

«Передача», «Прием», «Прием — передача» и др. Для передачи данных с максимальной скоростью предусмотрен режим многократной передачи в одном направлении без дополнительного обмена служебной информацией. При сбое оборудования в процессе передачи данных обеспечивается возможность повторения попытки обмена. Со стороны СМ ЭВМ программа, управляющая обменом через УСВМ, оформлена как драйвер нестандартного устройства системы ФОБОС. При реализации обмена через УСВМ со стороны верхнего уровня использован графический метод доступа ОС ЕС.

В процессе реализации системы были проведены эксперименты на имитационных моделях нейронов, которые продемонстрировали перспективность применения винеровского анализа для построения моделей простых нервных звеньев. В настоящее время начаты эксперименты на нейронах моллюсков.

Таким образом, описанная система в значительной мере обеспечивает проведение физиологических исследований, направленных на изучение отдельных звеньев нервной системы с учетом их нелинейности.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Винер Н. Нелинейные задачи в теории случайных процессов. М.: ИЛ, 1961.
2. Wedensky N. E. Tetanization Succeeded.— Compt. Rend. de l'Acad. Sci., 1907, vol. CXLV, p. 1440—1441.
3. Schetzen M. Measurement of the Kernels of a Non-Linear System of Finite Order.— Intern. J. of Control, 1965, vol. 1, p. 251—263.
4. Mormarelis P. Z., Naka K.-J. Identification of Multi-Input Biological Systems.— IEEE Trans. Biomed. Eng., 1974, vol. BME-21, p. 88—101.
5. French A. S., Butz E. G. Measuring the Wiener Kernels of a Non-Linear System Using the FFT Algorithm.— Int. J. Control, 1973, vol. 17, p. 529—539.
6. Katzenelson J., Gould L. A Spectrum Factorization Method for the Calculation of Non-Linear Filters of the Volterra Type.— Inform. and Control, 1965, vol. 8, p. 239—250.
7. Пятигорский Б. Я., Чинаров В. А. Статистическая идентификация релейных звеньев нервной системы с помощью случайных входных сигналов.— В кн.: Материалы VIII Всесоюз. конф. по электрофизиологии ЦНС. Ереван: изд. АН АрмССР, 1980.
8. Kroecker J. P. Wiener Analysis of Non-Linear Systems Using Poisson — Charlier Crosscorrelation.— Biol. Cybern., 1977, vol. 27, p. 221—227.
9. Штарк М. Б. и др. КАМАК-системы автоматизации в экспериментальной биологии и медицине. Новосибирск: Наука, 1978.
10. Малые ЭВМ и их применение/Под ред. Б. Н. Наумова. М.: Статистика, 1980.

*Поступила в редакцию 8 января 1981 г.*

УДК 577.352 : 61.007 : 612.822

**А. В. БУШ, Х. Л. ГАЙНУТДИНОВ, В. П. ХИЧЕНКО**

*(Новосибирск)*

### **ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЛЬТ-АМПЕРНЫХ И ИНАКТИВАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ИОННЫХ КАНАЛОВ НЕЙРОНАЛЬНЫХ МЕМБРАН С ПОМОЩЬЮ ЭВМ**

Одним из основных результатов исследования нервной клетки за последние годы явилось доказательство существования в возбудимых мембранах специализированных каналов, обладающих избирательной проницаемостью для ионов [1—3]. При изучении функционального состояния этих каналов применяется метод фиксации потенциала, позволяющий в

