties, in: *Proceedings 2nd International Congress of Serbian Society of Mechanics-IconSSM2009*, The International Federation of Automatic Control, Ohrid, Republic of Macedonia, 2009, pp.341–346.
109. Hedrih (Stevanović) R.K. and Hedrih N.A. 2009b. Eigen main chain modes of the double DNA fractional order chain helix vibrations (Part I), *Proceedings 2nd International Congress Of Serbian Society Of Mechanics-IconSSM 2009*,M1-03, CD, pp. 1-15.
110. Hedrih (Stevanović) K. & Hedrih N.A. 2010. Eigen modes of the double DNA chain helix vibrations. *Journal of Theoretical and Applied Mechanics-Poland*, 48(1):219-231.
111. Hedrih (Stevanović) KR & Machado JT. 2014. Discrete fractional order system vibrations,*International Journal Non-Linear Mechanics* Epub. January 6, DOI: 10.1016/j.ijnonlinmec. 2014.11.009.
112. Hedrih (Stevanović) RK & Hedrih AN. 2016. Phenomenological mapping and dynamical absorptions in chain systems with multiple degrees of freedom. *J Vib Contr* 22:18-36. (online first – March 19, 2014) doi:10.1177/ 1077546314525984
113. Hedrih (Stevanović) K, Ivanović-Šašić A, Simonović J, Kolar-Anić Lj, Čupić Ž. 2015a. Oscillators: Phenomenological mappings and analogies–First part: Mathematical analogy and chains, *Scientific Technical Review*, 65(3):27-38.

114. Hedrih (Stevanović) K, Simonović J, Ivanović-Šašić A, Kolar-Anić Lj, Čupić Ž. 2015b. Oscillators: Phenomenological mappings and analogies– Second part: Structural analogy and chains, *Scientific Technical Review*, 65(4):37-45.
115. Ho HC & Suarez SS. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Rep*122:519–526.
116. Hoodbhoy T, Dean J. 2004. Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction*.127(4):417-22.
117. Hsiao WW, Liao HS, Lin HH, Ding RF Huang KY & Chang CS. 2013. Motility Measurement of a Mouse Sperm by Atomic ForceMicroscopy. *Analt Sci* 29:3-8.
118. Huang HL, Lv C,Zhao YC, Li W, He XM, Li P, Sha A-G, Tian X., Papisian CJ, Deng HW, Lu G-X, & Xiao H-M. 2014. Mutant ZP1 in Familial Infertility N *Engl J Med*. 370(13):1220–1226.
119. Ikawa M, Inoue N, Okabe M. 2008. Mechanisms of sperm-egg interactions emerging from gene-manipulated animals, *Int. J. Dev. Biol.* 52: 657-664.
120. Ikawa M, Inoue N, Benham M.A, Okabe M. 2010. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte", *The Journal of Clinical Investigation*, 120:984–994.
121. Ishijima S. 2011. Dynamics of flagellar force generated by a hyperactivated spermatozoon. *Reproduction* 142:409–415.
122. Izquierdo-Rico MJ, Jimenez-Movilla M, Llop E, Pérez-Oliva AB, Ballesta J, Gutiérrez-GallegoR, Jimenez-Cervantes C, and Avile's M. 2009. Hamster Zona Pellucida Is Formed by Four Glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4 *Journal of Proteome Research*, 926–941.
123. Jaffe L.A, Sharp A. P., Wolf D. P. 1983. Absence of an electrical polyspermy block in the mouse. *Developmental Biology*, 96 (2):317–323.
124. Jennings C.P, Merriman A.J, Beckett L.E, Hansbro M.P. and Jones T.K. 2011. Increased zona pellucida thickness and meiotic spindle disruption in oocytes from cigarette smoking mice. *Human Reproduction*, 26(4):878-884. doi:10.1093/humrep/deq393.
125. Jia Z, Fu X, Deng G, Li K. 2013. Group synchronization in complex dynamical networks with different types of oscillators and adaptivecoupling schemes. *Commun Nonlinear Sci Numer Simulat* 18:2752–2760.

126. Jiménez-Movilla M, Avilés M, Gómez-Torres MJ, Fernández-Colom PJ, Castells MT, de Juan J, Romeu A, Ballesta J. 2004. Carbohydrate analysis of the zona pellucida and cortical granules of human oocytes by means of ultrastructural cytochemistry. *Hum Reprod.* 19(8):1842-55.
127. Jiménez-Movilla M, Martínez-Alonso E, Castells MT, Izquierdo-Rico MJ, Gutiérrez-Gallego MDSR, Fayrer-Hosken R, Ballesta J and Avilés M. 2009. Cytochemical and biochemical evidences for a complex tridimensional structure of the hamster zona pellucida. *Histol Histopathol* 24:599-609.
128. Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E. & Wassarman P.M. 2002. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nature Cell Biol.* 4:457–461.
129. Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher E.S, Wassarman P.M. 2004. A duplicated motif controls assembly of ZP domain proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:5922–5927
130. Jovine L, Darie C.C, Litscher E.S, Wassarman P.M. 2005. Zona pellucida domain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 74:83–114.
131. Jovine Luca, Janssen G William, Litscher S Eveline and Wassarman M Paul. 2006. The PLAC1-homology region of the ZP domain is sufficient for protein polymerisation *BMC Biochemistry* 7:11 doi:10.1186/1471-2091-7-11.
132. Jovine L, Qi H, Williams Z, Litscher ES, Wassarman PM. 2007. Features that affect secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins during mammalian oogenesis. *Society of Reproduction and Fertility Supplement.* 63:187-201.
133. Karličić D, Kozić P, Adhikari S, Cajić M, Murmu T, Lazarević M. 2015. Nonlocal mass-nanosensor model based on the damped vibration of single-layer graphene sheet influenced by in-plane magnetic field, *Int. Journal of Mech. Sciences*, 96–97:132–142.
134. Katebi M, Movahedin M, Abdolvahabi MA, Akbari M, Abolhassani F, Sobhani A, & Aoki F. 2005. Changes in Motility Parameters of Mouse Spermatozoa in Response to Different Doses of Progesterone during Course of Hyperactivation. *Iran Biomed Jo* 9: 73-79.

135. Keefe D, Tran P, Pellegrini C. and Oldenbourg R. 1997. Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida. *Hum. Reprod.* 12:1250–1252.
136. Kilani SS, Cooke S, Kan AK, Chapman MG. 2006. Do age and extended culture affect the architecture of the zona pellucida of human oocytes and embryos? *Zygote* 14:39–44.
137. Khalilian M, Navidbakhsh M, Valojerdi MR, & Chizari Mand Yazdi PE. 2010. Estimating Young's modulus of zona pellucida by micropipette aspiration in combination with theoretical models of ovum *J Roy Soc Inter* 7:687-694.
138. Khalilian, M. Navidbakhsh, M. Rezazadeh Valojerdi, M. Chizari, and P. Eftekhari Yazdi, 2011. Alteration in the Mechanical Properties of Human Ovum Zona Pellucida Following Fertilization: Experimental and Analytical Studies, *Exp Mech.* 51:175-182.
139. Kinukawa M, Nagata M & Aoki F. 2003. Changes in flagellar bending during the course of hyperactivation in hamster spermatozoa. *Rep*125:43–51.
140. Kozlovsky P. and Gefen A. 2012. The relative contributions of propulsive forces and receptor–ligand binding forces during early contact between spermatozoa and zona pellucida of oocytes, *J.Theor. Biol.* 294:139–143.
141. Kozlovsky P. & Gefen A. 2013. Sperm penetration to the zona pellucida of an oocyte: a computational model incorporating acrosome reaction. *Comp Meth Biomech Biomed Eng* 16(10) pp.7.
142. Kojić N, Milošević M, Petrović D, Isailović V, Sarioglu F.A, Haber A.D, et al. 2015. A computational study of circulating large tumor cells traversing microvessels. *Computers in Biology and Medicine* 63:187–195
143. Kralemann B, Frühwirth, Pikovsky A. 2013. In vivo cardiac phase response curve elucidates human respiratory heart rate variability. *Nature Communications*, 4:2418 doi: 10.1038/ncomms3418.
144. Krishnan P.G, Bazhenov M. Pikovsky A. 2013. Multipulse phase resetting curves *Physical Review E* 88, 042902.
145. Ladjaly H, Hanus J-L, Ferreira A. 2011. "IEEE International Conference on Robotics and Automation, San Francisco: United States " DOI: 10.1109/IROS.2011.6094965.

146. Lazarević M. 2012. Biologically inspired control and modeling of (bio)robotic systems and some applications of fractional calculus in mechanics, *Theor. and Applied Mech*, SI, 40(S1):163-187, ISSN:1450-5584.
147. Lazarević M. 2013. Further Results On Applications Of Fractional Calculus In Nonlinear Dynamics - Stability And Control Issues, UDK001 Serbian Scientific Society, YU ISSN 0350- 2910, *SCIENTIFIC REVIEW*(2013), Series: Scientific and Engineering- Special Issue Nonlinear Dynamics S2:149-178.
148. Lazarević M. Editor of, *Advanced Topics on Applications of Fractional Calculus on Control Problems, System Stability And Modeling*, Međunarodna naučna monografija, WSEAS, ID 9028, ISBN: 978-960-474-348-3, pp. 202, 2014a.
149. Lazarević M. Some Applications of Biomimetics and Fractional Calculus in Control and Modeling of (Bio)robotic Systems, in book *New Trends in Medical and Service Robots*, Series: Mechanisms and Machine Science, Vol. 20, (Rodić A., Pislá D., Bleuler H.) (Eds.) 2014b, p.350, ISBN 978-3-319-05430-8.
150. Lazarević M, Bućanović Lj. Contribution to the modeling and analysis of dynamics systems with fundamentals of fractional calculus, Faculty of Mech Eng, University of Belgrade, Belgrade, 2012, pp.222, ISBN 978-86-7083-747-8, (in Serbian).
151. Lazarević P.M. 2015. Elements of mathematical phenomenology of self-organization nonlinear dynamical systems: synergetics and fractional calculus approach, *International Journal of Non-Linear Mechanics*, 73:31-42.
152. Lefievre L, Bedu-Addo K, Conner SJ, Machado-Oliveira GSM, Chen Y, Kirkman-Brown JC, Afnan MA, Publicover SJ, Ford WCL & Barratt CLR. 2007. Counting sperm does not add up any more: time for a new equation? *Rep* 133:675–684.
153. Litscher ES, Janssen WG, Darie CC, Wassarman PM. 2008. Purified mouse egg zona pellucida glycoproteins polymerize into homomeric fibrils under non-denaturing conditions. *J Cell Physiol*. 214(1):153-7.
154. Litscher ES, Williams Z, and Wassarman P.M. 2009. Zona Pellucida Glycoprotein ZP3 and Fertilization in Mammals, *Mol Reprod Dev* 76:933–941.

155. Liu C, Litscher E.S, Mortillo S, Sakai Y, Kinloch R.A, Stewart C.L, and Wassarman, PM. 1996. Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5431–5436.
156. Liu DY, Liu ML, Clarke GN, Baker HW. 2007. Hyperactivation of capacitated human sperm correlates with the zona pellucida-induced acrosome reaction of zona pellucida-bound sperm. *Hum Reprod.*10:2632-8.
157. Liu X, Fernandes R, Jurisicova A, Casper R.F. and Sun Y. 2010. In situ mechanical characterization of mouse oocytes using a cell holding device. *The Royal Society of Chemistry, Lab Chip*, 10:2154–2161.
158. Liu X, Yishi J, Zong Z, Takwan K, Sun Y. 2012. Elastic and Viscoelastic Characterization of Mouse Oocytes Using Micropipette Indentation. *Annals of Biomedical Engineering*, 40 (10):2122–2130.DOI: 10.1007/s10439-012-0595-3
159. Malo AF, Gomendio M, Garde J, Lang-Lenton B, Soler AJ & Roldan ER. 2006. Sperm design and sperm function. *Bioll Lett*, 2:246–249.
160. Marco-Jiménez F, Naturil-Alfonso C, Jiménez-Trigos E, Lavara R., Vicente J.S. 2012. Influence of zona pellucida thickness on fertilization, embryo implantation and birth. *Animal Reproduction Science* 132:96– 100.
161. Martinova Y, Petrov M, Mollova M, Rashev R & Ivanova M. 2008. Ultrastructural study of cat zona pellucida during oocyte maturation and fertilization. *Anim Rep Sci* 108:425–434.
162. Meyer E. *Atomic Force Microscopy Progress in Surface Science*. 1992. Pergamon Press Ltd, 41:3-49.
163. Michelmann HW, Rath D, Topfer-Petersen E, Schwartz P. 2007. Structural and Functional Events on the Porcine Zona Pellucida During Maturation, Fertilization and Embryonic Development: a Scanning Electron Microscopy Analysis, *Reprod Dom Anim* 42:594–602.
164. Miki K & Clapham DE. 2013. Rheotaxis Guides Mammalian Sperm. *Curr Biol*, 23:443–452.
165. Mio Y, Iwata K, Yumoto K, Kai Y, Sargant HC, Mizoguchi C, et al. 2012. Possible mechanism of polyspermy block in human oocytes observed by time-

- lapse cinematography. *J Assist Reprod Genet* 29:951–956. DOI 10.1007/s10815-012-9815-x.
166. Mitropolyskiy YuA. "Nestashionarnie proshesi v nelinyeynih sistemah," AN USSR, Kiev. (in Russian), 1955.
 167. Mitropolyskiy YuA, "Problemi asimptoticheskoy teorii nestashionarnih kolebaniy," Nauka Moskva, pp. 431. (in Russian), 1964.
 168. Mitropolyskiy YuA. "Metod usrednyenia v nelinyeynoy mehanike," Naukova Dumka, Kiev, pp.340, 1971.
 169. Mitropolyskiy YuA., "Nelinyeynaya mehanika-Asimptoticheskie metodi," Institut matematiki NAN Ukraini, Kiev, pp. 397, 1995.
 170. Mitropolyskiy YuA. Mosseenkov BI. Lekciyi po primenyeniyu metodov k recheniyu uravneniy v chastnih proizvodnih," *Int. Math. AN USSR*, Kiev. (in Russian), 1968.
 171. Mitropolyskiy Yu.A, and Mosseenkov B.I. *Assimptoticheskie resheniya uravneniya v chastnih proizvodnih*, Vichaya chkola Kiev. (in Russian), 1976.
 172. Mitropolyskiy YuA, and Van Dao N. "Lectures on Asymptotic Methods of Nonlinear Dynamics," Vietnam National University Publishing House, Hanoi, pp. 494, 2003.
 173. Mitrović A. 2002. The effects of HBO treatments on vigility of spermatozoides in vitro circumstances. *Proceeding of the 28 EUBS, Belgium 2002* , 99-101.
 174. Mitrović A, Jovanović T, Stanimirović B, Đukić M, Kršić V, Dragojević S. 2002. Pokretljivost spermatozoida u uslovima in vitro hiperbarične oksigenacije. *Jugoslovenski kongres fertiliteta i steriliteta* ,Beograd, 130-134.
 175. Mitrović A, Jovanović T. 2003. Effect of hyperbaric therapy on endometrial growth. *Proceeding of 29th EUBS*, 103-109.
 176. Mitrović A, Jovanović T, Nikolić B, Brkić P, Dragojević S, Pavlović D.V, Stanimirović B. 2004. Hiperbarična Oksigenacija u Tretmanu Muškog Infertiliteta. *Zbornik radova Ginekološko akušerske nedelje SLD-a*, Beograd, Srbija, 279-285.
 177. Mitrović A, Brkić P, Nikolić B, Dragojlović S, Zarić O, Ljubić A, Jovanović T. 2005. In vitro fertilization (IVF) and HBO therapy. *Proceedings of the 31th*

