

УДК 544.4

## КИНЕТИКА ХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В МОЗГЕ ЧЕЛОВЕКА. ПРОТОННАЯ БЛОКАДА АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И pH-ИМПУЛЬС В МЕХАНИЗМЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОГО СИНАПСА

© 2020 г. Член-корреспондент РАН С. Д. Варфоломеев<sup>1</sup>, В. И. Быков<sup>2,\*</sup>, С. Б. Цыбенова<sup>2</sup>

Поступило 09.09.2019 г.

После доработки 09.09.2019 г.

Принято к публикации 09.09.2019 г.

Предложена кинетическая модель, описывающая динамику синаптического “разряда” с учетом кинетики инъекции нейромедиатора в синаптическую щель, pH-зависимости каталитической активности фермента и диффузионного вывода протонов. Модель дает физико-химическое объяснение для ряда принципиально важных физиологических феноменов, таких как нервно-мышечный паралич, молекулярный механизм нейрологической памяти, действия некоторых нейротоксинов и лекарств.

**Ключевые слова:** кинетическая модель, динамика процесса, мозг человека, ацетилхолинэстераза, ацетилхолин, нервно-мышечное сокращение, холинергический синапс, синаптическая щель, каталитическая активность фермента

DOI: 10.31857/S2686738920020274

Исследование поведения системы нейросетей мозга человека — одна из ключевых задач современного естествознания [1, 2]. Функционирование системы межнейронных контактов, синапсов в процессе передачи возбуждения от одного нейрона к другому — ключевой процесс в операционном поведении нейросетей мозга. Принципиально важную многофункциональную роль в нейронных сетях играют процессы на основе нейромедиатора ацетилхолина (холинергические синапсы). Межклеточные контакты синаптической природы осуществляются путем введения (механического впрыскивания) везикул, наполненных ацетилхолином в гелиевую среду синаптической щели, насыщенную высокой концентрацией ацетилхолинэстеразы, гидролизующей ацетилхолин с образованием холина и уксусной кислоты (физические и концентрационные характеристики холинергического синапса см. ниже). Ацетилхолин преодолевает гидролитический барьер ацетилхолинэстеразы, достигает постси-

наптической мембраны, связывается с ацетилхолиновыми рецепторами, действие которых вызывает передачу электрического возбуждения другому нейрону [3].

По крайней мере, два физиологических явления определяются работой холинергических синапсов:

1) Передача нейронного возбуждения и реализация механизма нейромышечного сокращения. Механизм передачи сигнала и мышечного сокращения — область большого научного и практического интереса. Механизмы действия нейропаралитических ядов (пестициды, боевые отравляющие вещества, некоторые лекарственные препараты) — предмет широкого и достаточно глубокого изучения в современной научной литературе [3–5]. Нервнопаралитические яды — ингибиторы ацетилхолинэстеразы синаптической щели, обеспечивающие почти беспрепятственный транспорт ацетилхолина до постсинаптической мембраны и постоянное сокращение (без расслабления) мышечных волокон.

2) Существуют весьма обоснованные представления об определяющей роли ацетилхолина, холинергических синапсов и рецепторов в осуществлении механизмов памяти и обучения [6].

Наиболее популярной и, на наш взгляд, физически обоснованной представляется теория записи информации по механизму “открыт–закрыт”

<sup>1</sup> Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Институт физико-химических основ функционирования сети нейронов и искусственного интеллекта, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: vibykov@mail.ru

холинергический синапс, где информация представлена “деревом” (3D-образом) связанных между собой нейронов возбуждаемых специализированным сигналом [7].

В настоящее время достаточно подробно исследована структура ацетилхолинэстеразы человека, возможных полиморфных модификаций и ряда медицинских проявлений, связанных с этими модификаторами.

Наиболее фундаментальные результаты о механизме действия холинэстераз получены методами QM/ММ моделирования на основе использования суперкомпьютерных технологий [8–11]. Активный центр ацетилхолинэстеразы включает два ключевых компонента, взаимодействие с которыми может принципиальным образом регулировать каталитическую активность. Для холинэстеразы человека это Ser203, по которому может идти необратимое ингибирование при фосфорилировании и His447, протонирование которого ведет к обратимой блокировке активности.

Нам представляется, что следующим существенным шагом вперед является системное моделирование механизма функционирования синапса как основополагающего элемента функционирования нейрональной сети. Кинетическое поведение ацетилхолинэстеразы определяется двумя особенностями:

1) Фермент характеризуется “неклассической” зависимостью скорости реакции от концентрации субстрата. Это фермент с ингибированием ферментативной активности высокими концентрациями ацетилхолина, при этом ингибирование проявляется при работе фермента в физиологических условиях [5, 12].

