

## ВЛИЯНИЕ ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОРГАНЕЛЬНОГО ДЕПО И БЕЗОРГАНЕЛЬНОГО ЦИТОЗОЛЯ НА ДИНАМИКУ УРОВНЕЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО КАЛЬЦИЯ В ДЕНДРИТЕ: МОДЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Поступила 07.02.09

На математических моделях, соответствующих тонкому фрагменту шипикового дендрита нейрона Пуркинье, изучена зависимость динамики уровней внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  от соотношения геометрических размеров отделов внутриклеточного пространства, обменивающихся кальцием. Плазматическая мембрана обладала характерными для данных нейронов ионными каналами, в том числе каналами, обеспечивающими возбуждающий синаптический ток, и ионным насосом. Модельные уравнения учитывали обмен кальция между цитозолем, внеклеточной средой, внутриклеточным депо (цистерной эндоплазматического ретикулума – ЭР), эндогенными кальциевыми буферами и экзогенным буфером – флуоресцентным красителем, используемым в экспериментах. Мембрана ЭР включала в себя кальциевый насос и каналы высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  (кальций- и инозитол-3-фосфатзависимого), а также каналы утечки. Оставляя размер компартмента фиксированным, варьировали диаметр цистерны ЭР таким образом, чтобы доля данной органеллы в общем объеме изменялась от 1 до 36 %. При этом идентичное синаптическое возбуждение порождало одинаковые электрические реакции (кальциевые пики), но разные концентрационные ответы. Равные приращения диаметра ЭР приводили к неравным, более выраженным при больших диаметрах, приращениям пиковых цитозольных концентраций  $\text{Ca}^{2+}$  [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> и комплекса  $\text{Ca}^{2+}$ – флуоресцентный краситель [CaD], а также концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ЭР дендрита (характеризуемой отклонением от базального уровня,  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ ). Изменения [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> и [CaD] в большей мере следовали изменениям безорганельного объема цитозоля, а  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  – изменениям площади мембраны ЭР. Следовательно, относительная наполненность внутриклеточного объема дендритного компартмента органельными кальциевыми депо и их размер являются важными структурными факторами, существенно модулирующими динамику уровней кальция, и эта структурная зависимость может адекватно отображаться в экспериментах с флуорофором.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** шипиковый дендрит, перенос ионов, динамика уровня  $\text{Ca}^{2+}$ , субклеточная геометрия, эндоплазматический ретикулум, кальциевые буферы, флуоресцентный краситель.

### ВВЕДЕНИЕ

В нервных клетках многие фундаментальные процессы – высвобождение нейротрансмиттеров, интеграция входных влияний в дендритах, экспрессия генов, клеточная дифференцировка, синаптическая пластичность, апоптоз и др. – запускаются или мо-

дулируются проходящими изменениями внутриклеточной концентрации свободного кальция – кальциевыми транзиентами [1–4]. Эти транзиенты обусловлены обменом кальция как между нейроном и внеклеточной средой, так и внутри клетки, с участием внутриклеточных буферов и органельных депо. Закономерности таких изменений являются предметом не только экспериментальных, но и теоретических модельных исследований [5, 6]. Усилия исследователей пока направлялись в основном на

<sup>1</sup> Днепропетровский национальный университет (Украина).  
Эл. почта: dnipro@biph.kiev.dp.ua (С. М. Корогод);  
ber\_linn@yahoo.com (Т. С. Новородовская).

выяснение связи локальной кальциевой динамики с кинетическими характеристиками реакций буферизации и переноса кальция через каналы и насосы плазматической мембраны и мембран внутриклеточных депо. Влияние же геометрических факторов на кальциевую динамику практически не изучалось.

Известно, что в процессе нормального развития и при разных видах клеточной патологии могут происходить значительные изменения размера и численности внутриклеточных органелл, а также размера и формы клеток в целом. В данном случае могут существенно изменяться отношения между обменивающимися кальцием объемами внутриклеточного пространства и разделяющими их поверхностями (мембранами), через которые осуществляется такой обмен. Это, в свою очередь, может заметно влиять на интенсивность концентрационных кальциевых сигналов. Поскольку экспериментальные морфометрические, физиологические и биохимические исследования упомянутого выше аспекта кальциевой динамики крайне трудоемки, представлялось вероятным, что важную новую информацию об указанной динамике можно получить, применяя такой комплементарный подход, как математическое моделирование.

Перед нашим исследованием был поставлен основной вопрос, как внутриклеточная кальциевая динамика зависит от соотношения геометрических размеров отделов внутриклеточного пространства, обменивающихся кальцием и занимаемых цитозолем, буферами и органельными депо. Объект данного исследования представлял собой математическую модель тонкого цилиндрического фрагмента нервной клетки, размеры и биофизические свойства которого подобны описанным для дендритных стволов и шипиков нейронов Пуркинье мозжечка. Основания для выбора именно этого объекта были следующими.

Нейроны Пуркинье являются относительно доступным и потому достаточно распространенным объектом натуральных экспериментов *in vitro* [7–10] и модельных исследований [11–13]. Результаты цитируемых работ свидетельствовали о важной функциональной роли кальциевой динамики в дендритах и позволили установить многие локальные кинетические характеристики соответствующих процессов. В недавних исследованиях на моделях реконструированных нейронов [14, 15] было показано существенное значение особенностей глобальной дендритной геометрии (в частности, метрической

асимметрии) для формирования специфических пространственно-временных паттернов электрических и концентрационных сигналов в масштабах целого дендритного разветвления, однако значение локальных геометрических соотношений для этих процессов не было выяснено.

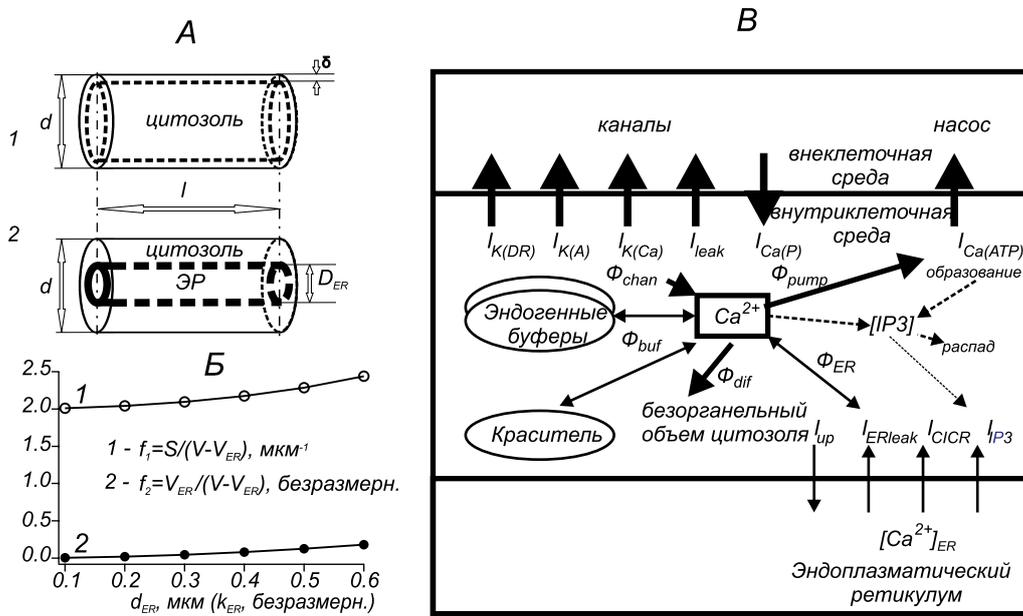
В дендритных стволах и шипиках нейронов Пуркинье присутствует эндоплазматический ретикулум (ЭР) [16–18] – один из видов органельных депо, играющих значительную роль в динамике внутриклеточного кальция [19]. ЭР – структурно динамичная органелла; его размеры и форма в разных физиологических состояниях изменяются [18, 20]. Такая же структурная (геометрическая) изменчивость присуща и шипикам [21–23].

И, наконец, в дендритах нейронов Пуркинье присутствуют и существенно влияют на кальциевую динамику эндогенные буферы – такие кальцийсвязывающие протеины, как кальмодулин, парвальбумин и др. [24–26].

