

МОДЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕОРГАНЕЛЬНОГО СВЯЗЫВАНИЯ КАЛЬЦИЯ «БЫСТРЫМИ» И «МЕДЛЕННЫМИ» БУФЕРАМИ В ДЕНДРИТАХ, СОДЕРЖАЩИХ В СЕБЕ ОРГАНЕЛЬНОЕ ДЕПО

Поступила 27.09.10

На математических моделях фрагментов реконструированного дендрита нейрона Пуркинью мозжечка исследовали зависимость внутриклеточных кальциевых сигналов от концентрации эндогенных буферов («медленного» – парвальбумина – и «быстрого» – кальмодулина) и кальцийчувствительного флуорофора (Fura-4F). В дендрите присутствовала депонирующая Ca^{2+} цистерна эндоплазматического ретикулума (ЭР). Кальциевые сигналы возникали в процессе генерации нейроном ответа на одиночное синаптическое возбуждение или собственной аperiodической импульсной активности. При этом изучали также динамику связывающей способности буферов; данная способность характеризовалась отношениями концентраций связанного с буфером и свободного кальция или же приращений указанных концентраций. Плазматическая мембрана дендрита обладала характерными для упомянутых нейронов ионными каналами (в том числе каналами синаптических токов) и кальциевым насосом. Уравнения модели учитывали обмен Ca^{2+} между цитозолем, буферами, ЭР и внеклеточной средой, а также процессы диффузии. Мембрана ЭР обладала кальциевым насосом, каналами утечки и каналами кальцийиндуцированного и инозитол-3-фосфатзависимого высвобождения Ca^{2+} . Цистерна ЭР занимала до 36 % внутриклеточного объема. При разном заполнении дендрита органелльным депо увеличение концентрации «медленного» буфера несколько уменьшало вызванные приложением синаптического стимула цитозольные транзиенты Ca^{2+} , не сказываясь на их форме. «Быстрый» же буфер и кинетически подобный ему краситель в условиях большей концентрации все более замедляли фазу нарастания кальциевого транзиента, уменьшали ранний и увеличивали поздний компоненты последнего. В случае аperiodических и асинхронных собственных колебаний мембранного потенциала, характерных для асимметричных активных дендритов, «медленный» буфер, подобно ЭР-депо, связывал больше Ca^{2+} в сопоставимых по размеру и заполнению органеллами фрагментах тех метрически асимметричных ветвей, которые в среднем дольше пребывали в состоянии высокой деполяризации; это обуславливало большее поступление Ca^{2+} извне. Тем самым картина структурно-функциональной организации кальциевой сигнализации в дендритах дополнена в части как непосредственных влияний, обусловленных локальной микрогеометрией дендритного разветвления, так и опосредованных, связанных с глобальной макрогеометрией дендрита.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: клетка Пуркинью, дендрит, динамика уровня Ca^{2+} , парвальбумин, кальмодулин, кальцийчувствительный флуорофор.

ВВЕДЕНИЕ

Кальций представляет собой универсальный внутриклеточный посредник, управляющий различными жизненно важными клеточными процессами.

¹Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара (Украина).

Эл. почта: ber_linn@yahoo.com (Т. С. Новородовская).

ми. Будучи столь универсальным и важным, Ca^{2+} в определенных случаях может быть токсичным агентом. Превышение токсичных уровней кальция в тех или иных участках внутриклеточного пространства и/или в тот или иной промежуток времени может привести к гибели клеток путем некроза или апоптоза [1–4]. Снижение концентрации Ca^{2+} до нетоксичных уровней происходит за счет вы-

качивания этих ионов во внеклеточное пространство и поглощения/связывания Ca^{2+} внутри клетки. Последнее обеспечивается захватом данного иона органеллами и связыванием его с особыми веществами, так называемыми кальциевыми буферами. Буферы – это специализированные протеины, способные связывать большую (до 99 %) часть Ca^{2+} , который поступает в клетку [5]. Цитозольные буферы активно участвуют в формировании амплитуды и длительности внутриклеточных кальциевых сигналов. К таким протеинам-буферам относятся парвальбумин, кальмодулин, кальбиндин, тропонин-С, кальретинин, кальцийнейрин, белок S-100 и ряд других [6]. В зависимости от диффузионных характеристик выделяют мобильные и немобильные буферы. Способность буфера связывать кальций характеризуется отношением либо двух величин – количества Ca^{2+} , связанного с буфером, и количества свободного цитозольного Ca^{2+} , либо приращений (Δ) этих величин. И то и другое отношение зачастую называют одинаково – коэффициентом связывания, емкостью буфера (buffer binding ratio, capacity) [7–9]. Более адекватным переводом последнего английского термина является «связывающая способность буфера», а отношение приращений лучше конкретизируется термином, который может быть переведен как «дифференциальный коэффициент связывания» (incremental binding ratio) [8, 9]. Эти характеристики связывающей способности буферов у клеток различных видов значительно варьируют. В зависимости от констант скоростей связывания и диссоциации Ca^{2+} буферы характеризуются как «медленные» (константы диссоциации k^- порядка 1 с^{-1}) или «быстрые» ($k^- \sim 100 \text{ с}^{-1}$) [5]. Из-за методических ограничений натурального эксперимента сведения о значениях как базальной (в исходном состоянии покоя), так и динамически меняющейся при разных состояниях активности нейронов концентрации свободных и связанных с кальцием буферов, различающихся кинетическими характеристиками, остаются разрозненными и крайне скудными. В силу этих обстоятельств многие существенные вопросы динамики неорганельного связывания кальция в клетке остаются практически неизученными. Математические модели позволяют рассчитывать ряд упомянутых выше концентраций и воссоздавать недоступные для прямого наблюдения элементы динамической картины многокомпонентных концентрационных процессов. Наша работа представляет собой модельное исследование процессов связывания «медленными»

и «быстрыми» цитозольными буферами ионов кальция, поступающих в клетку в случае одиночного срабатывания возбуждающего синапса или в процессе генерации сложных паттернов «собственной» (intrinsic) электрической активности в дендритах, которые обладают потенциалзависимыми проводимостями мембраны. Основное внимание было сосредоточено на том, как динамика неорганельного связывания Ca^{2+} зависит от концентраций эндогенных буферов с разной кинетикой связывания в отсутствие и при наличии подобного экзогенному «быстрому» буферу кальцийчувствительного красителя, широко используемого в исследованиях кальциевых сигналов. Указанные процессы рассмотрены в условиях разного относительного заполнения внутриклеточного объема дендрита цистерной эндоплазматического ретикулума (ЭР), играющей роль органельного кальциевого депо. Результаты работы позволили впервые одновременно описать динамику концентрационных изменений, сопровождающих электрические «дендритные» процессы разных типов, для различных фракций свободного и связанного кальция.