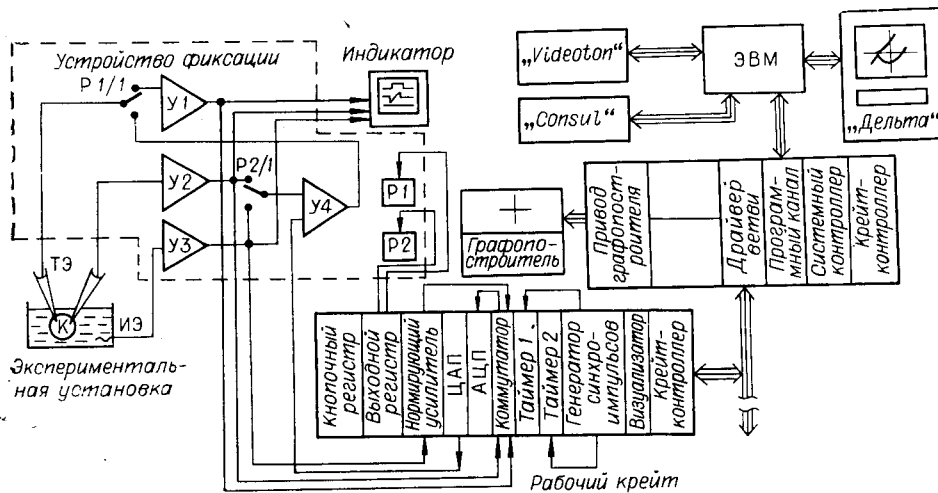


Рис. 1. Блок-схема автоматизированной системы исследований методом фиксации потенциала.

контролируемых условиях измерять протекающие через них ионные токи [2—4]. Использование этого метода связано с накоплением большого объема экспериментальных данных и их дальнейшей математической обработкой. Это обуславливает необходимость применения вычислительной техники, что позволяет: 1) обрабатывать полученные данные в реальном масштабе времени, 2) увеличивать скорость получения исследуемых параметров за счет управления мембранным потенциалом от ЭВМ.

В данной работе приводятся результаты исследования нейрональной мембраны, полученные с применением системы, созданной на основе мини-ЭВМ и аппаратуры КАМАК и обеспечивающей автоматизацию экспериментов, проводимых методом фиксации потенциала, а также подробно описаны алгоритмы определения некоторых характеристик мембран.

На рис. 1 представлена блок-схема этой системы. Она включает в себя мини-ЭВМ с ОЗУ не менее 8 К слов; аппаратуру, выполненную в стандарте КАМАК; устройство фиксации потенциала, согласованное с модулями КАМАК и обеспечивающее автоматическое управление режимом измерений; алфавитно-цифровой и графический дисплеи; графопостроитель на основе двухкоординатного самописца. Принципы ее работы и сама система были описаны ранее [5].

Система уравнений, описывающих ток  $I_m$ , протекающий через нейрональную мембрану моллюска по селективным каналам  $n$  различных типов, имеет следующий вид [6]:

$$I_m = C \frac{dV}{dt} + \sum_{i=1}^n I_i, \quad (1)$$

$$I_i = g_i(V, t)(V - \bar{V}_i), \quad (2)$$

$$g_i(V, t) = \bar{g}_i A_i^{h_i}(V, t) B_i^{l_i}(V, t), \quad (3)$$

$$\frac{dA_i(V, t)}{dt} = [A_i(V, \infty) - A_i(V, t)] \frac{1}{\tau_{A_i}(V)}, \quad (4)$$

$$\frac{dB_i(V, t)}{dt} = [B_i(V, \infty) - B_i(V, t)] \frac{1}{\tau_{B_i}(V)}, \quad (5)$$

где  $C$  — емкость мембраны;  $V$  — мембранный потенциал;  $i = 1, 2, 3, 4$  — соответственно для каналов входящего, быстрого и задержанного выхо-

дящего токов и тока утечки;  $\bar{g}_i$  — максимальная проводимость каналов  $i$ -го типа;  $\bar{V}_i$  — равновесный потенциал для тока, переносимого ионами  $i$ -го сорта;  $A_i(V, t)$  и  $B_i(V, t)$  — безразмерные параметры, изменяющиеся в пределах от 0 до 1;  $\tau_{A_i}$  и  $\tau_{B_i}$  — постоянные времена каналов  $i$ -го типа;  $A_i(V, \infty)$  и  $B_i(V, \infty)$  — стационарные уровни активации и инактивации каналов  $i$ -го типа. Показатели степени имеют следующие численные значения:

$$k_1 = 3, k_2 = 4, k_3 = 2, k_4 = 0; l_1 = l_2 = l_3 = 1, l_4 = 0.$$

Когда в условиях фиксации мембранный потенциал ступенчато изменяется от  $V_0$  до  $V_T$ , то после перезарядки емкости  $\frac{dV}{dt} = 0$  и

$$I_m = \sum_{i=1}^n I_i \quad (6)$$

переменные  $A_i$  и  $B_i$  в момент времени  $t$  после смещения потенциала имеют значения:

$$A_i(V_T, t) = A_i(V_T, \infty) - [A_i(V_0, \infty) - A_i(V_T, \infty)] e^{-t/\tau_{A_i}}, \quad (7)$$

$$B_i(V_T, t) = B_i(V_T, \infty) - [B_i(V_0, \infty) - B_i(V_T, \infty)] e^{-t/\tau_{B_i}}. \quad (8)$$