2) Как и все сериновые гидролазы, каталитическая функция которых определяется участием имидазольной группы гистидина, холинэстеразы ингибируются ионами водорода с  $pK_a$  имидазольной группы около 7 ( $K_8 \sim 10^{-7}$  М).

В настоящее время в первом приближении известны основные параметры функционирования холинергического синапса:

1) Толщина синаптической щели для разных категорий межклеточных контактов лежит в диапазоне 20–100 нм, диаметр площадки контакта  $(0.5–2) \cdot 10^{-4}$  см [13], при этом контакт нейрон–нейрон (условно назовем это *m*-контактом) меньше чем контакт нейрон–мышца (нейромышечная передача сигнала с участием мотонейрона (условно назовем это *n-j*-контактом)).

2) Концентрация ацетилхолина, нейромедиатора – субстрата ацетилхолинэстеразы, при инъекции его в синаптическую щель с поверхности пресинаптической мембраны при “разряде” синапса достаточно высока. Концентрация ацетилхолина в везикуле достигает 0.1–1 М [12, 14], при

“разряде” нескольких везикул с переносом ацетилхолина в синаптическую щель при известной геометрии щели, концентрация  $S_0$  достигает значения 10–300 Ммоль [14]. При относительной малой толщине щели диффузионное распределение субстрата происходит в высшей степени быстро.

3) Критический параметр – концентрация фермента в синаптической щели. Оценку диапазона концентрации фермента можно сделать на основании сопоставления времени гидролиза (несколько миллисекунд) со скоростью ферментативной реакции. Для того, чтобы фермент при известной  $k_{cat}$  был способен гидролизовать миллимолекулярную концентрацию субстрата за несколько миллисекунд его концентрация не может быть ниже 5–50 ммоль. Таким образом, концентрация ацетилхолинэстеразы в полисахаридном геле синаптической щели также исключительно высока. Для того, чтобы гидролизовать в норме нейромедиатор практически полностью и не дать ему “заселить” ацетилхолиновые рецепторы постсинаптической мембраны, необходима исключительно высокая концентрация фермента (см. ниже) [12, 14].

4) Принципиальной особенностью функционирования холинергического синапса является продукция в синаптической щели ионов водорода в результате образования достаточно сильной уксусной кислоты ( $pK_a \sim 4$ ). При проведении реакции гидролиза ацетилхолина в растворе кислотный продукт практически мгновенно нейтрализуется буферными компонентами раствора и практически не сказывается на кинетическом поведении системы [5]. Однако, в условиях высокой концентрации субстрата и фермента в макрокинетических условиях синаптической щели процесс продукции кислоты является принципиально важным и должен быть учтен при описании кинетики процесса. pH-зависимость каталитической активности ацетилхолинэстеразы контролируется ионогенной группой гистидина – 447 с  $pK_a$  около 7. При этом протонирование этой каталитически важной группы приводит к полной обратной блокировке активности фермента.

“Очистка” синапса от продуцированных ацетилхолинэстеразой протонов может происходить в первую очередь путем диффузии протонов из синаптической щели полисахаридного геля, поскольку не являются протон-проводящими средами. Оценка времени освобождения синапса путем диффузии протона в полимерной среде может быть проведена в первую очередь по уравнению

$$\tau_{диффH^+} = \frac{\ell^2}{D}, \quad (1)$$

где  $\ell$  — диффузионный путь,  $D$  — коэффициент диффузии.

Если принять  $\ell$  — радиус межклеточного контакта равной  $2 \cdot 10^{-5}$  см, коэффициент диффузии —  $5 \cdot 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с (предельно высокое значение коэффициента диффузии протона в полимерной среде), оценка  $\tau_{\text{диссH}^+}$  приводит к значению порядка  $\sim 1 \cdot 10^{-5}$  с [15]. Время “разряда” синапса в разных работах оцениваются по-разному: от 20–50 микросекунд [13, 14] до нескольких миллисекунд [12].