Сведения о геометрических соотношениях ЭР и клеточных компартментов, в которых он содержится, скудны. Практически лишь в одной работе [27] приведены морфометрические расчеты доли ЭР в объеме дендритного шипика; полагают, что она в норме составляет до 17 %. Ввиду такой неопределенности при моделировании мы варьировали этот параметр в более широких пределах – до 36, а в части экспериментов – до 64 %. Наши результаты показали, что структурные факторы заметно влияют на кальциевую динамику; данное влияние усиливается с увеличением доли ЭР в объеме дендритного компартмента. Следовательно, кальциевая динамика и связанные с ней процессы дендритной интеграции сигналов могут в существенной мере зависеть от такого структурного параметра дендритных стволов и шипиков, как относительный объем, занимаемый ЭР, а также от изменений этих структурных характеристик, которые отмечаются в условиях не только нормального развития, но и клеточной патологии. Очевидно, что такие изменения зависят от уровня активности мозга, нейронной пластичности и др.

## ОПИСАНИЕ МОДЕЛЕЙ

Исследования были выполнены на двух типах однокompартментных моделей, соответствующих цилиндрическому фрагменту тонкого (шипикового) дендрита нейронов Пуркинье мозжечка (рис. 1).



**Р и с. 1.** Модели дендритного компартмента нейрона Пуркинье мозжечка. На *A*: 1, 2 – геометрия моделей 1 и 2; модель 2 учитывает обмен кальция между цитозолем, внутриклеточными буферами и эндоплазматическим ретикулом (ЭР). *B* – геометрические коэффициенты, определяющие обмен кальция между цитозолем и внеклеточной средой (1) и ЭР (2) при разных диаметрах (*d*) внутрикомпарментной цистерны ЭР в модели 2. *B* – схема мембранных и внутриклеточных механизмов дендритного компартмента. Мембранные механизмы являются общими для моделей 1 и 2; внутриклеточные кальциевые механизмы учтены лишь в модели 2. Подробные объяснения в тексте.

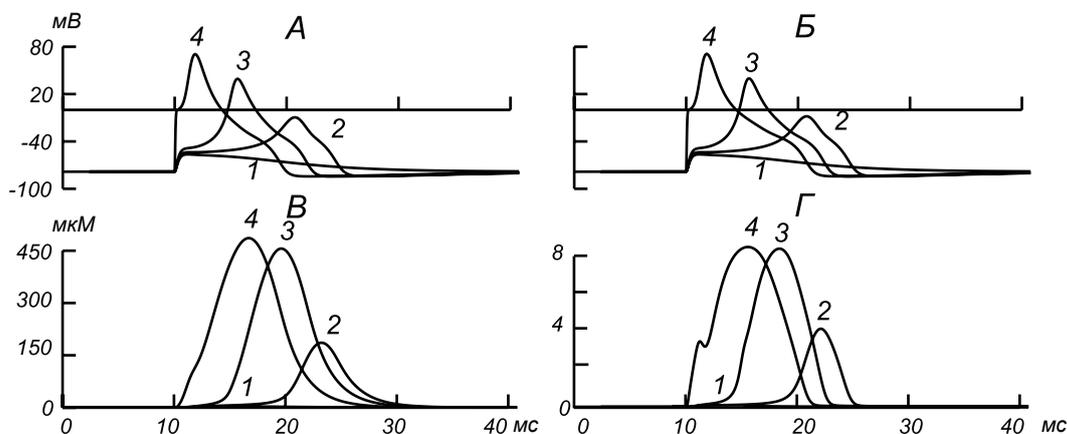
**Р и с. 1.** Моделі дендритного компартмента нейрона Пуркін'є мозочка.

В структуре модели 1 ЭР отсутствовал, а в структуре модели 2 – присутствовал (*A*, 1 и 2 соответственно). Во всех случаях диаметр и длина компартмента были выбраны следующими:  $d = 1$  мкм;  $l = 31.831$  мкм, так что площадь мембраны и объем компартмента составляли:  $S = \pi \cdot d \cdot l = 100$  мкм<sup>2</sup> и  $V = \pi \cdot d^2 \cdot l / 4 = 25$  мкм<sup>3</sup> соответственно. ЭР был представлен цилиндрической цистерной той же протяженности  $l$ , что и сам компартмент. Диаметр части дендрита, занимаемой ЭР ( $d_{ER}$ ), варьировал от 0.1 до 0.6 мкм с шагом 0.1 мкм, диаметр же дендритного компартмента  $d$  оставался фиксированным. Ввиду этого доля объема ЭР в объеме компартмента  $V_{ER}/V$  при увеличении  $d_{ER}$  возрастала от 1 до 36 %. Соответственно изменялись и входящие в уравнения модели 2 (см. ниже) характеристические геометрические соотношения: отношение площади плазматической мембраны к безорганельному объему цитозоля  $S/(V - V_{ER})$  и отношение объемов ЭР и цитозоля  $V_{ER}/(V - V_{ER})$  (*B*, кривые 1 и 2).

В обеих моделях плазматическая мембрана включала в себя ионные каналы и насосы (схема на рис. 1, *B*, толстые стрелки), характерные для мем-

браны дендритов названных нейронов и описываемые так же, как и в наших предыдущих работах [14, 15]. Такая мембрана обладала каналами входящего кальциевого тока Р-типа ( $I_{Ca(P)}$ ), выходящего калиевого тока задержанного выпрямления ( $I_{K(DR)}$ ), А-типа ( $I_{K(A)}$ ), кальцийзависимого тока ( $I_{K(Ca)}$ ) и неспецифического тока утечки ( $I_{leak}$ ), а также кальциевым насосом –  $Ca^{2+}$ -АТФазой ( $I_{Ca(ATP)}$ ). Общим для обеих моделей был также вид стимуляции – активация потенциалнезависимого возбуждающего синаптического тока  $I_s = G_s(t)(E - E_s)$  путем внесения изменяющейся во времени  $t$  электропроводности  $G_s(t) = G_s f(t)$ , где  $G_s$  – пиковое значение. Деполяризационный равновесный потенциал для данной электропроводности  $E_s$  составлял 0 мВ. Иначе говоря, рассматривался аналог глутаматергического синапса АМРА-типа. Зависимость синаптической электропроводности от времени была асимметричной колоколообразной и описывалась так называемой альфа-функцией (уравнение 1.1 [28]).

Модели 1 и 2 существенно различались описанием динамики внутриклеточного кальция. В модели 1 рассматривались изменения концентрации  $Ca^{2+}$  в



**Р и с. 2.** Сравнение электрических (А, Б) и кальциевых концентрационных (В, Г) ответов на одиночное синаптическое возбуждение нарастающей интенсивности в моделях 1 (А, Б) и 2 (Б, Г) дендритного сегмента нейрона Пуркинье. А, Б – изменения мембранного потенциала (мВ), В и Г – внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  (мкМ) во времени (мс). Пиковая синаптическая проводимость для графиков 1–4 составляла 0.7, 0.8, 1.0 и 50 нС соответственно. Нуль на оси абсцисс соответствует началу деполяризующего толчка тока.

**Р и с. 2.** Порівняння електричних (А, Б) і кальцієвих концентраційних (В, Г) відповідей на поодинокі синаптичне збудження наростаючої інтенсивності в моделях 1 (А, Б) і 2 (Б, Г) дендритного сегмента нейрона Пуркін'є.

тонком (толщина  $\delta = 0.1$  мкм) примембранном слое. Данная концентрация увеличивалась при генерации трансмембранного тока  $I_{Ca(P)}$  и уменьшалась под действием насоса  $I_{Ca(ATP)}$ , а также за счет спада до базального уровня ( $[Ca^{2+}]_b = 40$  нМ) с определенной постоянной времени. Это было эквивалентно диффузии  $\Phi_{diff}$  из примембранного слоя в более глубокие слои цитоплазмы и могло также рассматриваться как *невяное* отображение общего действия всех внутриклеточных кальцийсвязывающих механизмов (так, как представлялось в ряде работ [11, 12, 14, 15]). Модель 2 в *явном* виде учитывала обмен  $Ca^{2+}$  между цитозолем, внеклеточной средой, внутриклеточным депо (в качестве которого выступал ЭР), эндогенными протеиновыми буферами («быстрым» – кальмодулином и «медленным» – парвальбумином), а также флуоресцентным красителем (D, dye) – Fura-4, обладающим свойствами экзогенного буфера. Обмен  $Ca^{2+}$  с ЭР происходил благодаря потокам данных ионов через органелльные насосы и каналы: поглощения ( $\Phi_{up}$ ), пассивной утечки ( $\Phi_{ER leak}$ ), а также высвобождения  $Ca^{2+}$ , индуцированного кальцием ( $\Phi_{CICR}$ ), и высвобождения  $Ca^{2+}$  через каналы, чувствительные к инозитол-3-фосфату [IP3] ( $\Phi_{IP3}$ ). Учитывались также процессы продукции/распада IP3 (сдвиги [IP3]) и процессы буферизации  $Ca^{2+}$  ( $\Phi_{buf}$ ) и его диффузии в соседние компартменты ( $\Phi_{diff}$ ). Уравнения, описывающие

