

Параметры k_{ji} и V_{ji} характеризуют изменение максимальной проводимости и равновесного потенциала каналов i -го типа при изменении концентрации j -го иона. При выводе уравнения (7) считалось, что $i = n$ соответствует каналам утечки, тогда $f_n(V, t) \equiv 1$ и $\Delta I_{nj} = g_n(V_s - V_n) - k_{jn}g_n(V_s - V_{jn})$. При условии невырожденности матрицы L кинетики ионных токов определяются уравнением $I = VG = L^{-1}I^*$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hodgkin A. L., Huxley A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.— J. Physiol., 1952, v. 117, p. 500—544.
2. Llinas R., Sugimori M., Simon S. M. Transmission by presynaptic spike-like depolarization in the squid giant synapse.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, p. 2415—2419.
3. Starzak M. E., Starsak R. J. An action potential clamp to probe the effectiveness of space clamp in axons.— IEEE Trans. Biomed. Eng., 1978, v. BME-25, p. 201—204.
4. Cole K. S. Digital operations can be deceptive. Squid giant axon membrane.— Biophys. J., 1980, v. 31, p. 433—434.
5. Starzak M., Needle M. The action potential clamp as a test of space-clamp effectiveness—the Lettvin analog axon.— IEEE Trans. Biomed. Eng., 1983, v. BME-30, p. 139—140.

Поступила в редакцию 13 декабря 1985 г.

УДК 612.014.412 : 577.352.3

В. И. ХИЧЕНКО

(Новосибирск)

МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИНЕТИКИ ИОННЫХ ТОКОВ ВО ВРЕМЯ НЕРАСПРОСТРАНЯЮЩЕГОСЯ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ

Процесс генерации потенциала действия взаимосвязан с токами, текущими по ионным каналам электровозбудимой мембраны. При нахождении кинетики этих токов во время спайка используются методы численного интегрирования системы дифференциальных уравнений, аналогичных модели аксона Ходжкина — Хаксли [1]. Существенно, что в этом случае для получения решения необходимо в предварительных экспериментах с использованием метода фиксации потенциала определить параметры мембраны и зависимости ряда ее характеристик от мембранного потенциала [2].

В принципе можно косвенно найти кинетики ионных токов во время спайка без знания математической модели мембраны и определения ее потенциалзависимых характеристик. Эксперимент сводится к регистрации трансмембранного тока в условиях фиксации потенциала, когда, во-первых, в качестве командного импульса используется сигнал, тождественный предварительно зарегистрированному потенциалу действия, а, во-вторых, ионный ток изменен либо путем вариации концентрации соответствующего иона [9], либо использованием специфического блокатора ионных каналов [10].

Необходимое условие реализации такого метода — ток, текущий через мембрану I_m , — выражается уравнением

$$I_m = I_c + \sum_{i=1}^l I_i, \quad (1)$$

где $I_c = C \frac{dV}{dt}$ — емкостный ток (C и V — емкость и потенциал мембраны); $\sum_{i=1}^l I_i$ — сумма ионных токов, текущих по селективным каналам l различных типов.

Метод с использованием блокаторов ионных каналов наиболее прост и состоит в следующем. «Запомним» потенциал действия V_s , возникающий при пропускании через мембрану стимулирующего импульса тока I_e . Если теперь в условиях фиксации потенциала в качестве командного сигнала V_c используется V_s , то при выполнении условия фиксации пространства (изопотенциальности внутренней и внешней сторон мембраны) для зарегистрированного тока I_{m_0} справедливы соотношения $I_{m_0} = I_e$ [3, 7] и

$$I_{m_0} = I_c + \sum_{i=1}^l I_i \quad (2)$$

Применение блокатора j -го ионного тока приводит к тому, что $I_j = 0$; тогда в условиях фиксации потенциала при $V_c = V_s$ регистрируем ток I_{m_j} , для которого

$$I_{m_j} + I_{h_j} = I_c + \sum_{i=1}^l I_i \quad (3)$$

где $I_{h_j} = \text{const}$ — ток, необходимый для удержания мембранного потенциала на исходном уровне потенциала покоя. Из уравнений (2) и (3) получим соотношение

$$I_{m_j} - I_{m_0} + I_{h_j} = -I_j \quad (4)$$

свидетельствующее о том, что кинетику j -го ионного тока можно найти из данных эксперимента.