ОПИСАНИЕ МОДЕЛЕЙ

Исследования были выполнены на созданных в программной среде «НЕЙРОН» [10] моделях двух типов. Тип 1 соответствовал однокомпарментной модели дендрита нейрона Пуркинье мозжечка с ЭР, функционирующим в качестве кальциевого депо. Структура и биофизические свойства такой модели были подробно описаны нами ранее [11–13] (см. также работы других авторов [14, 15]). К типу 2 относились модели цилиндрических фрагментов, взятых из разных частей реконструированного реального дендритного разветвления нейрона Пуркинье. Для таких фрагментов ранее было установлено наличие существенных зависящих от геометрии различий пассивных передаточных свойств и соотношений фаз колебательных электрических процессов и кальциевых транзиентов [16–19]. Локализация рассматриваемых фрагментов в структуре дендритного разветвления представлена на рис. 1, А, взятом из нашей предыдущей работы [19], в которой также были подробно описаны структура и биофизические свойства данных моделей (см. также ниже вставку на рис. 5). Особенностью исследований моделей типа 2 было применение метода «динамической фиксации потенциала» (dynamic

voltage clamp) с использованием в качестве командного напряжения тех сигналов, которые регистрировались в указанных выше дендритных фрагментах в процессе генерации модельным нейроном Пуркинье (с полностью реконструированным дендритным разветвлением) сложных аperiodических пачек потенциалов действия (ПД) [19]. Синаптическую активацию имитировали путем внесения пассивной электропроводности (с потенциалом равновесия 0 мВ, т. е. аналога возбуждения глутаматергического синапса АМРА-типа). В моделях обоих типов учитывали обмен Ca^{2+} между цитозолем, внеклеточной средой, ЭР, а также буферизацию Ca^{2+} и его диффузию в безорганельный объем цитозоля. Учитывалось связывание Ca^{2+} с буферами – как с «медленным» В1 (парвальбумин), так и с «быстрым» В2 (кальмодулин и/или кальбиндин), которые присутствуют в дендритах нейронов Пуркинье, а также с флуоресцентным красителем D (dye, Fura-4), обладающим свойствами «быстрого» экзогенного буфера. Параметры буферов и флуорофора [20–23] приведены в таблице.

Поведение моделей характеризовали значениями потенциала на плазматической мембране (E), концентрации Ca^{2+} в цитозоле ($[Ca^{2+}]_i$), а также концентрации комплексов Ca^{2+} с парвальбумином ($[CaB1]$), кальмодулином ($[CaB2]$) и флуорофором ($[CaD]$).

Величину, обратную константе диссоциации (mM^{-1}), рассчитывали по формуле:

$$Kd = K1/K2, \quad (1)$$

где $K1$ – константа скорости связывания буфера или красителя с внутриклеточным свободным Ca^{2+} ($mM \cdot mc^{-1}$), $K2$ – константа скорости распада комплексов $[CaB1]$, $[CaB2]$ или $[CaD]$ (mc^{-1}).

Исходные концентрации первого и второго буферов, а также красителя составляли соответственно:

$$\begin{aligned} [B1]_0 &= [B1]/(1 + Kd_{B1}[Ca^{2+}]_i), \\ [B2]_0 &= [B2]/(1 + Kd_{B2}[Ca^{2+}]_i), \\ [D]_0 &= [D]/(1 + Kd_D[Ca^{2+}]_i), \end{aligned} \quad (2)$$

где $[B1]$, $[B2]$ и $[D]$ – полные концентрации первого, второго буферов и красителя соответственно (mM); Kd_{B1} , Kd_{B2} и Kd_D – величины, обратные константам диссоциации (mM^{-1}).

Концентрации связанных комплексов кальций–буфер1, кальций–буфер2 и кальций–краситель (mM) равнялись соответственно:

$$\begin{aligned} [CaB1] &= [B1] - [B1]_e; \\ [CaB2] &= [B2] - [B2]_e; \\ [CaD] &= [D] - [D]_e, \end{aligned} \quad (3)$$

где $[B1]_e$, $[B2]_e$ и $[D]_e$ – концентрации несвязанных буферов и красителя (mM).

Скорости изменения концентраций буферов и красителя в несвязанном состоянии составляли:

$$d[B1]_e/dt = K2_{B1}[CaB1] - K1_{B1}[Ca^{2+}]_i[B1]_e, \quad (4)$$

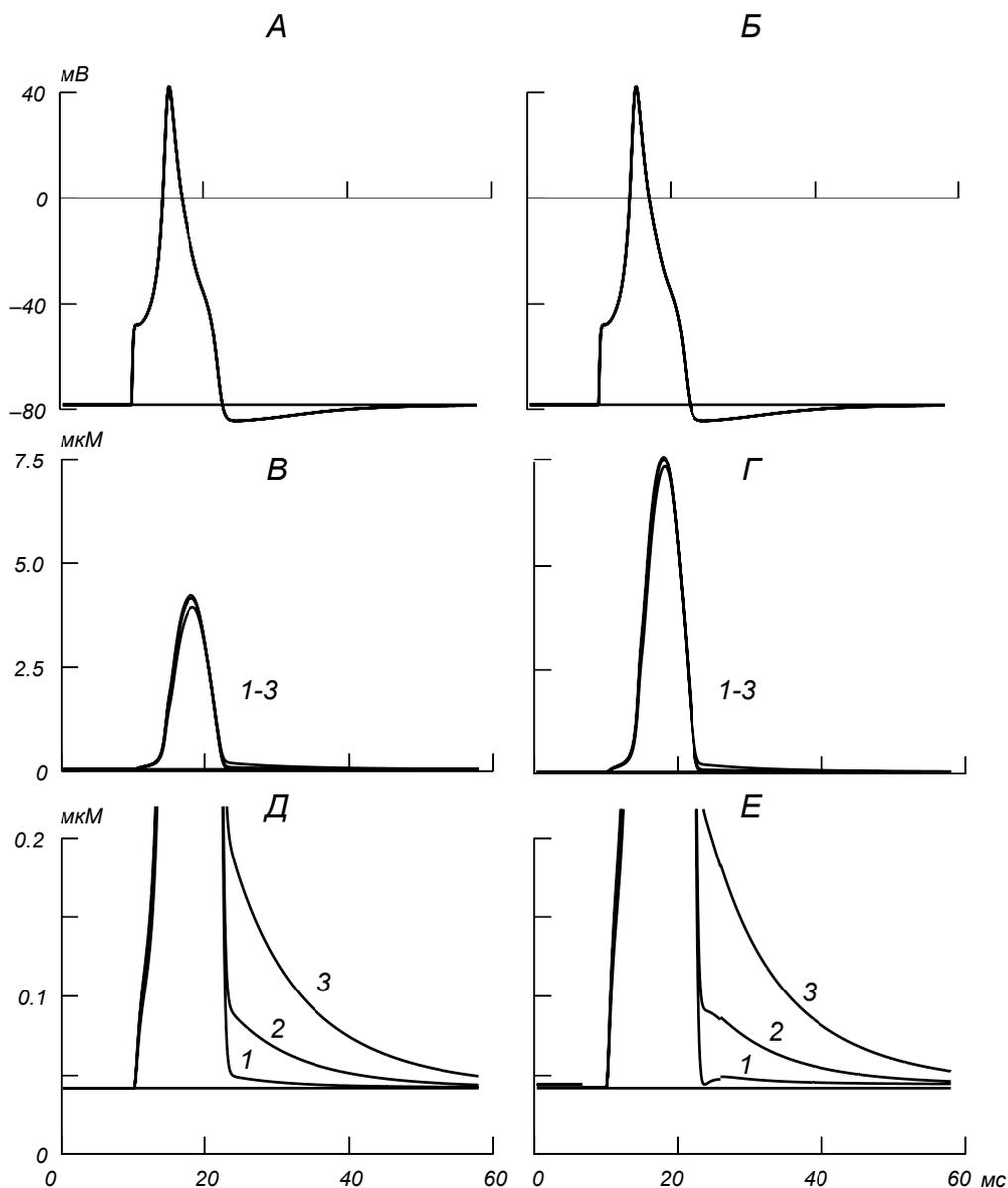
$$d[B2]_e/dt = K2_{B2}[CaB2] - K1_{B2}[Ca^{2+}]_i[B2]_e, \quad (5)$$