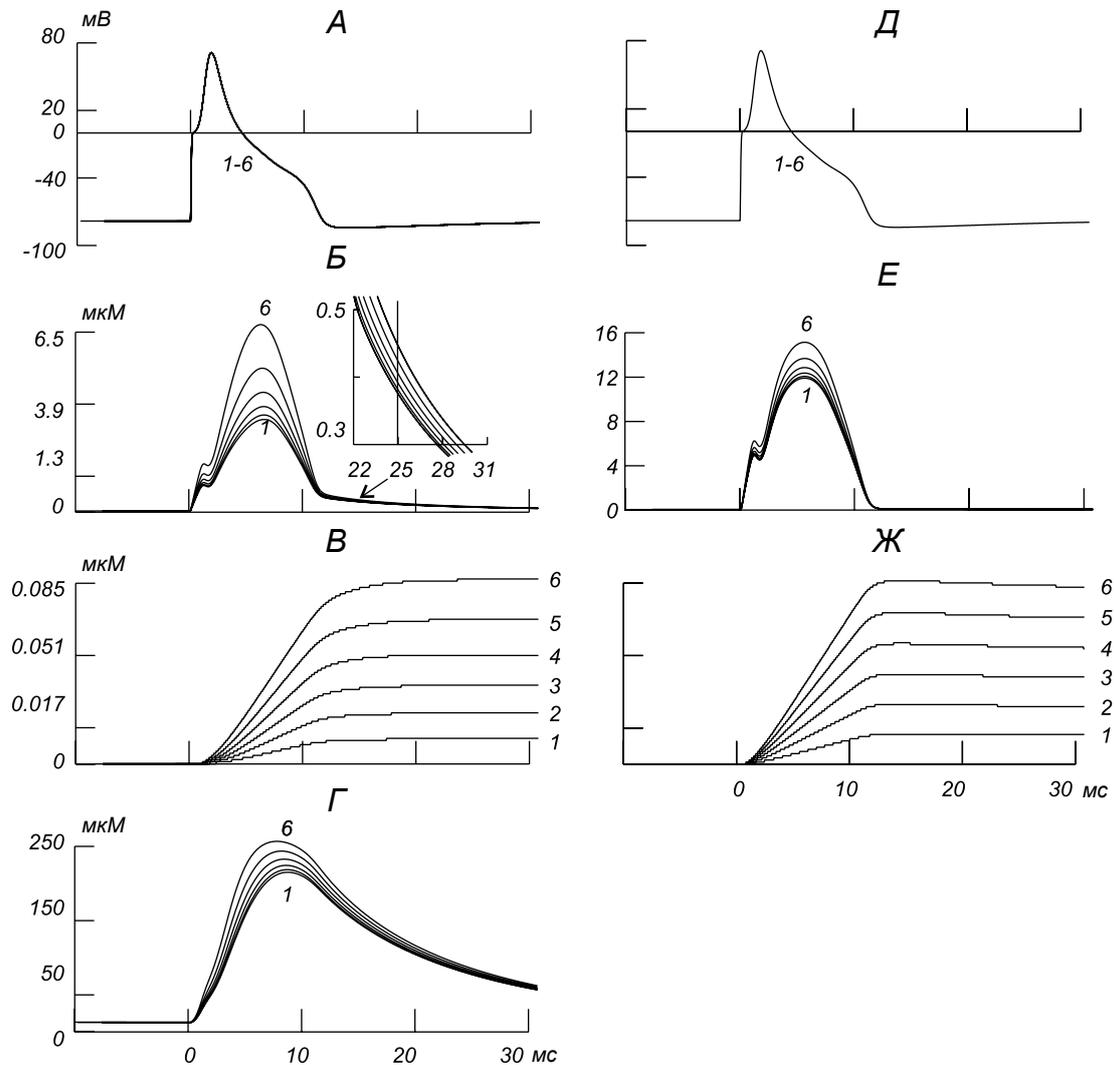
$\Phi_{up}$ ,  $\Phi_{ER leak}$ ,  $\Phi_{CICR}$ ,  $\Phi_{IP3}$ ,  $\Phi_{buf}$ , а также динамику [IP3] и буферов, были такими же, как в модели нейрона Пуркинье, представленной Де Шуттером и Смоленом [29], уравнение  $\Phi_{diff}$  – как в модели 1. Параметры буферов и флуорофора были взяты из опубликованных работ [5, 30–32].

Основными переменными, характеризующими поведение моделей, были трансмембранный потенциал ( $E$ ), концентрации кальция в цитозоле и ЭР ( $[Ca^{2+}]_i$  и  $[Ca^{2+}]_{ER}$  соответственно), а также концентрация комплекса кальций – флуорофор [CaD], которую можно использовать для опосредованной оценки интенсивности сигнала флуоресцентного зонда. Наряду с основными переменными вычислялись изменения концентрации всех свободных эндогенных и экзогенных буферов, связанных с  $Ca^{2+}$ . Изменения во времени переменных состояний описывались приведенными ниже обыкновенными дифференциальными уравнениями.

М о д е л и 1 и 2:

$$\frac{dE}{dt} = (I_{Ca(P)} + I_{K(DR)} + I_{K(A)} + I_{K(Ca)} + i_{leak} + I_{Ca(ATP)} + I_S) / C_m, \quad (1)$$

где  $C_m$  – емкость единицы поверхности плазматической мембраны (трансмембранные токи  $I$  также отнесены к единице поверхности).



**Р и с. 3.** Влияние относительного размера кальциевого депо в дендритном компартменте на динамику уровня  $\text{Ca}^{2+}$  при идентичной высокой интенсивности возбуждающей синаптической активации (50 нС).

*A–Г* и *Д–Ж* – при наличии и в отсутствие кальцийчувствительного флуорофора соответственно. *A, Д* – изменения во времени (мс) мембранного потенциала (мВ), *Б, Е* – внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (мкМ), *В, Ж* – концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ЭР (мкМ), *Г* – концентрации комплекса  $\text{Ca}^{2+}$ –флуорофор (мкМ). Кривые 1–6 получены при значениях относительного диаметра эндоплазматического ретикулума  $k_{\text{ER}} = d_{\text{ER}}/d$ , равных 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 и 0.6 соответственно.

**Р и с. 3.** Вплив відносного розміру кальцієвого депо в дендритному компартменті на динаміку рівня  $\text{Ca}^{2+}$  при ідентичній інтенсивності збуджуючої синаптичної активації (50 нС).

**М о д е л ь 1:**

$$d[\text{Ca}^{2+}]_i / dt = (I_{\text{Ca(P)}} + I_{\text{Ca(ATP)}}) / (z_{\text{Ca}} F \delta) + ([\text{Ca}^{2+}]_i - [\text{Ca}^{2+}]_b) / \Phi_{\text{diff}} \quad (2)$$