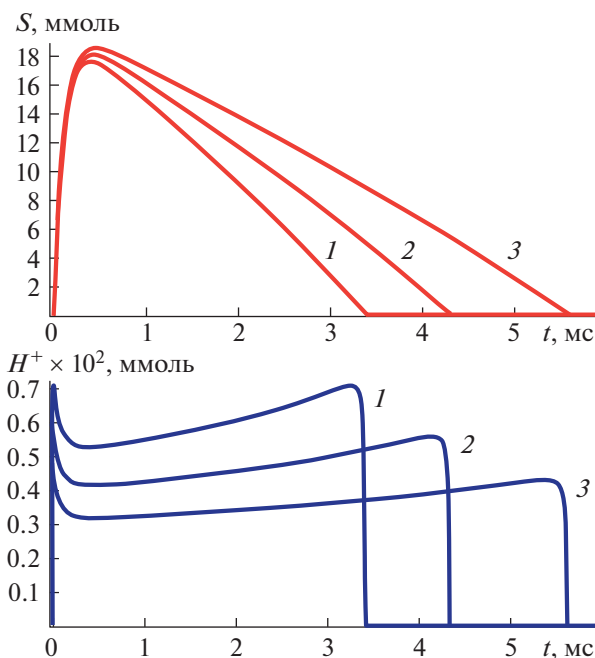
Динамику синаптического “разряда” с учетом кинетики инъекции нейромедиатора в синаптическую щель, рН-зависимости каталитической активности фермента и диффузионного вывода протонов описывает система уравнений

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= \alpha S_0 e^{-\delta t} - \frac{k_{\text{cat}} E_0 S}{(1 + \text{H}^+ / K_a)(K_m + S + S^2 / K_i)}, \\ \frac{d\text{H}^+}{dt} &= \frac{k_{\text{cat}} E_0 S}{(1 + \text{H}^+ / K_a)(K_m + S + S^2 / K_i)} - \beta \text{H}^+, \end{aligned} \quad (2)$$

где член  $\alpha S_0 e^{-\delta t}$  отражает скорость ввода субстрата с начальной концентрацией  $S_0$  с гашением скорости, характеризуемым параметром ( $\delta = 9 \cdot 10^3$ );  $k_{\text{cat}}$  — каталитическая константа скорости катализа ацетилхолинэстеразы ( $k_{\text{cat}} = 7 \cdot 10^3$  с<sup>-1</sup> [5]);  $E_0$  — концентрация фермента в синаптической щели;  $K_m$  — константа Михаэлиса ( $K_m = 0.058$  ммоль),  $K_i$  — коэффициент ингибирования фермента избытком субстрата ( $K_i = 17.9$  ммоль);  $K_a$  — константа равновесия связывания протона с имидазольной группой гистидина 447 активного центра. Константу скорости вывода протонов из синаптической щели оценочно можно принять равной  $\beta = 1/\tau_{\text{диссH}^+} = 5 \cdot 10^5$  с<sup>-1</sup>. Система уравнений (2) была проинтегрирована численно с начальными условиями  $S(0) = 0$ ,  $\text{H}^+(0) = 10^{-7.5}$  М (рН 7.5).

Процесс продукции протонов ацетилхолинэстеразой драматически сказывается на кинетическом поведении системы. На рис. 1 и 2 представлена динамика “разряда” ацетилхолинового синапса при различных концентрациях  $E_0$  и параметра диссипации протонов  $\beta$ . Почти синхронно с вводом в синаптическую щель нейромедиатора растет концентрация протонов и рН падает практически до 5. Продолжительность  $\text{H}^+$ -импульса строго коррелирует со временем гидролиза нейромедиатора. В рамках данной модели описать экспериментально наблюдаемый процесс гидролиза нейромедиатора ( $\tau \sim 3$  мс) удастся лишь при высоких значениях  $E_0$  и  $\beta$ . Формирование рН-импульса имеет почти прямоугольный характер и характеризуется относительно плоской вершиной (см. рис. 1 и рис. 2).

Проведенный анализ приводит к некоторым важным заключениям.