$$d[D]_e/dt = K2_D[CaD] - K1_D[Ca^{2+}]_i[D]_e. \quad (6)$$

Рассчитывали два наиболее часто рассматриваемых в литературе показателя связывающей функции буферов и буфероподобного красителя. Во-первых, это отношение концентрации комплекса кальций–буфер (кальций–краситель) к концентрации свободного цитозольного кальция, называемое коэффициентом связывания (binding ratio), или связывающей способностью (binding capacity), буфера (см., напр., обзор [7], т. е. $[CaB1]/[Ca^{2+}]_i$, $[CaB2]/[Ca^{2+}]_i$ и $[CaD]/[Ca^{2+}]_i$. Во-вторых, это отношение приращений тех же концентраций ($d[CaB1]/d[Ca^{2+}]_i$, $d[CaB2]/d[Ca^{2+}]_i$ и $d[CaD]/d[Ca^{2+}]_i$), называемое дифференциальным коэффициентом связывания (incremental binding ratio). Данный показатель связывающей способности, впервые введенный Нерером и Августином [9], определялся согласно приведенному в цитируемой работе уравнению 12 как $\kappa_{B1} = Kd_{B1} \cdot [B1]/(1 + Kd_{B1} \cdot [Ca^{2+}]_i)^2$, $\kappa_{B2} = Kd_{B2} \cdot [B2]/(1 + Kd_{B2} \cdot [Ca^{2+}]_i)^2$, и $\kappa_D = Kd_D \cdot [D]/(1 + Kd_D \cdot [Ca^{2+}]_i)^2$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

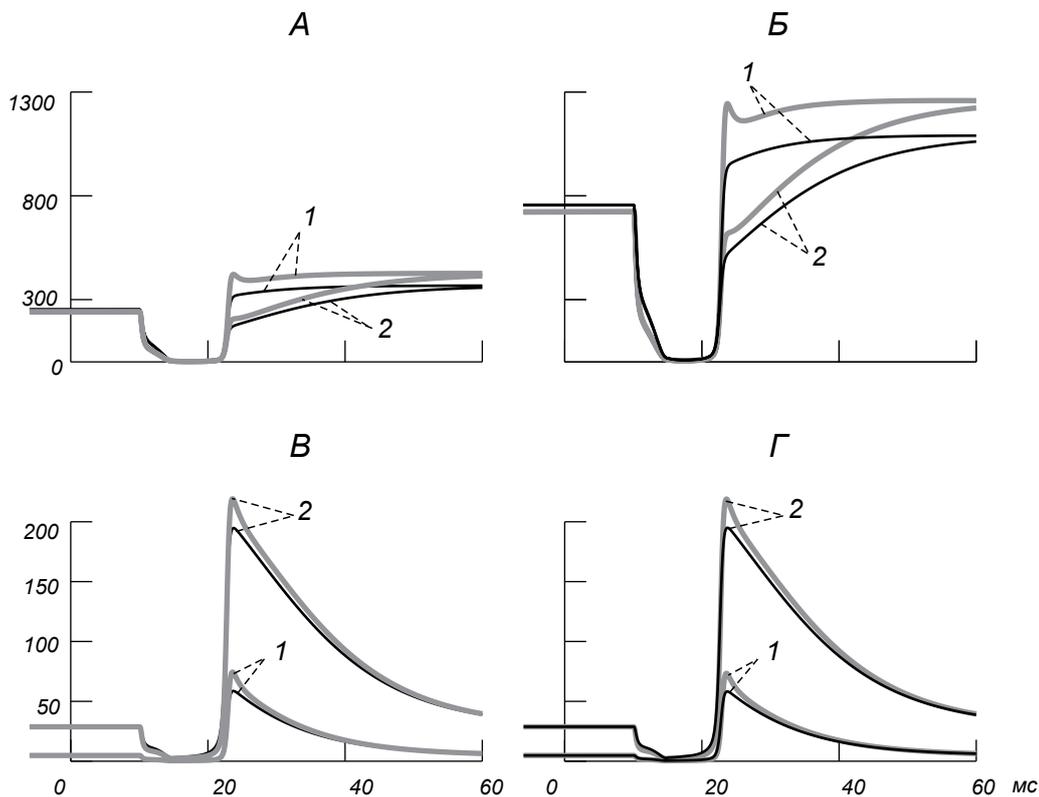
Динамика свободного Ca^{2+} в цитозоле дендрита при изменении геометрии оргanelьного депо (ЭР) и концентрации неорганельных буферов. Рис. 1 иллюстрирует воспроизведенные на модели одиночного дендритного компартмента (модель типа 1) и известные из натурального эксперимента (напр., [24]) эффекты увеличения концентрации «быстрого» буфера. Это усиление «медленного» низкоинтенсивного следового компонента процесса спада концентрации свободного кальция (кривые 1–3 на D и E), а также замедление нарастания и уменьшение интенсивности раннего высокоамплитудного компонента концентрационного кальциевого отве-



Р и с. 1. Вызванные применением одиночного синаптического стимула изменения мембранного потенциала (*A, Б*) и концентрации свободного кальция (*В–Е*) в цитозоле дендритного компартмента нейрона Пуркинье при разной степени заполнения внутриклеточного объема оргanelным депо – цистерной эндоплазматического ретикулума (ЭР) – и разных концентрациях «быстрого» кальциевого буфера.

Длительность стимула (внесенной синаптической электропроводности АМПА-типа интенсивностью 50 нС) 10 мс. Диаметр ЭР составлял 0.1 (*A, B, Д*) и 0.6 (*Б, Г, E*) диаметра компартмента, так что ЭР занимал 1 и 36 % внутриклеточного объема последнего. Кривые 1, 2 и 3 на *В–Е* соответствуют концентрациям «быстрого» буфера 5, 30 и 100 мкМ. На фрагментах *Д* и *Е* в увеличенном масштабе показаны следовые компоненты концентрационных транзиентов, представленных на *В* и *Г*.

Р и с. 1. Викликані прикладанням поодинокого синаптичного стимулу зміни мембранного потенціалу (*A, Б*) і концентрації вільного кальцію (*В–Е*) у цитозолі дендритного компартмента нейрона Пуркін'є при різній мірі заповнення внутрішньоклітинного об'єму оргanelним депо – цистерною ендоплазматичного ретикулума – та різних концентраціях «швидкого» кальцієвого буфера.