- Annual Scientific Meeting of the European Underwater and Baromedical Society, Barcelona, Spain, 208-210.
178. Mitrović A, Nikolić B, Dragojević S, Brkić P, Ljubić A, Jovanović T. 2006a. Hyperbaric oxygenation as a possible therapy of choice for infertility treatment. *Bosn J Basic Med Sci*, 6(2):21-24.
 179. Mitrovic A, Brkic P, Nikolic B, Dragojevic S, Zaric O, LjubicA, Jovanovic T. 2006b. Hyperbaric oxygen and in vitro fertilisation. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 46:456–462.
 180. Mitrovic A, Brkic P. & Jovanovic T. 2011. The effects of hyperbaric oxygen treatment on vigility of spermatozoids: preliminary report. *Ac Phys Hung*98, 84-89.
 181. Monne´, M., Han, L., Schwend, T., Burendahl, S., and Jovine, L. 2008. Crystal structure of the ZP-N domain of ZP3 reveals the core fold of animal egg coats. *Nature* 456:653–657.
 182. Montoto LG, Sanchez, MV, Tourmente M, Martin-Coello J, Luque-Larena JJ, Gomendio M & Roldan ERS. 2011. Sperm competition differentially affects swimming velocity and size of spermatozoa from closely related murid rodents: head first. *Rep*142:819–830.
 183. Morales DA, Bengoetxea E, Larrañaga P. 2008. Selection of human embryos for transfer by Bayesian classifiers, *Comput. Biol. Med.* 38:1177–1186.
 184. Mugnier S, Dell’Aquila ME, Douet JPC, Ambruosi B, De Santis T, Lacalandra GM, Lebos C, Sizaret P-Y, Delaleu B, Monget P, Mermillod P, Magistrini M, Meyers SA, and Goudet G. 2009. New Insights into the Mechanisms of Fertilization: Comparison of the Fertilization Steps, Composition, and Structure of the Zona Pellucida Between Horses and Pigs. *Biology of reproduction*. 81: 856–870.
 185. Murayama Y, Constantinou E.C, Omata S. 2004. Micro-mechanical sensing platform for the characterization of the elastic properties of the ovum via uniaxial measurement. *Journal of Biomechanics*. 37:67–72.
 186. Murayama Y, Mizuno J, Kamakura H, Fueta Y, Nakamura H, Akaishi H. 2006. Mouse zona pellucida dynamically changes its elasticity during oocyte

- maturation, fertilization and early embryo development. *Human Cell* 19:119–125.
187. Murayama Y, Yoshida M, Mizuno J, Nakamura H, Inoue S, Watanabe Y et al. 2008. Elasticity Measurement of Zona Pellucida Using a Micro Tactile Sensor to Evaluate embryo Quality. *J. Mamm. Ova Res.* 25:8-16.
 188. Nawroth F, Müller P, Wolf C, Sudik R. 2001. Is the Zona pellucida thickness of metaphase-II oocytes in an IVF/ICSI program influenced by the patient's age? *Gynecol Obstet Invest* 52:55–59.
 189. Nir A. 2002. The Fertilization Dance: A Mechanical View of the Egg Rotation During the Initial Spermatozoa-Ovum Interaction. *J. Theor. Biol.* 214:171-179.
 190. Nixon B, Aitken RJ, Mc Laughlina E.A. 2007. New insights into the molecular mechanisms of sperm–egg interaction, *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (14):1805–1823.
 191. Olusola I. O, Vincent E U, Njah N. A, Ali E. 2011. Control and Synchronization of Chaos in Biological Systems Via Backstepping Design. *International Journal of Nonlinear Science* 11(1):121-128.
 192. Papi M, Sylla L, Parasassi T, Brunelli R, Monaci M, Maulucci G. et al. 2009. Evidence of elastic to plastic transition in the zona pellucida of oocytes using atomic force spectroscopy, *App. Physic Lett.* 94:153902.
 193. Papi M, Brunelli R, Sylla L, Parasassi T, Monaci M, Maulucci G, et al. 2010. Mechanical properties of zona pellucida hardening, *Eur. Biophys. J.* 39:987–992.
 194. Papi M, Brunelli R, Familiari G, Frassanito MC, Lamberti L, et al. 2012. Whole-Depth Change in Bovine Zona Pellucida Biomechanics after Fertilization: How Relevant in Hindering Polyspermy? *PLoS ONE* 7(9):e45696. doi:10.1371/journal.pone.0045696.
 195. Papi M, Maiorana A.C, Douet C. Maulucci G, Parasassi T, Brunelli R, et al. 2013. Viscous forces are predominant in the zona pellucida mechanical resistance. *Appl Phys. Lett.* 102:043703–043705.
 196. Perović M, Ženski reproduktivni sistem u Anđelković i saradnici. *Histološka građa organa. GIP Bonafides, Niš*, 91-108, 2001.
 197. Pikovsky A, Rosenblum M, Kurths J. *Synchronization: A Universal Concept in Nonlinear Science.* Cambridge University Press, Cambridge, 2001.

198. Pikovsky A. & Rosenblum M. 2015. Dynamics of globally coupled oscillators: Progress and perspectives. *CHAOS* 25, 097616.
199. Pizzari T. 2006. Of mice and sperm. *PNAS* 103 (41):14983–14984.
200. Prasad S.V, Skinner S.M. Carino C. Wang N. Cartwright J. Dunbar B.S. 2000. Structure and Function of the Proteins of the Mammalian Zona pellucida. *Cells Tissues Organs* 166:148–164.
201. Prasad K, Tarannum SA. 2012. Basic principles of finite element method and its applications in orthodontics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences. JPBMS.* 16 (11).
202. Press W.H, et al. *Numerical Recipes in The Art of Scientific Computing*, Cambridge University Press. 1993.
203. Qi Huayu, Williams Z, Wassarman PM, 2002. Secretion and Assembly of Zona Pellucida Glycoproteins by Growing Mouse Oocytes Microinjected with Epitope-tagged cDNAs for mZP2 and mZP3, *Mol Biol Cell*,13:530–541.
204. Qi, H. and Wassarman, P.M. 1999. Secretion of zona pellucida glycoprotein mZP2 by growing oocytes from mZP3^{-/-} and mZP3^{-/-} mice. *Dev. Genet.* 25:95–102.
205. Rankin T, Familiar M, Lee E, Ginsberg A, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Drago J, Westphal H, Dean J. 1996. Mice homozygous for an insertional mutation in the ZP3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development.*122(9):2903-10.
206. Rankin T, Talbot P, Lee E. and Dean J. 1999. Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development*,126:3847-3855.
207. Rankin T.L, O'Brien M., Lee E., Wigglesworth K, Eppig J. Dean. 2001. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development.* 128:1119-1126.
208. Rankin TL, Coleman JS, Epifano O, Hoodbhoy T, Turner SG, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Dean J. 2003. Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Dev Cell.*5(1):33-43.
209. Rapajić M, Šekara T, Lazarević M. On Discrete, Finite-Dimensional Approximation of Linear, Infinite Dimensional Systems, in book *Fractional*

- Calculus, Theory, editors: R.A.Z. Daou, X. Moreau, Nova Science (Verlag) 2015, pp.275-278. ISBN: 978-1-63463-002-3.
210. Rašković PD. "Teorija oscilacija (Theory of Oscillations)", Naučna knjiga, 503, (In Serbian).1965.
 211. Rašković PD. "Analitička mehanika (Analytical Mechanics)," Mašinski fakultet Kragujevac, (In Serbian) 1974.
 212. Rašković P.D. 1985. Teorija elastičnosti (Theory of Elasticity), Naučna knjiga, 1985, pp. 414.
 213. Rath D, Töpfer-Petersen E, Michelmann HW, Schwartz P, von Witzendorff D, Ebeling S, Ekhlesi-Hundrieser M, Piehler E, Petrunkina A, Romar R. 2006. Structural, biochemical and functional aspects of sperm-oocyte interactions in pigs.Soc Reprod Fertil Suppl.62:317-30.
 214. Rega G. & Lenci S. 2008. Dynamical Integrity and Control of Nonlinear Mechanical Oscillators. *Journal of Vibration and Control*, 14(1–2): 159–179. DOI: 10.1177/1077546307079403.
 215. Rowat A.C, Lammerding J, Herrmann H, and Aebi U. 2008. Towards an integrated understanding of the structure and mechanics of the cell nucleus. *BioEssays* 30(3):226–236.
 216. Schaöpe J, Prauße S, Radmacher M, and Stick R. 2009. Influence of Lamin A on the Mechanical Properties of Amphibian Oocyte Nuclei Measured by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* 96:4319–4325.
 217. Shabanowitz R.B and. O'Rand M.G. 1988. Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J.Reprod. Fert.* 82:151-161.
 218. Shiloh H & Dirnfeld M. 2000. Study of zona pellucida thickness of embryos before their transfer and relation to age and follicle stimulating hormone. *Reprod Technol* 10:307–310.
 219. Shiloh H, LahavBaratz S, Koifman M, Ishai D, Bidder D, Weiner-Meganzi ZM, and Dirnfeld M. 2004. The impact of cigarette smoking on zona pellucida thickness of oocytes and embryos prior to transfer into the uterine cavity. *Human Reproduction.*19(1):157-159.

220. Shirakawa H, Miyazaki S. 1999. Spatiotemporal characterization of intracellular Ca²⁺ rise during the acrosome reaction of mammalian spermatozoa induced by zona pellucida. *Dev Biol*. 208(1):70-8.
221. Sigurdsson JK, Brown FLH & Atzberger PJ. 2013. Hybrid continuum-particle method for fluctuating lipid bilayer membranes with diffusing protein inclusions. *J Comp Phys* 252: 65–85.
222. Simonović J. 2013. Synchronization in Coupled Systems with Different Type of Coupling Elements, *Differential Equations and Dynamical Systems*, 21(1):141-148. Springer.
223. Simonovic J, & Hedrih A. 2014. Synchronisation in oscillatory behavior of embryo's ZP molecules in context of polyspermy block, in: *Electronic USB Proceedings of 8th European Nonlinear Dynamics Conference (ENOC2014), Nonlinear Dynamics in Biological Systems*, July 6–11, 2014, Vienna, Austria, MS13-1.
224. Spasić M.A, Lazarević M. 2005. Electroviscoelasticity of Liquid/Liquid Interfaces: Fractional Order Model, *Journal of Colloid and Interface Science*, 282:223-230.
225. Spasić, A, Lazarević M, Krstić D. Chapter: Theory of electroviscoelasticity, pp.371-394 in *Finely Dispersed Particles: Micro-, Nano-, and Atto-Engineering*, Dekker-CRC Press-Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, 2006, ISBN 1574444638, pp.950, International scientific monograph.
226. Spasić A, Lazarević M, Mitrović M, Krstić D. 2009. Colloid electrohydrodynamics, -*Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly CICEQ* 63 (5a) 511–527.
227. Subramani E, Basu H, Thangaraju S, Dandekar S, Mathur D, Chaudhury K. 2014. Rotational Dynamics of Optically Trapped Human Spermatozoa. *Scientific World Journal*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/154367>, ArticleID154367, 7 pages.
228. Sun QY. 2003. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microsc Res Tech*. 61(4):342-8.

229. Sun Y, Wan KT, Roberts KP, Bischof JC & Nelson BJ. 2003. Mechanical Property Characterization of Mouse Zona Pellucida. *IEEE Tran Nanobiosci* 2:279-286.
230. Sun Y, Nelson BJ, Greminger MA, 2005. Investigating Protein Structure Change in the Zona Pellucida with a Microrobotic System, *Int J Robot Res*, 24 (2-3):211-218,
231. Sundar S.S, Nandla B, Saikrishna D, Mallesh G.2012. Finite Element Analysis: A Maxillofacial Surgeon's Perspective. *J. Maxillofac. Oral Surg.* 11(2):206-211. DOI 10.1007/s12663-011-0319-5.
232. Suzuki H, Xianghong Y, Foote RH. 1994. Surface alterations of the bovine oocyte and its investments during and after maturation and fertilization in vitro. *Mol Reprod Dev* 38:421-430.
233. Tipalski-Fišteš N. 2005. Fiziologija menstrualnog ciklusa i oplodnja. In: *Fitiologija Trudnoće*, edn 1, pp.41-59, ed Milašinović Lj. IP SKK Kosmos, Beograd 2005.
234. Tourmente M, Montserrat G & Eduardo RRS. 2011. Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evolu Biol* 11, 12. doi:10.1186/1471-2148-11-12.
235. Tsaadon A., Eliyahu E., Shtraizent N., Shalgi R. 2006 When a sperm meets an egg: Block to polyspermy. *Mol Cell End* 252:107-114.
236. Vanroose G, Nauwynck H, Van Soom A, Ysebaert MT, Charlier G, Van Oostveldt P. and de Kruif A. 2000. Structural Aspects of the Zona Pellucida of In Vitro-Produced Bovine Embryos: A Scanning Electron and Confocal Laser Scanning Microscopic Studyti, *Biology of Reproduction*, 62:463-469.
237. Verhey F.J, Nathan S.N, Rienhoff O, Kikinis R,RakebrandtF, and D'Ambra N.M. 2006. Finite-element-method (FEM) model generation of time-resolved3D echocardiographic geometry data for mitral-valve volumetry. *BioMedical Engineering OnLine*5:17 doi:10.1186/1475-925X-5-17.
238. Wassarman, P.M. 1988. Zona pellucida glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 57:415-442.
239. Wassarman PM. 2008. Zona Pellucida Glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry.* 283:24285-24289.

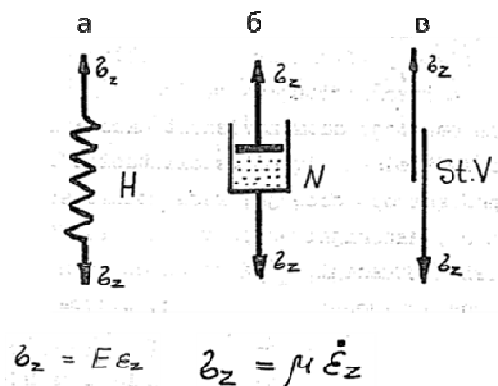
240. Wassarman, P.M, Kinloch R.A. 1992. Gene expression during oogenesis in mice. *Mutat Res* 296:3–15.
241. Wassarman PM, Liu C and Litscher ES. 1996. Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle *Journal of Cell Science* 109:2001–2004.
242. Wassarman PM, Qi H, Litscher ES. 1997. Mutant female mice carrying a single mZP3 allele produce eggs with a thin zona pellucida, but reproduce normally. *Proc Biol Sci.* 22;264(1380):323-8.
243. Wassarman PM & Litscher ES. 2012. Influence of the zona pellucida of the mouse egg on folliculogenesis and fertility. *Int J Dev Biol* 56:833-839. doi: 10.1387/ijdb.120136pw
244. Wilkinson J.H, Reinsch C. *Linear Algebra*. 1971. Handbook for Automatic Computation, Springer-Verlag, New York, NY, Vol. II., pp. 418–439
245. Wolf P, Feneux D, Ducot B, Rodrigues D & Jouannet P. 1995. Influence of sperm movement parameters on human sperm\oolemma fusion. *J Rep Fert* 105:185-192.
246. Woolley DM. 2003. Motility of spermatozoa at surfaces. *Rep* 126:259–270.
247. Yanez Livia Z., Han Jinnuo, Behr Barry B., Reijo Pera Renee A. & Camarillo David B. 2016. Human oocyte developmental potential is predicted by mechanical properties within hours after fertilization. *NATURE COMMUNICATIONS* 7:10809. DOI: 10.1038/ncomms10809. Published 24 Feb 2016.
248. Yashin V.V. & Balazs C.A. 2006. Pattern Formation and Shape Changes in Self-Oscillating Polymer Gels, *Science* 314:798-801.
249. Yashin V.V, Kuksenok O, Dayal P, Balazs C.A. 2012. Mechano-chemical oscillations and waves in reactive gels. *Rep. Prog. Phys.* 75 (066601), 40. <http://dx.doi.org/10.1088/0034-4885/75/6/066601>.
250. Yonezawa N, Kudo K, Terauchi H, Kanai S, Yoda N, Tanokura M, Ito K, Miura K, Katsumata T, Nakano M. 2005. Recombinant porcine zona pellucida glycoproteins expressed in Sf9 cells bind to bovine sperm but not to porcine sperm. *J Biol Chem.*280(21):20189-96.

251. Yu J, Hu C, Jiang H, Teng Z. 2012. Synchronization of nonlinear systems with delays via periodically nonlinear intermittent control. *Commun Nonlinear Sci Numer Simulat* 17:2978–2989.
252. Yue X, Wang L, and Wang R. 2013. Tissue Modeling and Analyzing with Finite Element Method:A Review for Cranium Brain Imaging. *International Journal of Biomedical Imaging*. Article ID 781603, 12 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/781603>
253. Zhao M, Gold L, Ginsberg AM, Liang LF, Dean J. 2002. Conserved furin cleavage site not essential for secretion and integration of ZP3 into the extracellular egg coat of transgenic mice. *Mol Cell Biol*.2(9):3111-20.

