

УДК 612 (075.8);

## **МЕТОД РАСЧЁТА ДИНАМИКИ ЗАХВАТА И ВЫБРОСА КРАСИТЕЛЯ ДВИГАТЕЛЬНЫМ НЕРВНЫМ ОКОНЧАНИЕМ**

Захаров А.В., Котов Н.В.

*Казанский Государственный Университет, mphiszav@rambler.ru.*

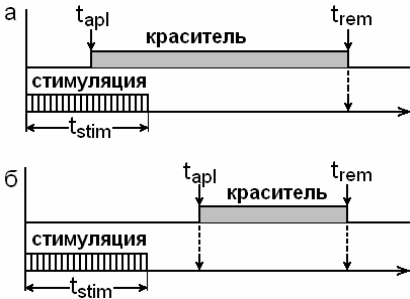
Знание молекулярных механизмов расходования и возобновления запасов медиатора в химическом синапсе в настоящее время не является полным. Методы, использующие флуоресцентные красители, позволили узнать много нового об организации синаптических везикул в нервных терминалах. Данные методы успешно применяются для изучения стационарных состояний синапса, а именно особенностей кластеризации везикул при разных видах активности [1, 2]. Однако, в силу свойств стироловых красителей типа FM, используемые подходы не могут обеспечить прямых данных о динамике расходования медиатора и его возобновления непосредственно во время работы синапса. Препятствие заключается в том, что при визуализации экзо- и эндоцитоза оба этих процесса одновременно дают вклад в регистрируемую картину [3]. Раздельное же наблюдение захвата и выброса красителя напрямую является сейчас практически нерешаемой экспериментальной задачей.

В данной работе предлагается способ постановки эксперимента и аналитической обработки данных для вычисления доли красителя, входящего в каждый момент времени в клетку и выходящего из неё. Основная идея метода заключается в том, что, если выразить скорость изменения количества красителя в клетке через разность двух взаимосвязанных функций  $d(t_{apl}, t) = d_{in}(t) - d_{out}(t_{apl}, t)$ , то при определённом способе проведения экспериментов появляется возможность вычисления отдельных вкладов захвата и выброса красителя в наблюдаемую динамику светимости терминалей. В приведённом выражении  $d_{in}(t)$  – скорость образования окрашенных везикул результате эндоцитоза,  $d_{out}(t_{apl}, t)$  – скорость выброса красителя при экзоцитозе везикул,  $t$  – время эксперимента,  $t_{apl}$  – момент аппликации FM.

### **Постановка эксперимента и обработка данных.**

Традиционный подход подразумевает аппликацию красителя на некоторый период во время стимуляции препарата либо после неё [4]. Предполагается, что в этот период происходит эндоцитоз и, следовательно, захват красителя в клетку. По интенсивности

флуоресцентного свечения судят о скорости и продолжительности эндоцитоза. Расходование запасов медиатора отслеживается по убыли свечения вследствие экзоцитоза окрашенных везикул. Для оценки временного хода эндоцитоза применяют аппликацию красителя на короткий период. При этом устанавливаемую светимость связывают



**Рис. 1.** Схема стимуляции препарата и аппликации красителя. **а.** Краситель добавляется во время стимуляции. **б.** Краситель добавляется после окончания стимуляции.

с данным небольшим отрезком времени работы синапса. Повышение точности измерения требует уменьшения периода аппликации. Однако сложно осуществить аппликацию, длящуюся менее одной минуты, без значительных погрешностей. Чем меньше интервал между моментами введения красителя в омывающий раствор и отмывки его, тем большую погрешность вносит растянутость процесса

установления стационарной концентрации красителя.

Для уменьшения погрешности предлагается производить отмывку красителя в момент, когда скорость изменения светимости становится минимальной, т.е. через несколько минут после прекращения стимуляции, когда эндоцитоз значительно замедляется. При этом определение искомых скоростей входа красителя в клетку и выхода из неё сведётся к решению системы уравнений. Эти уравнения свяжут значения скоростей в разные моменты со значениями светимости, полученными в экспериментах с различными вариантами загрузки красителя (рис. 1). В общем случае светимость запишется так:

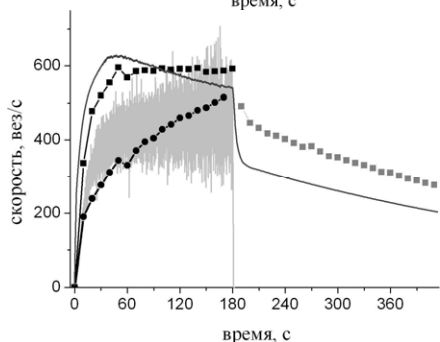
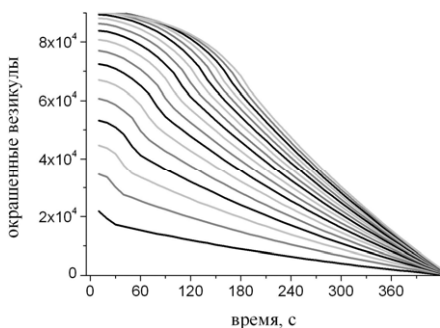
$$F(t_{apl}, t_{stim}) = \int_{t_{apl}}^{t_{stim}} d_{in}^{stim}(\xi) d\xi - \int_{t_{apl}}^{t_{stim}} d_{out}(t_{apl}, \xi) d\xi + \int_{t_{stim}}^{t_{rem}} d_{in}^{rest}(\xi, t_{stim}) d\xi \quad (1),$$