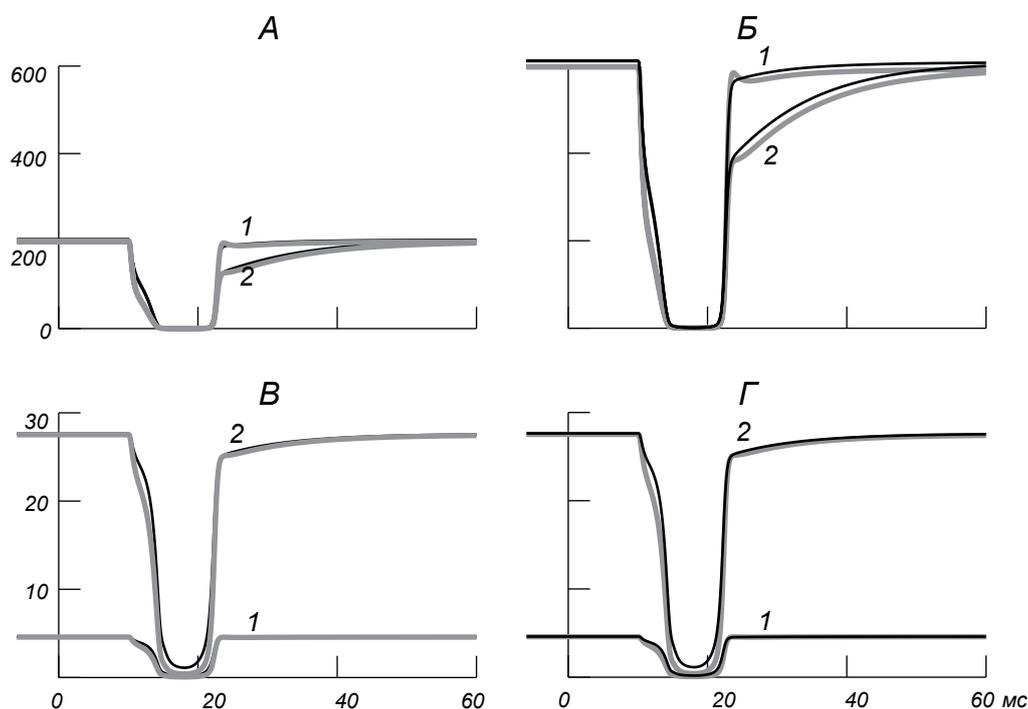


Р и с. 2. Характеристики динамики емкости кальциевых буферов при разных общих концентрациях последних и разной заполненности объема компартмента органелльным депо (цистерной эндоплазматического ретикулума – ЭР). *A, B* – изменения концентрации кальция, который связан с «медленным», *B, Г* – с «быстрым» буфером, отнесенной к концентрации свободного кальция, в условиях синаптической активации дендритного компартмента нейрона Пуркинью. Общая концентрация «медленного» буфера 50 (*A, B*) и 150 (*B, Г*) мкМ, «быстрого» – 5 и 30 мкМ (кривые 1 и 2 соответственно). Диаметр цистерны ЭР составлял 0.1 и 0.6 диаметра компартмента (1 и 36 % его объема, обозначено тонкой и толстой линиями соответственно).

Р и с. 2. Характеристики динаміки ємності кальцієвих буферів при різних загальних концентраціях останніх і різній заповненості об'єму компартмента органелльним депо (цистерною ендоплазматичного ретикулума).

та на предъявление стимула. Приложение одинаковых по интенсивности (50 нС) возбуждающих синаптических стимулов приводило к деполяризации мембраны до порога генерации дендритного кальциевого пика практически неизменной формы (*A, B*). Этот транзистент обуславливает массивированный вход Ca^{2+} в клетку, повышение внутриклеточной концентрации данных ионов и, соответственно, запуск процессов выкачивания избыточного кальция из клетки и его связывания органелльным депо и неорганелльными буферами. Интенсивность основного компонента транзистента $[Ca^{2+}]_i$ почти удваивалась с увеличением относительной части ЭР в объеме компартмента от 1 (*B*) до 36 (*Г*) % при разных комбинациях общих концентраций эндогенных буферов, которые варьировали от 50 до 150 мкМ у «медленного» буфера и от 5 до 100 мкМ у «быстро-

го». Вариация концентрации «медленного» буфера в указанных пределах сказывалась на транзистенте весьма слабо (не иллюстрировано). Вариация же концентрации «быстрого» буфера заметно влияла на следовой компонент транзистента $[Ca^{2+}]_i$. В условиях более высоких общих концентраций В2 интенсивность данного компонента была большей и слабо различалась при разных относительных объемах ЭР. Однако у временного течения транзистента проявлялась зависимость от объема ЭР особенность – некоторое замедление спада. В условиях низкой концентрации В2 (5 мкМ) наблюдалось временное повышение $[Ca^{2+}]_i$ (отмечено стрелками на *E*). Представленная картина в целом была практически одинаковой как при большей (150 мкМ), так и при меньшей (50 мкМ) концентрации «медленного» буфера.



Р и с. 3. То же, что и на рис. 2, но для дифференциальных коэффициентов связывания, используемых в качестве характеристик емкости буфера.

Коэффициенты определяются как отношение приращений концентраций связанного и свободного кальция.

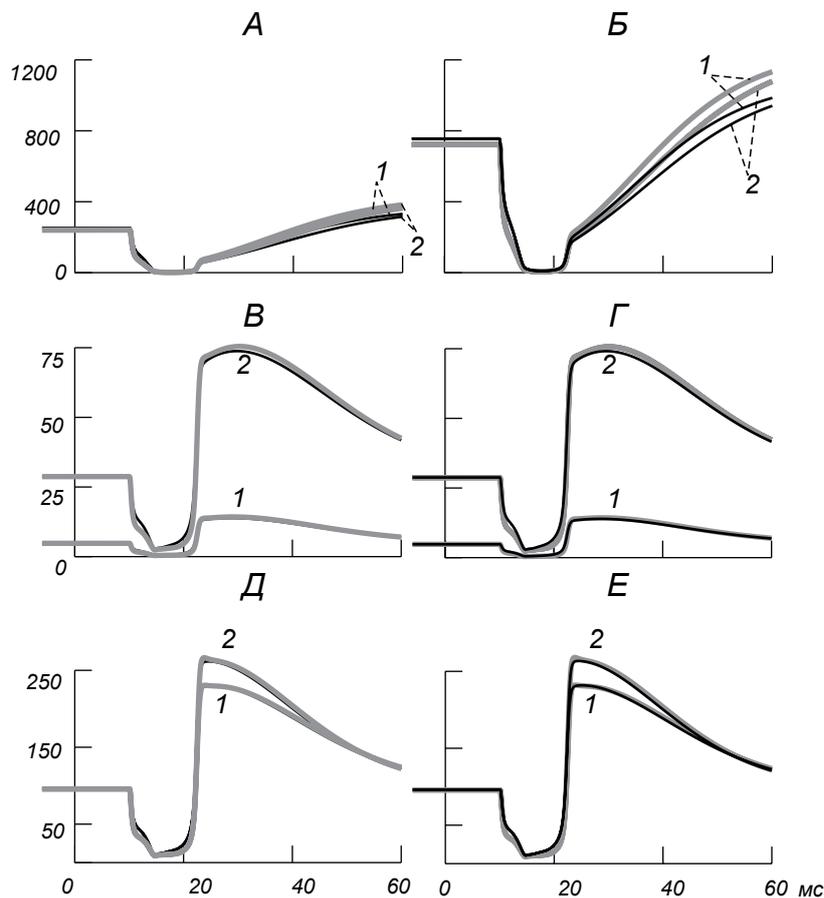
Р и с. 3. Те ж саме, що й на рис. 2, але для диференціальних коефіцієнтів зв'язування як характеристик ємності буфера.