Прилог 1

Реолошки модели материјала и конститутивне релације хибридних материјала

Најједноставнији модели за идеално еластични, идеално вискозни и идеално пластични материјал за случај аксијалног напрезања дати су на Слици П.1.



Слика П.1. Основни механички модели за случај аксијалног напрезања-линеарног и хомогеног стања напона у свим тачкама попречног пресека штапа или цеви. а. *Hooke*-ов идеално еластични материјал-напон σ_z је пропорционална дилатацији ε_z . б. *Newton*-ов идеални вискозни флуид-нормални напон σ_z је пропорционалан брзини дилатације $\dot{\varepsilon}_z$, а коефицијанат пропорционалности μ је коефицијанат вискозности. в. *Saint Venant*-ов идеално пластични материјал – нормални напон је константан у току пластичног течења, не зависи од времена и једнак је напону пластичног течења. Преузето из (*Hedrih (Stevanović), 1988*).

"Под дејством спољашњег оптерећења флуид тече јер не ствара отпор појавом смичућег напона, а по престанку дејства оптерећења флуид се не враћа у конфигурацију почетног стања пре оптерећења." (*Hedrih (Stevanović), 1988*).

Течење чврстих тела настаје када интензитет оптерећења пређе границу течења за тај материјал и тада настаје пластична деформација и пластично течење материјала у напетом телу.

Пластично течење се одвија само под дејством механичког оптерећења и може се сматрати да не зависи од времена и температуре и по престанку деловања оптерећења тело се не враћа у првобитно стање. Разлика између вискозног и пластичног течења је у интензитету оптерећења- код пластичног течења оптерећење треба да буде такво да пређе границу течења материјала, а код вискозног течења и мале силе могу изазвати вискозно течење. Када су оптерећења таква да не прелазе границу течења материјала, тело се еластично деформише. Еластична деформација подразумева да се тело по престанку дејства силе враћа у првобитну конфигурацију и без унутрашњег напона.

Паралелним или серијским спрезањем основних модела идеалних материјала добијамо сложеније моделе. Најпознатији су *Kelvin-Voigt*-ов модел за идеални виско-еластични материјал и *Maxwell*-ов модел за идеални еластовискозни флуид. Слика П.2.

***Kelvin-Voigt*-ов модел**

Kelvin-Voigt-ов модел се састоји од паралелно везане опруге која има еластична својства и клипа са вискозним својствима.

Напон на крајевима система једнак је збиру напона који настају као резултат еластичности односно вискозности:

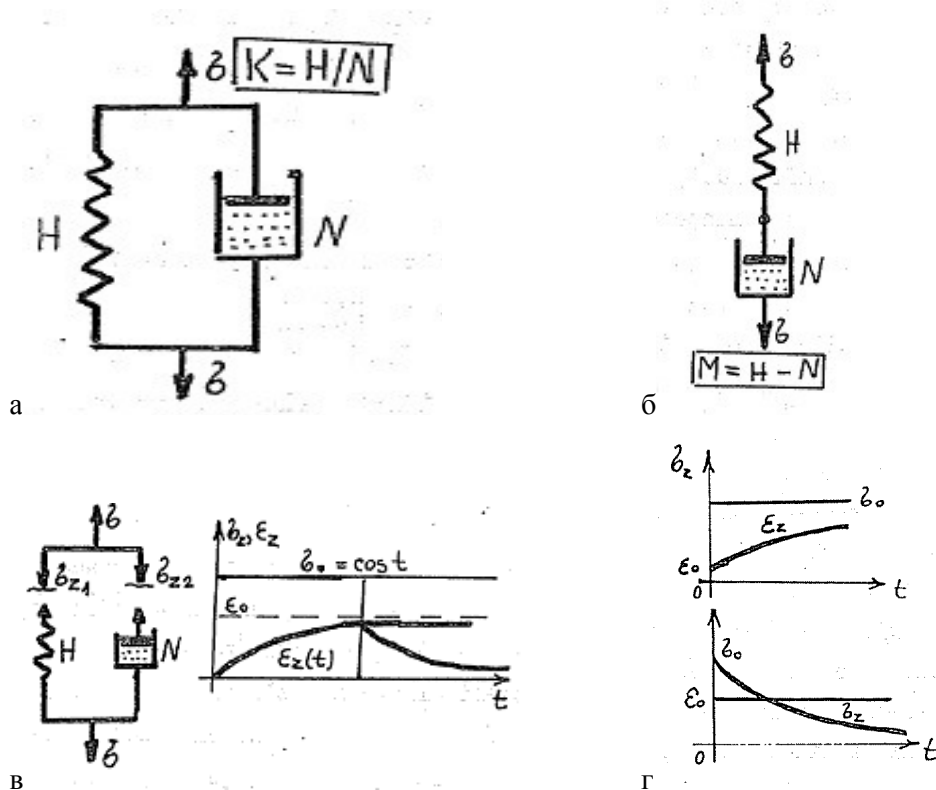
$$\sigma_z = \sigma_{z1} + \sigma_{z2} \quad (2.1)$$

$$\sigma_z = E\varepsilon + \mu \dot{\varepsilon} \quad (2.2)$$

Напон у *Kelvin-Voigt*-овом моделу зависи од дилатације и брзине дилатације. Када тело мирује или при веома спорој промени оптерећења, када можемо сматрати да је брзина дилатације једнака нули $\dot{\varepsilon} \rightarrow 0$, тада је напон пропорционалан дилатацији $\sigma_z \rightarrow E\varepsilon$. Када нормални напон расте од нуле до неке коначне константне вредности σ_0 тада је зависност дилатације од времена:

$$\varepsilon_z = \frac{\sigma_0}{E} \left(1 - e^{-\frac{E}{\mu} t} \right) \quad (2.3)$$

Са порастом времена $t \rightarrow \infty$, дилатација се асимптотски приближава некој граничној вредности $\varepsilon_z \rightarrow \frac{\sigma_0}{E}$. Овај материјал се слично понаша и при нагом растерећењу. Карактеристично својство вискоеластичног материјала је заостајање промене дилатације за напонам. Ово својство се назива накнадна еластичност или пузање. *Voigt* је направио модел проучавајући феномен пригушења осцилација у кристалима (*Hedrih (Stevanović), 1988*).



Слика П.2. а. *Kelvin-Voigt*-ов модел идеално вискоеластичног тела. б. за идеални еластовискозни флуид σ -напон, ε -дилатација t -време. в. Зависност напона и дилатације од времена за *Kevin-Voigt*-ов модел идеално вискоеластичног тела. г. Зависност напона и дилатације од времена за *Maxwell*-ов модел за идеални еластовискозни флуид преузето из (*Hedrih (Stevanović), 1988*).

Maxwell-ов модел за идеални еластовискозни флуид

Maxwell-ов модел се састоји од серијски везане опруге и пригушнице - клипа са вискозним својствима.

Нормални напон је исти у свим попречним пресецима а резултујућа брзина дилатације је једнака збиру брзина дилатације *Hook*-овог и *Newton*-новог материјала:

$$\dot{\varepsilon}_z = \dot{\varepsilon}_{zH} + \dot{\varepsilon}_{zN} \quad (2.4)$$

Из особине еластичности следи да је

$$\dot{\varepsilon}_{zH} = \frac{1}{E} \dot{\sigma}_z \quad (2.5)$$

Из особине вискозности следи да је

$$\dot{\varepsilon}_{zN} = \frac{1}{\mu} \dot{\sigma}_z \quad (2.6)$$

Резултујућа брзина дилатације за нормално стање напона је:

$$\dot{\varepsilon}_z = \frac{1}{E} \dot{\sigma}_z + \frac{1}{\mu} \dot{\sigma}_z \quad (2.7)$$

Када брзина промене нормалног напона тежи нули $\dot{\sigma}_z \rightarrow 0$ материјал се понаша као вискозни флуид јер је деформација тела расте неограничено без пораста оптерећења. $\dot{\sigma}_z \rightarrow \mu \dot{\varepsilon}_z$ Слика П.2г. При растерећењу материјала еластична деформација изчезава али остаје деформације услед течења материјала (*Hedrih (Stevanović), 1988*).

Када материјал нагло оптеретимо до неке вредности нормалног напона σ_0 материјал се тада еластично деформише по закону $\varepsilon_0 = \sigma_0 / E$ јер због наглог оптерећења у почетном тренутку посматрања материјала течење материјала не долази до изражаја. Ако спречимо развијање деформације уз претпоставку да брзина дилатације тежи нули онда нормални напон одређујемо из услова:

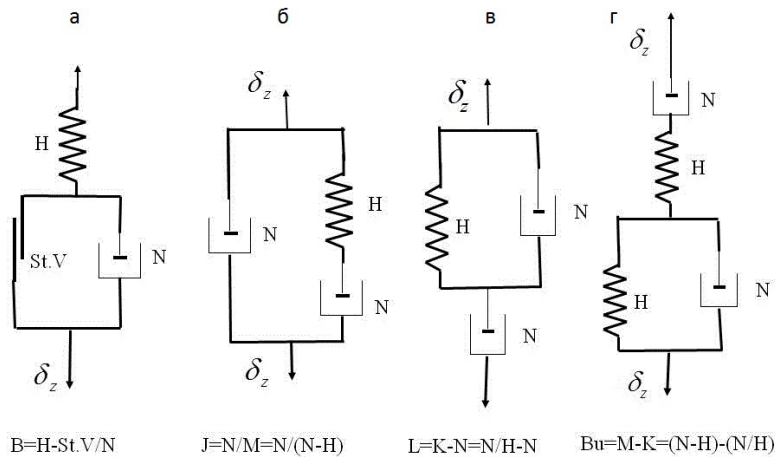
$$\frac{1}{E} \dot{\sigma}_z + \frac{1}{\mu} \sigma_z = 0 \quad (2.8)$$

Па је

$$\sigma_z = \sigma_0 e^{-\frac{E}{\mu} t} \quad (2.9)$$

У овом случају нормални напон опада и асимптотски тежи нули. Слика П.2г доњи график. Појава опадања напона са временом при константној дилатацији назива се релаксација напона.

Комбинацијом *Kelvin-Voigt*-овог и *Maxwell*-овог и/или *Saint Venant*-овог модела могу се добити различити сложени материјали. Неки примери сложених реолошких модела материјала као и конститутивне релације које описују однос напона и деформације дати су на Слици. П.3.



Слика.П.3. а. *Bingham*-ов модел б. *Jeffreys*-ов модел в. *Lethersich*-ов модел г. *Burgers*-ов модел.

Дилатација у *Zener*-овом моделу је једнака збиру дилатација опруге и дилатације *Kelvin-Voigt*-овог модела (Слика П.2.б):

$$\varepsilon = \varepsilon_s + \varepsilon_1 \quad (2.10)$$

дилатација опруге је

$$\varepsilon_s = \frac{\sigma_z}{E_s}, \quad (2.11)$$

дилатација **Kelvin-Voigt**-овог елемента:

$$\varepsilon_1 = \frac{\sigma_z}{E_p + sC_d} \quad (2.12)$$

па је

$$\varepsilon = \frac{\sigma_z}{E_s} + \frac{\sigma_z}{E_p + sC_d} \quad (2.13)$$

Prandtl-ово тело

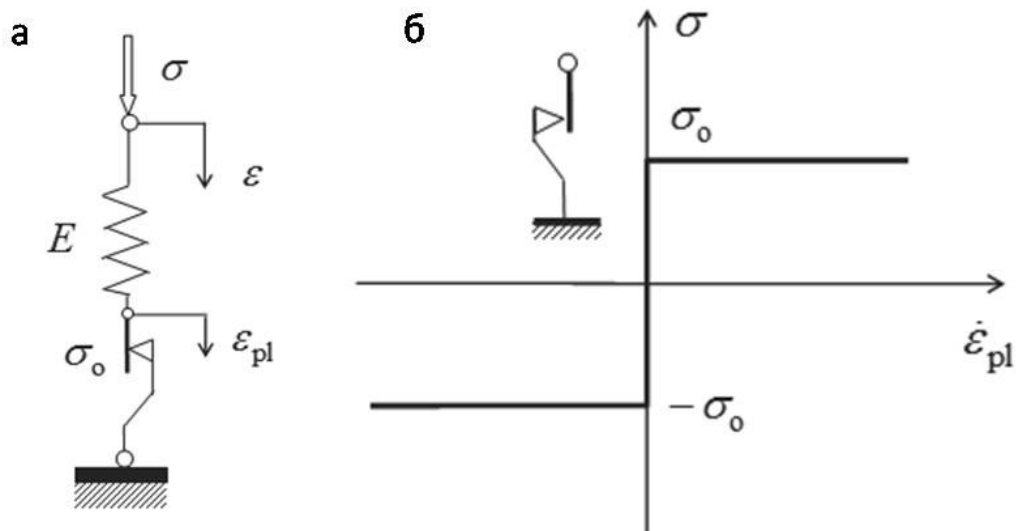
Prandtl-ово тело (Слика П.4.) је реолошки модел којим се описује понашање материјала који има еластична и пластичка својства- материјал који се понаша као *Hooke*-ов идеално еластични материјал све док је нормални напон мањи од напона течења а укупна дилатација се састоји од еластичне ε_{zH} и пластичне дилатације ε_{zS} .

$$\varepsilon_{zH} = \frac{1}{E} \sigma_z \quad \dot{\varepsilon}_{zS} = \lambda \dot{\sigma}_z \quad (2.14)$$

Па је брзина тоталне дилатације:

$$\dot{\varepsilon}_z = \frac{1}{E} \dot{\sigma}_z + \frac{\lambda}{2} \sigma_z \quad (2.15)$$

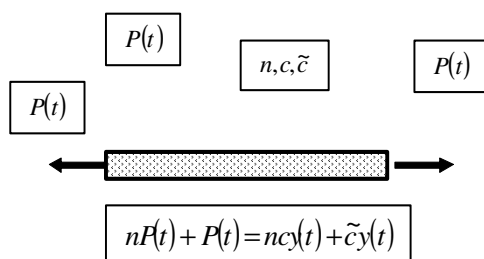
Напон течења и дилатација при којој почиње течење одређују тачку течења.



Слика П.4. а. Реолошки модел за материјал који има еластична и пластична својства-Prandtl-ово тело. б. однос напона и брзине дилатације за једноставан модел Prandtl-овог тела. Преузето из (Grzesikiewicz & Zbiciak, 2012).

Модели материјала са наследним својствима

Наследни елемент, је сачињен од материјала са наследним својствима и представљен у виду хомогеног призматичног штапа. Слика П.5.



Слика П.5. Приказ наследног елемента. Преузето из (Goroško & Hedrih, 2001).

Материјал трпи лонгитудиналне деформације као што су истезање, скраћење и аксијално напрезање услед чега се у материјалу јављају напони односно сила на

крајевима штапа (*Goroško & Hedrih, 2001*). При скраћењу и издужењу у реалности у штапу се јављају лонгитудиналне осцилације. Веза између напона и деформације је задата помоћу функције памћења која узима у обзир кашњење деформације за напоном што се назива ретардација и кашњење напона за деформацијом -својство познато као релаксација напона. Наследни елемент (греда/штап) представља деформабилно континуално тело. Ако је маса тела наследног елемента мала у односу на масе осталих тела у систему у реалним моделима масе наследних тела се могу занемарити (*Goroško & Hedrih, 2001*).

Интегрална конститутивна једначина тела са наследним својствима која описује стање напон-деформација има следећи облик:

$$P(t) = c \left[y(t) - \int_0^t R(t-\tau) y(\tau) d\tau \right] \quad (2.16)$$

чије се језгро

$$R(t-\tau) = \frac{c-\tilde{c}}{nc} e^{-\frac{1}{n}(t-\tau)} \quad (2.17)$$

назива језгром релаксације напона (резолвента) а коефицијент $\beta = \frac{1}{n}$, коефицијент релаксације. Где је $P(t)$ - сила c -, \tilde{c} - коефицијенти крутости при тренутном и дуготрајном дејству сила на наследни елемент $y(t)$ -координате деформације, $(t-\tau)$, τ , n - времена.

Када је издужење стандардног наследног елемента константно $y(t) = y_0 = const$ конститутивна једначина (2.16) описује релаксацију-смањење напона (силе) са временом и тада се назива једначина релаксације (*Goroško & Hedrih, 2001*).