где  $F(t_{apl}, t_{stim})$  - светимость, полученная в эксперименте, в котором длительность стимуляции  $t_{stim}$ , а аппликация красителя произведена в момент  $t_{apl}$  после начала стимуляции,  $d_{in}^{stim}(t)$  – скорость входа красителя во время стимуляции,  $d_{out}(t_{apl}, t)$  – скорость выхода красителя,  $d_{in}^{rest}(t, t_{stim})$  – скорость входа красителя после окончания стимуляции,  $t_{rem}$  – момент удаления красителя. Для определения всех значений искомых скоростей необходимо провести серию экспериментов, в которых

последовательно изменяется продолжительность стимуляции и время аппликации красителя (рис. 1). Поскольку в реальном эксперименте шаг изменения продолжительности стимуляции (или момента аппликации красителя) -  $\Delta t$  - конечный, то получим следующую систему уравнений:

$$F(t_i^{apl}, t_j^{stim}) = \sum_{m=i}^j d_{in}^{stim}(t_m) \cdot \Delta t - \sum_{n=i+1}^j d_{out}(t_i, t_n) \cdot \Delta t + \sum_{k=j>i}^{N_j} d_{in}^{rest}(t_j, t_k) \cdot \Delta t \quad (2),$$

где  $d_{in}^{stim}$ ,  $d_{out}$  и  $d_{in}^{rest}$  - неизвестные,  $m, n, k$  - индексы, обозначающие



**Рис. 2.** Результаты вычислительных экспериментов. Подробнее в тексте.

соответствующие времена аппликации и стимуляции,  $i$  и  $j$  - индексы перебора моментов окончания стимуляции и аппликации красителя соответственно,  $N_j$  - количество моментов аппликации красителя,  $\Delta t$  - шаг по времени. Чем точнее требуется определить функции, тем больше экспериментов необходимо провести, и тем большую размерность имеет матрица системы.

Проверка метода на модели синапса. Ранее нами была построена модель химического синапса, позволяющая воспроизводить эффекты расходования и возобновления запасов медиатора в клетке при заданных параметрах функционирования синапса. Описанный алгоритм

применён к модельным экспериментам. На рисунке 2 приведены результаты вычисления искомых зависимостей с применением изложенной идеи. На верхнем графике показана зависимость светимости от времени аппликации красителя. Разные линии соответствуют разным по продолжительности стимуляциям. Нижний график - сравнение вычисленных скоростей образования окрашенных везикул в клетке

(чёрные и серые квадратики) и выброса их при стимуляции (чёрные кружки) с исходными кривыми (соответственно тёмная и светлая линии), полученными с помощью модели. Видно, что полученное решение достаточно точно согласуется с расчётной динамикой красителя.

Эксперименты, в которых изменяется только время аппликации красителя, а продолжительность стимуляции остаётся постоянной, также представляют интерес. В этом случае экспериментальных данных не достаточно, чтобы составить нужное число уравнений, но остаётся возможность качественного исследования кинетики рециклизации синаптических везикул. Уравнение  $d_{out}(t_{apl}, t) = \Phi(d_{in}(t), t_{apl})$ , выражающее причинно-следственную связь между процессами входа и выхода красителя, позволяет уменьшить количество неизвестных. Например, если  $d_{out}(t_{apl}, t)$  пропорциональна количеству окрашенных везикул в клетке в данный момент, то имеем

$$d_{out}(t_{apl}, t) = k \cdot \left( \int_{t_{apl}}^{t < t_{stim}} d_{in}^{stim}(\xi) d\xi - \int_{t_{apl}}^{t < t_{stim}} d_{out}(t_{apl}, \xi) d\xi \right) \quad (3),$$

где  $k$  – коэффициент пропорциональности. Таким образом, получаем возможность экспериментальной проверки гипотез о зависимости  $d_{out}(t_{apl}, t)$  от  $d_{in}^{stim}(t)$ . Эта зависимость во многом является ключевой для понимания механизмов рециклизации везикул. Следовательно предлагаемый подход может стать инструментом для изучения свойств механизмов экзо- эндоцитоза и рециклизации везикул в синапсах разных типов.

## ЛИТЕРАТУРА.

1. Betz W. J., Bewick G. S. Optical monitoring of transmitter release and synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction // J.Physiol. Lond. 1993. V. 460. P. 287-309.
2. Зефирова А. Л., Григорьев П. Н., Петров А. М., Минлебаев М. Г., Ситдикова Г. Ф. Прижизненное флуоресцентное исследование двигательного нервного окончания лягушки с использованием эндоцитозного маркера FM 1-43 // Цитология. 2003. Т. 45, № 12. С. 1163-1171.
3. Heuser J. E., Reese T. S. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction // J. Cell Biol. 1973. V. 57. P. 315-344.
4. Betz W. J., Mao F., Bewick G. S. Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. J. Neurosci. 12: 363-375. 1992.