Поскольку в настоящее время метод непосредственной регистрации кинетики ионных токов во время потенциала действия неизвестен, то проверка правильности предлагаемой методики возможна лишь на математической модели, которая содержала бы уравнение (1). Естественно, что в качестве таковой была выбрана наиболее изученная классическая модель мембраны аксона Ходжкина — Хаксли [1].

Кроме того, если потенциал действия запоминается в цифровой форме, то модельные эксперименты необходимы для получения характеристик аналого-цифрового преобразователя (АЦП).

Методика. Вычисления и построение графиков проводились на ЭВМ «Искра 226». Программы были написаны на языке Бейсик. Использовалась модель участка мембраны аксона кальмара площадью 1 см^2 , которая описывается следующей системой уравнений Ходжкина — Хаксли:

$$I_m = C \frac{dV}{dt} + g_K n^4 (V - V_K) + g_{Na} m^3 h (V - V_{Na}) + g_L (V - V_L); \quad (5)$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n (1 - n) - \beta_n n; \quad (6)$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m (1 - m) - \beta_m m; \quad (7)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h (1 - h) - \beta_h h; \quad (8)$$

$$\alpha_n = 0,01 \frac{(V - 10)}{[1 - \exp(1 - 0,1V)]}; \quad \beta_n = 0,125 \exp(-V/80);$$

$$\alpha_m = 0,1 \frac{(V - 25)}{[1 - \exp(2,5 - 0,1V)]}; \quad \beta_m = 4 \exp(-V/18);$$

$$\alpha_h = 0,07 \exp(-V/20); \quad \beta_h = [1 + \exp(3 - 0,1V)]^{-1},$$

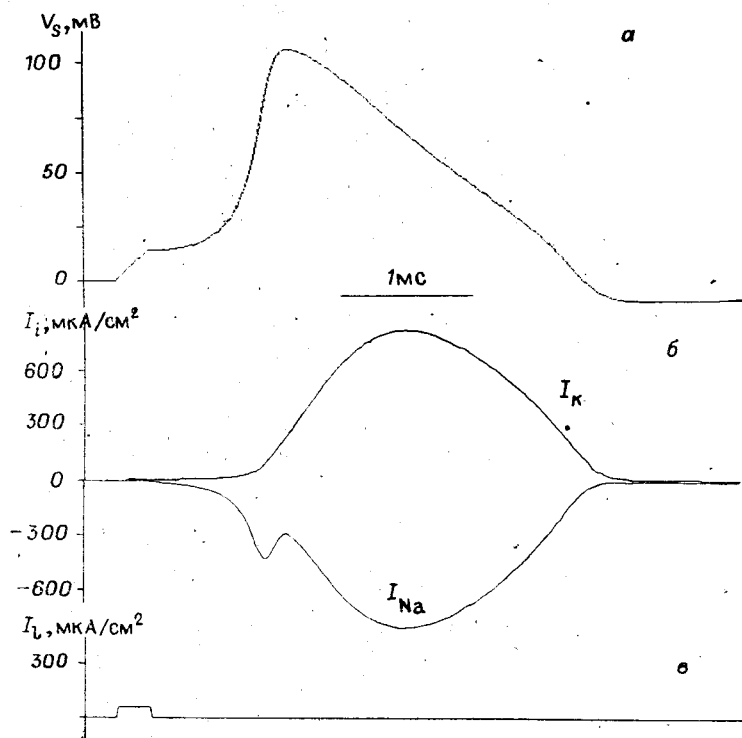


Рис. 1. Кинетики натриевого и калиевого токов (б) во время потенциала действия (а), вызванного пропусканием через мембрану раздражающего импульса тока (с), полученные при решении уравнений Ходжкина — Хаксли: по оси абсцисс — время, по оси ординат: а — мембранный потенциал, б — плотность ионного, с — трансмембранного токов

где $C = 1$ мкФ/см²; $g_{Na} = 120$ ммО/см²; $g_K = 36$ ммО/см²; $g_L = 0,3$ ммО/см²; $V_{Na} = 115$ мВ; $V_K = -12$ мВ; $V_L = 10$ мВ.

При моделировании полагалось, что схема фиксации потенциала имеет идеальные характеристики (бесконечно большой коэффициент усиления и нулевой выходной импеданс), а постоянная времени переходного процесса τ при ступенчатом смещении потенциала мембраны соответствует реальной величине; для большинства рассмотренных случаев $\tau = 10$ мкс [6].

