

ПРЕДПОСЫЛКИ К АВТОМАТИЗАЦИИ. МОДЕЛИРОВАНИЕ

УДК 612.014.412 : 577.352.3

З. А. БЕЦДУКИДЗЕ, Ю. П. ЗИЛЬБЕРТЕР, Е. П. ТИМНИ
(Москва)

К МЕТОДАМ ИЗУЧЕНИЯ ИОННЫХ КАНАЛОВ ВОЗБУДИМЫХ МЕМБРАН

Исследования ионных каналов возбудимых мембран приобретают в последнее время не только фундаментальное, но и практическое значение. Действительно, эффекты таких широко применяемых фармакологических средств, как местные анестетики, сердечные антиаритмические вещества, сосудорасширяющие препараты и другие, основаны на блокаде или изменениях кинетики работы тех или иных каналов в мембране. Однако, несмотря на очевидную практическую значимость таких исследований, их широкому внедрению мешает целый ряд технических трудностей: методы измерения ионной проницаемости мембран предполагают использование ЭВМ и специальной аппаратуры, удовлетворяющей довольно жестким требованиям, которые в ясном виде до сих пор не сформулированы.

Настоящая работа посвящена анализу возможностей и ограничений современных методов исследования ионной проницаемости и требований к электронным и вычислительным системам, обеспечивающим необходимую точность измерений.

Почему измерения электрической активности (потенциалов действия) не позволяют надежно судить об ионной проницаемости мембран? На первый взгляд, может показаться, что раз уж ионные проницаемости определяют потенциал на мембране, то, измеряя и анализируя последний, можно определить и сами проницаемости. Однако проницаемость электровозбудимых мембран, в свою очередь, обуславливается потенциалом: при возбуждении мембраны (нарастании потенциала) увеличивается ток, переносимый ионами Na, что ведет к увеличению потенциала и дальнейшему росту проницаемости мембраны для Na, а это вновь приводит к нарастанию потенциала и т. д. [1]. Специальные теоретические и экспериментальные исследования [2] показали, что этот процесс лавинообразного (регенеративного) нарастания потенциала исключительно устойчив к различным воздействиям, препятствующим его развитию. Так, например, можно «отравить» часть натриевых каналов в мембране нервного волокна, а амплитуда нервного импульса практически не изменится; непропорционально слабо реагирует на такое «грубое» вмешательство и крутизна переднего фронта импульса. Эта особенность практически исключает возможность судить о характеристиках ионных токов по потенциалу действия. Очевидно, что для исследования зависимости ионных проницаемостей от потенциала необходимо «остановить» регенеративный процесс (зафиксировать потенциал) и, таким образом, получить возможность осуществить необходимые измерения.

Метод фиксации потенциала. Эквивалентная электрическая схема возбудимой мембраны представляет собой параллельно соединенные емкость, сопротивление и генератор тока. Зависимость тока от потенциала на мембране описывается уравнениями типа уравнений Ходжкина — Хаксли [3]. Задача состоит в том, чтобы быстро (за время, намного меньшее, чем характерные времена развития различных компонентов тока) изменить потенциал на мембране и удержать его на заданном уровне, компенсируя ток, генерируемый мембраной.

Необходимость создания специальной электронной схемы для решения этой задачи обусловлена тем, что в большинстве случаев невозможно подвести электроды прямо к мембране (тогда нужно было бы подключить к мембране только генератор напряжения и измеритель тока); мембранный потенциал измеряется обычно через довольно большое сопротивление, и ток через мембрану также приходится подводить через сопротивление.

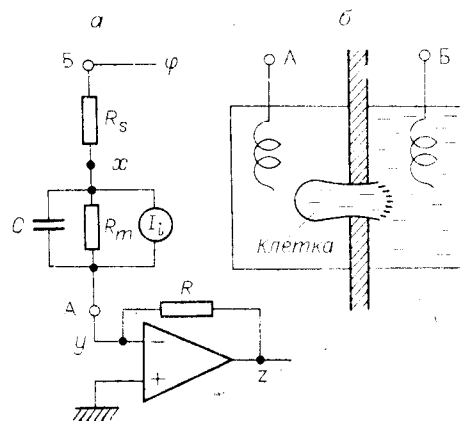
При всем многообразии исследуемых объектов (сердце, мышцы, нервные волокна и клетки) и способов измерения потенциала (микроэлектродная техника, сахарозный и воздушный мостики) метод фиксации потенциала имеет две принципиальные модификации (рис. 1, 2).