Интегрална једначина ретардације наследног тела изражена по координати деформације $y(t)$:

$$y(t) = \frac{1}{c} \left[P(t) + \int_0^t K(t-\tau) P(\tau) d\tau \right] \quad (2.18)$$

чије се језгро

$$K(t-\tau) = \frac{c-\tilde{c}}{nc} e^{-\frac{\tilde{c}}{nc}(t-\tau)} \quad (2.19)$$

назива језгром пузања/ретардације/реологије, а коефицијенат $\beta_1 = \frac{\tilde{c}}{nc}$ - коефицијентом пузања/ретардације/реологије. При фиксном оптерећењу (сили) $P(t) = P_0 = const$ једначина (2.18) описује издужење у времену стандардног наследног елемента изражено по координати деформације.

Уколико у почетку оптерећења постоје заостале деформације и напони који су повезани са претходном историјом оптерећења уместо једначина (2.16) и (2.18), користе се следеће једначине у интегралном облику:

$$P(t) = c \left[y(t) - \int_{-\infty}^t R(t-\tau)y(\tau)d\tau \right] \quad \text{и} \quad y(t) = \frac{1}{c} \left[P(t) + \int_{-\infty}^t K(t-\tau)P(\tau)d\tau \right] \quad (2.20)$$

у којим се интегралење остварује у границама: $-\infty < \tau < t$. То значи да се урачунава и узима у обзир предисторија напрезања материјала, који меморише шта се дешавало са оптерећивањем и растерећивањем.

Интегрални $\int_{-\infty}^t R(t-\tau)y(\tau)d\tau$ и $\int_{-\infty}^t K(t-\tau)P(\tau)d\tau$ узимају у обзир историју оптерећења наследног елемента (*Goroško & Hedrih, 2001*).

У последњој деценији у литератури се све чешће за моделирање вискоеластичних материјала (нпр *Kelvin-Voigt*-овоф модела) појављују конститутивне релације биоматеријала дефинисане изводима нецелог реда у облику:

$$P(t) = -\{c_0 x(t) + c_\alpha D_t^\alpha [x(t)]\} \quad (2.21)$$

где је $D_t^\alpha[\bullet]$ оператор нецелог реда, α^{th} , $0 < \alpha < 1$, коефицијент нецелог реда (фракционог реда) диференцирања од времена t . c_0 је коефицијент крутости-линеарне еластичности, $c_\alpha = c_0 \tau_\alpha^\sigma$ је коефицијент вискоеластичне крутости-модул пузања, τ_α^σ је време пузања (ретардације) α реалан број и има вредности $0 < \alpha < 1$.

У овим моделима стандардни лаки елемент фракционог реда повезује крута тела (материјалне тачке су апстракције реалних тела која се крећу трансляторно- не ротирају). Диференцијални оператор нецелог реда се тада може написати у облику:

$$D_t^\alpha [x(t)] = \frac{d^\alpha x(t)}{dt^\alpha} = x^{(\alpha)}(t) = \frac{1}{\Gamma(1-\alpha)} \frac{d}{dt} \int_0^t \frac{x(\tau)}{(t-\tau)^\alpha} d\tau \quad (2.12)$$

где су C, C_α коефицијенти крутости – тренутни и дуготрајни а α^{th} реалан број са особином $0 < \alpha < 1$ одређен експериментом ((*Stevanović Hedrih & Hedrih, 2009a, 2009b, Hedrih and (Stevanović) Hedrih, 2014a, 2014b.*

Прилог 2

Квадрати сопствених кружних фреквенција одређени графички помоћу нумеричког алата -

$$\begin{array}{ll}
 x_1 := 8.682 \cdot 10^7 & \text{wr}_1 := 9.318 \cdot 10^9 \\
 x_2 := 2.96 \cdot 10^8 & \text{wr}_2 := 1.72 \cdot 10^{10} \\
 x_3 := 7.33 \cdot 10^8 & \text{wr}_3 := 2.707 \cdot 10^{10} \\
 x_4 := 1.487 \cdot 10^9 & \text{wr}_4 := 3.856 \cdot 10^{10} \\
 x_5 := 1.918 \cdot 10^9 & \text{wr}_5 := 4.379 \cdot 10^{10} \\
 x_6 := 2.511 \cdot 10^9 & \text{wr}_6 := 5.011 \cdot 10^{10} \\
 x_7 := 3.049 \cdot 10^9 & \text{wr}_7 := 5.522 \cdot 10^{10} \\
 x_8 := 4.743 \cdot 10^9 & \text{wr}_8 := 6.887 \cdot 10^{10} \\
 x_9 := 4.833 \cdot 10^9 & \text{wr}_9 := 6.952 \cdot 10^{10} \\
 x_{10} := 4.933 \cdot 10^9 & \text{wr}_{10} := 7.024 \cdot 10^{10} \\
 x_{11} := 5.844 \cdot 10^9 & \text{wr}_{11} := 7.645 \cdot 10^{10}
 \end{array}$$

Матрице кофактора матрица система:

$$K_{111}(x) := \begin{pmatrix}
 c_2 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 c_2 + c_3 - m_2x & -c_3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 -c_3 & c_3 + c_4 - m_3x & -c_4 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & -c_4 & c_4 + c_5 - m_4x & -c_5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & -c_5 & c_5 + c_6 - m_5x & -c_6 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & -c_6 & c_6 + c_7 - m_6x & -c_7 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & -c_7 & c_7 + c_8 - m_7x & -c_8 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_8 & c_8 + c_9 - m_8x & -c_9 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_9 & c_9 + c_{10} - m_9x & -c_{10} & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_{10} & c_{10} + c_{11} - m_{10}x & -c_{11}
 \end{pmatrix}$$

$$K_{112}(x) := \begin{pmatrix}
 c_1 + c_2 - m_1x & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 -c_2 & -c_3 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & c_3 + c_4 - m_3x & -c_4 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & -c_4 & c_4 + c_5 - m_4x & -c_5 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & -c_5 & c_5 + c_6 - m_5x & -c_6 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & -c_6 & c_6 + c_7 - m_6x & -c_7 & 0 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & -c_7 & c_7 + c_8 - m_7x & -c_8 & 0 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_8 & c_8 + c_9 - m_8x & -c_9 & 0 & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_9 & c_9 + c_{10} - m_9x & -c_{10} & 0 \\
 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -c_{10} & c_{10} + c_{11} - m_{10}x & -c_{11}
 \end{pmatrix}$$

Вредности кофактора матрице система:

$K1_1 := -1.074 \cdot 10^{-6}$	$K2_1 := -2.098 \cdot 10^{-6}$	$K3_1 := 2.978 \cdot 10^{-6}$	$K4_1 := -3.519 \cdot 10^{-6}$
$K1_2 := -1.074 \cdot 10^{-6}$	$K2_2 := -1.976 \cdot 10^{-6}$	$K3_2 := 2.416 \cdot 10^{-6}$	$K4_2 := -1.918 \cdot 10^{-6}$
$K1_3 := -1.074 \cdot 10^{-6}$	$K2_3 := -1.72 \cdot 10^{-6}$	$K3_3 := 1.372 \cdot 10^{-6}$	$K4_3 := 2.956 \cdot 10^{-7}$
$K1_4 := -1.074 \cdot 10^{-6}$	$K2_4 := -1.279 \cdot 10^{-6}$	$K3_4 := -1.477 \cdot 10^{-8}$	$K4_4 := 1.279 \cdot 10^{-6}$
$K1_5 := -1.074 \cdot 10^{-6}$	$K2_5 := -1.026 \cdot 10^{-6}$	$K3_5 := -5.723 \cdot 10^{-7}$	$K4_5 := 7.3 \cdot 10^{-7}$
$K1_6 := -1.074 \cdot 10^{-6}$	$K2_6 := -6.792 \cdot 10^{-7}$	$K3_6 := -1.059 \cdot 10^{-6}$	$K4_6 := -6.939 \cdot 10^{-7}$
$K1_7 := -1.074 \cdot 10^{-6}$	$K2_7 := -3.643 \cdot 10^{-7}$	$K3_7 := -1.221 \cdot 10^{-6}$	$K4_7 := -2.08 \cdot 10^{-6}$
$K1_8 := -1.074 \cdot 10^{-6}$	$K2_8 := 6.273 \cdot 10^{-7}$	$K3_8 := 1.426 \cdot 10^{-8}$	$K4_8 := -5.67 \cdot 10^{-7}$
$K1_9 := -1.074 \cdot 10^{-6}$	$K2_9 := 6.8 \cdot 10^{-7}$	$K3_9 := -1.539 \cdot 10^{-7}$	$K4_9 := -1.145 \cdot 10^{-8}$
$K1_{10} := -1.074 \cdot 10^{-6}$	$K2_{10} := 7.385 \cdot 10^{-7}$	$K3_{10} := 3.178 \cdot 10^{-7}$	$K4_{10} := 6.838 \cdot 10^{-7}$
$K1_{11} := -1.074 \cdot 10^{-6}$	$K2_{11} := 1.272 \cdot 10^{-6}$	$K3_{11} := 2.236 \cdot 10^{-6}$	$K4_{11} := 1.141 \cdot 10^{-5}$
$K5_1 := 3.819 \cdot 10^{-6}$	$K6_1 := -3.939 \cdot 10^{-6}$	$K7_1 := 3.789 \cdot 10^{-6}$	
$K5_2 := 9.727 \cdot 10^{-7}$	$K6_2 := 1.296 \cdot 10^{-7}$	$K7_2 := -1.202 \cdot 10^{-6}$	
$K5_3 := -1.793 \cdot 10^{-6}$	$K6_3 := 2.574 \cdot 10^{-6}$	$K7_3 := -1.87 \cdot 10^{-6}$	
$K5_4 := -1.046 \cdot 10^{-6}$	$K6_4 := -3.516 \cdot 10^{-8}$	$K7_4 := 1.075 \cdot 10^{-6}$	
$K5_5 := 2.15 \cdot 10^{-7}$	$K6_5 := -9.354 \cdot 10^{-7}$	$K7_5 := 2.427 \cdot 10^{-7}$	
$K5_6 := 1.075 \cdot 10^{-6}$	$K6_6 := 1.466 \cdot 10^{-8}$	$K7_6 := -1.075 \cdot 10^{-6}$	
$K5_7 := 3.858 \cdot 10^{-7}$	$K6_7 := 1.949 \cdot 10^{-8}$	$K7_7 := 3.967 \cdot 10^{-7}$	
$K5_8 := -9.984 \cdot 10^{-7}$	$K6_8 := -1.585 \cdot 10^{-8}$	$K7_8 := 9.709 \cdot 10^{-7}$	
$K5_9 := -1.746 \cdot 10^{-7}$	$K6_9 := -9.903 \cdot 10^{-8}$	$K7_9 := -4.326 \cdot 10^{-9}$	
$K5_{10} := 9.713 \cdot 10^{-7}$	$K6_{10} := -1.619 \cdot 10^{-8}$	$K7_{10} := -1.002 \cdot 10^{-6}$	
$K5_{11} := 2.745 \cdot 10^{-5}$	$K6_{11} := 2.109 \cdot 10^{-5}$	$K7_{11} := 2.743 \cdot 10^{-5}$	

$$\begin{aligned}
K8_1 &:= -3.46 \cdot 10^{-6} \\
K8_2 &:= 2.08 \cdot 10^{-6} \\
K8_3 &:= 4.182 \cdot 10^{-7} \\
K8_4 &:= -1.244 \cdot 10^{-6} \\
K8_5 &:= 7.035 \cdot 10^{-7} \\
K8_6 &:= 6.651 \cdot 10^{-7} \\
K8_7 &:= -2.084 \cdot 10^{-6} \\
K8_8 &:= 5.827 \cdot 10^{-7} \\
K8_9 &:= 9.629 \cdot 10^{-8} \\
K8_{10} &:= -6.724 \cdot 10^{-7} \\
K8_{11} &:= 1.138 \cdot 10^{-5}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
K9_1 &:= 2.894 \cdot 10^{-6} \\
K9_2 &:= -2.473 \cdot 10^{-6} \\
K9_3 &:= 1.275 \cdot 10^{-6} \\
K9_4 &:= -4.392 \cdot 10^{-8} \\
K9_5 &:= -5.87 \cdot 10^{-7} \\
K9_6 &:= 1.06 \cdot 10^{-6} \\
K9_7 &:= -1.233 \cdot 10^{-6} \\
K9_8 &:= -4.039 \cdot 10^{-8} \\
K9_9 &:= 1.783 \cdot 10^{-7} \\
K9_{10} &:= -2.658 \cdot 10^{-7} \\
K9_{11} &:= 2.19 \cdot 10^{-6}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
K10_1 &:= -1.999 \cdot 10^{-6} \\
K10_2 &:= 1.906 \cdot 10^{-6} \\
K10_3 &:= -1.741 \cdot 10^{-6} \\
K10_4 &:= 1.246 \cdot 10^{-6} \\
K10_5 &:= -1.007 \cdot 10^{-6} \\
K10_6 &:= 7.092 \cdot 10^{-7} \\
K10_7 &:= -3.855 \cdot 10^{-7} \\
K10_8 &:= -4.12 \cdot 10^{-7} \\
K10_9 &:= 6.782 \cdot 10^{-7} \\
K10_{10} &:= -5.172 \cdot 10^{-7} \\
K10_{11} &:= 1.037 \cdot 10^{-6}
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
K11_1 &:= 9.666 \cdot 10^{-7} \\
K11_2 &:= -8.938 \cdot 10^{-7} \\
K11_3 &:= 1.202 \cdot 10^{-6} \\
K11_4 &:= -9.886 \cdot 10^{-7} \\
K11_5 &:= 1.08 \cdot 10^{-6} \\
K11_6 &:= -1.076 \cdot 10^{-6} \\
K11_7 &:= 1.078 \cdot 10^{-6} \\
K11_8 &:= -7.555 \cdot 10^{-7} \\
K11_9 &:= 1.047 \cdot 10^{-6} \\
K11_{10} &:= -7.092 \cdot 10^{-7} \\
K11_{11} &:= 5.09 \cdot 10^{-7}
\end{aligned}$$

Закони осциловања молекула у ланцу по координатама -зависност координата у меридијалном и циркуларном правцу од времена:

$$u_1(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{111s}(xs) \cdot Cs \cdot \cos(ws \cdot t + as)$$

$$v_1(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{111s}(xs) \cdot Cbs \cdot \cos(ws \cdot t + bs)$$

$$u_2(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{112s}(xs) \cdot Cs \cdot \cos(ws \cdot t + as)$$

$$v_2(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{112s}(xs) \cdot Cbs \cdot \cos(ws \cdot t + bs)$$

$$u_3(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{113s}(xs) \cdot Cs \cdot \cos(ws \cdot t + as)$$

$$v_3(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{113s}(xs) \cdot Cbs \cdot \cos(ws \cdot t + bs)$$

$$u_4(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{114s}(xs) \cdot Cs \cdot \cos(ws \cdot t + as)$$

$$v_4(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{114s}(xs) \cdot Cbs \cdot \cos(ws \cdot t + bs)$$

$$u_5(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{115s}(xs) \cdot Cs \cdot \cos(ws \cdot t + as)$$

$$v_5(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{115s}(xs) \cdot Cbs \cdot \cos(ws \cdot t + bs)$$

$$u_6(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{116s}(xs) \cdot Cs \cdot \cos(ws \cdot t + as)$$

$$v_6(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{116s}(xs) \cdot Cbs \cdot \cos(ws \cdot t + bs)$$

$$u_7(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{117s}(xs) \cdot Cs \cdot \cos(ws \cdot t + as)$$

$$v_7(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{117s}(xs) \cdot Cbs \cdot \cos(ws \cdot t + bs)$$

$$u_8(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{118s}(xs) \cdot Cs \cdot \cos(ws \cdot t + as)$$

$$v_8(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{118s}(xs) \cdot Cbs \cdot \cos(ws \cdot t + bs)$$

$$u_9(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{119s}(xs) \cdot Cs \cdot \cos(ws \cdot t + as)$$

$$v_9(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{119s}(xs) \cdot Cbs \cdot \cos(ws \cdot t + bs)$$

$$u_{10}(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{110s}(xs) \cdot Cs \cdot \cos(ws \cdot t + as)$$

$$v_{10}(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{110s}(xs) \cdot Cbs \cdot \cos(ws \cdot t + bs)$$

$$u_{11}(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{111s}(xs) \cdot Cs \cdot \cos(ws \cdot t + as)$$

$$v_{11}(t) := \sum_{s=1}^{11} K_{111s}(xs) \cdot Cbs \cdot \cos(ws \cdot t + bs)$$

Интеграционе константе закона сопственог осциловања материјалних тачака у ланцима за задате почетне услове:

$$\begin{aligned}
 C1_1 &:= -0.025 \cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1) & D1_1 &:= -0.025 \cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1) \\
 C1_2 &:= -0.031 \cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1) & D1_2 &:= -0.031 \cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1) \\
 C1_3 &:= 1.099 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)) & D1_3 &:= 1.099 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)) \\
 C1_4 &:= 1.649 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)) & D1_4 &:= 1.649 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)) \\
 C1_5 &:= -1.452 \cdot 10^{-3} \cdot \cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1) & D1_5 &:= -1.452 \cdot 10^{-3} \cdot \cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1) \\
 C1_6 &:= 1.269 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)) & D1_6 &:= 1.269 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)) \\
 C1_7 &:= -1.151 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)) & D1_7 &:= -1.151 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)) \\
 C1_8 &:= 9.231 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)) & D1_8 &:= 9.231 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)) \\
 C1_9 &:= -9.144 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)) & D1_9 &:= -9.144 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)) \\
 C1_{10} &:= 9.051 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)) & D1_{10} &:= 9.051 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)) \\
 C1_{11} &:= -8.316 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)) & D1_{11} &:= -8.316 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1))
 \end{aligned}$$

Почетни услови:

V је почетна брзина материјалне тачке (молекула) у почетном тренутку коју је добила услед удара сперматозоида у исту.

