

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ВЫЗВАННОГО АЦЕТИЛХОЛИНОМ ТОКА НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА ПРИ ПАРНОЙ СТИМУЛЯЦИИ: АНАЛИЗ С ПОМОЩЬЮ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

© 2016 г. Г.Б. Мурзина, А.С. Пивоваров*, Д.А. Махновский*

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485, Москва, ул. Бутлерова, 5а

E-mail: gbmurзина@mail.ru

**Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12*

E-mail: as_pivovarov@mail.ru

Поступила в редакцию 17.08.15 г.

После доработки 31.08.15 г.

С использованием метода парной стимуляции получена экспериментальная зависимость парного отношения вызванных ацетилхолином входящих токов командных нейронов виноградной улитки от интервала между аппликациями медиатора. С помощью математической модели, которая учитывает мембранное и внутриклеточное расположение рецепторов, их латеральную диффузию и зависящие от внутриклеточных процессов эндоцитоз и экзоцитоз рецепторов, проведен анализ полученной экспериментальной зависимости. Согласно результатам вычислений, основным процессом, определяющим вид этой зависимости, является эндоцитоз мембранных рецепторов. Исследовано влияние экзоцитоза и латеральной диффузии мембранных рецепторов на вид этой зависимости. Уточнены параметры существующей математической модели.

Ключевые слова: математическая модель, рецепторы, латеральная диффузия, эндоцитоз, экзоцитоз, депрессия холиночувствительности, командные нейроны, парная стимуляция, виноградная улитка.

В течение ряда лет нами проводились исследования механизмов депрессии (уменьшения) чувствительности к ацетилхолину (АХ) командных нейронов оборонительного поведения виноградной улитки на клеточном аналоге привывания [1–4] как одной из разновидностей механизмов нейронной пластичности. В рамках этих исследований была получена кривая восстановления АХ-тока – зависимость парного отношения амплитуды входящего трансмембранного АХ-тока этих нейронов (I) в ответ на второй (тестирующий) стимул по отношению к амплитуде АХ-тока в ответ на первый (кондиционирующий) стимул при парных аппликациях ацетилхолина от величины интервала между стимулами в паре (t). Это исследование было сделано с целью определения межстимульного интервала, начиная с которого парное отношение близко к единице. Интервал между стимулами варьировал от единиц до сотен се-

кунд. Согласно полученным результатам кривая $I(t)$ при некоторых значениях t достигает минимальных значений и первоначальное уменьшение парного отношения сменяется его монотонным ростом при увеличении t . Необходимо было выяснить, какие процессы определяют: 1) полученную зависимость величины депрессии вызванного АХ-тока в ответ на тестирующий стимул при парной стимуляции от величины межстимульного интервала и 2) наличие минимального значения $I(t)$. Результаты такого анализа позволяют уточнить параметры существующей математической модели, учитывающей мембранное и внутриклеточное расположение рецепторов, их латеральную диффузию и зависящие от внутриклеточных процессов эндоцитоз и экзоцитоз рецепторов (ЭнР и ЭкР соответственно) [5]. Уточненную и модифицированную на этом основании математическую модель планируется использовать для продолжающихся исследований механизмов пластичности нейронов с учетом латеральной диффузии рецепторов.

Сокращения: АХ – ацетилхолин, ЭнР – эндоцитоз рецепторов, ЭкР – экзоцитоз рецепторов, ЛПа – левый париеальный ганглий, ППа – правый париеальный ганглий, ЛДР – латеральная диффузия рецепторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа включает две части: экспериментальную (электрофизиологические эксперименты) и теоретическую (математическое моделирование динамики АХ-рецепторов по мембране, ЭНР и ЭкР). Электрофизиологические эксперименты проведены на идентифицированных нейронах № 2 и № 3 из левого парietального (ЛПа2, ЛПа3), № 2 и № 3 правого парietального (ППа2, ППа3) ганглиев наземного моллюска (виноградной улитки *Helix lucorum*) [6] на препарате изолированных ганглиев. Улитки были собраны в Крыму, в окрестностях Севастополя. Указанные нейроны вовлечены в реализацию оборонительного поведения этого наземного моллюска [7].

Препарат изолированных ганглиев. Предварительно животное анестезировали, охлаждая в течение 30 мин в смеси воды со льдом. Затем из тела улитки извлекали нервное окологлоточное кольцо ганглиев, которое фиксировали стальными микроиглами в проточной камере к подложке, изготовленной из полимерного материала силгард (Dow-Corning). Объем камеры составлял 1 мл, она была заполнена физиологическим раствором следующего состава (в мМ): NaCl – 100, KCl – 4, CaCl₂ – 10, MgCl₂ – 4, трис-HCl – 10, pH 7,5–7,7. После обработки нервного окологлоточного кольца ганглиев раствором фермента дигестазы (Seatec, Россия-Люксембург; 8 мг/1,2 мл, 20–70 мин при комнатной температуре) удаляли соединительнотканые оболочки, покрывающие ганглии.