Модель эксперимента должна включать описание следующих физиологических и физических процессов: 1) генерацию потенциала действия при прохождении через мембрану раздражающего импульса тока в условиях фиксации тока; 2) преобразование полученного аналогового сигнала в цифровую форму с помощью АЦП; 3) действие блокаторов ионных каналов; 4) регистрацию трансмембранного тока в условиях фиксации потенциала, когда в качестве командного используется сигнал, соответствующий «оцифрованному» потенциалу действия.

Процесс генерации потенциала действия под влиянием стимулирующего импульса тока I_e представлялся решением системы уравнений Ходжкина — Хаксли относительно V . В качестве стимулирующего выбирался ступенчатый импульс тока (рис. 1, с) амплитудой 60 мкА и длительностью 25 мкс:

$$I_e = I_m = \begin{cases} 0, & 0 < t < 25; \\ 60, & 25 \leq t \leq 50; \\ 0, & 50 < t. \end{cases}$$

Численное интегрирование проводилось с шагом $\Delta t = 1$ мкс методом Рунге — Кутты, причем уравнения (6) — (8) представлялись в аналити-

ческом виде [5], например, $n(t) = n_{\infty} - (n_{\infty} - n_0) \exp(-t/\tau_n)$, где $\tau_n = 1/(\alpha_n + \beta_n)$, $n_{\infty} = \alpha_n/(\alpha_n + \beta_n)$, а n_0 — значение параметра $n(t)$ на предыдущем шаге интегрирования. Полученный в результате решения числовой массив $V_s(p)$ (здесь $p = 1, 2, \dots, 5 \cdot 10^3$) при заданном шаге интегрирования в наибольшей степени приближался к аналоговому сигналу V_s и в дальнейшем играл роль последнего.

Преобразованию аналогового сигнала в цифровой соответствовало программное преобразование массива $V_s(p)$ в числовой массив $V_{sN}(p)$ с учетом (разрядности N) АЦП. При исследовании влияния периода квантования АЦП (интервала времени T между двумя преобразованиями) на форму трансмембранного тока из массивов $V_{sN}(p)$ выбирались значения, для которых p было кратно T .

Регистрации трансмембранного тока методом фиксации потенциала соответствовало аналитическое решение системы уравнений относительно I_m при использовании значений $V_{sN}(p)$, записанных на диск на предыдущем этапе. Эти данные вводились в основную систему через уравнение

$$V = V_{sN} \left(\frac{T}{\Delta t} \left[\frac{t}{T} \right] + 1 \right) - \left[V_{sN} \left(\frac{T}{\Delta t} \left[\frac{t}{T} \right] + 1 \right) - V_0 \right] \exp(-t^*/\tau), \quad (9)$$

где V_0 — мембранный потенциал, найденный при окончании предыдущей ступени командного импульса; t^* — время, отсчитываемое от момента установления очередного значения V_c .

Трансмембранному току при блокаде проводимости натриевых каналов отвечало решение системы уравнений при $g_{Na} = 0$, а блокаде ка-