Схема, представленная на рис. 1, применяется при исследованиях на одиночных клетках [4, 5]. Клетка «втягивается» гидростатическим давлением в отверстие перегородки, разделяющей два раствора. Один раствор имитирует внеклеточную среду, другой — внутриклеточную. Часть мембраны, выходящая во внутриклеточный раствор, разрушается (рис. 1, б), и исследователь получает возможность электрически «подключиться» к внутренней стороне мембраны, оставшейся неразрушенной. К точке А (внешний электрод) подключается измеритель тока («Виртуальная земля»), к точке Б — генератор напряжения (двухэлектродная схема). Разность потенциалов между точками А и Б остается постоянной даже в тех случаях, когда мембрана генерирует ток I_i . Если сопротивление R_s достаточно мало (подробный анализ см. ниже), то потенциал на мембране примерно равен потенциалу в точке Б (точка А находится под потенциалом «земли»).

Другой вариант метода представлен на рис. 2. В этом случае потенциал на мембране измеряется через «электрод» с большим сопротивлением, измеренный потенциал x сравнивается с задаваемым φ , полученная разница усиливается и подается с обратным знаком через другой электрод на мембрану. Отклонения измеряемого потенциала от уровня φ можно эффективно подавлять обратной связью, если быстродействие и коэффициент усиления электронной системы достаточно велики. К другой «стороне» мембраны подключается общий электрод (трехэлектродная схема). Такой вариант метода применяется для исследований мембран-

Рис. 1. Двухэлектродная схема метода фиксации потенциала:

а — эквивалентная схема установки: А — внешний электрод, Б — «внутренний» электрод, R_s — сопротивление поры, в которую помещается клетка, С — емкость мембраны, R_m — сопротивление мембраны и утечки по краю контакта мембрана — пора, I_i — генератор мембранного тока; б — схематическое изображение клетки, помещенной в тонкую пору; мембрана правой части клетки разрушена, А и Б — электроды.



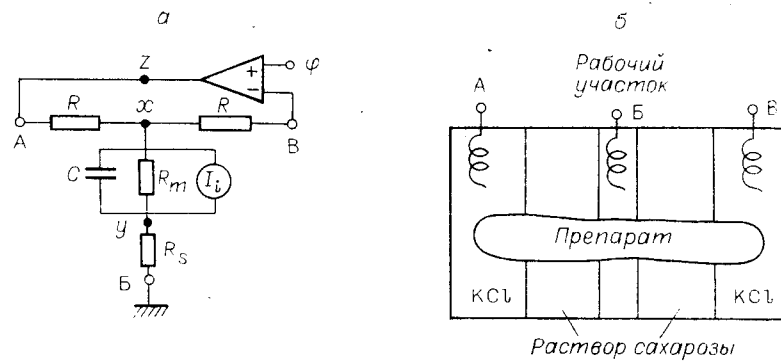


Рис. 2. Трехэлектродная схема метода фиксации потенциала: а — эквивалентная схема установки; б — схематическое изображение препарата, помещенного в двойной сахарозный мост (А, Б, В — электроды, R — сопротивление ткани, находящейся в отсеке с раствором сахарозы).

ных ионных токов в целых полосках ткани (сердечной, мышечной), когда рабочий участок изолируется с помощью непроводящего раствора (обычно раствора сахарозы), края полоски погружаются в раствор (обычно KCl), в котором мембрана теряет потенциал. Таким образом, внутреннее содержимое клеток ткани, находящейся в растворе сахарозы, служит своего рода «электродом», подключенным к внутреннему содержанию клеток рабочего участка за счет хороших межклеточных контактов [6]. К этой схеме сводятся многочисленные вариации метода с двумя сахарозными мостами [7], с одним стеклянным микроэлектродом для измерения потенциала и сахарозным мостом для подачи тока [8] и двумя микроэлектродами и т. д.