Регистрация трансмембранных ионных токов. Для регистрации трансмембранных токов нейронов использовали методику двухэлектродной фиксации потенциала на мембране по схеме заземления объекта на «виртуальную землю». Для этого применяли микроэлектродный усилитель MEZ-8201 и усилитель фиксации потенциала CEZ-1100 (оба прибора фирмы Nihon Kohden, Япония). Внутриклеточные электроды для двухэлектродной фиксации потенциала, изготовленные из стекла «пирекс» (Harvard Apparatus, США), заполняли 2 М раствором ацетата калия. Сопротивление электродов 23–58 МОм ($29,78 \pm 3,68$ МОм). Регистрируемые токи передавали через аналого-цифровой интерфейс L-154 (АО «L-CARD», Россия) на персональный компьютер и с помощью программы CONAN 3.0 записывали на жесткий диск, а после эксперимента анализировали изменение амплитуд токов. В эксперименте токи записывали также на аналоговом самописце КСП-4 для оценки их динамики в реальном времени.

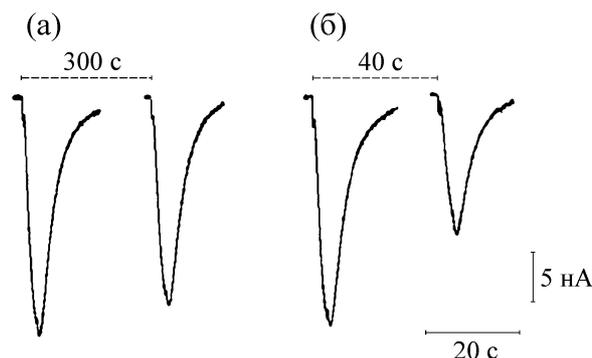


Рис. 1. Пример АХ-токов идентифицированного нейрона (клетка под номером 3 из левого парietального ганглия виноградной улитки) в ответ на парные аппликации АХ при разных значениях межстимульного интервала: 300 с (а) и 40 с (б). Калибровка времени относится к записям АХ-токов, а не ко всему рисунку.

Тестирующая стимуляция. Применяли локальную ионофоретическую аппликацию АХ на дорзальную поверхность сомы нейрона из стеклянной микропипетки, заполненной 1 М раствором хлорида АХ (Sigma, США). Сопротивление форетических пипеток составляло 10–45 МОм. Индифферентная пипетка в цепи микроионофореза была заполнена физиологическим раствором (сопротивление 1–5 МОм). В цепь ионофореза было последовательно подключено ограничивающее сопротивление 100 МОм. Катионные токи (200–500 нА, 0,3–3,0 с) пропускали через пипетку с раствором АХ от изолирующего от земли устройства, подключенного к выходу электростимулятора ЭСЛ-2. Для оценки величины входного сопротивления нейрона измеряли амплитуду тока утечки, вызванного гиперполяризующим смещением фиксируемого потенциала на 10 мВ. Прямоугольный импульс тока длительностью 5 с подавали с выхода электростимулятора ЭСЛ-2 за 10 с перед аппликацией АХ. Входное сопротивление нейронов составляло 2–8 МОм.

Эксперимент включал: 1) фоновое тестирование холиночувствительности сомы нейрона – подача одиночных аппликаций АХ с постоянным интервалом 10 мин при неизменных параметрах микроионофореза АХ (величина и длительность тока через пипетку); 2) парная стимуляция – две последовательные аппликации АХ, интервал между которыми изменяли от 10 до 600 с (рис. 1). В предварительных экспериментах было выяснено, что при последовательных аппликациях АХ с интервалами в 600, 900 и 1200 с амплитуда АХ-тока не меняется, т.е. парное отношение равно единице. Поэтому при получении кривой восстановления АХ-тока при

парной аппликации АХ интервал между парами (время после контрольной аппликации АХ до первой аппликации медиатора в паре стимулов) был выбран 600 с.

Полученные на 10 нейронах (ЛПа2 – 1 клетка, ЛПа3 – 2 клетки, ППа3 – 6 клеток, ППа2 – 1 клетка) в 10 препаратах результаты не зависели от типа нейрона и поэтому объединены в одну выборку. Мембранный потенциал клеток, электрическая активность которых зарегистрирована, составлял от -76 до -34 мВ ($-55,11 \pm 4,65$ мВ); потенциал фиксации -75 мВ.