V JE BRZINA MATERIJALNE TACKE U KOJU JE UDARIO SPERMATOOID

Vsp je brzina spermatozooida hiperaktivisanih izrazena u m/s

Msp je masa spermatozooida u kg

$$m_3 := 332.1080 \cdot 10^{-24}$$

$$V_{sp} := 171.1 \cdot 10^{-6}$$

$$M_{sp} := 10^{-14}$$

$$V = 5,152 \cdot 10^3 \text{ m/s}$$

Матрице детерминанти система и кофактора система које су потребе за одређивање интеграционих константи за изабране почетне услове, одређивање интеграционих константи C_s и α_s , $s = 1, 2, 3, \dots, 11$ и цртање закона сопственог осциловања молекула у ланцу, у репрезентативном узорку сферне ZP мреже, као и *Lissajus*-ових кривих:

$$\Delta g_1 := \begin{pmatrix} w_2 \cdot K_{1_2} & w_3 \cdot K_{1_3} & w_4 \cdot K_{1_4} & w_5 \cdot K_{1_5} & w_6 \cdot K_{1_6} & w_7 \cdot K_{1_7} & w_8 \cdot K_{1_8} & w_9 \cdot K_{1_9} & w_{10} \cdot K_{1_{10}} & w_{11} \cdot K_{1_{11}} \\ w_2 \cdot K_{2_2} & w_3 \cdot K_{2_3} & w_4 \cdot K_{2_4} & w_5 \cdot K_{2_5} & w_6 \cdot K_{2_6} & w_7 \cdot K_{2_7} & w_8 \cdot K_{2_8} & w_9 \cdot K_{2_9} & w_{10} \cdot K_{2_{10}} & w_{11} \cdot K_{2_{11}} \\ w_2 \cdot K_{3_2} & w_3 \cdot K_{3_3} & w_4 \cdot K_{3_4} & w_5 \cdot K_{3_5} & w_6 \cdot K_{3_6} & w_7 \cdot K_{3_7} & w_8 \cdot K_{3_8} & w_9 \cdot K_{3_9} & w_{10} \cdot K_{3_{10}} & w_{11} \cdot K_{3_{11}} \\ w_2 \cdot K_{4_2} & w_3 \cdot K_{4_3} & w_4 \cdot K_{4_4} & w_5 \cdot K_{4_5} & w_6 \cdot K_{4_6} & w_7 \cdot K_{4_7} & w_8 \cdot K_{4_8} & w_9 \cdot K_{4_9} & w_{10} \cdot K_{4_{10}} & w_{11} \cdot K_{4_{11}} \\ w_2 \cdot K_{5_2} & w_3 \cdot K_{5_3} & w_4 \cdot K_{5_4} & w_5 \cdot K_{5_5} & w_6 \cdot K_{5_6} & w_7 \cdot K_{5_7} & w_8 \cdot K_{5_8} & w_9 \cdot K_{5_9} & w_{10} \cdot K_{5_{10}} & w_{11} \cdot K_{5_{11}} \\ w_2 \cdot K_{6_2} & w_3 \cdot K_{6_3} & w_4 \cdot K_{6_4} & w_5 \cdot K_{6_5} & w_6 \cdot K_{6_6} & w_7 \cdot K_{6_7} & w_8 \cdot K_{6_8} & w_9 \cdot K_{6_9} & w_{10} \cdot K_{6_{10}} & w_{11} \cdot K_{6_{11}} \\ w_2 \cdot K_{7_2} & w_3 \cdot K_{7_3} & w_4 \cdot K_{7_4} & w_5 \cdot K_{7_5} & w_6 \cdot K_{7_6} & w_7 \cdot K_{7_7} & w_8 \cdot K_{7_8} & w_9 \cdot K_{7_9} & w_{10} \cdot K_{7_{10}} & w_{11} \cdot K_{7_{11}} \\ w_2 \cdot K_{8_2} & w_3 \cdot K_{8_3} & w_4 \cdot K_{8_4} & w_5 \cdot K_{8_5} & w_6 \cdot K_{8_6} & w_7 \cdot K_{8_7} & w_8 \cdot K_{8_8} & w_9 \cdot K_{8_9} & w_{10} \cdot K_{8_{10}} & w_{11} \cdot K_{8_{11}} \\ w_2 \cdot K_{9_2} & w_3 \cdot K_{9_3} & w_4 \cdot K_{9_4} & w_5 \cdot K_{9_5} & w_6 \cdot K_{9_6} & w_7 \cdot K_{9_7} & w_8 \cdot K_{9_8} & w_9 \cdot K_{9_9} & w_{10} \cdot K_{9_{10}} & w_{11} \cdot K_{9_{11}} \\ w_2 \cdot K_{10_2} & w_3 \cdot K_{10_3} & w_4 \cdot K_{10_4} & w_5 \cdot K_{10_5} & w_6 \cdot K_{10_6} & w_7 \cdot K_{10_7} & w_8 \cdot K_{10_8} & w_9 \cdot K_{10_9} & w_{10} \cdot K_{10_{10}} & w_{11} \cdot K_{10_{11}} \end{pmatrix}$$

$$\Delta g_2 := \begin{pmatrix} w_1 \cdot K_{1_1} & w_3 \cdot K_{1_3} & w_4 \cdot K_{1_4} & w_5 \cdot K_{1_5} & w_6 \cdot K_{1_6} & w_7 \cdot K_{1_7} & w_8 \cdot K_{1_8} & w_9 \cdot K_{1_9} & w_{10} \cdot K_{1_{10}} & w_{11} \cdot K_{1_{11}} \\ w_1 \cdot K_{2_1} & w_3 \cdot K_{2_3} & w_4 \cdot K_{2_4} & w_5 \cdot K_{2_5} & w_6 \cdot K_{2_6} & w_7 \cdot K_{2_7} & w_8 \cdot K_{2_8} & w_9 \cdot K_{2_9} & w_{10} \cdot K_{2_{10}} & w_{11} \cdot K_{2_{11}} \\ w_1 \cdot K_{3_1} & w_3 \cdot K_{3_3} & w_4 \cdot K_{3_4} & w_5 \cdot K_{3_5} & w_6 \cdot K_{3_6} & w_7 \cdot K_{3_7} & w_8 \cdot K_{3_8} & w_9 \cdot K_{3_9} & w_{10} \cdot K_{3_{10}} & w_{11} \cdot K_{3_{11}} \\ w_1 \cdot K_{4_1} & w_3 \cdot K_{4_3} & w_4 \cdot K_{4_4} & w_5 \cdot K_{4_5} & w_6 \cdot K_{4_6} & w_7 \cdot K_{4_7} & w_8 \cdot K_{4_8} & w_9 \cdot K_{4_9} & w_{10} \cdot K_{4_{10}} & w_{11} \cdot K_{4_{11}} \\ w_1 \cdot K_{5_1} & w_3 \cdot K_{5_3} & w_4 \cdot K_{5_4} & w_5 \cdot K_{5_5} & w_6 \cdot K_{5_6} & w_7 \cdot K_{5_7} & w_8 \cdot K_{5_8} & w_9 \cdot K_{5_9} & w_{10} \cdot K_{5_{10}} & w_{11} \cdot K_{5_{11}} \\ w_1 \cdot K_{6_1} & w_3 \cdot K_{6_3} & w_4 \cdot K_{6_4} & w_5 \cdot K_{6_5} & w_6 \cdot K_{6_6} & w_7 \cdot K_{6_7} & w_8 \cdot K_{6_8} & w_9 \cdot K_{6_9} & w_{10} \cdot K_{6_{10}} & w_{11} \cdot K_{6_{11}} \\ w_1 \cdot K_{7_1} & w_3 \cdot K_{7_3} & w_4 \cdot K_{7_4} & w_5 \cdot K_{7_5} & w_6 \cdot K_{7_6} & w_7 \cdot K_{7_7} & w_8 \cdot K_{7_8} & w_9 \cdot K_{7_9} & w_{10} \cdot K_{7_{10}} & w_{11} \cdot K_{7_{11}} \\ w_1 \cdot K_{8_1} & w_3 \cdot K_{8_3} & w_4 \cdot K_{8_4} & w_5 \cdot K_{8_5} & w_6 \cdot K_{8_6} & w_7 \cdot K_{8_7} & w_8 \cdot K_{8_8} & w_9 \cdot K_{8_9} & w_{10} \cdot K_{8_{10}} & w_{11} \cdot K_{8_{11}} \\ w_1 \cdot K_{9_1} & w_3 \cdot K_{9_3} & w_4 \cdot K_{9_4} & w_5 \cdot K_{9_5} & w_6 \cdot K_{9_6} & w_7 \cdot K_{9_7} & w_8 \cdot K_{9_8} & w_9 \cdot K_{9_9} & w_{10} \cdot K_{9_{10}} & w_{11} \cdot K_{9_{11}} \\ w_1 \cdot K_{10_1} & w_3 \cdot K_{10_3} & w_4 \cdot K_{10_4} & w_5 \cdot K_{10_5} & w_6 \cdot K_{10_6} & w_7 \cdot K_{10_7} & w_8 \cdot K_{10_8} & w_9 \cdot K_{10_9} & w_{10} \cdot K_{10_{10}} & w_{11} \cdot K_{10_{11}} \end{pmatrix}$$

Детерминанта система алгебарских једначина по непознатим интеграционим константама:

$$\Delta := w_1 \cdot K1_1 | \Delta_{e1} | - w_2 \cdot K1_2 | \Delta_{e2} | + w_3 \cdot K1_3 | \Delta_{e3} | - w_4 \cdot K1_4 | \Delta_{e4} | + w_5 \cdot K1_5 | \Delta_{e5} | - w_6 \cdot K1_6 | \Delta_{e6} | + w_7 \cdot K1_7 | \Delta_{e7} | - w_8 \cdot K1_8 | \Delta_{e8} | + w_9 \cdot K1_9 | \Delta_{e9} | - w_{10} \cdot K1_{10} | \Delta_{e10} | + w_{11} \cdot K1_{11} | \Delta_{e11} |$$

$$L := \left[\sum_{s=1}^{11} (-1)^{1+s} (w_s \cdot K1_s | \Delta_{es} |) \right]$$

Матрице детерминанти за одређивање непознатих интеграционих константи на основу задатих почетних услова- удар сперматозоида у 3. -чворни молекул:

$$\Delta_1 := \begin{pmatrix} w_2 \cdot K1_2 & w_3 \cdot K1_3 & w_4 \cdot K1_4 & w_5 \cdot K1_5 & w_6 \cdot K1_6 & w_7 \cdot K1_7 & w_8 \cdot K1_8 & w_9 \cdot K1_9 & w_{10} \cdot K1_{10} & w_{11} \cdot K1_{11} \\ w_2 \cdot K2_2 & w_3 \cdot K2_3 & w_4 \cdot K2_4 & w_5 \cdot K2_5 & w_6 \cdot K2_6 & w_7 \cdot K2_7 & w_8 \cdot K2_8 & w_9 \cdot K3_9 & w_{10} \cdot K2_{10} & w_{11} \cdot K2_{11} \\ w_2 \cdot K4_2 & w_3 \cdot K4_3 & w_4 \cdot K4_4 & w_5 \cdot K4_5 & w_6 \cdot K4_6 & w_7 \cdot K4_7 & w_8 \cdot K4_8 & w_9 \cdot K4_9 & w_{10} \cdot K4_{10} & w_{11} \cdot K4_{11} \\ w_2 \cdot K5_2 & w_3 \cdot K5_3 & w_4 \cdot K5_4 & w_5 \cdot K5_5 & w_6 \cdot K5_6 & w_7 \cdot K5_7 & w_8 \cdot K5_8 & w_9 \cdot K5_9 & w_{10} \cdot K5_{10} & w_{11} \cdot K5_{11} \\ w_2 \cdot K6_2 & w_3 \cdot K6_3 & w_4 \cdot K6_4 & w_5 \cdot K6_5 & w_6 \cdot K6_6 & w_7 \cdot K6_7 & w_8 \cdot K6_8 & w_9 \cdot K6_9 & w_{10} \cdot K6_{10} & w_{11} \cdot K6_{11} \\ w_2 \cdot K7_2 & w_3 \cdot K7_3 & w_4 \cdot K7_4 & w_5 \cdot K7_5 & w_6 \cdot K7_6 & w_7 \cdot K7_7 & w_8 \cdot K7_8 & w_9 \cdot K7_9 & w_{10} \cdot K7_{10} & w_{11} \cdot K7_{11} \\ w_2 \cdot K8_2 & w_3 \cdot K8_3 & w_4 \cdot K8_4 & w_5 \cdot K8_5 & w_6 \cdot K8_6 & w_7 \cdot K8_7 & w_8 \cdot K8_8 & w_9 \cdot K8_9 & w_{10} \cdot K8_{10} & w_{11} \cdot K8_{11} \\ w_2 \cdot K9_2 & w_3 \cdot K9_3 & w_4 \cdot K9_4 & w_5 \cdot K9_5 & w_6 \cdot K9_6 & w_7 \cdot K9_7 & w_8 \cdot K9_8 & w_9 \cdot K9_9 & w_{10} \cdot K9_{10} & w_{11} \cdot K9_{11} \\ w_2 \cdot K10_2 & w_3 \cdot K10_3 & w_4 \cdot K10_4 & w_5 \cdot K10_5 & w_6 \cdot K10_6 & w_7 \cdot K10_7 & w_8 \cdot K10_8 & w_9 \cdot K10_9 & w_{10} \cdot K10_{10} & w_{11} \cdot K10_{11} \\ w_2 \cdot K11_2 & w_3 \cdot K11_3 & w_4 \cdot K11_4 & w_5 \cdot K11_5 & w_6 \cdot K11_6 & w_7 \cdot K11_7 & w_8 \cdot K11_8 & w_9 \cdot K11_9 & w_{10} \cdot K11_{10} & w_{11} \cdot K11_{11} \end{pmatrix}$$