Исходные параметры буферов и флуоресцентного красителя, связывающих кальций
Вихідні параметри буферів і флуоресцентного барвника, зв'язуючих кальцій

Вещества	Константа скорости связывания, М·мс ⁻¹	Константа скорости распада, мс ⁻¹	Общая концентрация, мМ
Парвальбумин (B1)	6	0.9·10 ⁻³	0.15
Кальмодулин (B2)	100	0.1	0.03
Fura-4F (D)	120	0.12	0.1

Динамика связывания Ca²⁺ «медленным» и «быстрым» эндогенными буферами при их разной концентрации. Рис. 2 иллюстрирует реакции эндогенных кальциевых буферов, индуцированные в дендритном компартменте (модель типа 1) приложением одиночного синаптического стимула длительностью 10 мс (вносимая электропроводность синапса АМРА-типа 50 нС). Вызванные транзисты [Ca²⁺]_i, подобные представленным на рис. 1, имели большую или меньшую интенсивность при соответственно 36 %- или 1 %-ном заполнении объ-

ема компартмента цистерной ЭР. Базальные (пре-стимульные) значения связывающей способности каждого из буферов определялись общей концентрацией последнего и не зависели от концентрации буфера-конкурента. Так, для дендритного компартмента с 36 %-ным заполнением объема органелльным депо (ЭР) базальные значения отношения [CaB1]/[Ca²⁺]_i при [B1] = 50 и 150 мкМ равнялись около 260 и 770 (A, B), а таковые у [CaB2]/[Ca²⁺]_i при [B2] = 5 и 30 мкМ – около 4.8 и 28.7 соответственно (B, Г). Во время развития кальциевого тран-



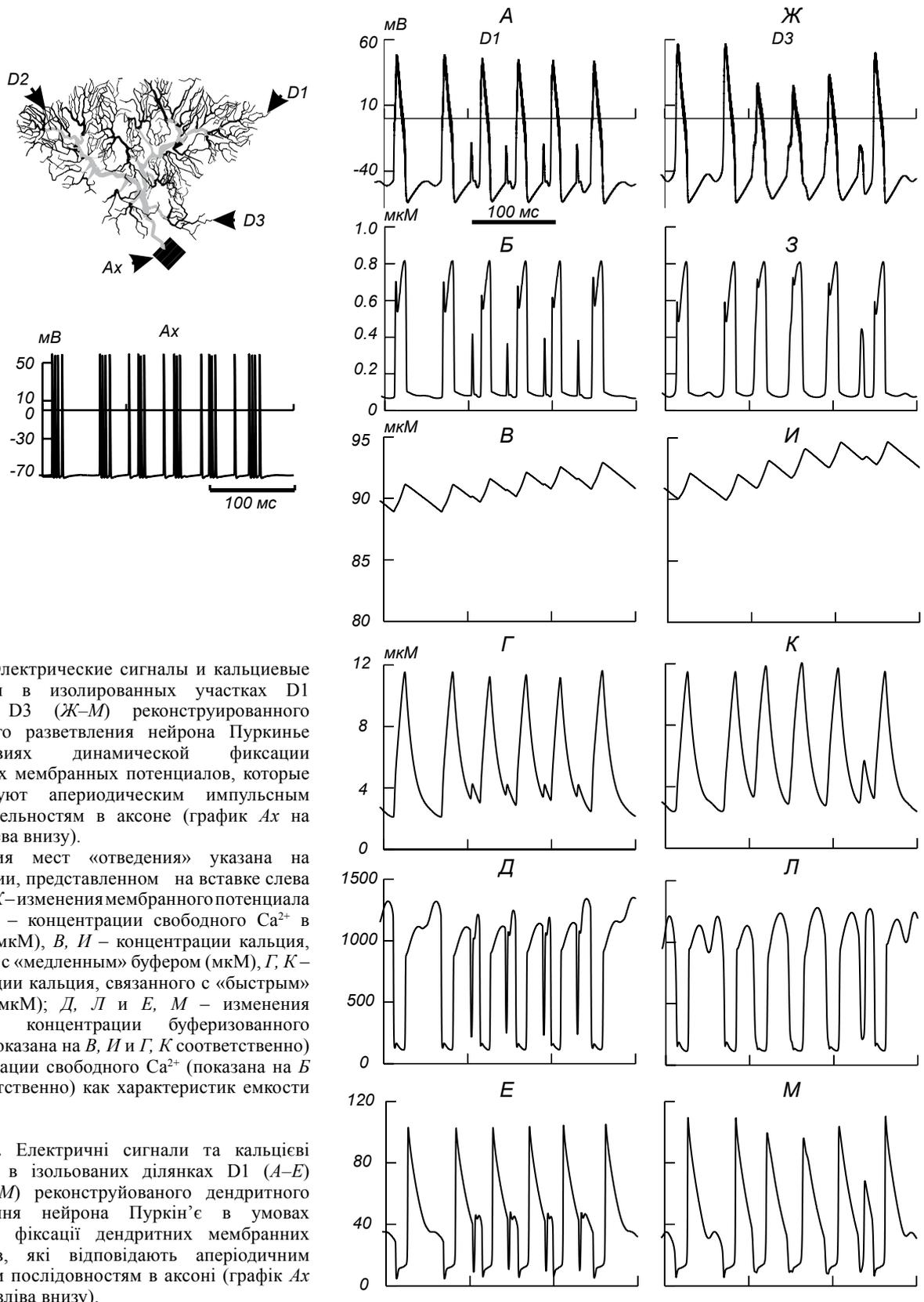
Р и с. 4. То же, что и на рис. 2, но в присутствии 100 мкМ флуорофора, обладающего свойствами «быстрого» буфера. Д, Е – концентрация комплекса Ca-флуорофор, отнесенная к концентрации свободного Ca^{2+} .

Р и с. 4. Те ж саме, що й на рис. 2, але в присутності 100 мкМ флуорофора, який має властивості «швидкого» буфера.

зиента (с 10-й по 22-ю мс) отношения $[\text{CaB1}]/[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $[\text{CaB2}]/[\text{Ca}^{2+}]_i$ снижались до 2.0–6.2 (А, Б) и 0.38–2.3 (В, Г) соответственно. Данное обстоятельство указывало на то, что в условиях пикового повышения концентрации свободного кальция (в данном случае $[\text{Ca}^{2+}]_i = 7.6$ мкМ при базальном значении 44 нМ) связывающие способности обоих буферов явно низки.

Наблюдаемые после окончания массивного входа кальция следовые процессы связывания у «медленного» и «быстрого» буферов различались весьма характерным образом. Отношение $[\text{CaB2}]/[\text{Ca}^{2+}]_i$ быстро достигало значений, на порядки превосходящих базальные, – около 73 и 220 при общей концентрации «быстрого» буфера $[\text{B2}] = 5$ и 30 мкМ соответственно, вне зависимости от $[\text{B1}]$. После этого в течение приблизительно 100 мс упо-

мянутое отношение возвращалось к базальным значениям (рис. 2, В, Г). В то же время отношение $[\text{CaB1}]/[\text{Ca}^{2+}]_i$ нарастало, причем с различными скоростями увеличения – вначале резко до уровня выше или ниже базального (в зависимости от менее или более высокой концентрации В1), а затем, в течение около 100 мс (время возврата «быстрой» буферизации к базальному уровню), – медленно, до уровня, который существенно превосходил базальный. Этот уровень зависел от общей концентрации «медленного» буфера (около 435 и 1290 при $[\text{B1}] = 50$ и 150 мкМ соответственно) и не зависел от концентрации «быстрого» (А, Б). Возврат к базальным значениям данного отношения происходил за время около 4.0–4.5 с. Описанные закономерности качественно сохранялись как при меньшем, так и при большем заполнении объема компартмента ор-



Р и с. 5. Электрические сигналы и кальциевые транзистенты в изолированных участках D1 (А–Е) и D3 (Ж–М) реконструированного дендритного разветвления нейрона Пуркинье в условиях динамической фиксации дендритных мембранных потенциалов, которые соответствуют аперидическим импульсным последовательностям в аксоне (график Ах на вставке слева внизу).

Локализация мест «отведения» указана на изображении, представленном на вставке слева вверху. А, Ж – изменения мембранного потенциала (мВ), Б, З – концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле (мкМ), В, И – концентрации кальция, связанного с «медленным» буфером (мкМ), Г, К – концентрации кальция, связанного с «быстрым» буфером (мкМ); Д, Л и Е, М – изменения отношений концентрации буферизованного кальция (показана на В, И и Г, К соответственно) к концентрации свободного Ca^{2+} (показана на Б и З соответственно) как характеристик емкости буферов.