Статистические методы. Нормализованные значения представлены как среднее арифметическое выборки \pm стандартная ошибка среднего арифметического. Для статистической обработки использовали компьютерную программу SigmaPlot 12.3 (Systat Software, Inc., США). Непараметрический тест Mann–Whitney Rank Sum использован для сравнения экспериментальной и контрольной групп. При $p \leq 0,05$ различия считали статистически значимыми.

Математическая модель. Анализ экспериментальной кривой проводился с помощью существующей математической модели, созданной для исследования депрессии холиночувствительности нейронов [5]. Математическая модель содержит описание процессов ЭнР, ЭкР и латеральной диффузии рецепторов (ЛДР), протекающих при ритмической аппликации медиатора на сому нейрона, с учетом геометрических характеристик нейрона виноградной улитки, основных внутриклеточных процессов, влияющих на изменения скоростей ЭнР и ЭкР, и зависимости коэффициента ЛДР от состояния примембранной «актиновой решетки». Сому нейрона моделировали в виде плоской поверхности, в центр которой апплицировали ацетилхолин. Концентрация мембранных рецепторов $u(r,t)$ и концентрация рецепторов в примембранной области $v(r,t)$ в зависимости от расстояния r от места аппликации медиатора в момент времени t описывается системой дифференциальных уравнений. На основании работ [2,4] в модели полагалось, что скорости ЭнР и ЭкР изменяются при аппликации медиатора вследствие активации ряда протеинкиназ и протеинфосфатаз. А изменение коэффициента ЛДР может быть связано с изменением конформации белков (осуществляющих взаимодействие «актиновой решетки» с мембраной [8]) при активации определенных протеинкиназ и протеинфосфатаз или изменении внутриклеточной концентрации Са [9]. В модели эти изменения коэффициентов скоростей транспортировки и диффузии рецепторов и изменение концентрации апплицируемого медиатора описываются

дифференциальными уравнениями. Значения используемых в модели констант и их обоснование представлены в работе [5].

Анализ экспериментальной кривой для выяснения механизмов, определяющих зависимость $I(t)$, был осуществлен в два этапа. Первоначально была использована упрощенная математическая модель без учета диффузии мембранных рецепторов (коэффициент ЛДР равен нулю) и с постоянными константами скоростей ЭнР и ЭкР. В этом случае концентрация мембранных рецепторов $u(r,t) = u(t)$ и концентрация рецепторов в примембранной области $v(r,t) = v(t)$. Их изменения в зависимости от времени t описываются уравнениями:

$$\frac{\partial u(t)}{\partial t} = -k_1 u(t) + k_2 v(t), \quad (1)$$

$$\frac{\partial v(t)}{\partial t} = k_1 u(t) - k_2 v(t) - k_3 v(t) + V_0$$

с начальными условиями $u(0) = V_0 k_2^0 / (k_1^0 k_3)$, $v(0) = V_0 / k_3$, где k_1 и k_2 – константы скоростей ЭнР и ЭкР соответственно, k_3 – константа скорости транспорта рецепторов из эндосом в лизосомы для их последующего расщепления, V_0 – скорость поступления вновь синтезированных рецепторов из эндоплазматического ретикула в примембранную область, k_1^0 и k_2^0 – константы скоростей ЭнР и ЭкР соответственно до аппликации медиатора, которые определяются равновесными транспортными процессами нейрона в состоянии покоя. Решение линейной неоднородной системы дифференциальных уравнений с постоянными коэффициентами (1) осуществлялось путем нахождения решения однородной системы уравнений и частного решения, удовлетворяющего заданным начальным условиям.

После анализа результатов вычислений упрощенной модели были проведены вычисления с применением полной модели [5], в которой зависимость k_1 и k_2 от концентрации апплицируемого медиатора (M) и активности внутриклеточных процессов, влияющих на ЭнР и ЭкР, имеют следующий вид:

$$k_i = k_i^0 (1 + B_i), \quad \frac{dB_i}{dt} = -\alpha_i B_i + \beta_i M^2, \quad (2)$$

где B_i – внутриклеточное вещество (например, протеинкиназа или протеинфосфатаза), активность которого увеличивается при аппликации медиатора, β_i и α_i – константы, учитывающие

увеличение и спад активности такого вещества, $i = 1$ в случае ЭнР, $i = 2$ в случае ЭкР.