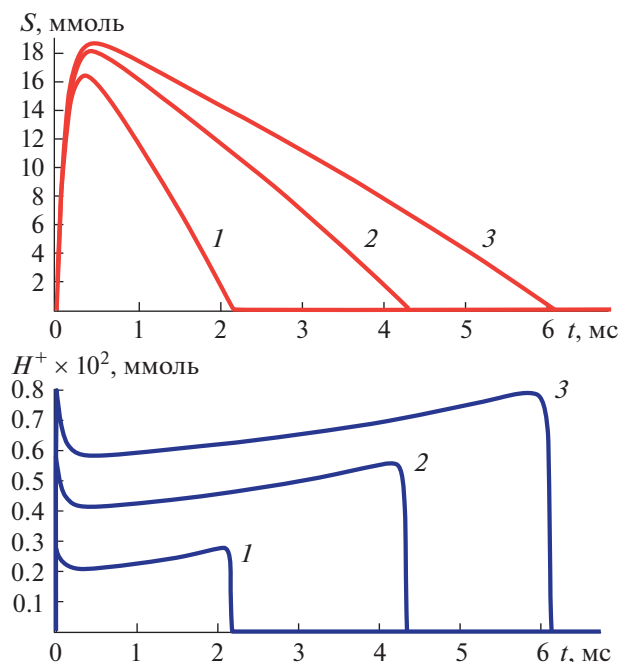
**Рис. 1.** Динамика “разряда” ацетилхолинового синапса и концентрации  $\text{H}^+$  при значениях параметров:  $S_0 = 18.5$  ммоль;  $\alpha = 10^4$  с<sup>-1</sup>;  $\beta = 10^6$  с<sup>-1</sup>;  $\delta = 9 \cdot 10^3$ ;  $k_{\text{cat}} = 7 \cdot 10^3$  с<sup>-1</sup>;  $K_m = 0.058$  ммоль;  $K_i = 17.9$  ммоль;  $K_a = 10^{-4}$  ммоль и различных концентрациях фермента  $E_0$ : 1 —  $E_0 = 80$  ммоль; 2 —  $E_0 = 50$  ммоль; 3 —  $E_0 = 30$  ммоль.

Функционирование нервно-мышечного синаптического контакта ( $n$ - $j$  контакта) может протекать в двух режимах:

1)  $\tau_{\text{pH имп}} < 1/\omega$ , где  $\omega$  — частота возбуждения нейрона. Это нормальный режим, при котором синапс освобождается от протонов раньше, чем приходит следующий нейромедиатор синапса;

2)  $\tau_{\text{pH имп}} > 1/\omega$ , это патологическое состояние, при котором возбуждение нейрона происходит раньше диссипации протонов. В этом режиме ацетилхолинэстераза блокирована по активному центру, фермент обратимо инактивирован, нейромедиатор практически беспрепятственно преодолевает синаптическую щель и связывается с рецепторами постсинаптической мембраны. Если это происходит при нервно-мышечной передаче — мышца всегда находится в сокращенном состоянии. Это нервно-мышечный паралич. По-видимому, процессы такого характера происходят при инсультных поражениях, коме и родственных нейропатологиях.

Если учесть большую роль ацетилхолина и ацетилхолиновых синапсов в механизмах нейропатологической памяти и обучения [6],  $\text{H}^+$  блокировка холинергического синапса может служить



**Рис. 2.** Расчетные кривые динамики изменения концентраций ацетилхолина и протонов в синаптической щели при значениях параметров:  $S_0 = 18.5$  ммоль;  $E_0 = 50$  ммоль;  $\alpha = 10^4 \text{ с}^{-1}$ ;  $\delta = 9 \cdot 10^3$ ;  $k_{cat} = 7 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$ ;  $K_m = 0.058$  ммоль;  $K_i = 17.9$  ммоль;  $K_a = 10^{-4}$  ммоль и при варьировании  $\beta$ :  $1 - \beta = 4 \cdot 10^6 \text{ с}^{-1}$ ;  $2 - \beta = 10^6 \text{ с}^{-1}$ ;  $3 - \beta = 5 \cdot 10^5 \text{ с}^{-1}$ .

механизмом записи и поддержания информации. В рамках клеточной теории нейробиологической памяти информация создается и хранится в виде “3D-образа” открытых нейрональных контактов, поддерживаемых нейросетью определенное время и активируемых сигналом востребованности. Для синаптических холинергических контактов этого типа ( $m$ -синапсы) условием сохранения “3D-образа” является устойчивая проницаемость синапсов по всей совокупности нейрональных контактов, задействованных в формировании “3D-образа”. Условием такого рода состояния является  $\tau_{\text{pH имп}} > 1/\omega$  для каждого синапса цепи.