Р и с. 5. Електричні сигнали та кальцієві транзистенти в ізолюваних ділянках D1 (А–Е) і D3 (Ж–М) реконструйованого дендритного розгалуження нейрона Пуркін'є в умовах динамічної фіксації дендритних мембранных потенціалів, які відповідають аперіодичним імпульсним послідовностям в аксоні (графік Ах на вставці зліва внизу).

ганельным депо ЭР (тонкие и толстые кривые на $A-G$). Относительные же концентрации обоих комплексов кальций-буфер были большими в случае большей доли ЭР в объеме компартмента.

На рис. 3 представлены выполненные в условиях, идентичных вышеописанным, расчеты еще одного показателя связывающей способности буферов – дифференциальных коэффициентов связывания κ_{B1} и κ_{B2} (определяемых уравнением 12 из работы Нера и Августина [9]). Поведение этого показателя предоставляет практически ту же информацию, что и поведение описанного выше отношения концентраций буферизованного и свободного кальция, с той лишь разницей, что все изменения в данном случае происходили в области значений ниже базального уровня (ср. рис. 3, $A-G$ и рис. 2, $A-G$). Во время генерации ответа на синаптическую активацию дифференциальный коэффициент связывания во всех случаях резко падал от базального уровня до значений, на порядок или два меньших. После окончания же массивированного входа кальция в клетку происходил двухфазный возврат к базальному уровню. В условиях более высокой общей концентрации «медленного» буфера базальное значение соответствующего дифференциального коэффициента связывания κ_{B1} было заметно выше (ср. B и A на рис. 3) независимо от общей концентрации «быстрого» буфера. Последняя влияла на уровень κ_{B1} , при котором «быстрая» фаза возврата к базальному уровню сменялась «медленной»; этот суббазальный уровень «излома» кривой возврата был ниже в случае более высокой общей концентрации «быстрого» буфера. Что же касается дифференциального коэффициента связывания «быстрого» буфера κ_{B2} , то его базальное значение было тем выше, чем большей была концентрация данного буфера (независимо от концентрации «медленного» буфера; рис. 3, B, G). Возврат к более низкому базальному уровню требовал меньшего времени, но в любом случае такой интервал не превышал 100 мс. Практически столь же быстро возвращался к базальному уровню и дифференциальный коэффициент связывания κ_{B1} «медленного» буфера при любой общей концентрации «быстрого», что существенно отличалось от порядка времени релаксации отношений $[CaB1]/[Ca^{2+}]_i$ и $[CaB2]/[Ca^{2+}]_i$ (порядка секунд).

Динамика буферизованного Ca^{2+} при добавлении кальцийчувствительного флуорофора. Добавление 100 мкМ флуорофора, подобного «быстрым» буферам по кинетике связывания Ca^{2+} , практически не сказывалось на базальных и динамических минималь-

ных значениях связывающей способности, а также на значениях времени возврата данного показателя к базальному уровню. Это было характерно как для «медленного», так и для «быстрого» эндогенных буферов при всех рассмотренных выше комбинациях общих концентраций последних (рис. 4, $A-G$). У флуорофора базальное отношение $[CaD]/[Ca^{2+}]_i$ было около 95, а минимальное (на пике концентрации свободного Ca^{2+}) – на порядок меньшим – 9 (D, E), причем в динамических паттернах связывания становились существенно более выраженными компоненты, определяемые наличием «быстрого» буфера в повышенной концентрации. Так, при обоих значениях общей концентрации «медленного» буфера после падения до минимума относительной концентрации его комплекса с кальцием $[CaB1]/[Ca^{2+}]_i$ фаза быстрого нарастания сменялась медленным нарастанием на фоне существенно меньших (примерно в три раза) суббазальных значений (A, B , ср. с кривыми 2 на рис. 2). Длительность «медленной» фазы роста (около 100 мс) и в этом случае соответствовала времени возврата к базальному уровню связывающей способности «быстрого» эндогенного буфера $[CaB2]/[Ca^{2+}]_i$ (B, G) после столь же быстрого скачка до практически того же, что и в отсутствие флуорофора, сверхбазального уровня. Связывающая способность флуорофора $[CaD]/[Ca^{2+}]_i$, подобно таковой «быстрого» эндогенного буфера, по окончании массивированного входа кальция скачкообразно повышалась до максимума, намного превышавшего базальный, – до 267 или 231 при меньшей (5 мкМ) или большей (30 мкМ) общей концентрации «быстрого» буфера. В течение же последующих 100 мс она возвращалась к базальному значению независимо от концентрации «медленного» буфера. После достижения максимума связывающая способность «медленного» буфера уменьшалась до базального уровня приблизительно за те же 5 с, что и в отсутствие флуорофора.

Буферизация Ca^{2+} в асимметричных дендритах в процессе генерации на выходе нейрона аperiodических импульсных последовательностей. В завершающей серии вычислительных экспериментов мы сравнивали электрические и концентрационные транзисты в изолированных компартментах (соответствовавших участкам D1 и D3 реконструированного дендритного разветвления) при подаче на эти компартменты командных напряжений, зарегистрированных в указанных участках в условиях, когда на выходе моделируемого нейрона ге-

нерировались аperiодические (стохастические) импульсные последовательности (Ax на вставке рис. 5), описанные в нашей предыдущей работе [19]. На рис. 5 представлены развивающиеся одновременно на двух указанных участках аperiодические транзиенты мембранного потенциала (A и $Ж$), концентрации свободного цитозольного кальция (B и $З$), а также концентраций комплексов кальция с «медленным» (B и $И$) и «быстрым» ($Г$ и $К$) эндогенными буферами. Кроме того, показаны изменения отношений $[CaB1]/[Ca^{2+}]_i$ ($Д$ и $Л$) и $[CaB2]/[Ca^{2+}]_i$ ($Е$ и $М$), характеризующих связывающую способность буферов. Генерируемые на выходе нейрона аperiодические пачки ПД и одиночные импульсы (Ax на вставке рис. 5) сопровождалась в асимметричных частях D1 и D3 дендритного разветвления асинхронными всплесками деполяризации мембраны (A , $Ж$) и концентрации свободного кальция (B , $З$) разной интенсивности, причем с присутствием «быстрых» и «медленных» компонентов. При этом, судя по абсолютным и относительным значениям концентраций комплексов кальций–буфер, «медленный» и «быстрый» эндогенные буферы по-разному реагировали на генерацию локального паттерна изменений мембранного потенциала. Так, концентрация связанного с кальцием «медленного» буфера нарастала во время развития «медленного» компонента цитозольного кальциевого сигнала и практически не реагировала на быстрые всплески (B , $И$). Наблюдавшаяся здесь в процессе продолжающейся активности тенденция – практически монотонное повышение среднего уровня (более высокого на дендритном участке D3) концентрации данного комплекса – весьма напоминает динамику концентрации Ca^{2+} , захваченного ЭР этих же участков (ср. $Г$ и $М$ на рис. 7 нашей предыдущей работы [19]). Совершенно по-иному протекал одновременный процесс связывания Ca^{2+} с «быстрым» буфером. Концентрация комплекса Ca^{2+} с этим буфером быстро нарастала, причем процесс включал в себя развитие как медленных, так и быстрых цитозольных транзиентов. Реакция на низкоамплитудные быстрые цитозольные транзиенты была хорошо выражена, тогда как на «быстрые» компоненты высокоамплитудных транзиентов она практически отсутствовала (рис. 5, $Г$, $К$). Например, четыре быстрым пикам $[Ca^{2+}]_i$ на рис. 5, $Б$ соответствовали четыре заметных зубца на нисходящих фазах транзиентов, показанных на $Г$. Благодаря более быстрому спаду концентрации комплекса кальция с «быстрым» буфером (что соответствовало более