Для получения расчетной кривой, аналогичной экспериментальной кривой $I(t)$, вычислялось выраженное в процентах отношение $W(t) = S(t_m)/S(t_0) \cdot 100\%$, где $t_0 = 0$ – момент подачи первого кондиционирующего стимула (первая аппликация медиатора), $t = t_m$ – время подачи второго тестирующего стимула. Таким образом, t_m является интервалом между стимулами. Суммарный ответ нейрона $S(t_c)$ в момент времени аппликации медиатора t_c вычислялся по формуле:

$$S(t_c) = \int_0^L u(r, t_c) \tilde{M}(r) dr,$$

где L – расстояние от места аппликации медиатора до границ плоской поверхности, определяемых размерами сомы нейрона, $\tilde{M}(r)$ – концентрация медиатора на расстоянии r от места аппликации; $t_c = t_m$ и $t_c = t_0$.

Графическое представление результатов вычислений и решение дифференциальных уравнений полной модели осуществляли с использованием программы MATLAB 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты электрофизиологических экспериментов. Полученная зависимость $I(t)$ отношения амплитуды АХ-тока в ответ на второй стимул к амплитуде АХ-тока на первый стимул от интервала между стимулами в паре t представлена на рис. 2 (кривая 1). Интервал между стимулами t варьировали от 10 до 600 с. Как видно, парная стимуляция при коротких интервалах между стимулами в паре вызывает подавление амплитуды второго ответа относительно первого (парная депрессия) ($p < 0,01$). При увеличении интервала ($t > 40$ с) наблюдается монотонный рост $I(t)$. Полное восстановление амплитуды второго АХ-тока относительно первого тока наступает при межстимульном интервале 600 с (нет различий между амплитудами 1-го и 2-го токов, $p > 0,05$). Поведение кривой $I(t)$ парного отношения при межстимульном интервале $t > 300$ с соответствует существующим экспериментальным данным по выработке депрессии. Согласно этим данным [10], депрессия холинчувствительности мембраны практически не возникает ($p > 0,05$), если интервал времени между последовательными аппликациями АХ на сому нейрона превышает 300 с.

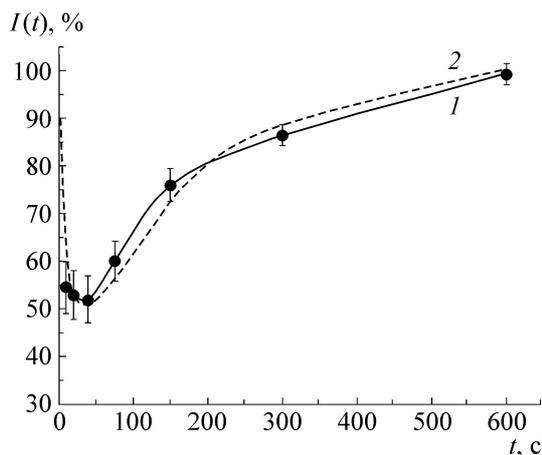


Рис. 2. Зависимости амплитуды входящего трансмембранного АХ-тока в ответ на второй стимул по отношению к амплитуде АХ-тока в ответ на первый стимул (%) от величины интервала между стимулами (с) при парных аппликациях АХ. По оси абсцисс – межстимульный интервал, по оси ординат – амплитуда АХ-тока в ответ на 2-й стимул относительно амплитуды АХ-тока в ответ на первый стимул в паре. 1 – Экспериментальная кривая. Представлены результаты по всей выборке нейронов ($n = 10$). Вертикальные линии – стандартная ошибка среднего арифметического. 2 – Расчетная кривая. Уточненные параметры модели: $D_0 = 0,2$ мкм²/с, $k_1^0 = 0,33$ мин⁻¹, $k_2^0 = 0,08$ мин⁻¹, $\alpha_1 = 0,8$.

Результаты вычислений упрощенной модели.

Решение системы уравнений (1) для концентрации мембранных рецепторов имеет следующий вид:

$$u(t) = -A (me^{-\lambda t} + ne^{-\eta t}) + U,$$

где

$$\begin{aligned} A &= V_0 k_2 / (k_1 k_3) (1 - k_2^0 k_1^0 / k_2 k_1) / (m + n), \\ m &= [(k_2 + k_3)^2 + k_1 k_2] / K, \quad n = (k_1 + k_2) / K, \\ K &= k_1 + k_2 + k_3, \quad m + n = K / k_1 - 2k_3 / K, \\ U &= V_0 k_2 / (k_1 k_3) \\ \lambda &= k_1 k_3 / K, \quad \eta = K - \lambda. \end{aligned}$$

Согласно полученной зависимости $u(t)$ при значениях k_1 и k_2 , отличных от k_1^0 и k_2^0 , происходит монотонный двухэкспоненциальный переход к новой концентрации рецепторов на мембране с постоянными времени $\tau_1 = 1/\lambda$ и $\tau_2 = 1/\eta$. В случае, когда $k_1 > k_2$ и $k_1 > k_3$, $\tau_1 \sim 1/k_3$, $\tau_2 \sim 1/k_1$ и $u(t)$ при $t \rightarrow \infty$ принимает значение $U = V_0 k_2 / (k_1 k_3)$. Поскольку при неизменных значениях V_0 и k_3 $k_2/k_1 < k_2^0/k_1^0$, то концентрация мембранных рецепторов уменьшается.