$$\Delta_2 := \begin{pmatrix} w_1 \cdot K1_1 & w_3 \cdot K1_3 & w_4 \cdot K1_4 & w_5 \cdot K1_5 & w_6 \cdot K1_6 & w_7 \cdot K1_7 & w_8 \cdot K1_8 & w_9 \cdot K1_9 & w_{10} \cdot K1_{10} & w_{11} \cdot K1_{11} \\ w_1 \cdot K2_1 & w_3 \cdot K2_3 & w_4 \cdot K2_4 & w_5 \cdot K2_5 & w_6 \cdot K2_6 & w_7 \cdot K2_7 & w_8 \cdot K2_8 & w_9 \cdot K2_9 & w_{10} \cdot K2_{10} & w_{11} \cdot K2_{11} \\ w_1 \cdot K4_1 & w_3 \cdot K4_3 & w_4 \cdot K4_4 & w_5 \cdot K4_5 & w_6 \cdot K4_6 & w_7 \cdot K4_7 & w_8 \cdot K4_8 & w_9 \cdot K4_9 & w_{10} \cdot K4_{10} & w_{11} \cdot K4_{11} \\ w_1 \cdot K5_1 & w_3 \cdot K5_3 & w_4 \cdot K5_4 & w_5 \cdot K5_5 & w_6 \cdot K5_6 & w_7 \cdot K5_7 & w_8 \cdot K5_8 & w_9 \cdot K5_9 & w_{10} \cdot K5_{10} & w_{11} \cdot K5_{11} \\ w_1 \cdot K6_1 & w_3 \cdot K6_3 & w_4 \cdot K6_4 & w_5 \cdot K6_5 & w_6 \cdot K6_6 & w_7 \cdot K6_7 & w_8 \cdot K6_8 & w_9 \cdot K6_9 & w_{10} \cdot K6_{10} & w_{11} \cdot K6_{11} \\ w_1 \cdot K7_1 & w_3 \cdot K7_3 & w_4 \cdot K7_4 & w_5 \cdot K7_5 & w_6 \cdot K7_6 & w_7 \cdot K7_7 & w_8 \cdot K7_8 & w_9 \cdot K7_9 & w_{10} \cdot K7_{10} & w_{11} \cdot K7_{11} \\ w_1 \cdot K8_1 & w_3 \cdot K8_3 & w_4 \cdot K8_4 & w_5 \cdot K8_5 & w_6 \cdot K8_6 & w_7 \cdot K8_7 & w_8 \cdot K8_8 & w_9 \cdot K8_9 & w_{10} \cdot K8_{10} & w_{11} \cdot K8_{11} \\ w_1 \cdot K9_1 & w_3 \cdot K9_3 & w_4 \cdot K9_4 & w_5 \cdot K9_5 & w_6 \cdot K9_6 & w_7 \cdot K9_7 & w_8 \cdot K9_8 & w_9 \cdot K9_9 & w_{10} \cdot K9_{10} & w_{11} \cdot K9_{11} \\ w_1 \cdot K10_1 & w_3 \cdot K10_3 & w_4 \cdot K10_4 & w_5 \cdot K10_5 & w_6 \cdot K10_6 & w_7 \cdot K10_7 & w_8 \cdot K10_8 & w_9 \cdot K10_9 & w_{10} \cdot K10_{10} & w_{11} \cdot K10_{11} \\ w_1 \cdot K11_1 & w_3 \cdot K11_3 & w_4 \cdot K11_4 & w_5 \cdot K11_5 & w_6 \cdot K11_6 & w_7 \cdot K11_7 & w_8 \cdot K11_8 & w_9 \cdot K11_9 & w_{10} \cdot K11_{10} & w_{11} \cdot K11_{11} \end{pmatrix}$$

$$\begin{aligned}
C_1 &:= (-V \div L) \cdot |\Delta_1| & C_1 &= -0.025 \\
C_2 &:= (V \div L) \cdot |\Delta_2| & C_2 &= -0.03 \\
C_3 &:= (-V \div L) \cdot |\Delta_3| & C_3 &= -1.108 \times 10^{-3} \\
C_4 &:= V \div L \cdot |\Delta_4| & C_4 &= 1.716 \times 10^{-3} \\
C_5 &:= -V \div L \cdot |\Delta_5| & C_5 &= -1.511 \times 10^{-3} \\
C_6 &:= V \div L \cdot |\Delta_6| & C_6 &= 1.321 \times 10^{-3} \\
C_7 &:= -V \div L \cdot |\Delta_7| & C_7 &= -1.198 \times 10^{-3} \\
C_8 &:= V \div L \cdot |\Delta_8| & C_8 &= 9.608 \times 10^{-4} \\
C_9 &:= -V \div L \cdot |\Delta_9| & C_9 &= -9.518 \times 10^{-4} \\
C_{10} &:= V \div L \cdot |\Delta_{10}| & C_{10} &= 9.421 \times 10^{-4} \\
C_{11} &:= -V \div L \cdot |\Delta_{11}| & C_{11} &= -8.656 \times 10^{-4}
\end{aligned}$$

Пример за 4 хиперактивисана сперматозооида која делују на 4 различите чворне тачке под углом $\pi/4$:

Интеграционе константе за одређивање амплитуда и померања молекула услед дејства једног сперматозооида на 1. чворни молекул брзином V_1 :

$$\begin{aligned}\gamma_1 &:= \pi \div 4 \\ \theta_1 &:= \pi \div 4\end{aligned}$$

$$V_{mer} := V \cdot \cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)$$

$$V_{vir} := V \cdot \cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)$$

$$V_{rad} := V \cdot \sin(\gamma_1)$$

$$K3_1 := 2.978 \cdot 10^{-6}$$

$$K3_2 := 2.416 \cdot 10^{-6}$$

$$K3_3 := 1.372 \cdot 10^{-6}$$

$$K3_4 := -1.477 \cdot 10^{-8}$$

$$K3_5 := -5.723 \cdot 10^{-7}$$

$$K3_6 := -1.059 \cdot 10^{-6}$$

$$K3_7 := -1.221 \cdot 10^{-6}$$

$$K3_8 := 1.426 \cdot 10^{-8}$$

$$K3_9 := -1.539 \cdot 10^{-7}$$

$$K3_{10} := 3.178 \cdot 10^{-7}$$

$$K3_{11} := 2.236 \cdot 10^{-6}$$

$$K9_1 := 2.894 \cdot 10^{-6}$$

$$K9_2 := -2.473 \cdot 10^{-6}$$

$$K9_3 := 1.275 \cdot 10^{-6}$$

$$K9_4 := -4.392 \cdot 10^{-8}$$

$$K9_5 := -5.87 \cdot 10^{-7}$$

$$K9_6 := 1.06 \cdot 10^{-6}$$

$$K9_7 := -1.233 \cdot 10^{-6}$$

$$K9_8 := -4.039 \cdot 10^{-8}$$

$$K9_9 := 1.783 \cdot 10^{-7}$$

$$K9_{10} := -2.658 \cdot 10^{-7}$$

$$K9_{11} := 2.19 \cdot 10^{-6}$$

$$\alpha_1 := \pi \div 2$$

$$\alpha_2 := \pi \div 2$$

$$\alpha_3 := \pi \div 2$$

$$\alpha_4 := \pi \div 2$$

$$\alpha_5 := \pi \div 2$$

$$\alpha_6 := \pi \div 2$$

$$\alpha_7 := \pi \div 2$$

$$\alpha_8 := \pi \div 2$$

$$\alpha_9 := \pi \div 2$$

$$\alpha_{10} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{11} := \pi \div 2$$

$$\beta_1 := \pi \div 2$$

$$\beta_2 := \pi \div 2$$

$$\beta_3 := \pi \div 2$$

$$\beta_4 := \pi \div 2$$

$$\beta_5 := \pi \div 2$$

$$\beta_6 := \pi \div 2$$

$$\beta_7 := \pi \div 2$$

$$\beta_8 := \pi \div 2$$

$$\beta_9 := \pi \div 2$$

$$\beta_{10} := \pi \div 2$$

$$\beta_{11} := \pi \div 2$$

$$wr_1 := 9.318 \cdot 10^9$$

$$wr_2 := 1.72 \cdot 10^{10}$$

$$wr_3 := 2.707 \cdot 10^{10}$$

$$wr_4 := 3.856 \cdot 10^{10}$$

$$wr_5 := 4.379 \cdot 10^{10}$$

$$wr_6 := 5.011 \cdot 10^{10}$$

$$wr_7 := 5.522 \cdot 10^{10}$$

$$wr_8 := 6.887 \cdot 10^{10}$$

$$wr_9 := 6.952 \cdot 10^{10}$$

$$wr_{10} := 7.024 \cdot 10^{10}$$

$$wr_{11} := 7.645 \cdot 10^{10}$$

$$\begin{aligned}
C1_1 &:= -0.025 \cdot \cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1) \\
C1_2 &:= -0.031 \cdot \cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1) \\
C1_3 &:= 1.099 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)) \\
C1_4 &:= 1.649 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)) \\
C1_5 &:= -1.452 \cdot 10^{-3} \cdot \cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1) \\
C1_6 &:= 1.269 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)) \\
C1_7 &:= -1.151 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)) \\
C1_8 &:= 9.231 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)) \\
C1_9 &:= -9.144 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)) \\
C1_{10} &:= 9.051 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1)) \\
C1_{11} &:= -8.316 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \cos(\theta_1))
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
C1_1 &= -0.013 & \alpha_{11} &:= \pi + 2 \\
C1_2 &= -0.016 & \alpha_{12} &:= \pi + 2 \\
C1_3 &= 5.495 \times 10^{-4} & \alpha_{13} &:= \pi + 2 \\
C1_4 &= 8.245 \times 10^{-4} & \alpha_{14} &:= \pi + 2 \\
C1_5 &= -7.26 \times 10^{-4} & \alpha_{15} &:= \pi + 2 \\
C1_6 &= 6.345 \times 10^{-4} & \alpha_{16} &:= \pi + 2 \\
C1_7 &= -5.755 \times 10^{-4} & \alpha_{17} &:= \pi + 2 \\
C1_8 &= 4.616 \times 10^{-4} & \alpha_{18} &:= \pi + 2 \\
C1_9 &= -4.572 \times 10^{-4} & \alpha_{19} &:= \pi + 2 \\
C1_{10} &= 4.526 \times 10^{-4} & \alpha_{110} &:= \pi + 2 \\
C1_{11} &= -4.158 \times 10^{-4} & \alpha_{111} &:= \pi + 2
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
D1_1 &:= -0.025 \cdot \cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1) \\
D1_2 &:= -0.031 \cdot \cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1) \\
D1_3 &:= 1.099 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)) \\
D1_4 &:= 1.649 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)) \\
D1_5 &:= -1.452 \cdot 10^{-3} \cdot \cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1) \\
D1_6 &:= 1.269 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)) \\
D1_7 &:= -1.151 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)) \\
D1_8 &:= 9.231 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)) \\
D1_9 &:= -9.144 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)) \\
D1_{10} &:= 9.051 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)) \\
D1_{11} &:= -8.316 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1))
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
D1_1 &= -0.013 & \beta_{11} &:= \pi + 2 \\
D1_2 &= -0.016 & \beta_{12} &:= \pi + 2 \\
D1_3 &= 5.495 \times 10^{-4} & \beta_{13} &:= \pi + 2 \\
D1_4 &= 8.245 \times 10^{-4} & \beta_{14} &:= \pi + 2 \\
D1_5 &= -7.26 \times 10^{-4} & \beta_{15} &:= \pi + 2 \\
D1_6 &= 6.345 \times 10^{-4} & \beta_{16} &:= \pi + 2 \\
D1_7 &= -5.755 \times 10^{-4} & \beta_{17} &:= \pi + 2 \\
D1_8 &= 4.615 \times 10^{-4} & \beta_{18} &:= \pi + 2 \\
D1_9 &= -4.572 \times 10^{-4} & \beta_{19} &:= \pi + 2 \\
D1_{10} &= 4.526 \times 10^{-4} & \beta_{110} &:= \pi + 2 \\
D1_{11} &= -4.158 \times 10^{-4} & \beta_{111} &:= \pi + 2
\end{aligned}$$

Интеграционе константе за одређивање амплитуда и померања молекула услед дејства једног сперматозоида на 2. чворни молекул брзином

$$D1_2 := -0.031 \cdot \cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)$$

$$D1_3 := 1.099 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1))$$

$$D1_4 := 1.649 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1))$$

$$D1_5 := -1.452 \cdot 10^{-3} \cdot \cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1)$$

$$D1_6 := 1.269 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1))$$

$$D1_7 := -1.151 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1))$$

$$D1_8 := 9.231 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1))$$

$$D1_9 := -9.144 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1))$$

$$D1_{10} := 9.051 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1))$$

$$D1_{11} := -8.316 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_1))$$

integracione konstante za odredjivanje amplituda i pomeranja taèaka u prvom i drugom lancu usled dejstva drugog spermatozoida u drugu cvornu tacku brzinom v2.

$$\gamma_2 := \pi \div 4$$

$$\theta_2 := \pi \div 4$$

$$V_{rad} := V \cdot \sin(\gamma_2)$$

$$V_{mer} := V \cdot \cos(\gamma_2) \cdot \cos(\theta_2)$$

$$V_{cir} := V \cdot \cos(\gamma_2) \cdot \sin(\theta_2)$$

$$C2_1 := -0.025 \cdot \cos(\gamma_2) \cdot \cos(\theta_2)$$

$$C2_2 := -0.031 \cdot \cos(\gamma_2) \cdot \cos(\theta_2)$$

$$C2_3 := 1.099 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_2) \cdot \cos(\theta_2))$$

$$C2_4 := 1.649 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_2) \cdot \cos(\theta_2))$$

$$C2_5 := -1.452 \cdot 10^{-3} \cdot \cos(\gamma_2) \cdot \cos(\theta_2)$$

$$C2_6 := 1.269 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_2) \cdot \cos(\theta_2))$$

$$C2_7 := -1.151 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_2) \cdot \cos(\theta_2))$$

$$C2_8 := 9.231 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_2) \cdot \cos(\theta_2))$$

$$C2_9 := -9.144 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_2) \cdot \cos(\theta_2))$$

$$C2_{10} := 9.051 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_2) \cdot \cos(\theta_2))$$

$$C2_{11} := -8.316 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_2) \cdot \cos(\theta_2))$$

$$\alpha_{11} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{12} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{13} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{14} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{15} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{16} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{17} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{18} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{19} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{110} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{111} := \pi \div 2$$

Интеграционе константе за одређивање амплитуда и померања молекула услед дејства једног сперматозооида на 3. чворни молекул брзином V_3 :

$$\gamma_3 := \pi \div 4$$

$$\theta_3 := \pi \div 4$$

$$V_{rad} := V \cdot \sin(\gamma_3)$$

$$V_{mer} := V \cdot \cos(\gamma_3) \cdot \cos(\theta_3)$$

$$V_{cir} := V \cdot \cos(\gamma_3) \cdot \sin(\theta_3)$$

$$C3_1 := -0.025 \cdot \cos(\gamma_3) \cdot \cos(\theta_3)$$

$$C3_2 := -0.031 \cdot \cos(\gamma_3) \cdot \cos(\theta_3)$$

$$C3_3 := 1.099 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \cos(\theta_3))$$

$$C3_4 := 1.649 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \cos(\theta_3))$$

$$C3_5 := -1.452 \cdot 10^{-3} \cdot \cos(\gamma_3) \cdot \cos(\theta_3)$$

$$C3_6 := 1.269 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \cos(\theta_3))$$

$$C3_7 := -1.151 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \cos(\theta_3))$$

$$C3_8 := -9.144 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \cos(\theta_3))$$

$$C3_9 := -9.144 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \cos(\theta_3))$$

$$C3_{10} := 9.051 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \cos(\theta_3))$$

$$C3_{11} := -8.316 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \cos(\theta_3))$$

$$\alpha_{11} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{12} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{13} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{14} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{15} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{16} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{17} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{18} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{19} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{110} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{111} := \pi \div 2$$

$$D3_1 := -0.025 \cdot \cos(\gamma_3) \cdot \sin(\theta_3)$$

$$D3_2 := -0.031 \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \sin(\theta_3))$$

$$D3_3 := 1.099 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \sin(\theta_3))$$

$$D3_4 := 1.649 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \sin(\theta_3))$$

$$D3_5 := -1.452 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \sin(\theta_3))$$

$$D3_6 := 1.269 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \sin(\theta_3))$$

$$D3_7 := -1.151 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \sin(\theta_3))$$

$$D3_8 := 9.231 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \sin(\theta_3))$$

$$D3_9 := -9.144 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \sin(\theta_3))$$

$$D3_{10} := 9.051 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \sin(\theta_3))$$

$$D3_{11} := -8.316 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_3) \cdot \sin(\theta_3))$$

$$\beta_{11} := \pi \div 2$$

$$\beta_{12} := \pi \div 2$$

$$\beta_{13} := \pi \div 2$$

$$\beta_{14} := \pi \div 2$$

$$\beta_{15} := \pi \div 2$$

$$\beta_{16} := \pi \div 2$$

$$\beta_{17} := \pi \div 2$$

$$\beta_{18} := \pi \div 2$$

$$\beta_{19} := \pi \div 2$$

$$\beta_{110} := \pi \div 2$$

$$\beta_{111} := \pi \div 2$$

Интеграционе константе за одређивање амплитуда и померања молекула услед дејства једног сперматозоида на 4. чворни молекул брзином V_4 :