быстрой диссоциации данного буфера) наблюдаемые в пределах межпачечных интервалов перепады концентраций связанного с кальцием «быстрого» буфера $[CaB2]$ были более выраженными, чем таковые у «медленного» буфера $[CaB1]$ (ср. $Г$, $К$ и $В$, $И$ на рис. 5). Изменения отношений $[CaB1]/[Ca^{2+}]_i$ ($Д$, $Л$) и $[CaB2]/[Ca^{2+}]_i$ ($Е$, $М$), характеризующих связывающую способность буферов, демонстрировали сложную динамику, причем различия между разными дендритными участками были более значительными по сравнению с межрегиональными различиями абсолютных концентраций соответствующих комплексов кальций–буфер ($В$, $И$, $Г$, $К$). В частности, «быстрые» составляющие изменений цитозольной концентрации свободного кальция ($Б$, $З$) существенно сказывались на значениях относительной $[CaB1]/[Ca^{2+}]_i$, но не абсолютной $[CaB1]$ ($В$, $И$) концентрации связанного с кальцием «медленного» буфера. Более выраженным было и влияние указанных «быстрых» составляющих на относительную концентрацию $[CaB1]/[Ca^{2+}]_i$ «быстрого» буфера ($Е$, $М$).

Такая ситуация возможна в случае, если дендриты, включавшие в себя сравниваемые участки, в условиях генерации нейроном асинхронного аperiодического импульсного паттерна пребывали в состоянии высокой деполяризации (обеспечивающей открывание кальциевых каналов) на протяжении разных промежутков времени соответственно и вход этих ионов в клетку был различным.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основные результаты данной работы можно суммировать следующим образом.

Во-первых, разработанная модель кальциевой динамики с участием органельных депо, двух эндогенных и экзогенного буферов продемонстрировала свою валидность в аспекте адекватности представления процессов неорганельного связывания Ca^{2+} : модель воспроизводила эффекты, известные по результатам натуральных экспериментов. В частности, полученные эффекты, зависящие от концентрации «быстрого» буфера, – замедление фазы нарастания и уменьшение интенсивности раннего компонента, а также увеличение интенсивности позднего компонента цитозольного кальциевого транзиента с появлением характерной «полочки» – фазы медленного спада, следовавшей за фазой быстрого спада основного транзиента, – соответствуют таким же

особенностям транзиента, отмеченным в работах Неера [8, 24]. Подчеркивалось, что эти специфические черты наиболее характерны для наблюдаемого в эксперименте действия буфероподобного красителя.

Во-вторых, общая концентрация «медленного» буфера в диапазоне, установленном на основании экспериментальных оценок [5, 20], в некоторой степени влияет на интенсивность цитозольного кальциевого транзиента, порожденного одиночным синаптическим действием, но практически не изменяет формы этого транзиента и не влияет на изменения концентрации Ca^{2+} , связанного с «быстрым» буфером (и депонированного в ЭР). Таким образом, влияние на форму цитозольного транзиента (появление следовой «полочки») оказывают лишь буферы и буфероподобные красители, для которых характерны быстрые кинетики связывания. Эти же буферы в основном и конкурируют между собой за свободный внутриклеточный Ca^{2+} при их обоюдном наличии в цитоплазме. В то же время буферы с замедленной кинетикой не составляют «быстрым» буферам и буфероподобным красителям особой конкуренции, так как не успевают «перехватить» у них Ca^{2+} .

В-третьих, эффекты неорганического связывания кальция с «быстрыми» эндогенными буферами наиболее выражены у компонентов цитозольного транзиента, имеющих низкую интенсивность (в диапазоне нескольких сотен наномолей на литр). На первый взгляд, концентрационные процессы столь низкой интенсивности, которым присущи особенности, обусловленные именно быстрыми эффектами неорганического связывания, можно рассматривать как малозначимые (особенно в сравнении с высокоамплитудными пиками транзиентов, достигающими нескольких микромолей на литр), а значит, и не имеющие большого функционального значения. Однако следует подчеркнуть, что основным динамическим диапазоном для нормального функционирования Ca^{2+} как посредника огромного набора внутриклеточных сигнальных процессов являются именно «субмикромолярные» изменения. Превышение же верхних границ этого диапазона, особенно длительное, сопряжено с неизбежными нарушениями адекватности внутриклеточных процессов (кальциевой токсичностью). Данные аспекты динамики неорганического связывания, видимо, заслуживают дальнейшего углубленного и внимательного изучения, поскольку необходимость детальных и более точных сведений о кинетических

параметрах реакций буферизации кальция (возможно, с использованием синтезированных буферов *in vitro*) очевидна.

В-четвертых, результаты наших настоящей и предыдущих работ наглядно показали зависимость динамики неорганического связывания кальция от соотношения свободный объем/поверхность в той или иной части клетки. Акцентированы связанные с геометрией особенности кальциевой динамики в асимметричных частях дендритного разветвления, которые отражают особенности локальных паттернов электрических процессов, сопровождающихся входом Ca^{2+} . Представленные здесь результаты дополняют описанную нами в предыдущей работе [19] картину значительной специфики процессов накопления Ca^{2+} в органельном депо, которые в одинаковой степени заполняют идентичные по размеру компартменты (ЭР), однако находящиеся в асимметричных дендритах с активными мембранными свойствами. Ранее отмечалось, что именно метрическая асимметрия обуславливает то обстоятельство, что пространственно однородное и постоянное во времени синаптическое возбуждение (действие входного сигнала) приводит к генерации пространственно неоднородных электрических процессов в активном дендритном разветвлении и сложных по своим временным характеристикам последовательностей ПД на выходе клетки. Как следствие, возникали существенные различия процессов депонирования Ca^{2+} , особенно выраженные в случае генерации аperiодических выходных импульсных паттернов, которые сопровождались асинхронными разновеликими изменениями мембранного потенциала и цитозольной концентрации Ca^{2+} в асимметричных дендритных разветвлениях (см. рис. 7, Г, З, М в нашей предыдущей работе [19]). Одним из существенных дополнений, полученным в настоящей работе, является обнаруженное явное сходство динамики связывания Ca^{2+} «медленным» эндогенным буфером (рис. 5, В, И) с динамикой депонирования данного иона органельным депо, т. е. ЭР ([19], рис. 7). Как и в случае упомянутого процесса органельного депонирования, при сходных абсолютных и относительных размерах расположенных в разных дендритах компартментов и депо комплекс кальция с «медленным» буфером в большей степени накапливается в компартментах тех дендритов, которые в среднем дольше пребывали в состоянии высокой деполаризации; это и обуславливало поступление большего количества Ca^{2+} в цитозоль. Таким образом, выяв-

лен еще один аспект – наличие не только прямой зависимости динамики дендритной концентрации Ca^{2+} от локальной микрогеометрии данного дендрита, но и косвенной зависимости указанной концентрации от глобальной макрогеометрии всего асимметричного дендритного разветвления. Разработанный в настоящей работе подход может быть в будущем использован для более углубленного исследования особенностей динамики процессов взаимодействия цитозольного кальция с кальцийсвязывающими протеинами, происходящих в дендритах. Указанные протеины играют роль как собственно буферов (поглотителей, подобных рассматриваемым в данной работе), так и метаболитов жизненно важных внутриклеточных биохимических реакций [6, 7].