Результаты вычислений полной модели. Результаты моделирования соответствовали результатам вычислений упрощенной модели. В

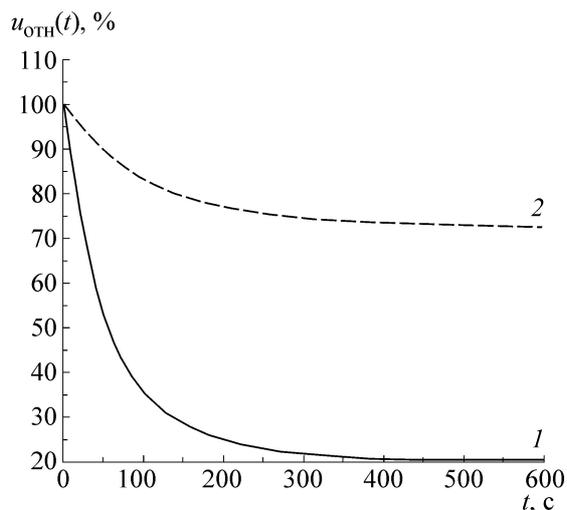


Рис. 3. Расчетные изменения концентрации мембранных рецепторов после аппликации медиатора. По оси абсцисс – значение промежутка времени между двумя подведениями медиатора, по оси ординат – концентрация мембранных рецепторов после аппликации медиатора относительно концентрации мембранных рецепторов до аппликации. Кривые получены в случае независимых от времени констант скоростей эндоцитоза и экзоцитоза рецепторов (k_1 и k_2) при коэффициенте латеральной диффузии рецепторов $D_0 = 0$ (кривая 1) и $D_0 = 0,1$ мкм²/с (кривая 2).

случае независимых от времени (независимых от активности внутриклеточных процессов) констант скоростей ЭнР и ЭкР в модели предполагалось, что после аппликации медиатора k_1 и k_2 принимают значения k_1^* и k_2^* : $k_1^* > k_1^0$ и $k_2^* > k_2^0$. Это приводит к изменению концентрации мембранных рецепторов (рис. 3, кривая 1). Наличие латеральной диффузии рецепторов приводит к увеличению концентрации мембранных рецепторов после стимуляции (рис. 3, кривая 2).

В случае существования у k_2 зависимости (2) от активности внутриклеточных веществ и отсутствия ее у k_1 (k_1 изменялась скачкообразно после аппликации медиатора) при равном нулю коэффициенте ЛДР зависимость $W(t)$ имеет монотонный характер с низким стационарным уровнем (рис. 4, кривая 1). Согласно уравнению (2) величина k_2 зависит от t опосредованно вследствие зависимости от t количества активного внутриклеточного вещества B_2 . Изменение α_2 (как увеличение, так и уменьшение в 10 раз относительно значения, используемого в модели [5]) показало, что характер зависимости $W(t)$ не меняется. Изменяется только стационарный уровень: при уменьшении α_2 он увеличивается до 20%, а при увеличении α_2 – практически не

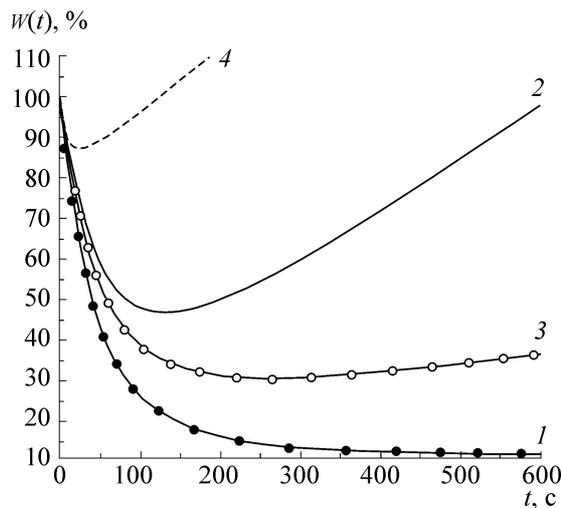


Рис. 4. Зависимости суммарного ответа моделируемого нейрона на второй стимул относительно ответа нейрона на первый стимул от величины интервала между стимулами при различных параметрах транспортировки рецепторов. По оси абсцисс – межстимульный интервал, по оси ординат – суммарный ответ моделируемого нейрона на второй стимул относительно ответа нейрона на первый стимул. Кривые получены при $D_0 = 0$ в случае независимой от времени константы скорости эндоцитоза рецепторов k_1 (кривая 1), независимой от времени константы скорости экзоцитоза рецепторов k_2 при неизменных коэффициентах уравнения (2), используемых в модели [5] (кривая 2), и при изменении α_1 : уменьшении в 10 раз (кривая 3) и увеличении в 10 раз (кривая 4).