$$\gamma_4 := \pi \div 4$$

$$\theta_4 := \pi \div 4$$

$$V_{rad} := V \cdot \sin(\gamma_4)$$

$$V_{mer} := V \cdot \cos(\gamma_4) \cdot \cos(\theta_4)$$

$$V_{cir} := V \cdot \cos(\gamma_4) \cdot \sin(\theta_4)$$

$$C4_1 := -0.025 \cdot \cos(\gamma_4) \cdot \cos(\theta_4)$$

$$C4_2 := -0.031 \cdot \cos(\gamma_4) \cdot \cos(\theta_4)$$

$$C4_3 := 1.099 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \cos(\theta_4))$$

$$C4_4 := 1.649 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \cos(\theta_4))$$

$$C4_5 := -1.452 \cdot 10^{-3} \cdot \cos(\gamma_4) \cdot \cos(\theta_4)$$

$$C4_6 := 1.269 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \cos(\theta_4))$$

$$C4_7 := -1.151 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \cos(\theta_4))$$

$$C4_8 := 9.231 \cdot 10^{-4} \cdot 10^{-8} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \cos(\theta_4))$$

$$C4_9 := -9.144 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \cos(\theta_4))$$

$$C4_{10} := 9.051 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \cos(\theta_4))$$

$$C4_{11} := -8.316 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \cos(\theta_4))$$

$$\alpha_{11} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{12} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{13} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{14} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{15} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{16} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{17} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{18} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{19} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{110} := \pi \div 2$$

$$\alpha_{111} := \pi \div 2$$

$$D4_1 := -0.025 \cdot \cos(\gamma_1) \cdot \sin(\theta_4)$$

$$D4_2 := -0.031 \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \sin(\theta_4))$$

$$D4_3 := 1.099 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \sin(\theta_4))$$

$$D4_4 := 1.649 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \sin(\theta_4))$$

$$D4_5 := -1.452 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \sin(\theta_4))$$

$$D4_6 := 1.269 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \sin(\theta_4))$$

$$D4_7 := -1.151 \cdot 10^{-3} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \sin(\theta_4))$$

$$D4_8 := 9.231 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \sin(\theta_4))$$

$$D4_9 := -9.144 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \sin(\theta_4))$$

$$D4_{10} := 9.051 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \sin(\theta_4))$$

$$D4_{11} := -8.316 \cdot 10^{-4} \cdot (\cos(\gamma_4) \cdot \sin(\theta_4))$$

$$\beta_{11} := \pi \div 2$$

$$\beta_{12} := \pi \div 2$$

$$\beta_{13} := \pi \div 2$$

$$\beta_{14} := \pi \div 2$$

$$\beta_{15} := \pi \div 2$$

$$\beta_{16} := \pi \div 2$$

$$\beta_{17} := \pi \div 2$$

$$\beta_{18} := \pi \div 2$$

$$\beta_{19} := \pi \div 2$$

$$\beta_{110} := \pi \div 2$$

$$\beta_{111} := \pi \div 2$$

Померања трећег и девог (чворних) молекула у ланцу у циркуларном и меридијалном првцу када сперматозоид дејствује на 3. молекул у ланцу одговарајућом брзином:

Поремећај преко 1. чворне тачке:

$$V_a := V_{pr} \div V_{hr}$$

$$V_1 := 1 \quad V_2 := 1 \quad V_3 := 1 \quad V_4 := 1$$

$$u_{3N1c}(t) := V_1 \cdot \sum_{s=1}^{11} K_{3s} \cdot C_{1s} \cdot \cos(w_{r_s} \cdot t + \alpha_{1s}) \quad v_{3N1m}(t) := V_1 \cdot \sum_{s=1}^{11} K_{3s} \cdot D_{1s} \cdot \cos(w_{r_s} \cdot t + \beta_{1s})$$

$$u_{9N1c}(t) := V_1 \cdot \sum_{s=1}^{11} K_{9s} \cdot C_{1s} \cdot \cos(w_{r_s} \cdot t + \alpha_{1s})$$

$$v_{9N1m}(t) := V_1 \cdot \sum_{s=1}^{11} K_{9s} \cdot D_{1s} \cdot \cos(w_{r_s} \cdot t + \beta_{1s})$$

Поремећај преко 2. чворне тачке:

$$u_{3N2c}(t) := V_2 \cdot \sum_{s=1}^{11} K_{3s} \cdot D_{2s} \cdot \cos(w_{r_s} \cdot t + \alpha_{1s}) \quad v_{3N2m}(t) := V_2 \cdot \sum_{s=1}^{11} K_{3s} \cdot C_{2s} \cdot \cos(w_{r_s} \cdot t + \beta_{1s})$$

$$u_{9N2c}(t) := V_2 \cdot \sum_{s=1}^{11} K_{9s} \cdot D_{2s} \cdot \cos(w_{r_s} \cdot t + \alpha_{1s})$$

$$v_{9N2m}(t) := V_2 \cdot \sum_{s=1}^{11} K_{9s} \cdot C_{2s} \cdot \cos(w_{r_s} \cdot t + \beta_{1s})$$

Поремећај преко 3. чворне тачке:

$$u_{3N3c}(t) := V_3 \sum_{s=1}^{11} K_3 \cdot C_3 \cdot \cos(\omega_r \cdot t + \alpha_{1s}) \quad v_{3N3m}(t) := V_3 \sum_{s=1}^{11} K_3 \cdot D_3 \cdot \cos(\omega_r \cdot t + \beta_{1s})$$

$$u_{9N3c}(t) := V_3 \sum_{s=1}^{11} K_9 \cdot C_3 \cdot \cos(\omega_r \cdot t + \alpha_{1s})$$

$$v_{9N3m}(t) := V_3 \sum_{s=1}^{11} K_9 \cdot D_3 \cdot \cos(\omega_r \cdot t + \beta_{1s})$$

Поремећај преко 4. чворне тачке:

$$u_{3N4c}(t) := V_4 \sum_{s=1}^{11} K_3 \cdot D_4 \cdot \cos(\omega_r \cdot t + \alpha_{1s}) \quad v_{3N4m}(t) := V_4 \sum_{s=1}^{11} K_3 \cdot C_4 \cdot \cos(\omega_r \cdot t + \beta_{1s})$$

$$u_{9N4c}(t) := V_4 \sum_{s=1}^{11} K_9 \cdot D_4 \cdot \cos(\omega_r \cdot t + \alpha_{1s})$$

$$v_{9N4m}(t) := V_4 \sum_{s=1}^{11} K_9 \cdot C_4 \cdot \cos(\omega_r \cdot t + \beta_{1s})$$

Резултујућа померања чворних тачака:

Чворна тачка 1:

$$u_1(t) := u_{3N1c}(t) + u_{9N2c}(t)$$

$$v_1(t) := v_{3N1m}(t) + v_{9N4m}(t)$$

Чворна тачка 3:

$$u_3(t) := u_{3N3c}(t) + u_{9N4c}(t)$$

$$v_3(t) := v_{3N3m}(t) + v_{9N2m}(t)$$

Чворна тачка 2:

$$u_2(t) := u_{9N1c}(t) + u_{3N2c}(t)$$

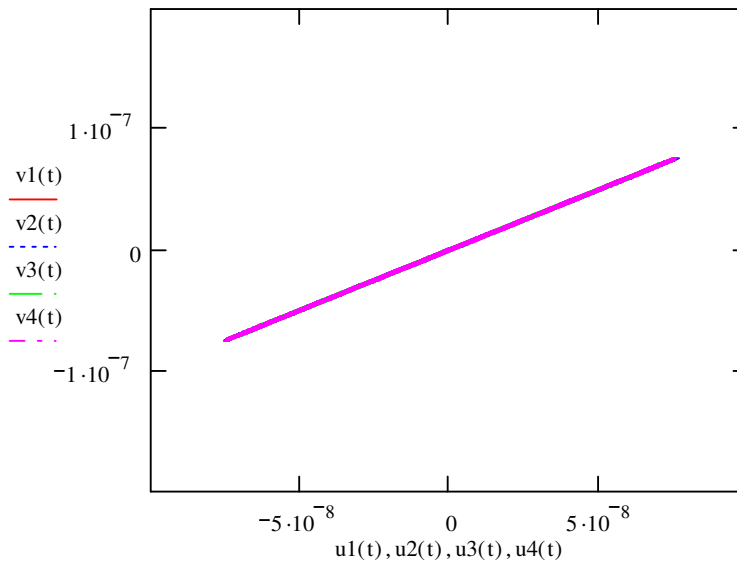
$$v_2(t) := v_{3N2m}(t) + v_{9N3m}(t)$$

Чворна тачка 4:

$$u_4(t) := u_{9N3c}(t) + u_{3N4c}(t)$$

$$v_4(t) := v_{9N1m}(t) + v_{3N4m}(t)$$

График осциловања сва четири чворна молекула у циркуларном и меридијалном правцу за поменуте почетне услове нацртан на основу претходно израчунатих параметара:



Слика П.6. График осциловања сва четири чворна молекула у циркуларном и меридијалном правцу када су сви углови дејства сперматозооида $\pi/4$ и све брзине једнаке средњој брзини хиперактивисаних сперматозооида.

Прилог 3

Математичке основе методе коначних елемената које се заснивају на механици деформабилног тела

Да би смо дефинисали стање напона, стање деформација и померања тачака деформабилног тела под дејством површинских и запреминских сила потребно је да одредимо елементе тензора напона, три нормална σ_x , σ_y и σ_z и три тангенцијална τ_{xy} , τ_{xz} и τ_{yz} у свакој тачки деформабилног тела тензора деформације, три дилатације ϵ_x , ϵ_y и ϵ_z линијских елемената и три клизања γ_{xy} , γ_{xz} и γ_{yz} међу паровима линијских елемената повучених из једне тачке, и компоненте вектора померања \vec{s} , у три ортогонална правца u , v и w , које ћемо овде обележити као елементе врста и колона у облику:

$$\begin{aligned}
 (\sigma) &= (\sigma_x \quad \sigma_y \quad \sigma_z \quad \tau_{xy} \quad \tau_{xz} \quad \tau_{yz}), \quad (\varepsilon) = (\varepsilon_x \quad \varepsilon_y \quad \varepsilon_z \quad \gamma_{xy} \quad \gamma_{xz} \quad \gamma_{yz}), \\
 (s) &= (u \quad v \quad w)
 \end{aligned}
 \tag{5.1}$$

$$\{\sigma\} = \begin{Bmatrix} \sigma_x \\ \sigma_y \\ \sigma_z \\ \tau_{xy} \\ \tau_{xz} \\ \tau_{yz} \end{Bmatrix} \quad \{\varepsilon\} = \begin{Bmatrix} \varepsilon_x \\ \varepsilon_y \\ \varepsilon_z \\ \gamma_{xy} \\ \gamma_{xz} \\ \gamma_{yz} \end{Bmatrix} \quad \{s\} = \begin{Bmatrix} u \\ v \\ w \end{Bmatrix}
 \tag{5.2}$$

На почетку треба поставити једначине равнотеже. За деформабилно тело то су: *Navier*-ове парцијалне диференцијелне једначине у облику:

$$D'\{\sigma\} + \{F'_n\} = \{0\}
 \tag{5.3}$$

где је D диференцијални оператор, а D' његов транспоновани облик:

$$D = \begin{pmatrix} \frac{\partial}{\partial x} & & & & & \\ & \frac{\partial}{\partial y} & & & & \\ & & \frac{\partial}{\partial z} & & & \\ \frac{\partial}{\partial y} & \frac{\partial}{\partial x} & & & & \\ & \frac{\partial}{\partial z} & \frac{\partial}{\partial y} & & & \\ \frac{\partial}{\partial z} & & \frac{\partial}{\partial x} & & & \end{pmatrix} \quad D' = \begin{pmatrix} \frac{\partial}{\partial x} & & & & & \\ & \frac{\partial}{\partial y} & & \frac{\partial}{\partial z} & \frac{\partial}{\partial y} & \frac{\partial}{\partial x} \\ & & \frac{\partial}{\partial z} & \frac{\partial}{\partial y} & \frac{\partial}{\partial x} & \\ & & & \frac{\partial}{\partial y} & \frac{\partial}{\partial x} & \\ & & & & \frac{\partial}{\partial y} & \frac{\partial}{\partial x} \\ & & & & & \frac{\partial}{\partial x} \end{pmatrix}
 \tag{5.4}$$

$\{F'_n\}$ је матрица колона запреминских сила, чији су елементи X'_v , Y'_v и Z'_v компоненте специфичне запреминске силе, у облику:

$$\{F'_n\} = \begin{Bmatrix} X'_v \\ Y'_v \\ Z'_v \end{Bmatrix}
 \tag{5.5}$$

Експлицитни облик записивања *Navier*-ових парцијалних диференцијелних једначина (5.3) је у облику:

$$\begin{pmatrix} \frac{\partial}{\partial x} & & & & & \\ & \frac{\partial}{\partial y} & & & & \\ & & \frac{\partial}{\partial z} & & & \\ & & & \frac{\partial}{\partial y} & & \\ & & & & \frac{\partial}{\partial x} & \\ & & & & & \frac{\partial}{\partial z} \end{pmatrix} \begin{Bmatrix} \sigma_x \\ \sigma_y \\ \sigma_z \\ \tau_{xy} \\ \tau_{xz} \\ \tau_{yz} \end{Bmatrix} + \begin{Bmatrix} X'_v \\ Y'_v \\ Z'_v \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{Bmatrix} \quad (5.6)$$

Cauchy-јеве кинематичке једначине деформабилног тела, које дају везу између специфичних деформација, три дилатације ϵ_x , ϵ_y и ϵ_z линијских елемената и три клизања γ_{xy} , γ_{xz} и γ_{yz} међу паровима линијских елемената повучених из једне тачке, и компонената вектора померања \vec{s} , у три ортогонална правца u , v и w , су у облику:

$$\{\epsilon\} = D\{s\} \quad (5.7)$$

или у развијеном облику

$$\{\epsilon\} = \begin{Bmatrix} \epsilon_x \\ \epsilon_y \\ \epsilon_z \\ \gamma_{xy} \\ \gamma_{xz} \\ \gamma_{yz} \end{Bmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{\partial}{\partial x} & & & & & \\ & \frac{\partial}{\partial y} & & & & \\ & & \frac{\partial}{\partial z} & & & \\ & \frac{\partial}{\partial y} & & \frac{\partial}{\partial x} & & \\ & & \frac{\partial}{\partial z} & & \frac{\partial}{\partial y} & \\ \frac{\partial}{\partial z} & & & \frac{\partial}{\partial x} & & \end{pmatrix} \begin{Bmatrix} u \\ v \\ w \end{Bmatrix} \quad (5.8)$$

Hooke-ов закон еластичности даје везу између компонентних напона, три нормална σ_x , σ_y и σ_z и три тангенцијална τ_{xy} , τ_{xz} и τ_{yz} у свакој тачки деформабилног тела, и елемената тензора деформације, три дилатације ϵ_x , ϵ_y и

ε_z линијских елемената и три клизања γ_{xy} , γ_{xz} и γ_{yz} у свакој тачки деформабилног тела, и има следећи облик:

$$\{\sigma\} = \mathbf{E} \{\varepsilon\} + \{\sigma^T\} \quad (5.9)$$

\mathbf{E} је матрица коефицијената еластичности односно матрица тензора еластичности, и за идеално еластично тело има облик:

$$\mathbf{E} = \begin{pmatrix} \lambda + 2\nu & \nu & \nu & & & \\ \nu & \lambda + 2\nu & \nu & & & \\ \nu & \nu & \lambda + 2\nu & & & \\ & & & \nu & & \\ & & & & \nu & \\ & & & & & \nu \end{pmatrix} \quad (5.10)$$

Lamé-ове константе λ и ν су у релацији са коефицијентом еластичности \mathbf{E} и коефицијентом смицања \mathbf{G} у следећем облику:

$$\lambda = \frac{\mu k \mathbf{E}}{1 + \mu}, \quad k = \frac{1}{1 - 2\mu}, \quad \nu = \mathbf{G}, \quad \lambda + 2\nu = 2\mu k \mathbf{G} + 2\mathbf{G} = 2\mathbf{G}(\mu k) \quad (5.11)$$

$\{\sigma^T\}$ је матрица, колона чији су елементи компонентни напони настали као резултат термалних напрезања, у условима линеарне термоеластичности деформабилног тела.