Авторы благодарны проф. С. М. Корогоду за полезные замечания и комментарии к настоящей работе.

Т. С. Новородовська¹, І. Б. Кулагіна¹

МОДЕЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ НЕОРГАНЕЛЬНОГО ЗВ'ЯЗУВАННЯ КАЛЬЦІЮ „ШВИДКИМИ” ТА „ПОВІЛЬНИМИ” БУФЕРАМИ В ДЕНДРИТАХ, ЩО ВМІЩУЮТЬ ОРГАНЕЛЬНЕ ДЕПО

¹Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара (Україна).

Резюме

На математичних моделях фрагментів реконструйованого дендрита нейрона Пуркін'є мозочка досліджували залежність внутрішньоклітинних кальцієвих сигналів від концентрації ендогенних буферів («повільного» – парвальбуміну – та «швидкого» – кальмодуліну) і кальційчутливого флуорофора (Fura-4F). У дендриті була присутня депонуюча Ca^{2+} цистерна ендоплазматичного ретикулума (ЕР). Кальцієві сигнали виникали в процесі генерації нейроном відповіді на поодинокі синаптичне збудження або власної аперіодичної імпульсної активності. При цьому вивчали також динаміку зв'язувальної здатності буферів; дана здатність характеризувалася відношеннями концентрацій зв'язаного з буфером і вільного кальцію або ж приростів вказаних концентрацій. Плазматична мембрана дендрита мала характерні для згаданих нейронів іонні канали (у тому числі канали синаптичних струмів) і кальцієвий насос. Рівняння моделі враховували обмін Ca^{2+} між цитозолем, буферами, ЕР і зовнішньоклітинним середовищем, а також процеси дифузії. Мембрана ЕР мала кальцієвий насос, канали витоку й канали кальцій-індукованого та інозитол-3-фосфатзалежного вивільнення Ca^{2+} . Цистерна ЕР займала до 36 % внутрішньоклітинного об'єму. При різному заповненні дендрита органельним

депо збільшення концентрації „повільного” буфера дещо зменшувало викликані прикладенням синаптичного стимулу цитозольні транзєнти Ca^{2+} , не позначаючись на їх формі. «Швидкий» же буфер і кінетично подібний до нього барвник в умовах більшої концентрації все більше уповільнювали фазу зростання кальцієвого транзєнта, зменшували ранній і збільшували пізній компоненти останнього. У випадку аперіодичних і асинхронних власних коливань мембранного потенціалу, характерних для асиметричних активних дендритів, „повільний” буфер, подібно до ЕР-депо, зв'язував більше Ca^{2+} у порівнянні за розміром і заповненням органелами фрагментах тих метрично асиметричних віток, котрі в середньому довше перебували в стані високої деполяризації; це зумовлювало більше надходження Ca^{2+} ззовні. Тим самим картина структурно-функціональної організації кальцієвої сигналізації в дендритах доповнена в частині як безпосередніх впливів, зумовлених локальною мікрогеометрією дендритного розгалуження, так і опосередкованих, пов'язаних з глобальною макрогеометрією дендрита.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. P. G. Kostyuk and A. Verkhratsky, *Calcium Signalling in the Nervous System*, Wiley, Chichester (1995).
2. M. J. Berridge, “Neuronal calcium signalling,” *Neuron*, **21**, No. 1, 13-26 (1998).
3. Calcium as a Cellular Regulator, E. Carafoli and C. Klee (eds.), Oxford Univ. Press, New York (1999).
4. L. D. Pozzo-Miller, J. A. Connor, and S. B. Andrews, “Microheterogeneity of calcium signalling in dendrites,” *J. Physiol.*, **525**, 53-61 (2000).
5. M. Falcke, “Buffers and oscillations in intracellular Ca^{2+} dynamics,” *Biophys. J.*, **84**, 28-41 (2003).
6. C. W. Heizmann and W. Hunziker, “Intracellular calcium-binding proteins: more sights than insights,” *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 98-103 (1991).
7. M. J. Berridge, M. D. Bootman, and H. L. Roderick, “Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 517-29 (2003).
8. E. Neher, “Details of Ca^{2+} dynamics matter,” *J. Physiol.*, **586.8**, 2031 (2008).
9. E. Neher and G. J. Augustine, “Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells,” *J. Physiol.*, **450**, 273-301 (1992).
10. N. T. Carnevale and M. L. Hines, *The NEURON Book*, Cambridge Univ. Press, Cambridge (2006).
11. С. М. Корогод, Т. С. Новородовська, “Вплив геометричних характеристик органельного депо та безорганельного цитозолу на динаміку рівнів внутрішньоклітинного кальцію в дендриті: модельне дослідження”, *Нейрофізіологія/Neurophysiology*, **41**, № 1, 19-31 (2009).
12. Т. С. Новородовская, С. М. Корогод, “Сравнительный модельный анализ кальциевого обмена между цитозолем и депо митохондрий или эндоплазматического ретикулума”, *Нейрофізіологія/Neurophysiology*, **41**, № 5, 367-380 (2009).
13. Т. С. Новородовская, “Модельное исследование особенностей кальциевой динамики, обусловленных обменом между цитозолем и органельными депо”, *Нейрофізіологія/Neurophysiology*, **41**, № 5, 450-459 (2009).

14. E. De Schutter and J. Bower, "An active membrane model of the cerebellar Purkinje cell I. Simulation of current-clamps in slice," *J. Neurophysiol.*, **71**, 375-400 (1994).
15. T. Miyasho, H. Takagi, H. Suzuki, et al., "Low-threshold potassium channels and a low-threshold calcium channel regulate Ca²⁺ spike firing in the dendrites of cerebellar Purkinje neurons: a modeling study," *Brain Res.*, **891**, 106-115 (2001).
16. I. B. Kulagina, S. M. Korogod, G. Horcholle-Bossavit, et al., "The electro-dynamics of the dendritic space in Purkinje cells of the cerebellum," *Arch. Ital. Biol.*, **145**, Nos. 3/4, 211-233 (2007).
17. I. B. Kulagina, "Phase relationship between calcium and voltage oscillations in different dendrites of Purkinje neuron", *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **40**, № 5/6, 477-485 (2008).
18. S. M. Korogod and S. Tyč-Dumont, *Electrical Dynamics of the Dendritic Space*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, New York, Melbourne, et al. (2009).
19. Т. С. Новородовская, И. Б. Кулагина, "Структурная зависимость кальциевой динамики в дендритах нейрона Пуркинье при генерации пачечных разрядов: модельное исследование", *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **42**, № 1, 67-81 (2010).
20. E. De Schutter and P. Smolen, "Calcium dynamics in large neuronal models," in: *Methods in Neuronal Modeling: from Ions to Networks*, C. Koch and I. Segev (eds.), MIT Press, Cambridge (1998), pp. 211-250.
21. S. Dargan, B. Schwaller, and I. Parker, "Spatiotemporal patterning of IP3-mediated Ca²⁺ signals in *Xenopus* oocytes by Ca²⁺-binding proteins," *J. Physiol.*, **556**, No. 2, 447-461 (2004).
22. J. B. Sorensen, U. Matti, S. H. Wei, et al., "The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, No. 3, 1627-1632 (2002).
23. D. L. Wokosin, C. M. Loughrey, and G. L. Smith, "Characterization of a range of Fura dyes with two-photon excitation," *Biophys. J.*, **86**, No. 3, 1726-1738 (2004).
24. E. Neher, "Calcium buffers in flash-light," *Biophys. J.*, **79**, No. 6, 2783-2784 (2000).