изменяется. В случае существования зависимости (2) у k_1 и отсутствия ее у k_2 (при равном нулю коэффициенте ЛДР) зависимость $W(t)$ имеет другой вид, чем в предыдущих случаях: монотонный спад при небольших межстимульных интервалах, начиная с некоторого значения $t = t_{\min}$, сменяется возрастанием (рис. 4, кривая 2). Изменение α_1 (как увеличение, так и уменьшение в 10 раз относительно значения, используемого в модели [5]) показало, что вид зависимости $W(t)$ не меняется. Изменяются величина минимального значения $W_{\min} = W(t_{\min})$, значение межстимульного интервала t_{\min} , когда он наблюдается, время выхода на стационарный уровень после окончания аппликации медиатора и величина стационарного уровня. При уменьшении $\alpha_1 W_{\min}$ тоже уменьшается, а t_{\min} возрастает (рис. 4, кривая 3), при увеличении α_1 изменения W_{\min} и t_{\min} имеют противоположную направленность (рис. 4, кривая 4).

Если от внутриклеточных процессов (2) зависят оба параметра, k_1 и k_2 , то при равном нулю коэффициенте ЛДР зависимость $W(t)$ (кривая 1, рис. 5), несмотря на общие законо-

мерности, не совпадает с экспериментальной зависимостью $I(t)$ (рис. 2, кривая 1): расчетное $W_{\min} < I_{\min}$ экспериментального, а расчетное t_{\min} больше экспериментального. Уменьшение коэффициента k_1 приводит к увеличению W_{\min} (рис. 5, кривая 2). Увеличение коэффициента k_2 приводит к увеличению W_{\min} и уменьшению t_{\min} (рис. 5, кривая 3). При наличии диффузии мембранных рецепторов наблюдается еще большее увеличение W_{\min} и уменьшение t_{\min} (рис. 5, кривая 4). С учетом полученных результатов были скорректированы параметры существующей модели, и расчетная зависимость $W(t)$ стала соответствовать экспериментальной зависимости $I(t)$ (рис. 2). Были увеличены по сравнению с соответствующими значениями существующей модели [5] такие параметры, как скорости эндцитоза и экзоцитоза рецепторов, коэффициент ЛДР (в три раза) и параметр, учитывающий степень влияния активности внутриклеточных процессов на эндцитоз рецепторов (в два раза).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отношение амплитуды входящего трансмембранного АХ-тока нейронов в ответ на второй (тестирующий) стимул по отношению к амплитуде АХ-тока в ответ на первый (кондиционирующий) стимул при парных аппликациях АХ позволяет судить об изменениях внутриклеточных и мембранных процессов, влияющих на концентрацию мембранных рецепторов при аппликации медиатора. Поскольку от этих изменений зависит входящий АХ-ток, парная стимуляция позволяет выявить динамику мембранных рецепторов после аппликации медиатора. Согласно полученной экспериментальной кривой при небольших межстимульных интервалах (порядка нескольких десятков секунд) количество мембранных рецепторов уменьшается, в то время как при больших межстимульных интервалах (более пятидесяти секунд) наблюдается противоположная динамика. Определение величины межстимульного интервала, начиная с которого наблюдается восстановление концентрации мембранных рецепторов, и процессов, от которых это зависит, необходимо при проведении ряда экспериментов.