Анализ двухэлектродной схемы. Двухэлектродная схема, представленная на рис. 1, а, описывается уравнениями

$$(\varphi - x)/R_s = C\dot{E} + E/R_m + I_i = (y - z)/R,$$

где $E = x - y$ — потенциал на мембране.

Рассмотрим вначале работу схемы с идеальным усилителем, имеющим бесконечное быстродействие): $z = \varphi$. Включая неизвестные x, y, z получим

$$\dot{E} + (E/C)[1/R_m - 1/(R_s + R/(K + 1))] = \varphi/C[R_s + R/$$

Из (2) видно, что электронная система будет устанавливать потенциал на мембране с характерным временем

$$\tau = CR_m[R_s + R/(K + 1)]/(R_m + R_s + R/(K + 1))$$

Величины C и R_m (емкость и пассивное сопротивление) регулируются экспериментатором. Величина R_s определяется сопротивлением отверстия, в которое втягивается клетка. R_s должно быть как можно меньше, для этого необходимо использовать более тонкую стенку. В реальных условиях R_s определяется R_m и $R/(K + 1)$, так что $\tau \approx CR_s$. При генерации тока потенциал отклоняется от заданного на величину ΔE . Видно, что R_s оказывает существенное влияние на установление нужного потенциала на мембране, но не на скорость. Это обстоятельство следует особо подчеркнуть, поскольку исследователи полагают достаточным добиться установления потенциала и тогда быть уверенным в высоком качестве процесса, хотя, конечно, уменьшение R_s ведет к ускорению переходного процесса, и к уменьшению времени фиксации потенциала на мембране. Добившись

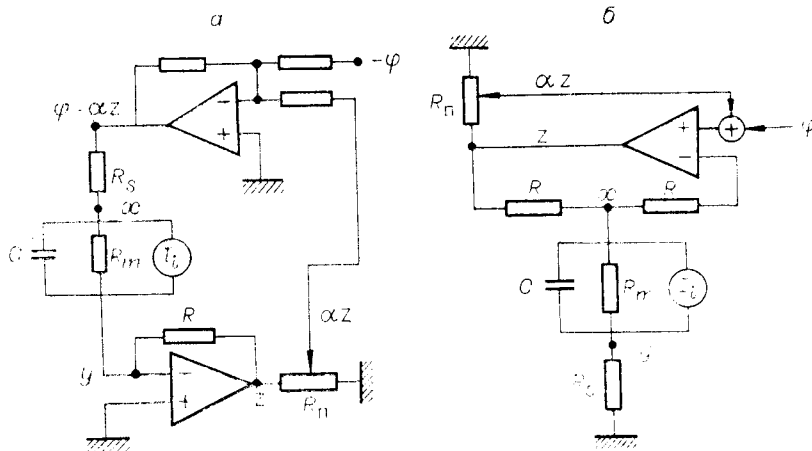


Рис. 3. Схема, иллюстрирующая введение «компенсации R_s » (α — коэффициент деления потенциала на потенциометре): а — двухэлектродная схема, б — трехэлектродная.

процесса, измерив ионные токи и оценив величину R_s , необходимо хотя бы ретроспективно оценить величину $R_s \max \{I_i\}$ (эта ошибка прямо не измеряется) и отбраковать те эксперименты, где она превышала несколько милливольт.