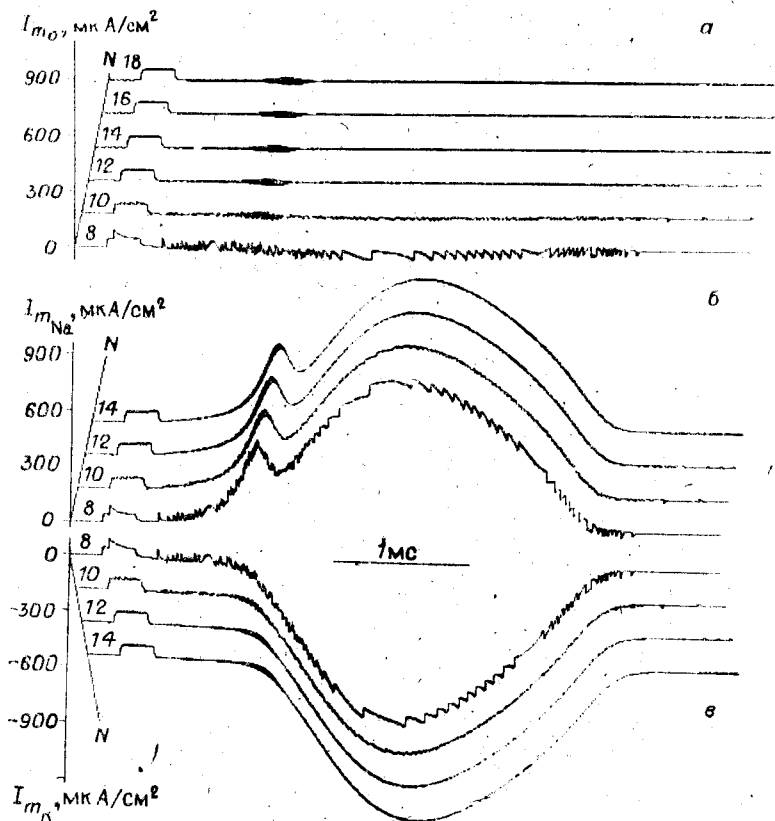


Рис. 2. Зависимость формы трансмембранного тока от разрядности АЦП с периодом квантования 1 мкс:

а — мембрана в норме; б, в — при блокаде проводимости натриевых и калиевых каналов соответственно; по оси абсцисс — время; по оси ординат — разрядность АЦП; по оси аппликат — плотность трансмембранного тока

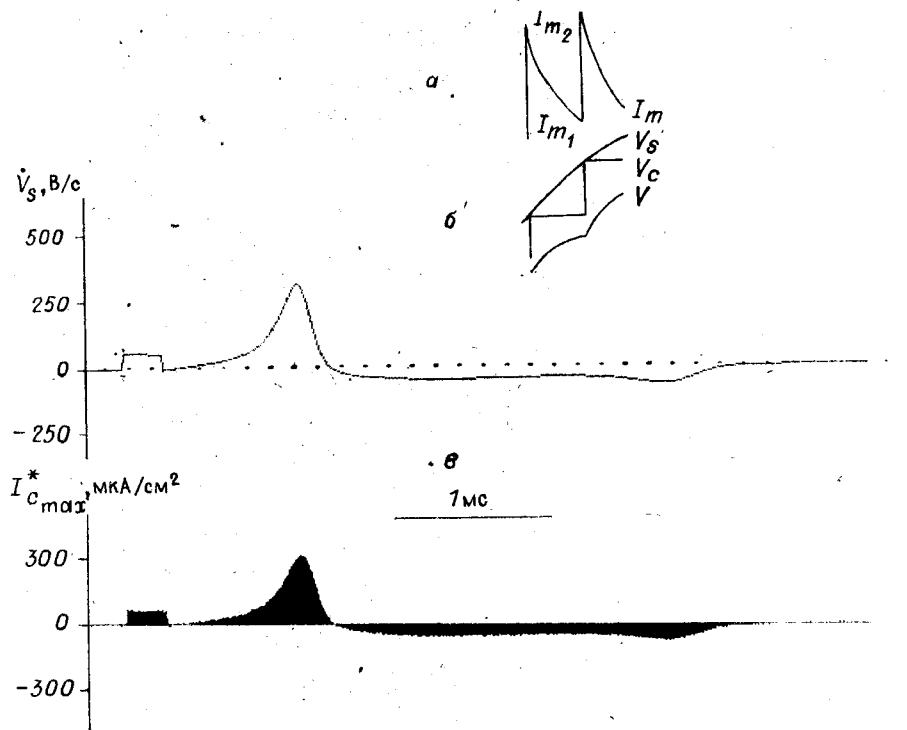


Рис. 3. Схема возникновения цифрового шума трансмембранного тока I_m , обусловленного отличиями потенциала мембраны V в условиях фиксации от мембранного потенциала при генерации спайка V_s вследствие ступенчатой формы командного сигнала V_c (а); соответствие производной потенциала действия (б) и максимальной амплитуды цифрового шума (в) трансмембранного тока, полученного для 12-разрядного АЦП с периодом квантования 10 мкс:

по оси абсцисс — время; по оси ординат: для б — производная потенциала действия, для в — максимальное значение амплитуды цифрового шума

лиевых каналов — решение при $g_k = 0$. Регистрации тока в нормальных условиях соответствовало решение, при котором максимальные проводимости ионных каналов не изменялись.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 показаны полученные при решении системы уравнений Ходжкина—Хаксли потенциал действия, а также натриевый и калиевый токи, в дальнейшем используемые в качестве контроля.