Согласно полученным результатам упрощенной модели, если изменение скоростей ЭнР и ЭкР при аппликации медиатора сводится только к их увеличению без дальнейшего спада, то характер изменения концентрации мембранных рецепторов не соответствует динамике экспериментальной кривой $I(t)$: происходит только монотонный переход к новому стационарному значению. Моделирование показало, что вид

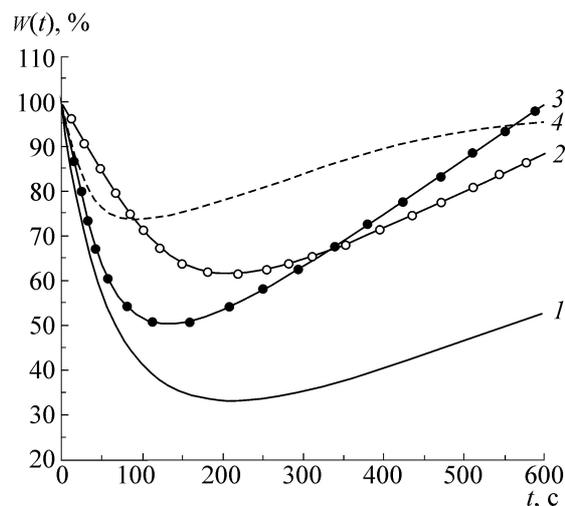


Рис. 5. Расчеты зависимости суммарного ответа моделируемого нейрона на второй стимул относительно ответа нейрона на первый стимул от величины интервала между стимулами. По оси абсцисс – межстимульный интервал, по оси ординат – суммарный ответ моделируемого нейрона на второй стимул относительно ответа нейрона на первый стимул. Кривые получены в случае $D_0 = 0$ при используемых ранее параметрах модели [5] (кривая 1), при уменьшении k_1 в два раза (кривая 2), при увеличении k_2 в два раза (кривая 3); в случае $D_0 = 0,3$ мкм²/с (кривая 4).

экспериментальной кривой определяет зависимость от внутриклеточных процессов скорость ЭнР. Величина межстимульного интервала, начиная с которого после спада наблюдается увеличение отношения амплитуды АХ-тока при парной стимуляции, в большей степени зависит от скорости ЭкР. Чем больше скорость ЭкР, тем большее количество рецепторов «успевает вернуться» на мембрану и тем быстрее достигается прежний стационарный уровень. Аналогичный эффект будет наблюдаться и при увеличении коэффициента ЛДР, поскольку этот процесс также способствует увеличению сниженной концентрации рецепторов на отдельных локусах нейрональной мембраны. Величина отношения амплитуды АХ-тока зависит от значений всех трех параметров: увеличение скорости ЭнР приводит к увеличению различий между ответами на первый и второй стимулы, а увеличение скорости ЭкР и коэффициента ЛДР, наоборот, к их уменьшению. Таким образом, активизация процессов, приводящих к увеличению скорости ЭнР, будет приводить к увеличению межстимульных интервалов и, следовательно, времени, необходимого для восстановления первоначальной концентрации мембранных рецепторов. В свою очередь, активизация процессов, приводящих к увеличению скорости ЭкР, и увеличение коэффициента ЛДР будут

приводить к противоположным эффектам. Исследования влияния блокаторов ряда протеинкиназ и протеинфосфатаз на депрессию и восстановление вызванного АХ входящего тока командных нейронов оборонительного поведения показали, что основной мишенью протеинкиназ и протеинфосфатаз является транспортная система нейрона – цитоскелет и моторные белки [2,4]. От состояния этой транспортной системы зависят скорости ЭнР и ЭкР, а от плотности примембранного актинового матрикса зависит коэффициент ЛДР. Поскольку при проведении исследований часто используются препараты, влияющие на активность разных протеинкиназ и протеинфосфатаз, состояние примембранного матрикса и состав мембраны, то кривые парной стимуляции могут различаться как межстимульными интервалами, так и минимальным отношением амплитуды входящего трансмембранного тока нейронов в ответ на второй стимул по отношению к амплитуде тока в ответ на первый стимул. Следовательно, будут различаться и минимальные межстимульные интервалы, начиная с которых парное отношение близко к единице.

Как следует из результатов математического моделирования, расчетные кривые (рис. 4,5) отличаются от экспериментальной кривой (рис. 2) величинами межстимульных интервалов и парного отношения, поскольку отдельные параметры модели из-за недостатка имеющихся экспериментальных значений для нейронов моллюска брались из существующего диапазона значений ряда внутриклеточных процессов [5]. Проведенные исследования позволили уточнить параметры существующей математической модели и определить возможные временные характеристики транспортных процессов для нейронов виноградной улитки: коэффициент ЛДР $D_0 = 0,2 \text{ мкм}^2/\text{с}$, постоянную времени ЭнР $\tau_1 \approx 3 \text{ мин}$, постоянную времени ЭкР $\tau_2 \approx 12 \text{ мин}$. В результате такой коррекции параметров модели полученная расчетная кривая соответствует экспериментальной кривой (рис. 2). Изменения в два–три раза параметров существующей модели связаны с тем, что, несмотря на наличие их экспериментально определенного диапазона, точные значения могут варьировать в зависимости от состояния нейрона, типов рецепторов, структуры мембраны и еще ряда факторов. Так, например, экспериментально определенные значения коэффициента латеральной диффузии мембранных рецепторов различаются в 10 раз [11]. В этих же пределах лежит и диапазон изменения других параметров. Параметры существующей модели выбирались из этого диапазона на основании экспериментальных дан-