В реальных условиях зачастую невозможно довести R_s до таких величин, которые обеспечивают приемлемую точность измерений, поэтому необходимость скомпенсировать влияние R_s с помощью электродной компенсации очень проста. Поскольку $\Delta E \approx I_i R_s$, можно по известному сигналу φ величину, пропорциональную току I_i , измерять схемой «Виртуальная земля». Иными словами, надо сложить с φ (рис. 3, а). Уравнение (1) при-

$$(\varphi - \alpha z - x)/R_s = C\dot{E} + E/R_m + I_i = (y - z)/R, \quad (1a)$$

коэффициент деления на потенциометре R_n . После исключения y и z получим (при $K \rightarrow \infty$)

$$(E/C)(1/R_m + 1/(R_s - \alpha R)) = \varphi/C(R_s - \alpha R) - I_i/C. \quad (2a)$$

Выбирая α так, чтобы $\alpha R \rightarrow R_s$, можно сделать переходный процесс быстрым, а ошибку $\Delta E \approx I_i(R_s - \alpha R)$ — сколь угодно малой в реальных условиях при введении компенсации R_s (от нуля) ток, идущий на перезарядку емкости, вначале имеет переходный процесс ускорения, а начиная с некоторого момента приобретает колебательный характер (затухающие колебания), описываемый уравнением (2а). Причина состоит в том, что быстродействие усилителя ограничено. Передаточная функция усилителя в схеме «виртуальная земля» не просто коэффициент K , а

$$W = -K/(1 + T_1 p) = -1/(1/K + T_1 p),$$

где T_1 — время единичного усиления, p — переменная Лапласа. Подставив уравнение (1а) и новую передаточную функцию усилителя в уравнение (2а) и включив переменные x , y и z , получим (в предположе-

$$\frac{R_m(1 + T_1 p)}{-\alpha R + p[CR_m(R_s - \alpha R) + T_1(R_m + R_s - \alpha R)] + p^2 T_1} \Rightarrow \Rightarrow \frac{1}{(R_s + R)CR_m}. \quad (3)$$

Обычно величину α увеличивают до тех пор, пока на записи емкостного тока не появятся первые признаки колебаний. Как нетрудно оценить из (3), величина «оставшегося» эффективного последовательного сопротивления $R'_s = R_s - \alpha R$ будет равна (формула упрощена в предположении, что $R_s \approx R$ и $R_m \gg R_s$)

$$R_s - \alpha R \approx -\frac{T_1}{C} + \sqrt{\frac{T_1^2}{C^2} + 8\frac{T_1 S_s}{C}}. \quad (4)$$

При достаточно хорошем усилителе (т. е. при очень малом T_1) $8T_1 R_s / C \gg \gg T_1^2 / C^2$, так что

$$R_s - \alpha R \approx \sqrt{8T_1 R_s / C}. \quad (5)$$

Из формулы (5) видно, что при выборе усилителя очень важно стремиться к максимально возможному быстродействию. Реальные оценки показывают ($R_s \approx 1$ мОм, $R_m \approx 20$ мОм и $CR_m \approx 1$ мс), что даже лучшие отечественные (К574УД1 и К544УД2) и зарубежные (LF357, США) микросхемы, имеющие полосу частот при единичном усилении порядка 15 МГц ($T_1 \approx 0,01$ мкс), позволяют скомпенсировать R_s до эффективной величины $\sim 0,1$ мОм. Именно к этой величине необходимо стремиться при работе, например, с одиночными сердечными клетками, когда величина ионного тока I_i достигает десятков наноампер [5, 9]:

$$\Delta E \approx \max \{I_i\} (R_s - \alpha R) \approx 0,1 \cdot 10^6 \text{ Ом} \cdot 10^{-8} \text{ А} = 1 \text{ мВ}.$$

Таким образом, при конструировании электронной схемы ее быстродействие нужно выбирать исходя отнюдь не из характерных времен развития ионного тока, как это принято. Быстродействие схемы должно быть очень высоким, чтобы обеспечить устойчивость ее работы при введении «компенсации R_s ». Грубо необходимое быстродействие можно оценить по формуле (5).

Анализ трехэлектродной схемы. Приведем уравнения, описывающие трехэлектродную схему, представленную на рис. 2, а:

$$(z - x) / R = C\dot{E} + E / R_m + I_i = y / R_s,$$

где $E = (x - y)$ — потенциал на мембране.