Развитая модель достаточно адекватно описывает поведение холинергических синапсов при отравлении организма отравляющими веществами и пестицидами, терапевтические эффекты “ботокса”, лекарственные эффекты ингибиторов ацетилхолинэстеразы при терапии болезни Альцгеймера.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 18–13–00030).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варфоломеев С.Д., Семенова Н.А., Быков В.И., и др. Кинетика химических процессов в мозге человека. Моделирование BOLD-сигнала при фМРТ исследовании // ДАН. 2019. Т. 488. № 2. С. 39–43.
2. Varfolomeev S.D., Semenova N.A., Ublinskiy M.V. et al. fMRI and MR-spectroscopy in research on triggering and autostabilization of N-acetylaspargate // Chem. Phys. Let. 2019. V. 729. P. 84–91.
3. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.Н. Рецепторы физиологически активных веществ. 2-е изд. Волгоград: Семь ветров, 1999.
4. Rozengart E.V., Basova N.E., Moralev S.N., et al. Research on cholinesterases in the Soviet Union and Russia: a historical perspective // Chemico-Biological Interactions. 2013. V. 203. № 1. P. 3–9.
5. Rosenberry T.L., Mallender W.D., Thomas P.J., et al. A steric blockade model for inhibition of acetylcholinesterase by peripheral site ligands and substrate // Chemico-Biological Interactions. 1999. V. 119–120. P. 85–97.
6. Hasselmo M.E. The role of acetylcholine in learning and memory // Current Opinion in Neurobiology. 2006. V. 16. № 6. P. 710–715.
7. Тумов С.А. Нейрохимические основы памяти. В: Ашмарин И.П., Стукалов П.В., Ещенко Н.Д., ред. Нейрохимия. М.: Изд. Института биомедицинской химии РАН, 1996. С. 370–414.
8. Lushchekina S.V., Schopfer L.M., Grigorenko B.L., et al. Optimization of cholinesterase-based catalytic bioscavengers against organophosphorus agents // Frontiers in Pharmacology. 2018. V. 9. № 211. P. 1–13.
9. Немухин А.В., Кулакова А.М., Луцкекина С.В., и др. Моделирование химических превращений в активных центрах холинэстераз методами квантовой теории // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. 2015. Т. 56. № 6. С. 343–347.
10. Nemukhin A.V., Grigorenko B.L., Morozov D.I., et al. On quantum mechanical-molecular mechanical (QM/MM) approaches to model hydrolysis of acetylcholine by acetylcholinesterase // Chemico-Biological Interactions. 2013. V. 203. № 1. P. 51–56.
11. Lushchekina S., Gubaydullina A., Polomskih V., et al. QM/MM of ChE-catalyzed reactions with special attention to OP inhibition // FEBS Journal. 2013. V. 280. № SI Suppl. 1. P. 164–174.
12. Reed M.C., Lieb A., Nijhout H.F. The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions // Bioessays. 2010. V. 32. P. 422–429.
13. Tai K., Bond S.D., MacMillan H.R., et al. Finite element simulations of acetylcholine diffusion in neuromuscular junctions // Biophysical Journal. 2003. V. 84. № 4. P. 2234–2241.
14. Aidoo A., Ward K. Spatio-temporal concentration of acetylcholine in vertebrate synaptic cleft // Mathematical and Computer Modelling. 2006. V. 44. P. 952–962.
15. Middendorf H.D., Di Cola D., Cavatorta F., et al. Water dynamics in charged and uncharged polysaccharide gels by quasi-elastic neutron scattering // Biophysical Chemistry. 1994. V. 47. P. 145–153.

# KINETICS OF CHEMICAL PROCESSES IN THE HUMAN BRAIN. PROTON BLOCKADE OF ACETYLCHOLINESTERASE AND PH-IMPULSE IN THE MECHANISM OF FUNCTIONING OF THE CHOLINERGIC SYNAPSE

Corresponding Member of the RAS **S. D. Varfolomeev<sup>a</sup>, V. I. Bykov<sup>b, #</sup>, and S. B. Tsybenova<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> *Institute of Physicochemical Foundations of the Functioning of Neural Network and Artificial Intelligence,  
Moscow State University, 119991, Moscow, Russia*

<sup>b</sup> *Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334, Moscow, Russia*

<sup>#</sup> *e-mail: vbykov@mail.ru*

The proposed kinetic model describing the dynamics of synaptic “discharge” taking into account the kinetics of the injection of the neurotransmitter into the synaptic cleft, the pH-dependence of catalytic activity of the enzyme and diffusion withdrawal of protons. The model provides a physico-chemical explanation for a number of important physiological phenomena, such as neuromuscular paralysis, the molecular mechanism of neurological memory, the action of some neurotoxins and drugs.

**Keywords:** kinetic model, the dynamics of the process, the human brain, acetylcholinesterase, acetylcholine, neuromuscular junction, cholinergic synapse, synaptic cleft, the catalytic activity of the enzyme