ных по исследованию депрессии АХ-тока, и их корректировка также лежит в этих границах. Уточненная математическая модель будет использована для анализа экспериментальных результатов в наших дальнейших исследованиях механизмов депрессии чувствительности к ацетилхолину командных нейронов оборонительного поведения виноградной улитки на клеточном аналоге привыкания.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментальная кривая восстановления вызванного ацетилхолином тока при парной стимуляции позволяет определить наименьший межстимульный интервал, начиная с которого парное отношение близко к единице.

2. Анализ с помощью математической модели экспериментальной зависимости отношения трансмембранных токов при парной стимуляции позволяет предположить, что основным процессом, определяющим вид этой зависимости, является изменяющийся при стимуляции эндоцитоз мембранных рецепторов. Зависимость скорости эндоцитоза от времени может являться следствием активизации ряда внутриклеточных процессов после подачи стимула (апликации медиатора).

3. Результаты моделирования позволяют считать, что величина отношения трансмембранных токов при парной стимуляции и межстимульный интервал, при котором наблюдается минимальное значение этого отношения, зависят от экзоцитоза рецепторов и их латеральной диффузии по мембране.

4. Основываясь на результатах математического моделирования и результатах ранее проведенных исследований депрессии ацетилхолинового тока полагаем, что аналогичные кривые восстановления вызванного ацетилхолином тока при парной стимуляции и интервал между стимулами, начиная с которого парное отношение близко к единице, могут различаться в экспериментах с участием блокаторов протеинкиназ и протеинфосфатаз, влияющих на эндоцитоз, экзоцитоз или латеральную диффузию мембранных рецепторов.

5. Результаты моделирования позволяют определить возможные временные диапазоны транспортных процессов (эндоцитоза и экзоцитоза) рецепторов и коэффициент латеральной диффузии мембранных рецепторов для нейронов виноградной улитки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. А. Махновский, М. С. Третьякова и др., Журн. высш. нервн. деятельности **60** (2), 244 (2010).
2. Д. А. Махновский, Г. Б. Мурзина и др., Журн. высш. нервн. деятельности **61** (4), 459 (2011).
3. А. С. Пивоваров, Н. А. Васильева и др., Журн. высш. нервн. деятельности **62** (2), 222 (2012).
4. А. С. Пивоваров, Г. Б. Мурзина и др., Журн. высш. нервн. деятельности **63** (2), 256 (2013).
5. Г. Б. Мурзина, Биофизика **58** (3), 516 (2013).
6. В. Н. Иерусалимский и И. С. Захаров, Журн. высш. нервн. деятельности **42** (6), 1075 (1992).
7. О. А. Максимова, П. М. Балабан, *Нейронные механизмы пластичности поведения* (Наука, М., 1983).
8. В. К. Cole, M. Curto, et al., *Mol. Cell. Biol.* **28**, 1274 (2008).
9. Г. Б. Мурзина, Журн. высш. нервн. деятельности **60** (3), 261 (2010).
10. A. S. Pivovarov and R. J. Walker, *Regulatory Peptides* **67** (3), 169 (1996).
11. B. A. Earnshaw and B. A. Bressloff, *J. Neurosci.* **26**, 12362 (2006).

Recovery of Acetylcholine-induced Current in Molluscan Neurons During Paired-Pulse Stimulation: Analysis Using a Mathematical Model

G.B. Murzina*, A.S. Pivovarov, and D.A. Makhnovsky****

**Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
ul. Butlerova 5a, Moscow, 117485 Russia*

***Biology Department, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, 119991 Russia*

Using the method of paired-pulse stimulation, the experimental relation between paired-pulse ratio of acetylcholine-induced inward currents of *Helix lucorum* command neurons and interstimulus interval was discovered. A mathematical model, which takes into account the membrane and intracellular location of receptors, their lateral diffusion, the receptor endocytosis and exocytosis, depending on intracellular processes, was used for the analysis of the obtained experimental data. The influence of exocytosis and lateral diffusion of membrane receptors on the type of this dependence was investigated. According to model results, the endocytosis of membrane receptors is the basic process that determines the type of this dependence. More exact parameters of an existing mathematical model were obtained.

Key words: mathematical model, receptors, lateral diffusion, endocytosis, exocytosis, depression of cholin sensitivity, command neurons, paired-pulse stimulation, Helix lucorum