Рассмотрим вначале, как и в предыдущем случае, работу схемы с идеальным усилителем: $z = K(\varphi - x)$. Здесь предполагается, что входное сопротивление усилителя бесконечно велико и потенциал на входе равен потенциалу x . После исключения переменных x , y и z получим

$$\dot{E} + \frac{E}{C} \left[\frac{1}{R_m} + \frac{1}{R_s + R/(K+1)} \right] = \frac{K\varphi}{C[R + R_s(K+1)]} - \frac{I_i}{C}.$$

Аналогично тому, как это было в случае двухэлектродной схемы при $K \rightarrow \infty$, длительность переходного процесса $\tau \approx CR_s R_m / (R_s + R_m) \approx CR_s$, ошибка установления мембранного потенциала $\Delta E \approx R_s I_i$. Следует отдельно отметить, что при реальных параметрах объектов коэффициент усиления K можно считать достаточно большим только тогда, когда он превышает 1500—2000.

Для ряда объектов (нервные волокна) величина R_s достаточно мала, так что нет нужды в специальной ее компенсации. Для многоклеточных же препаратов (полоски сердечной и мышечной тканей) величина R_s довольно велика, так что отклонение мембранного потенциала от заданного достигает величин порядка 10—20 мВ [8, 10].

Компенсация R_s достигается в принципе тем же способом, что и в предыдущем случае: часть сигнала, пропорционального мембранному току (выход усилителя z), смешивается с командным потенциалом φ . Уравнение, описывающее такую схему, получается аналогично тому, как

это делалось выше:

$$\begin{aligned} C\dot{E} + E \left[\frac{1}{R_m} + \frac{1 - \alpha K + K}{R_s(1 - \alpha K + K) + R(1 - \alpha K)} \right] &= \\ &= \frac{K\varphi}{R_s(1 - \alpha K + K) + R(1 - \alpha K)} - I_i. \end{aligned}$$

При

$$\alpha \rightarrow \alpha^* = \frac{R_s(K+1) + R}{K(R_s + R)} \approx \frac{R_s}{R + R_s}$$

время переходного процесса и ошибка установления потенциала будут уменьшаться. И в этой схеме при компенсации R_s огромное значение имеет быстродействие усилителя. Полный анализ работы схемы с учетом ограниченности быстродействия усилителя в общем случае практически неосуществим. Различные параметров используемых объектов настолько велики, что каждая модификация схемы требует самостоятельного исследования. Практический же опыт показывает, что ошибки измерения потенциала на многоклеточных препаратах так велики из-за электрической неоднородности исследуемого участка, что говорить о «компенсации R_s » невозможно. При работе на одиночных нервных волокнах величина R_s очень мала и компенсация его влияния не нужна.

Обеспечение исследований, позволяющих судить о работе отдельных ионных каналов. В настоящее время для изучения молекулярных механизмов работы ионных каналов начали широко применяться методы статистического анализа флуктуаций ионного тока. По типу решаемых физиологических задач и главным образом по метрологическим возможностям экспериментальных методов эти исследования условно можно разделить на три группы: исследования популяций каналов численностью от 10^5 до 10^6 на таких объектах, как перехват Ранвье миелинизированного нервного волокна; исследования популяций от 10^2 до 10^4 каналов; исследования участков мембраны, содержащих от 1 до 100 каналов.

По данным различных авторов [11—13], проводимость одиночного канала $\gamma \sim 1 - 10^{-2}$, а время жизни в открытом состоянии $\tau \sim 10^{-4} - 10^{-2}$ с. Таким образом, измерительная аппаратура должна обеспечивать разрешение токовых сигналов по амплитуде до 10^{-13} А и по частотному спектру до 10^4 Гц. При решении описанных задач необходимо иметь очень низкошумящие измерители тока. Следует учитывать, что схема становится очень высокоомной, так что результаты измерений могут сильно искажаться различными паразитными емкостями. К сожалению, в одной работе нет возможности провести общий анализ влияния паразитных емкостей, эта задача требует самостоятельного исследования. Можно указать, например, что входные емкости усилителей и емкость между выходом и входом резко ограничивают их эффективное быстродействие.