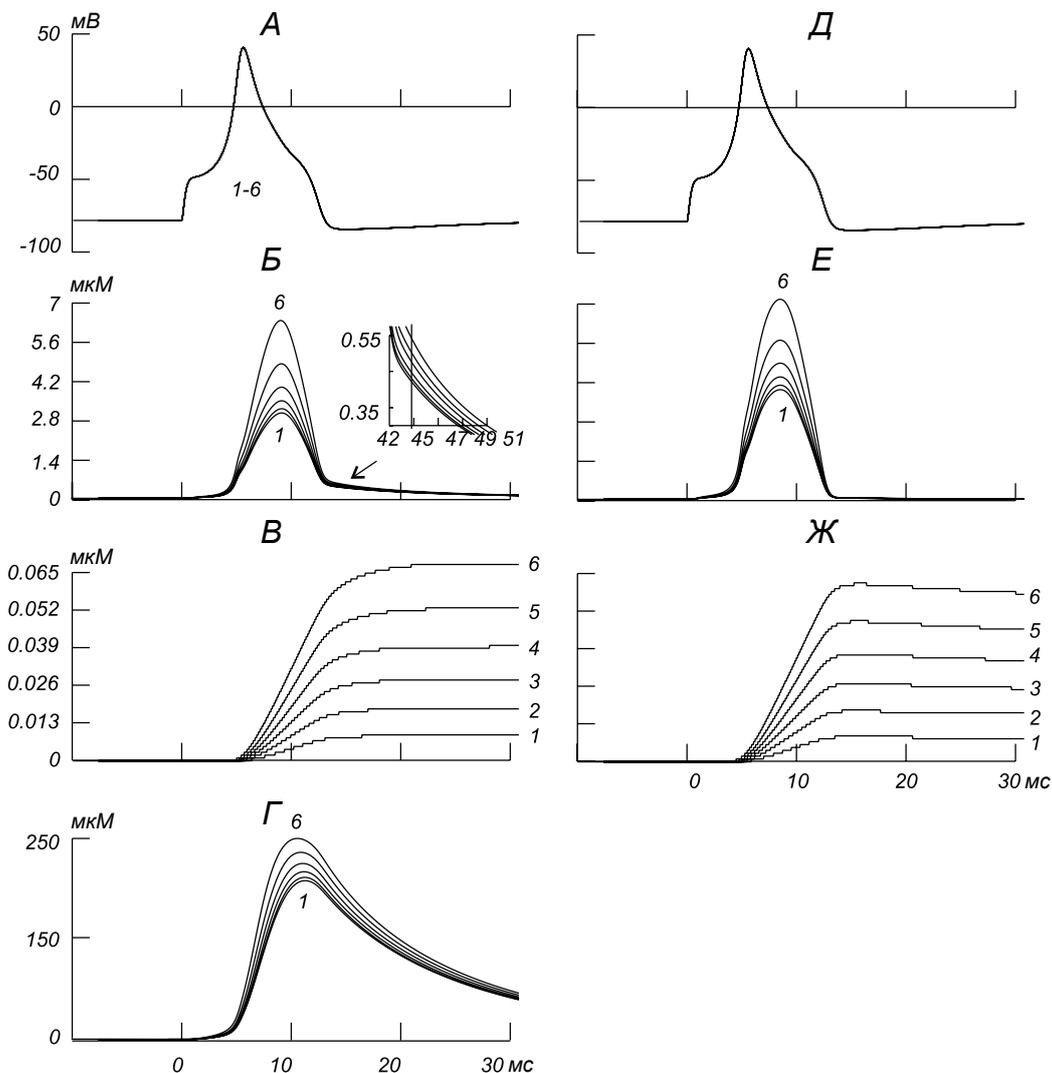
где  $z_{\text{Ca}} = 2$  – валентность иона кальция,  $F$  – постоянная Фарадея.

**М о д е л ь 2:**

$$d[\text{Ca}^{2+}]_i / dt = -(S/V_{\text{cyt}})(I_{\text{Ca(P)}} + I_{\text{Ca(ATP)}}) / (z_{\text{Ca}} F) - (V_{\text{ER}}/V_{\text{cyt}}) d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}} / dt - \Phi_{\text{buP}} \quad (3)$$

$$d[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}} / dt = S_{\text{ER}}(\Phi_{\text{up}} - \Phi_{\text{ER leak}} - \Phi_{\text{CICR}} - \Phi_{\text{IP}_3}), \quad (4)$$

где потоки обмена кальция в системе “цитозоль – ЭР”  $\Phi_{\text{up}}$ ,  $\Phi_{\text{ER leak}}$ ,  $\Phi_{\text{CICR}}$  и  $\Phi_{\text{IP}_3}$  отнесены к единице поверхности мембраны ЭР ( $\text{M} \cdot \text{mkm}^{-2} \cdot \text{ms}^{-1}$ );  $S$  и  $S_{\text{ER}}$  – площади ( $\text{mkm}^2$ ) мембраны дендритного компартмента и заключенной в нем цистерны ЭР соответственно;  $V_{\text{cyt}} = V - V_{\text{ER}}$  – объем цитозоля, измеряемый в литрах (т. е.  $1 \text{ дм}^3 = 10^3 \text{ см}^3 = 10^{15} \text{ мкм}^3$ ) и определяемый объемом дендритного компартмента



**Р и с. 4.** Влияние относительного размера кальциевого депо на динамику уровня  $\text{Ca}^{2+}$  при низкой интенсивности возбуждающей синаптической активации (1 нС), приблизительно соответствующей эффекту высвобождения нейротрансмиттера из двух синаптических везикул. Обозначения те же, что и на рис. 3.

**Р и с. 4.** Вплив відносного розміру кальцієвого депо на динаміку рівня  $\text{Ca}^{2+}$  при низькій інтенсивності збуджуючої синаптичної активації (1 нС), приблизно відповідній ефекту вивільнення нейротрансмітера з двох синаптичних везикул.

( $V$ ) за вычетом объема содержащейся в нем части ЭР ( $V_{\text{ER}}$ ).

В этой модели динамика связывания кальция с эндогенными буферами  $[\text{B}_1]$  (парвальбумин) и  $[\text{B}_2]$  (кальмодулин), а также с флуорофором  $[\text{D}]$  (Fura-4F) описывалась одинаковыми уравнениями:

$$d[\text{B}_1]/dt = K_{2\text{B}_1}[\text{CaB}_1] - K_{1\text{B}_1}[\text{Ca}^{2+}]_i[\text{B}_1], \quad (5)$$

$$d[\text{B}_2]/dt = K_{2\text{B}_2}[\text{CaB}_2] - K_{1\text{B}_2}[\text{Ca}^{2+}]_i[\text{B}_2], \quad (6)$$

$$d[\text{D}]/dt = K_{2\text{D}}[\text{CaD}] - K_{1\text{D}}[\text{Ca}^{2+}]_i[\text{D}], \quad (7)$$

где  $K_{1*}$  – константы скорости связывания свободного внутриклеточного кальция с буферами и красителем ( $\text{mM} \cdot \text{ms}^{-1}$ );  $K_{2*}$  – константы скорости распада комплексов  $[\text{CaB}_1]$ ,  $[\text{CaB}_2]$  и  $[\text{CaD}]$  ( $\text{ms}^{-1}$ ), а  $[\text{B}_1]$ ,  $[\text{B}_2]$  и  $[\text{D}]$  – концентрации свободных буферов и красителя в цитоплазме ( $\text{mM}$ ). Решение последнего уравнения  $[\text{D}]$  использовалось для расчета концентрации комплекса кальций–флуорофор:

$$[\text{CaD}] = [\text{D}]_{\text{tot}} - [\text{D}], \quad (8)$$

где  $[\text{D}]_{\text{tot}}$  – полная концентрация связанного с кальцием и свободного флуоресцентного красителя

**Т а б л и ц а 1. Параметры связывающих кальций буферов и флуоресцентного красителя**

**Т а б л и ц я 1. Параметри буферів та флуоресцентного барвника, що зв'язують кальцій**

Вещества	Константа скорости связывания, мМ · мс <sup>-1</sup>	Константа скорости распада, мс <sup>-1</sup>	Концентрация, мМ
Парвальбумин [B <sub>1</sub> ]	6	0.9 · 10 <sup>-3</sup>	0.54
Кальмодулин [B <sub>2</sub> ]	100	0.1	0.03
Fura-4F [D]	120	0.12	0.1

**Т а б л и ц а 2. Параметры концентрационных откликов при разных относительных размерах эндоплазматического ретикулума**

**Т а б л и ц я 2. Параметри концентраційних відкликів при різних відносних розмірах ендоплазматичного ретикулуму**

$k_{ER} = d_{ER}/d$	$[Ca^{2+}]_{i,peak}$ мкМ	$[Ca^{2+}]_{i,foot}$ мкМ	$\Delta[Ca^{2+}]_{ER}$ нМ	$[CaD]_{peak}$ мкМ
0.1	3.3462	0.374817	12	215.208
0.2	3.50812	0.380846	24	218.636
0.3	3.81209	0.390509	37	224.461
0.4	4.32621	0.404558	51	232.805
0.5	5.19659	0.422897	68	243.699
0.6	6.76876	0.445775	87	256.849

Пр и м е ч а н и е. Подробные объяснения в тексте.

внутри компартмента (аналог так называемой пепеточной концентрации в натуральных экспериментах). Кинетические характеристики буферов и красителя приведены в табл. 1.