Трансмембранные токи для нормального раствора и АЦП различных разрядностей приведены на рис. 2, а. Как и в работе [6], эти токи воспроизводили форму раздражающего импульса (рис. 1, в), однако были искажены шумом, который усиливался с уменьшением разрядности АЦП.

В ряде модельных экспериментов исследовался трансмембранный ток при блокаде проводимости ионных каналов. Если пренебречь постоянной составляющей I_{h_j} , то из уравнения (4) для $t > 50$ мкс следует $I_{m_j} = -I_j$, т. е. когда элиминирован ток каналов j -го типа, регистрируемый трансмембранный ток равен по модулю, но противоположен по направлению ионному току, протекающему по этим каналам в нормальных условиях генерации нераспространяющегося потенциала действия [10]. Токи, соответствующие блокаде проводимости натриевых либо калиевых каналов, приведены на рис. 2, б, в. Как видно, действительно, между контрольными и полученными токами существует зеркальная симметрия относительно прямой $I_m(t) = 0$. Так же как и в предыдущем случае, искажение токов цифровым шумом увеличивалось при уменьшении разрядности АЦП.

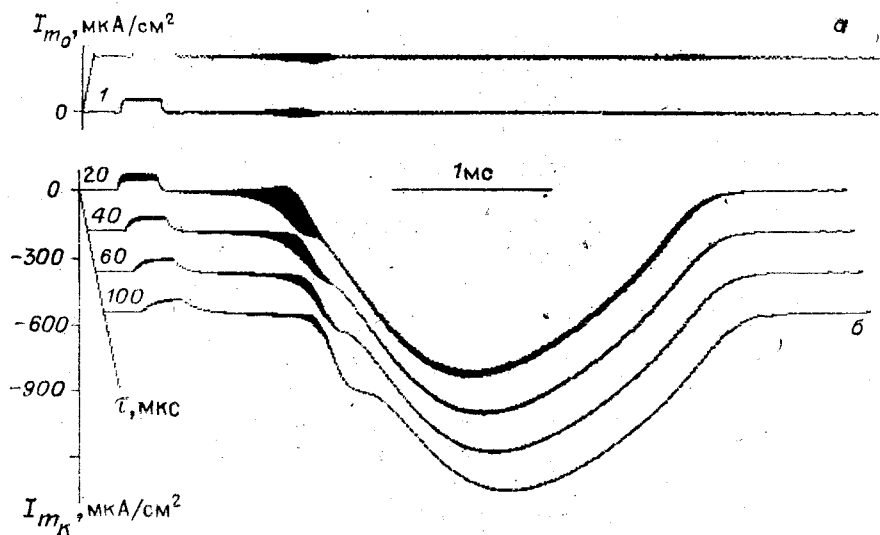


Рис. 4. Влияние периода квантования 12-разрядного АЦП на форму трансмембранных токов, соответствующих нормальному раствору (а); зависимость формы трансмембранных токов при блокаде проводимости калиевых каналов от постоянной времени системы фиксации потенциала (12-разрядный АЦП с периодом квантования 10 мкс) (б):

по оси абсцисс — время; по оси ординат: для а — период квантования, для б — постоянная времени; по оси аппликат — плотность трансмембранного тока

Цифровой шум связан с преобразованием исходной гладкой кривой потенциала действия в ступенчатую форму и обусловлен емкостью мембраны [4, 6]. Поскольку потенциал мембраны после установления очередного значения V_c выражается уравнением (9), то емкостный ток I_c^* во время ступени V_c описывается соотношением

$$I_c^* = \frac{C}{\tau} \left[V_{sN} \left(\frac{I}{\Delta t} \left[\frac{t}{T} \right] + 1 \right) - V_0 \right] \exp(-t^*/\tau). \quad (10)$$

Отсюда следует, что I_c^* максимален в начале установления очередного значения командного сигнала, поэтому для характеристики цифрового шума использовалось выражение $I_{c\max}^* = I_{m_2} - I_{m_1}$, где I_{m_1} и I_{m_2} — трансмембранные токи в конце и начале двух соседних ступеней командного сигнала (рис. 3, а). При сравнении зависимости максимальной амплитуды цифрового шума $I_{c\max}^*$ от времени (рис. 3, в) и производной потенциала действия \dot{V}_s (рис. 3, б) видно, что между $I_{c\max}^*(t)$ и $\dot{V}_s(t)$ существует однозначное соответствие. Максимум цифрового шума, проявляющийся на всех записях трансмембранных токов, совпадает с максимумом $\dot{V}_s(\dot{V}_{s\max})$.