В качестве регистрирующей части установки должны применяться ЭВМ. К настоящему времени уже разработаны и разрабатываются измерительно-вычислительные комплексы на базе мини- и микро-ЭВМ, которые позволяют как управлять экспериментом (ЦАП: 12 разрядов, быстродействие 1 мкс), так и регистрировать сигналы с достаточным разрешением (АЦП: 10—12 разрядов, быстродействие 1—10 мкс). Очень существенно иметь развитый процессор, позволяющий получать в реальном времени результаты предварительной обработки (например, спектр мощности флуктуаций ионного тока), большой объем памяти.

Исследования ионных токов к настоящему времени не являются рутинными, поэтому математическое обеспечение и измерительно-управляющая часть комплекса должны иметь гибкий модульный характер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ходоров Б. И. Общая физиология возбудимых мембран.— В кн.: Руководство по физиологии. М.: Наука, 1975.
2. Khodorov B. I., Timin E. N. Nerve Impulse Propagation Along Nonuniform Fibres.— Progr. Biophys. Molec. Biol., 1975, vol. 30, p. 145—184.
3. Hodgkin A. L., Huxley A. F. A Quantitative Description of Membrane Currents and its Application to Conduction and Excitation in Nerve.— J. Physiol., 1952, vol. 117, p. 500—544.
4. Крышталь О. А., Пидопличко В. И. Внутриклеточная перфузия гигантских нейронов улитки.— Нейрофизиология, 1975, т. 7, с. 327—329.
5. Undrovinas A. I. et al. Voltage Clamp Method on the Single Cardiac Cells from Adult Rat Heart.— Experientia, 1980, vol. 36, p. 572—573.
6. Stämpfli R. A New Method for Measuring Membrane Potentials with External Electrodes.— Experientia, 1954, vol. 10, p. 508—509.
7. Julian F., Moore J. W., Goldman D. E. Membrane Potentials of the Lobster Giant Axon Obtained by Use of the Sucrose Gap Technique.— J. Gen. Physiol., 1962, vol. 45, p. 1195—1216.
8. Beeler G. W., Reuter H. Voltage Clamp Experiments on Ventricular Myocardium Fibres.— J. Physiol., 1970, vol. 207, p. 165—190.
9. Lee K. S. et al. Sodium Currents in Single Heart Muscle Cells.— Nature, 1979, vol. 278, p. 269—271.
10. Beeler G. W., McGuigan J. A. S. Voltage Clamping of Multicellular Myocardial Preparations: Capabilities and Limitations.— Progr. Biophys. Molec. Biol., 1978, vol. 34, p. 219—254.
11. Krishtal O. A., Pidoplichko V. I., Shakhvalov Yu. A. Properties of Single Calcium Channels in the Neuronal Membrane.— Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1980, vol. 7, p. 195—207.
12. Neher E., Sakmann B., Steinbach J. H. The Extracellular Patch Clamp: a Method for Resolving Currents through Individual Open Channels in Biological Membranes.— Pflüg. Arch., 1978, Bd 375, S. 219—228.
13. Neher E., Stevens C. F. Conductance Fluctuations and Ionic Pores in Membranes.— Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1977, vol. 6, p. 345—381.

Поступила в редакцию 16 февраля 1981 г.

УДК 612.014.412 : 577.352.3

В. И. ХИЧЕНКО

(Новосибирск)

О ВОЗМОЖНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ КИНЕТИКИ ИОННЫХ ТОКОВ ВО ВРЕМЯ СПАЙКА МЕТОДОМ ФИКСАЦИИ ПОТЕНЦИАЛА

Потенциал действия обусловлен токами, протекающими по ионным каналам электровозбудимой мембраны. Для исследования кинетики этих токов во время спайка находят численное решение системы дифференциальных уравнений Ходжкина — Хаксли [1]. Эти уравнения были получены в связи с исследованием мембраны аксона кальмара, затем они были адаптированы для описания электровозбудимых мембран других объектов [2].

Протекающий через мембрану ток I_m состоит из емкостного тока $I_c = C \frac{dV}{dt}$ (C и V — емкость и потенциал мембраны) и суммы ионных токов $\sum_{i=1}^n I_i$, текущих по селективным каналам n различных типов:

$$I_m = I_c + \sum_{i=1}^n I_i. \quad (4)$$