Для того, чтобы дать полный ответ на основной вопрос работы, необходимы адекватные количественные оценки связи показателей динамики кальция и субклеточной геометрии. Детерминистический характер модели исключает возможность использования для этих целей статистических методов корреляционного и регрессионного анализов. Невозможно и получение в явном виде выражений, определяющих функциональные зависимости потенциала и концентраций реагентов от диаметра ЭР и/или более сложных геометрических характеристик (таких, как  $S/(V - V_{ER})$  или  $V_{ER}/(V - V_{ER})$ ), поскольку изменения вышеназванных переменных состояния – результат решения системы нелинейных дифференциальных уравнений высокого порядка, причем при помощи численных методов. В этих условиях мы использовали следующий подход к решению поставленной задачи. Используя известный вид функциональных зависимостей входящих в уравнения модели геометрических коэффициентов от абсолютного или относительного значения диаметра ЭР ( $d_{ER}$  или  $k_{ER} = d_{ER}/d$  соответственно; рис. 1, B):

$$f_1 = S/(V - V_{ER}) = (S/V)(1 - V_{ER}/V) = (4/d^2)/(1 - (d_{ER}/d)^2) = (4/d^2)/(1 - k_{ER}^2), \quad (9)$$

$$f_2 = V_{ER}/(V - V_{ER}) = (V_{ER}/V)(1 - V_{ER}/V) = (d_{ER}/d)^2/(1 - (d_{ER}/d)^2) = k_{ER}^2/(1 - k_{ER}^2) \quad (10)$$

для уравнений (3)

$$f_3 = S_{ER} = \pi \cdot d_{ER} \cdot l = (\pi \cdot d \cdot l) \cdot (d_{ER}/d) = (\pi \cdot d \cdot l) \cdot k_{ER} \quad (11)$$

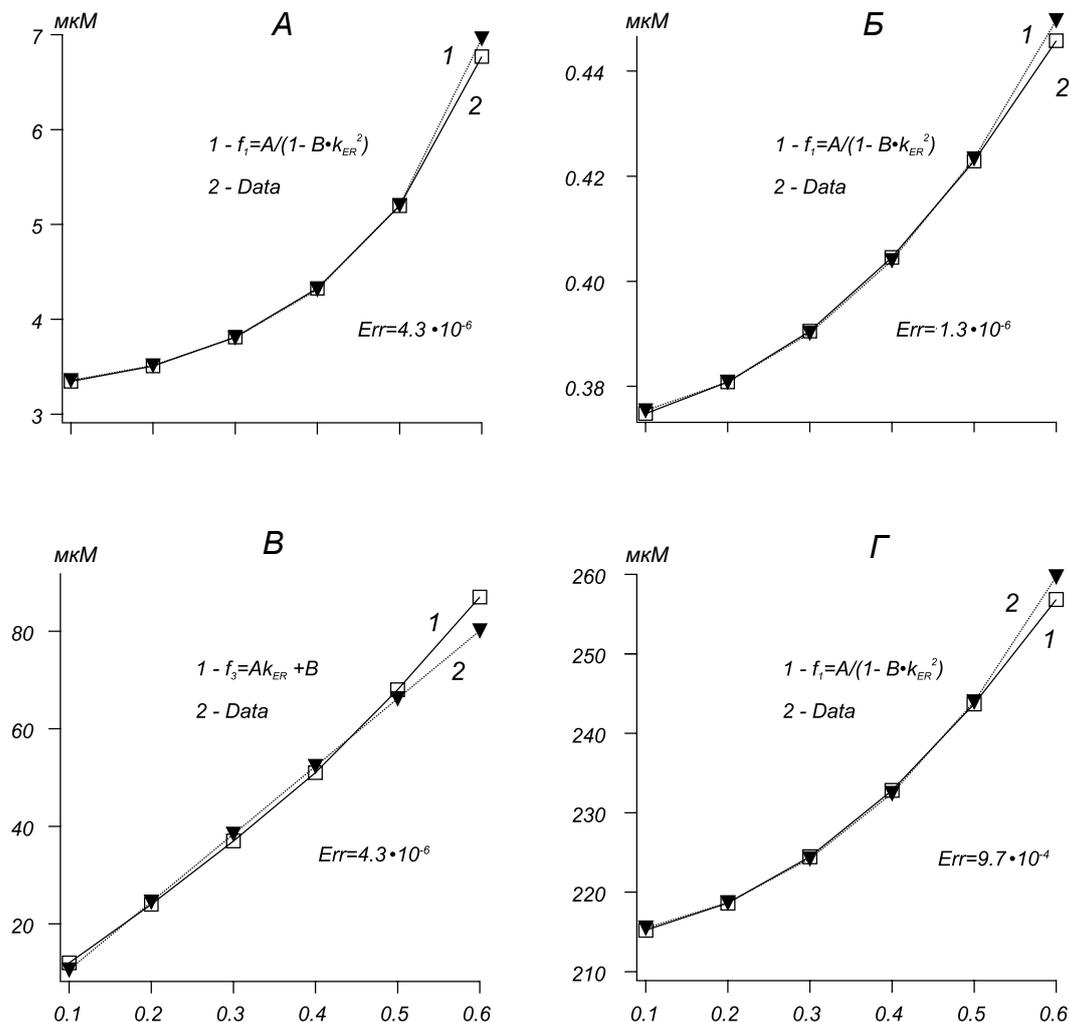
и (4), мы строили приближающие функции такого же вида с неизвестными коэффициентами  $A$  и  $B$ , а именно:

$$f_{1ap} = A/(1 - B \cdot k_{ER}^2), \quad (12)$$

$$f_{2ap} = A \cdot k_{ER}^2 / (1 - B \cdot k_{ER}^2), \quad (13)$$

$$f_{3ap} = A \cdot k_{ER} + B. \quad (14)$$

С использованием подгонки параметризованных функций подбирали такие значения неизвестных коэффициентов (параметров), которые дают наилучшее (в аспекте минимума средних квадратов отклонений) приближение функций  $f_{1ap}$  и  $f_{2ap}$  (уравнения 12 и 13) и  $f_{3ap}$  (уравнение 14) к табулированным результатам вычислительных экспериментов для одинаковых значений независимой переменной



**Р и с. 5.** Подобие изменений параметров кальциевых сигналов (рис. 3) и геометрических параметров субклеточных поверхностей и объемов при изменении относительного размера кальциевого депо.

*A–Г* – зависимости концентраций цитозольного  $Ca^{2+}$  на пике подъема  $[Ca^{2+}]_{i, peak}$ , мкМ (*A*), концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле в фазе медленного спада  $[Ca^{2+}]_{i, foot}$ , мкМ (*Б*), максимального превышения базального уровня концентрации  $Ca^{2+}$  в эндоплазматическом ретикуле (ЭР)  $\Delta[Ca^{2+}]_{ER}$ , мкМ (*В*) и пиковой концентрации комплекса  $Ca^{2+}$ –флуорофор  $[CaD]_{peak}$ , нМ (*Г*) от относительного диаметра ЭР  $k_{ER} = d_{ER}/d$ . 1 – значения приближающих функций, 2 – значения указанных параметров.

**Р и с. 5.** Подібність змін параметрів кальцієвих сигналів (рис. 3) і геометричних параметрів субклітинних поверхонь та об'ємів при зміні відносного розміру кальцієвого депо.

$d_{ER}$  (или  $k_{ER}$ ). Сравнивая полученные при этом средние квадратические ошибки, оценивали, какой вид приближающей функции в наибольшей мере соответствует данным вычислительного эксперимента.