Однако цифровой шум не является единственной причиной, из-за которой I_m отличается от контрольной кривой. Если программно отфильтровать цифровой шум, то и в этом случае в области $\dot{V}_{s\max}$ наблюдается отклонение полученного решения от контрольного. Можно полагать, что в интервале времени, соответствующем $\dot{V}_{s\max}$, происходят наибольшие отклонения значений емкостного тока, вычисленных для

конца очередной ступени командного импульса, и потенциалзависимых параметров мембраны от аналогичных величин исходного потенциала действия вследствие максимальных различий между V_s и V (см. рис. 3, а).

Параметром, в значительной степени влияющим на форму сигнала, является период квантования T [4, 6]. На рис. 4, а приведены токи, полученные при вариации этого параметра для нормального раствора. Цифровой шум для токов, характеризующих ионные токи натриевых и калиевых каналов, зависит от T аналогичным образом. Из уравнения (10) следует, что увеличение амплитуды шума при увеличении T обусловлено ростом величины $[V_{sN}(p) - V_0]$.

Из соотношения (10) следует также, что цифровой шум должен уменьшаться с увеличением τ . В реальных схемах фиксации потенциала τ определяется характеристиками биологического объекта и стимулирующего электрода [8]. Данные, полученные на модели при увеличении значений τ , могли бы отвечать, например, повышению сопротивления токового электрода. Как видно (рис. 4, б), рост τ приводит к снижению амплитуды цифрового шума, однако при этом наблюдаются существенные искажения кривых трансмембранных токов в сравнении с контролем.

Если для выражения кинетики ионных токов использовать соотношение $I_j = I_{m_0} - I_{m_j}$, то наблюдается гораздо более точное соответствие полученных значений контрольным вследствие компенсации ошибок, имеющих для I_{m_0} и I_{m_j} одинаковую природу.

На основании сравнения кривых трансмембранных и контрольных токов можно полагать, что для качественных исследований кинетики ионных токов во время потенциала действия возможно использование АЦП разрядностью 12—14 бит с периодом квантования не более 2 мкс.

Чувствительность данного метода к возможным изменениям параметров мембраны в ходе реального эксперимента требует дальнейших исследований.

Автор глубоко признателен М. Б. Штарку и О. П. Саранчину за обсуждение работы и консультации по вычислительной технике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hodgkin A. L., Huxley A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.— J. Physiol., 1952, v. 117, p. 500—544.
2. Connor J. A., Stevens C. F. Prediction of repetitive firing behavior from voltage clamp data on an isolated neurone soma.— J. Physiol., 1971, v. 213, p. 31—53.
3. Starzak M. E., Starzak R. J. An action potential clamp to probe the effectiveness of space clamp in axons.— IEEE Trans. Biomed. Eng., 1978, v. BME-25, p. 201—204.
4. Cole K. S. Digital operations can be deceptive. Squid giant axon membrane.— Biophys. J., 1980, v. 31, p. 433—434.
5. Moore J. W., Ramon F. On numerical integration of the Hodgkin and Huxley equations for a membrane action potential.— J. Theor. Biol., 1974, v. 45, p. 249—273.
6. Moore J. W., Stockridge N., Schiff S. J. On the squid axon membrane's response to sequential voltage current clamps.— Biophys. J., 1982, v. 40, p. 259—262.
7. Starzak M., Needle M. The action potential clamp as a test of space-clamp effectiveness—the Lettvin analog axon.— IEEE Trans. Biomed. Eng., 1983, v. BME-30, p. 139—140.
8. Максимов А. П., Мумладзе Р. К., Чемерис Н. К. Вопросы стабилизации напряжений и токов на клеточных мембранах.— В кн.: Приборы и методы для микроэлектродного исследования клеток. Пуццино: Научный центр биологических исследований, 1975.
9. Хиченко В. И., Хиченко В. Г. О методе определения кинетики ионного тока во время нераспространяющегося потенциала действия.— Автометрия, 1986, № 3.
10. Хиченко В. И. О возможности исследования кинетики ионных токов во время спайка методом фиксации потенциала.— Автометрия, 1981, № 4, с. 28—31.

Поступила в редакцию 13 декабря 1985 г.