У МКЕ важи принцип виртуелних померања. „Под виртуалним померањем подразумевају се могућа бесконачно мала померања која су непрекидне и диференцијалне функције координата тачака тела и која су једнака нули у свим тачкама контурне површи тела у којима су задата померања једнака нули. Ако деформабилно тело добије максимална виртуелна померања које везе допуштају мора збир радова свих сила и спољашњих и унутрашњих на свим померањима бити једнак нули. То значи да и виртуелни рад спољашњих сила мора бити једнак

прираштају потенцијалне енергије. Везе које омогућавају виртуелна померања морају задовољити услов непрекидности деформација и граничне услове за померања тачака површи омотача тела" (*Hedrih (Stevanović), 1988*).

Према *Lejeune –Dirichlet*-овом критеријуму стабилности, у конфигурацији стабилне еластичне равнотеже деформабилног тела потенцијална енергија има стационарну вредност и то минимум. Од свих могућих померања деформабилног тела, које везе допуштају, стварна померања деформабилног тела се одликују тиме што јер за њих потенцијална енергија има екстремну вредност и то минимум. Ово је принцип минимума потенцијалне енергије при варијацији компонентних померања или принцип виртуалног рада. На овом принципу виртуалног рада се заснива и метода коначних елемената. Рад силе $\{\mathbf{F}\}$ на виртуалним померањима (δs) једнак је виртуалном раду еластичне деформације деформабилног тела, односно нагомиланом (створеном) еластичном потенцијалу унутрашњих сила на виртуалним дилатацијама и клизањима и има следећи облик:

$$(\delta s)\{\mathbf{F}\} = (\delta \varepsilon)\{\sigma\}dV \quad (5.12)$$

где је dV диференцијални елемент запремине деформабилног тела. Стабилно стање напона је дефинисано раније представљеном матрицом колоном $\{\sigma\}$ и виртуалним прирастом елемената дилатација $(\delta \varepsilon)$ за сваки елемент запремине dV .

У развијеном облику претходна релација добија облик:

$$(\delta u \quad \delta v \quad \delta w) \begin{Bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{Bmatrix} = (\delta \varepsilon_x \quad \delta \varepsilon_y \quad \delta \varepsilon_z \quad \delta \gamma_{xy} \quad \delta \gamma_{xz} \quad \delta \gamma_{yz}) \begin{Bmatrix} \sigma_x \\ \sigma_y \\ \sigma_z \\ \tau_{xy} \\ \tau_{xz} \\ \tau_{yz} \end{Bmatrix} dV \quad (5.13)$$

Јадначину (5.12) једнакости варијационог рада и виртуалног еластичног потенцијала пишемо за сваки коначни елемент и целу конструкцију:

$$(\mathbf{F}) = (F_1 \quad F_2 \quad F_3 \quad \dots \quad F_{n-1} \quad F_n \quad M_1 \quad M_2 \quad M_3 \quad \dots \quad M_{n-1} \quad M_n) \quad (5.14)$$

$$(\delta s) = (\delta u_1 \quad \delta u_2 \quad \delta u_3 \quad \dots \quad \delta u_{n-1} \quad \delta u_n \quad \delta \varphi_1 \quad \delta \varphi_2 \quad \delta \varphi_3 \quad \dots \quad \delta \varphi_{n-1} \quad \delta \varphi_n) \quad (5.15)$$

Вектор матрица врста (5.14) је матрица врста спољашњих чворних сила (\mathbf{F}), чији су елементи генерализане координате чворних сила и вектор матрица врста (δs) виртуалних померања (5.15), чији су елементи генерализане координате вектора виртуелних померања нападних тачака одговарајућих тачака чворних сила.

Матрица поља и интерполациона матрица коначног елемента

Сваки елеменат конструкције има поље и чворове. Конструкција је преко заједничких чворва елемената повезана у целину.

Вектори померања тачака $N(x, y, z)$ у пољу коначног елемента су функције координата и могу се написати у облику:

$$\{s\} = \begin{Bmatrix} u \\ v \\ w \end{Bmatrix} = \begin{Bmatrix} u(x, y, z) \\ v(x, y, z) \\ w(x, y, z) \end{Bmatrix} \quad (5.16)$$

Вектори померања тачака $N(x, y, z)$ у пољу коначног елемента можемо написати и у облику:

$$\{s\} = P \{C\} \quad (5.17)$$

где је $\{s\}$ матрица колона вектора померања тачака $N(x, y, z)$ у пољу коначног елемента. P правоугаона матрица, коју називамо **матрица поља коначних елемената**, чији елементи су функције координата (x, y, z) , матрица колона $\{C\}$ је матрица чији су елементи константе, које можемо изабрати тако да вектор померања $\{s\}$ у чворовима коначног елемента задовољава граничне услове. Матрица поља P коначног елемента се бира као функција координата и за сваки

облик коначног елемента представља матрицу којом интерполирамо поље померања коначног елемента.

Овде нећемо улазити у остале детаље, јер ћемо користити професионални софтверски пакет за чију примену је довољно изабрати коначне елементе, одредити чворне тачке, компонентне силе које дејствују на контуру и граничне услове. Сам софтверски програм је састављен на основим принципима које смо овде приказали.

Корисник софтверског пакета не мора да зна све елементе програма, већ само да припреми улазне и излазне податке.

Навешћемо још неколико важних релација и једначина.

Означимо сада са $\{S\}$ матрица колона вектора померања чворних тачака $N_i(x_i, y_i, z_i)$ коначног елемента за разлику од ознаке $\{s\}$ матрица колона вектора померања тачака $N(x, y, z)$ у пољу коначног елемента. За сваки чвор коначног елемента можемо написати:

$$\{S_i\} = P_{N_i} \{C\} \quad , \quad i = 1, 2, 3, \dots, n \quad (5.18)$$

где је P_{N_i} матрица P поља коначног елемента за вредности координата у чворним тачкама коначног елемента $N_i(x_i, y_i, z_i)$, за сваки од коначних елемената.

Уведимо сада матрицу B као производ у облику:

$$B = P P_{N_i}^{-1} \quad (5.19)$$

коју ћемо назвати интерполационом матрицом (*Shape Function*). Помоћу те функције успостављамо везу између вектора: $\{S\}$ вектора померања чворних тачака $N_i(x_i, y_i, z_i)$ коначног елемента са вектором $\{s\}$ вектором померања тачака $N(x, y, z)$ у пољу коначног елемента у следећем облику:

$$\{s\} = P \{C\} = P P_{N_i}^{-1} \{S\} = B \{S\} \quad (5.20)$$

Избор интерполационе матрице \mathbf{B} је од фундаменталног значаја за тачност нумеричких прорачуна по МКЕ.

Горе описани начин није једини могући начин за добијање релације (5.20) за везу између вектора $\{S\}$ вектора померања чворних тачака $N_i(x_i, y_i, z_i)$ коначног елемента са вектором $\{s\}$ вектором померања тачака $N(x, y, z)$ у пољу коначног елемента.

Једначину коначних елемената пишемо у облику:

$$\{\mathbf{F}\} = \mathbf{k}\{S\} \quad (5.21)$$

у којој је \mathbf{k} матрица крутости коначног елемента, $\{\mathbf{F}\}$ вектор чворних сила коначног елемента, $\{S\}$ матрица чворних померања коначног елемента. Једначина (5.21) је основна једначина коначног елемента. Она даје везу између $\{\mathbf{F}\}$ вектора чворних сила коначног елемента и $\{S\}$ матрице чворних померања коначног елемента.

Матрица крутости \mathbf{k} коначног елемента се израчунава једанпут за одређени тип коначних елемената и важи за све елементе истог типа, који су садржани у конструкцији (деформабилном телу). То је зато што је матрица крутости коначног елемента једног типа резултат геометријских карактеристика коначног елемента и физичких карактеристика материјала од кога је коначни елемент, односно од конститутивне релације напон – деформација материјала коначног елемента.

Како је за сваки коначни елемент једначина коначног елемената написана у облику (5.21) у систему локалних координата, за сваки коначни елемент треба одредити матрицу трансформације \mathbf{A} координата из локалног у глобални систем координата конструкције да би се затим саставила једначина конструкције. Једначина трансформације матрице крутости коначног елемента из локалног у глобални систем координата има облик:

$$\tilde{\mathbf{k}} = \mathbf{A}\mathbf{k}\mathbf{A}' \quad (5.22)$$

где је са \tilde{K} означена матрица крутости коначног елемента у глобалном систему координата целог деформабилног тела, а A' транспонована матрица трансформације координата A .

Једначина конструкције се саставља из једначина коначних елемената које смо трансформисали из локалних система координата у глобални. Користимо (5.22), као и одговарајуће трансформисане (из локалног у глобални систем координата) $\{\tilde{F}\}$ векторе чворних сила коначног елемента и $\{\tilde{S}\}$ матрице чворних померања коначног елемента.

Једначину конструкције сада пишемо у облику:

$$F = KS \quad (5.23)$$

K је матрица крутости конструкције (односно целог деформабилног тела), F је матрица колона сила чији су елементи све чворне силе коначних елемената на које смо дискретизовали конструкцију, а S је матрица колона чији су елементи координате чворних померања коначних елемената поређани редом. Матрица крутости конструкције је састављена из матрица крутости коначних елемената изражених у глобалном систему координата према релацији трансформације (5.22)

$$F = \begin{Bmatrix} \{\tilde{F}^{(1)}\} \\ \{\tilde{F}^{(2)}\} \\ \{\tilde{F}^{(3)}\} \\ \{\tilde{F}^{(4)}\} \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \{\tilde{F}^{(n-1)}\} \\ \{\tilde{F}^{(n)}\} \end{Bmatrix} \quad S = \begin{Bmatrix} \{\tilde{S}^{(1)}\} \\ \{\tilde{S}^{(2)}\} \\ \{\tilde{F}^{(3)}\} \\ \{\tilde{S}^{(4)}\} \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \{\tilde{S}^{(n-1)}\} \\ \{\tilde{S}^{(n)}\} \end{Bmatrix} \quad (5.24)$$

Матрица крутости деформабилног тела у развијеном облику је:

$$K = \begin{pmatrix} \tilde{k}_{11} & \tilde{k}_{12} & \tilde{k}_{13} & \tilde{k}_{14} & \cdot & \cdot & \cdot & \tilde{k}_{1,n-1} & \tilde{k}_{1,n} \\ \tilde{k}_{21} & \tilde{k}_{22} & \tilde{k}_{23} & \tilde{k}_{24} & \cdot & \cdot & \cdot & \tilde{k}_{2,n-1} & \tilde{k}_{2,n} \\ \tilde{k}_{31} & \tilde{k}_{32} & \tilde{k}_{33} & \tilde{k}_{34} & \cdot & \cdot & \cdot & \tilde{k}_{3,n-1} & \tilde{k}_{3,n} \\ \tilde{k}_{41} & \tilde{k}_{42} & \tilde{k}_{43} & \tilde{k}_{44} & \cdot & \cdot & \cdot & \tilde{k}_{4,n-1} & \tilde{k}_{4,n} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \tilde{k}_{n-1,1} & \tilde{k}_{n-1,2} & \tilde{k}_{n-1,3} & \tilde{k}_{n-1,4} & \cdot & \cdot & \cdot & \tilde{k}_{n-1,n-1} & \tilde{k}_{n-1,n} \\ \tilde{k}_{n,1} & \tilde{k}_{n,2} & \tilde{k}_{n,3} & \tilde{k}_{n,4} & \cdot & \cdot & \cdot & \tilde{k}_{n,n-1} & \tilde{k}_{n,n} \end{pmatrix} \quad (5.25)$$

Гранични услови

Једначину конструкције (5.23) решавамо уз услов да су задовољени гранични услови на контурној површи деформибилног тела. Гранични услови се задају помоћу површинских сила, које дејствују расподељене по контурној површи, али и помоћу померања тачака на контурној површи или комбиновано. Ако је деформабилно тело ослоњено на ослонце најчешће су у тачкама ослонцима померања једнака нули, или ако су укљештена, нема обртања ни померања у тим ослонцима, али су зато непознате реакције ослонаца односно моменти укљештења непознати. Тада су у матрицама колоне (5.24) чворна померања неких елемената једнака нули, или пак у матрицама сила ако су на неким контурним површима површинске силе једнаке нули. У том случају се матрична једначина конструкције (5.23) може поделити у два подсистема, при чему су у једном од њих непознате силе, а у другом непозната померања. Та два подсистема су независна, па је лакше решавати подсистеме са мањим бројем непознатих, него јединствени систем са укупним бројем непознатих. Некада нам није потребно да одредимо све непознате, па решавамо само један од подсистема. Тиме зависно од граничних услова, можемо да поједноставимо задатке.

По истом принципу ради и софтверски програм и за случај осцилација система, па је тада диференцијална једначина у матричном облику:

$$M\ddot{S} + KS = F \quad (5.26)$$

у којој је M матрица инерционих коефицијената маса коначних елемената или аксијалних момената инерције маса за осе ротације, а \ddot{S} матрица колона чији су елементи други изводи по времену координата чворних померања коначних елемената поређани редом, односно њихова убрзања.

Фреквентна једначина деформабилног тела је сада:

$$f(\omega^2) = |K - \omega^2 M| = 0 \quad (5.27)$$

Софтверски пакет ради на истом принципу, довољно је дефинисати облик и број коначних елемената, матрице крутости конструкције и матрицу инерционих коефицијената – матрицу маса.

У пракси не одређујемо ручно ни матрице крутости коначних елемената, ни матрице крутости целог деформабилног тела. Овај приказ основа на којим почива МКЕ дат је ради разумевања шта програм ради, како поставити контурне услове и остале параметре и како протумачити резултате. Ова знања су корисна и за варијације параметара система, као нпр. величине и облика коначних елемената. Уколико уочимо да у неком делу деформабилног тела постоји напон, можемо смањити величину коначних елемената и увећати њихов број или урадити неке друге параметарске модификације.

Биографија Анђелке Н. Хедрих

Медицински факултет у Нишу је завршила 2005. г. са просечном оценом 9,89. Била је стипендиста Фондације за стипендирање научног и уметничког подмлатка, добитник стипендије норвешке владе 2000. г., те стипендије аустријске агенције за интернационалну сарадњу, образовање и истраживање (*OeAD*) 2012. године. Добитник је једне од две додељене награде младим истраживачима **EUROMECH ENOC Young Scientist Prize 2011.**

Године 2005. уписала је докторске студије на Универзитету у Београду, на смеру Биомедицинско инжењерство и технологије и положила све испите са просечном оценом 10 (десет). Одобрена јој је тема Докторске дисертације 12. 12. 2012. године.

Током 2008. године радила је као докторант сарадник у настави на предмету Анатомија и Физиологија за инжењере на Машинском факултету Универзитета у Београду. Октобра 2009.г. засновала је радни однос на Државном Универзитету у Новом Пазару, а септембра 2010. изабрана је у звање асистента.

Као стипендиста Министарства науке Републике Србије у периоду од 2006. до 2009. учествовала је у пројекту 142075 Министарства за науку и технолошки развој: "Интеракција имобилисаних ћелија, ткива и биолошки активних молекула у биореакторским системима." којим је руководио проф. др Бранко Бугарски.

Од јануара 2011 ангажована на пројекту Министарства просвете и науке Р. Србије ОИ147001, "Динамика хибридних система сложених структура. Механика материјала".

Рецензент је за часопис *Psychology, Health & Medicine* IF (2014) 1,255 M22.

Члан је Лакарске коморе Србије -Регионална лекарска комора за југоисточну Србију и Српског друштва за Механику.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Анђелка Н. Хедрих

Број индекса или пријаве докторске дисертације 2/05 ; ОС Број: 020-210-30-8.2/2/12

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

"Осцилаторно понашање Zona-e Pelucida-e миша
пре и после оплодање"

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена докторска дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 03.05.2016.

Анђелка Хедрих

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторске дисертације**

Име и презиме аутора Анђелка Н. Хелрих
Број индекса или пријаве докторске дисертације 2/05; ОГ БРОЈ: 020-21030-8.2/2/12
Студијски програм Биомедицинско инжењерство и технологије
Наслов докторске дисертације "Осцилаторно понашање *Zonae Plicidae* миша пре и
после оплодње"
Ментори: проф. др Михаило ЈАЗАРЕВИЋ и проф. др АНА МИТРОВИЋ-ЈОВАНОВИЋ

Потписана Анђелка Н. Хелрих

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 03.05.2016.

Анђелка Хелрих

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

"Осцилаторно понашање Zone-е Perovskite-а мицца пре и после
оплаште"

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на крају).

Потпис докторанда

У Београду, 05.05.2016.

Анђелина Хегрлић

1. Ауторство - Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.