Построение и исследование моделей осуществляли в программной среде моделирования «НЕЙРОН» [25]. Входящий в эту же среду инструмент подгонки параметризованных функций Function-Fitter использовали для построения и анализа приближающих функций и оценки меры приближения к данным вычислительных экспериментов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Реакции на синаптическое возбуждение у моделей с неявным и явным описаниями депонирования  $Ca^{2+}$ .* Идентичное по своим характеристикам синаптическое возбуждение порождало в моделях 1 и 2 одинаковые электрические, но разные концентрационные «отклики» (рис. 2). Это наблюдалось в условиях разных интенсивностей синаптического действия, определяемых пиковыми значениями синаптической проводимости  $G_s$ . Так, при  $G_s = 0.7$ ,

0.8, 1.0 и 50.0 нС у обеих моделей деполяризационные смещения мембранного потенциала (*A*, *B*) были одинаковыми – от уровня покоя  $-78$  мВ до пиковых значений  $-56.5$ ,  $-6.7$ ,  $40$  и  $71$  мВ (*I–4* соответственно). Для этих деполяризационных ответов характерным было наличие раннего короткого («быстрого») низкоамплитудного компонента, за которым следовал более длительный («медленный») высокоамплитудный компонент. Первый компонент был обусловлен входящим синаптическим током, а второй – регенеративным входящим током через потенциалзависимые кальциевые каналы, т. е. по существу являлся кальциевым пиком (*A*, *B*). Соответственно уровню мембранной деполяризации, а значит и уровню активации кальциевых каналов и интенсивности входящего кальциевого тока, наблюдались разновеликие «всплески» внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (*B*, *Г*). При наименьшей синаптической интенсивности ( $G_s = 0.7$  нС) деполяризация мембраны (пиковое значение  $-56.5$  мВ) сопровождалась незначительным повышением цитозольной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  от базального уровня  $0.04$  мкМ до пикового значения  $[\text{Ca}^{2+}]_{i, \text{peak}} = 3.5$  мкМ в модели 1 и до  $0.06$  мкМ в модели 2 (*B*, *I*, *Г*, *Л*). При трех более высоких интенсивностях синаптической активации и деполяризационных откликах (см. выше) концентрационные всплески были более выражены, достигая больших пиковых значений  $[\text{Ca}^{2+}]_{i, \text{peak}} = 200, 459$  и  $488$  мкМ в тонком примембранном слое модели 1 и меньших  $[\text{Ca}^{2+}]_{i, \text{peak}} = 1.4, 3.3$  и  $3.5$  мкМ в цитозоле модели 2 (*B*, *Г*, *2–4* соответственно).

*Кальциевые сигналы при разных относительных размерах кальциевых депо.* В последующих вычислительных экспериментах на модели 2 исследовали влияние относительного размера ЭР на динамику  $[\text{Ca}^{2+}]$  при наличии (рис. 3, *A–Г*) и отсутствии (*Д–Ж*) флуорофора. Варьируя диаметр ЭР  $d_{\text{ER}}$  от  $0.1$  до  $0.6$  мкм, рассчитывали величины ответов на синаптическую активацию одинаковой интенсивности ( $G_s = 50$  нС) – изменения мембранного потенциала (*E*, мВ), внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , мкМ), приращение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ЭР по сравнению с базальным уровнем  $200$  мкМ ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ , мкМ), а также концентрацию комплекса  $\text{Ca}^{2+}$ – флуорофор ( $[\text{CaD}]$ , мкМ) (*A–Г*, *I–6* соответственно). Идентичное синаптическое возбуждение вызывало одинаковые электрические реакции в модельном компартменте дендрита (*A*, *Д*). Мембранный потенциал смещался от уровня покоя  $-78$  мВ до пикового значения  $71$  мВ. В данном случае, однако,

наблюдались различные концентрационные кальциевые ответы (*B–Г*, *E*, *Ж*; табл. 2). В компартментах с флуорофором (концентрация  $[\text{D}]_{\text{tot}} = 300$  мкМ) общим свойством «всплесков»  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  были наличие «быстрого» и «медленного» компонентов (*B*) и их неравномерное приращение (см. вставку для лучшей дифференциации приращений «медленного» компонента) при равномерном приращении  $d_{\text{ER}}$ . Соответствующие пиковые значения «быстрого» компонента  $[\text{Ca}^{2+}]_{i, \text{peak}}$  достигаемые приблизительно через  $6.5$  мс после включения стимула (*B*, *Л*), представлены в табл. 2. Для сравнения, в отсутствие флуорофора значения данного изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  были намного большими –  $11.9, 12.1, 12.4, 12.9, 13.7$  и  $15.2$  мкМ соответственно (*E*). Одновременно в ЭР увеличивалась концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ , после чего она медленно возвращалась к базальному уровню. При наличии флуорофора повышения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ЭР медленнее достигали максимальных значений, приведенных в табл. 2, и также медленнее спадали (*B*), чем в отсутствие флуорофора (*Ж*). Это согласуется с видом кривых нарастания и спада концентрации комплекса  $\text{Ca}^{2+}$ –флуорофор (*Г*). Данные графики показывают, что флуорофор вначале быстро связывал  $\text{Ca}^{2+}$ , а затем его высвобождал, тем самым вначале сокращая, а затем увеличивая ресурс  $\text{Ca}^{2+}$ , доступного для депонирования в ЭР. В отсутствие флуорофора (и, соответственно, без конкуренции за ресурс  $\text{Ca}^{2+}$ ) приращения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ЭР достигали несколько больших значений ( $0.014, 0.028, 0.042, 0.057, 0.071$  и  $0.086$  мкМ соответственно), и эти сдвиги быстрее переходили в фазу спада (*Ж*). Заметим, что равные инкременты диаметра ЭР обуславливали также разные значения приращений пиковой концентрации комплекса  $[\text{CaD}]$  (табл. 2).

Описанные выше результаты исследования наших моделей могут вызвать критические замечания из-за чрезмерно высоких значений интенсивностей моделируемого возбуждающего синаптического действия. Следует полагать, что данные значения заметно превышают наблюдаемые в условиях реального функционирования межнейронных синаптических соединений. Поэтому выявленные закономерности (рис. 3; табл. 2) были проверены при существенно более низкой интенсивности синаптической активации ( $G_s = 1.0$  нС). Такую интенсивность можно считать приблизительно соответствующей эффекту высвобождения нейромедиатора из двух везикул в ответ на приход одного пресинаптического импульса. При таких характеристиках сти-

мула кальциевый пик и, соответственно, концентрационные отклики следовали за синаптическим потенциалом с существенной задержкой (рис. 2, Б, Г, 3; рис.4). В то же время характер структурозависимости показателей кальциевой динамики в полной мере сохранялся (рис.4, Б-Г, Е, Ж).

*Модулирующее влияние субклеточной геометрии на кальциевые сигналы.* Представленные в предыдущем разделе данные были использованы для оценки связи количественных показателей субклеточной геометрии ( $k_{ER} = d_{ER}/d$ ) и динамики  $[Ca^{2+}]$ , характеризующейся цитозольными концентрациями на пике «быстрого» компонента ( $[Ca^{2+}]_{i, peak}$ ) и у его «подножия» ( $[Ca^{2+}]_{i, foot}$  – через 15 мс после начала стимула во время доминирования «медленного» компонента) (рис. 3, Б, основной график и вставка соответственно), максимального приращения концентрации  $Ca^{2+}$  в ЭР ( $\Delta[Ca^{2+}]_{ER}$ ) и пиковой концентрации комплекса  $Ca^{2+}$ -флуорофор ( $[CaD]_{peak}$ ) (рис. 3, В и Г соответственно). Значения перечисленных показателей, рассчитанные для шести значений  $d_{ER}$  в случае при интенсивности синаптической активации  $G_s = 50$  нС, сведены в табл. 2. Заметим, что при фиксированном значении диаметра компартмента  $d = 1$  мкм численные значения  $k_{ER}$  и  $d_{ER}$  совпадают. Для каждого из вышеназванных показателей кальциевой динамики строили три приближающие параметризованные функции, определяемые уравнениями (12–14). Затем осуществляли подгонку параметров  $A$  и  $B$  каждой функции до достижения минимума средних квадратических отклонений значений этой функции от значений показателя (для всего набора значений относительного диаметра ЭР). Сравнивая полученные значения средних квадратических ошибок, отбирали ту функцию, у которой ошибка приближения была наименьшей. На рис. 5 для каждого показателя кальциевой динамики представлен график, изображающий отобранную таким образом функцию и зависимость этого показателя динамики от относительного диаметра ЭР. Например, для такого показателя, как  $[Ca^{2+}]_{i, peak}$ , был получен следующий результат. Минимальная средняя квадратическая ошибка для приближающих функций  $f_{1ap}$ ,  $f_{2ap}$  и  $f_{3ap}$  составляла соответственно  $4.3054 \cdot 10^{-6}$  (достигнута при значениях параметров  $A = 3.307$  и  $B = 1.4577$ );  $0.014076$  ( $A = 981.67$  и  $B = 218.49$ ) и  $0.0023125$  ( $A = 4.5189$  и  $B = 2.6822$ ). Ошибка приближения в случае функции  $f_{1ap}$  очень мала сама по себе и на несколько порядков меньше, чем при использовании двух других функций. По такому признаку мы отобрали именно  $f_{1ap}$  как функцию,

наиболее близко отображающую зависимость данного показателя динамики от геометрии. Это может быть также наглядно проиллюстрировано наложением графика указанной функции на график зависимости  $[Ca^{2+}]_{i, peak}$  от  $k_{ER}$  ( $A$ ). Зависимость от  $k_{ER}$  у показателей  $[Ca^{2+}]_{i, foot}$  и  $[CaD]_{peak}$  наилучшим образом отображалась также функцией  $f_{1ap}$ , но с иными параметрами  $A$  и  $B$  (ошибки  $1.2871 \cdot 10^{-6}$  и  $1.3252 \cdot 10^{-6}$  соответственно), а у показателя  $\Delta[Ca^{2+}]_{ER}$  – функцией  $f_{3ap}$  (ошибка  $9.7702 \cdot 10^{-4}$ ) (Б–Г).

Следует отметить, что и в условиях пониженной интенсивности синаптической активации ( $G_s = 1$  нС) были получены количественные характеристики структурозависимости кальциевой динамики. Такие характеристики оценивались с помощью приближающих функций  $f_{1ap}$ ,  $f_{2ap}$  и  $f_{3ap}$ , которые в общем соответствовали значениям, полученным при  $G_s = 50$  нС. Так, именно функция  $f_{1ap}$  обеспечивала наименьшую ошибку приближения, причем с аналогичными порядками величин для тех же трех показателей кальциевой динамики  $[Ca^{2+}]_{i, peak}$ ,  $[Ca^{2+}]_{i, foot}$  и  $[CaD]_{peak}$  (значения ошибок составляли  $1.4841 \cdot 10^{-6}$ ,  $2.949 \cdot 10^{-6}$  и  $1.519 \cdot 10^{-6}$  соответственно), а функция  $f_{3ap}$  давала наилучшее приближение структурозависимости  $\Delta[Ca^{2+}]_{ER}$ ; ошибка ( $1.286 \cdot 10^{-3}$ ) оказалась того же порядка, что и при  $G_s = 50$  нС.

Таким образом, структурозависимые изменения таких показателей, как  $[Ca^{2+}]_{i, peak}$ ,  $[Ca^{2+}]_{i, foot}$  и  $[CaD]_{peak}$ , находились в наиболее близком соответствии с изменениями отношения поверхности компартмента к той части его объема, которая свободна от ЭР, а изменения  $\Delta[Ca^{2+}]_{ER}$  – изменениям площади мембраны ЭР.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Основной вывод, следующий из описанных выше результатов, можно сформулировать следующим образом. Относительная наполненность части объема клеточной структуры (дендрита) органелльными депо и размеры последних являются существенными структурными факторами, в значительной степени модулирующими кальциевую динамику во всех частях указанной субклеточной структуры, и эта структурозависимость может адекватно отображаться при использовании кальцийчувствительного флуорофора. Обоснованность такого вывода поддерживается соответствием наблюдавшихся феноменов общефизическим закономерностям и данным исследований (пока единичных) других авторов (см. ниже).

*Возможности и ограничения модели.* Функционирование нейрона в целом и отдельных его частей сопровождается переносом заряда и вещества между разновеликими областями клеточного пространства, разделенными мембранами. Существенное влияние клеточной и субклеточной геометрии на электрические процессы в нейронах в настоящее время общепризнано. В то же время зависимость концентрационных процессов от структурных характеристик остается далекой от понимания; причинами этого являются ограниченные возможности натурального эксперимента и неразвитость аппарата математического моделирования. Наше модельное исследование представляет собой попытку отчасти восполнить указанный пробел. Из общефизических соображений ясно, что транспорт определенного количества ионов через мембрану, разделяющую неравные объемы, приводит к противоположным по направленности и неравным по величине изменениям концентрации данных ионов в этих объемах. Общее же количество переносимых ионов определяется площадью поверхности мембраны и поверхностной плотностью мембранных транспортных механизмов (многие из которых являются концентрационнозависимыми). Отношение площадь мембраны/объем обратно пропорционально диаметру компартмента (как цилиндрического, так и сферического), и поэтому очевидно, что при одинаковой поверхностной плотности механизмов мембранного транспорта ионов изменения ионной концентрации будут более значительными в меньшем объеме. Представляется логичным, что упомянутые геометрические соотношения особенно важны для динамики процессов в малоразмерных частях нейрона – синаптических терминалях, тонких (дистальных) дендритах и дендритных шипиках.

Полученные нами результаты на примере клеточного компартмента с цистерной ЭР в качестве кальциевого депо демонстрируют существенное влияние субклеточной геометрии на кальциевую динамику во всех частях такой структуры, обменивающихся кальцием, и конкретизируют характер этого влияния. Следует отметить, что использование программной среды «НЕЙРОН» для построения и исследования моделей локальной кальциевой динамики с участием множества транспортных систем открывает перспективы дальнейшего эффективного использования данной локальной модели в качестве конструктивного элемента в более сложных моделях реконструированных реальных

нейронов (подобных тем, которые описаны в ряде работ [12–15] с предельно упрощенным представлением кальциевой динамики). Наша модель, столь же точно отображая динамику мембранных электрических процессов, открывает отсутствовавшие ранее возможности явного учета отношений между геометрическими характеристиками клеточного компартмента и включенного в него органелльного депо, в данном случае ЭР. Учитывая, наряду с депо, и другие кальцийсвязывающие механизмы, в частности кальциевые буферы, модель позволяет воспроизводить наблюдаемые в натурном эксперименте особенности кальциевой динамики, приписываемые именно связыванию кальция с эндогенными буферами и подобными экзогенным буферам красителями, – двухфазный спад концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  после «всплеска», вызванного синаптической стимуляцией [33]. Результаты сравнения изменений концентрации свободного  $\text{Ca}^{2+}$  и комплекса  $\text{Ca}^{2+}$ –флуорофор (рис. 3, А, Г) указывают не только на возможность использования модели в сопряжении с натурными экспериментами (основная информация в которых получена с помощью флуоресцентных кальцийчувствительных зондов), но и на возможную информативность применения зонда в плане выявления структурной зависимости кальциевых сигналов. Вместе с тем данная модель, конечно, не является исчерпывающей, так как содержит в себе ряд существенных упрощений. В ней рассматривается только простейшая цилиндрическая форма цистерны ЭР, буферы считаются немобильными, а концентрации веществ в пределах цитозоля и депо – однородными (она представляет собой так называемую *well-stirred model*). В целом же есть основания считать предложенную модель достаточно адекватным инструментом исследования структурозависимости кальциевой динамики.

*Сопоставление с аналогами.* В доступной литературе нам не удалось выявить прямых аналогов ни среди модельных, ни среди экспериментальных работ. Не были обнаружены и экспериментальные работы, в которых хотя бы косвенно затрагивались подобные вопросы. Среди же модельных работ наиболее близким по проблематике является исследование влияния микрогеометрии дендритных шипиков на кальциевую динамику в нейронах гиппокампа [34]. На модели с упрощенным описанием обмена  $\text{Ca}^{2+}$  с депо (при наличии насоса и кальцийзависимого высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$ ) и через дендритную мембрану (за счет насоса и по-

тенциалзависимых кальциевых каналов) авторы упомянутой работы в основном исследовали геометрические ограничения диффузии  $\text{Ca}^{2+}$ , высвобожденного из депо под действием кофеина, между шипиком и стволом дендрита. Электрические же процессы в данном контексте вообще не моделировались. Однако в ходе проверки степени сохранения валидности модели при масштабировании ее параметров (робустности этой модели) путем уменьшения вдвое относительного объема кальциевого депо в шипике по сравнению с таковым в стволе (от 10 до 5 % общего объема) было обнаружено, что в подобных шипиках изменения уровня  $\text{Ca}^{2+}$  были меньшими, чем в “контроле” (мы заключаем термин «контроль» в кавычки, поскольку эксперимент был вычислительным). Наши результаты согласуются с этим наблюдением.

*Перспективы.* Представленные нами данные о существенности модулирующего влияния субклеточной геометрии на динамику внутриклеточного кальция могут представить интерес в нескольких аспектах. Во-первых, следовало бы выяснить, существует ли структурозависимая специфика концентрационных процессов в тонких (т. е., как правило, дистальных) дендритах по сравнению с толстыми (проксимальными) дендритами нейронов разных типов. Во-вторых, подобные вопросы о микроструктурной зависимости кальциевой динамики могут быть адресованы любым малоразмерным элементам – как шипикам и тонким дендритам, так и пресинаптическим терминалям аксонов и синаптическим бутонам. В-третьих, повышается востребованность данных морфометрических исследований об изменениях относительного размера кальцийдепонирующих органелл, которые происходят при нормальном развитии, при связанных с активностью пластических перестройках нервных связей, а также при различных патологиях (в частности, нейродегенеративных процессах).

В целом можно заключить, что описанные в данной работе закономерности зависимости кальциевой динамики от относительных размеров внутриклеточного депо должны в существенной степени проявляться в любых малоразмерных клеточных компартментах, содержащих в себе органелльные депо, - шипиках и тонких стволах дендритов, синаптических бутонах, пресинаптических аксонных терминалях.

С. М. Корогод<sup>1</sup>, Т. С. Новородовська<sup>1</sup>

#### ВПЛИВ ГЕОМЕТРИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОРГАНЕЛЬНОГО ДЕПО ТА БЕЗОРГАНЕЛЬНОГО ЦИТОЗОЛЯ НА ДИНАМІКУ РІВНІВ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО КАЛЬЦІЮ В ДЕНДРИТІ: МОДЕЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

<sup>1</sup>Дніпропетровський національний університет (Україна).

#### Резюме

На математичних моделях, що відповідають тонкому фрагменту шипикового дендрита нейрона Пуркін'є, вивчена залежність динаміки рівнів внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  від співвідношення геометричних розмірів відділів внутрішньоклітинного простору, що обмінюються кальцієм. Плазматична мембрана мала характерні для даних нейронів іонні канали (включно з каналами, які забезпечували синаптичний струм), та іонний насос. Модельні рівняння враховували обмін кальцієм між цитозолем, позаклітинним середовищем, внутрішньоклітинним депо (цистерною ендоплазматичного ретикулуму – ER), ендогенними кальцієвими буферами та екзогенним буфером – флуоресцентним барвником, що використовується в експериментах. Мембрана ER включала в себе кальцієвий насос і канали вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  (кальцій-та інозитол-3-фосфатзалежного), а також канали витоку. Залишаючи розмір компартмента фіксованим, варіювали діаметр цистерни ER таким чином, щоб частка даної органели в загальному об'ємі змінювалася від 1 до 36 %. При цьому ідентичне синаптичне збудження породжувало однакові електричні реакції (кальцієві піки), але різні концентраційні відповіді. Рівні прирости діаметра ER призводили до нерівних, більш виражених при більших діаметрах, приростів пікових цитозольних концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) і комплексу  $\text{Ca}^{2+}$ –флуоресцентний барвник ( $[\text{CaD}]$ ), а також концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в ER дендрита (що характеризувалася відхиленням від базального рівня  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ ). Зміни  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  і  $[\text{CaD}]$  у більшій мірі відповідали змінам безорганельного об'єму цитозоля, а  $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  – змінам площі мембрани ER. Таким чином, відносно наповнення внутрішньоклітинного об'єму дендритного компартмента органелльними кальцієвими депо та їх розмір є важливими структурними факторами, що істотно модулюють динаміку рівнів кальцію, і ця структурна залежність може адекватно відображатися в експериментах з флуорофором.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. P. G. Kostyuk and A. Verkhratsky, *Calcium Signalling in the Nervous System*, Wiley, Chichester (1995).
2. M. J. Brridge, “Neuronal calcium signalling,” *Neuron*, **21**, No. 1, 13-26 (1998).
3. *Calcium as a Cellular Regulator*, E. Carafli and C. Klee (eds.), Oxford Univ. Press, New York (1999).

4. L. D. Pizzo-Miller, J. A. Connor, and S. B. Andrews, "Microheterogeneity of calcium signalling in dendrites," *J. Physiol.*, **525**, 53-61 (2000).
5. W. Amada, C. Koch, and P. Adams, "Multiple channels and calcium dynamics," in: *Methods in Neuronal Modeling: From Synapses to Networks*, C. Koch and I. Segev (eds.), MIT Press, Cambridge (1989), pp. 137-170.
6. C. Koch, *Biophysics of Computations: Information Processing in Single Neurons*, Oxford Univ. Press, New York (1999).
7. J. Meldolesi, A. Villa, P. Podini, et al., "Intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in neurons. Identification and functional aspects," *J. Physiol.*, **86**, Nos. 1/3, 23-30 (1992).
8. W. G. Regehr and D. W. Tank, "Dendritic calcium dynamics," *Current Opin. Neurobiol.*, **4**, No. 3, 373-382 (1994).
9. J. Eilrs and A. Konnerth, "Dendritic signal integration," *Current Opin. Neurobiol.*, **7**, No. 3, 385-390 (1997).
10. M. Canepari, K. Vogt, and D. Zecovic, "Combining voltage and calcium imaging from neuronal dendrites," *Cell Mol. Neurobiol.*, **28**, No. 8, 1079-1093 (2008).
11. 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).
12. T. Miyasho, H. Takagi, H. Suzuki, et al., "Low-threshold potassium channels and a low-threshold calcium channel regulate Ca<sup>2+</sup> spike firing in the dendrites of cerebellar Purkinje neurons: a modeling study," *Brain Res.*, **891**, 106-115 (2001).
13. P. Achard and E. De Schutter, "Calcium, synaptic plasticity and intrinsic homeostasis in Purkinje neuron models," *Front Comput. Neurosci.*, **2**, 8 (2008).
14. 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).
15. I. B. Kulagina, "Phase relationship between calcium and voltage oscillations in different dendrites of Purkinje neuron," *Neurophysiology*, **40**, Nos. 5/6, 477-485 (2008).
16. C. A. Ross, J. Meldolesi, T. A. Milner, et al., "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons," *Nature*, **339**, No. 6224, 468-470 (1989).
17. P. Volpe, A. Nori, A. Martini, et al., "Multiple/heterogeneous Ca<sup>2+</sup> stores in cerebellum Purkinje neurons," *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.*, **105**, No. 2, 205-211 (1993).
18. K. Takei, G. A. Mignery, E. Mugnaini, et al., "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor causes formation of ER cisternal stacks in transfected fibroblasts and in cerebellar Purkinje cells," *Neuron*, **12**, 327-342 (1994).
19. A. Verkhratsky, "Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons," *Physiol. Rev.*, **85**, 201-279 (2005).
20. M. Bootman, O. Petersen, and A. Verkhratsky, "The endoplasmic reticulum is a focal point for co-ordination of cellular activity," *Cell Calcium*, **32**, 231-234 (2002).
21. D. Hillman and S. Chen, "Plasticity of synaptic size with constancy of total synaptic contact area on Purkinje cells in the cerebellum," *Prog. Clin. Biol. Res.*, **59A**, 229-245 (1981).
22. J. Takas and J. Hamori, "Developmental dynamics of Purkinje cells and dendritic spines in rat cerebellar cortex," *J. Neurosci. Res.*, **38**, No. 5, 515-530 (1994).
23. H. Kim, I. Kim, K. J. Lee, et al., "Specific plasticity of parallel fiber/Purkinje cell spine synapses by motor skill learning," *NeuroReport*, **13**, No. 13, 1607-1610 (2002).
24. E. Bastianelli, "Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum," *Cerebellum*, **2**, No. 4, 242-262 (2003).
25. H. Schmidt, K. M. Stiefel, P. Racay, et al., "Mutational analysis of dendritic Ca<sup>2+</sup> kinetics in rodent Purkinje cells: role of parvalbumin and calbindin D28k," *J. Physiol.*, **551**, No. 1, 13-32 (2003).
26. H. Schmidt, S. Kunerth, C. Wilms, et al., "Spino-dendritic cross-talk in rodent Purkinje neurons mediated by endogenous Ca<sup>2+</sup>-binding proteins," *J. Physiol.*, **581**, No. 2, 619-629 (2007).
27. K. Harris and J. Stevens, "Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics," *J. Neurosci.*, **8**, No. 12, 4455-4469 (1988).
28. N. T. Carnevale and M. L. Hines, *The NEURON Book*, Cambridge Univ. Press, Cambridge (2006).
29. 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.
30. S. Dargan, B. Schwaller, and I. Parker, "Spatiotemporal patterning of IP3-mediated Ca<sup>2+</sup> signals in *Xenopus* oocytes by Ca<sup>2+</sup>-binding proteins," *J. Physiol.*, **556**, No. 2, 447-461 (2004).
31. 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).
32. 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).
33. E. Neher, "Details of Ca<sup>2+</sup> dynamics matter," *J. Physiol.*, **586**, No. 8, 2031 (2008).
34. N. Volfovsky, H. Parnas, M. Segal, and E. Korkotian, "Geometry of dendritic spines affects calcium dynamics in hippocampal neurons: theory and experiments," *J. Neurophysiol.*, **82**, No. 1, 450-462 (1999).