**Измерение мембранного тока, возникающего в ответ на ступенчатое смещение фиксируемого напряжения.** Этот режим измерения соответствует режиму обычной работы экспериментатора с традиционным оборудованием: электростимулятором, осциллографом, фоторегистратором. Но в данном случае управление, регистрация, обработка результатов и их представление осуществляются системой при участии ЭВМ. Параметры, необходимые для реализации программы, задаются перед началом эксперимента через «Videoton-340», а ток через мембрану во время тестирующего импульса ( $V_T$ ) представляется в виде распечатки таблицы или графика. Алгоритм программы приведен на рис. 2.

**Определение равновесного потенциала  $\bar{V}_i$  и проводимости каналов утечки  $\bar{g}_i$ .** Оно осуществляется путем ступенчатого смещения мембранного потенциала в область гиперполяризации (рис. 3). Поскольку в этом случае  $A_i = 0$ , включая  $i \in \{1, 2, 3\}$ , то

$$I_m = \bar{g}_i(V_T - \bar{V}_i). \quad (9)$$

Отсюда следует, что из двух измерений можно вычислить

$$\bar{g}_4 = (I_{m_2} - I_{m_1}) / (V_{T_2} - V_{T_1}), \quad (10)$$

$$\bar{V}_4 = V_{T_1} - (I_{m_1} / \bar{g}_4). \quad (11)$$

**Измерение вольт-амперной характеристики быстрого входящего и задержанного выходящих токов.** Для проведения измерений через «Videoton-340» задаются следующие параметры: начальная амплитуда тестирующих ступенчатых импульсов  $V_n$ , их максимальная амплитуда  $V_m$ , шаг приращения амплитуды  $\Delta V$ , длительность  $V_T - T_T$  и длительность паузы между  $V_T - T_n$  (см. рис. 3, а). После фиксации потенциала на уровне потенциала покоя  $V_0$  на клетку подается серия тестирующих импульсов, амплитуда которых изменяется с шагом  $\Delta V$  из области гиперполяризации ( $V_n$ ) в сторону деполяризации (до  $V_m$ ). В ответ на каждый  $V_T$  производится измерение тока, протекающего через мембрану, и запись его в память ЭВМ. Шаг квантования во времени задается таймером и генератором синхроимпульсов (см. рис. 1). Далее из полученного массива токов определяется минимальное значение для входящего тока и установившееся (стационарное) для выходящего; полученные

Рис. 2. Алгоритм программы измерения мембранного тока:

$V_T$  — тестирующий потенциал,  $V_P$  — поддерживаемый потенциал,  $T_1$  — таймер 1,  $T_2$  — таймер 2,  $T_T$  — время  $V_T$ ,  $T_3$  — время задержки на перезарядку емкости мембраны,  $T_{кв}$  — период квантования.

данные заносятся в массивы соответствующих ВАХ. На основании заданных амплитуд  $V_T$  и соответствующих им значений входящего и выходящего токов выдаются на цифропечать две таблицы параметров ВАХ, которые отображаются также и графопостройтеlem в виде функций  $I_1^{\max}(V_T)$  и  $I_3(V_T)$ . ВАХ могут быть представлены как с вычетом тока утечки, так и в виде суммарного тока. Алгоритм программы измерений ВАХ показан на рис. 4.

**Определение равновесного потенциала входящего тока  $\bar{V}_1$ .** Из уравнений (1) и (2) следует, что потенциал мембраны, при котором ВАХ входящего тока (после вычета тока утечки) пересекает ось потенциалов, соответствует  $\bar{V}_1$ .

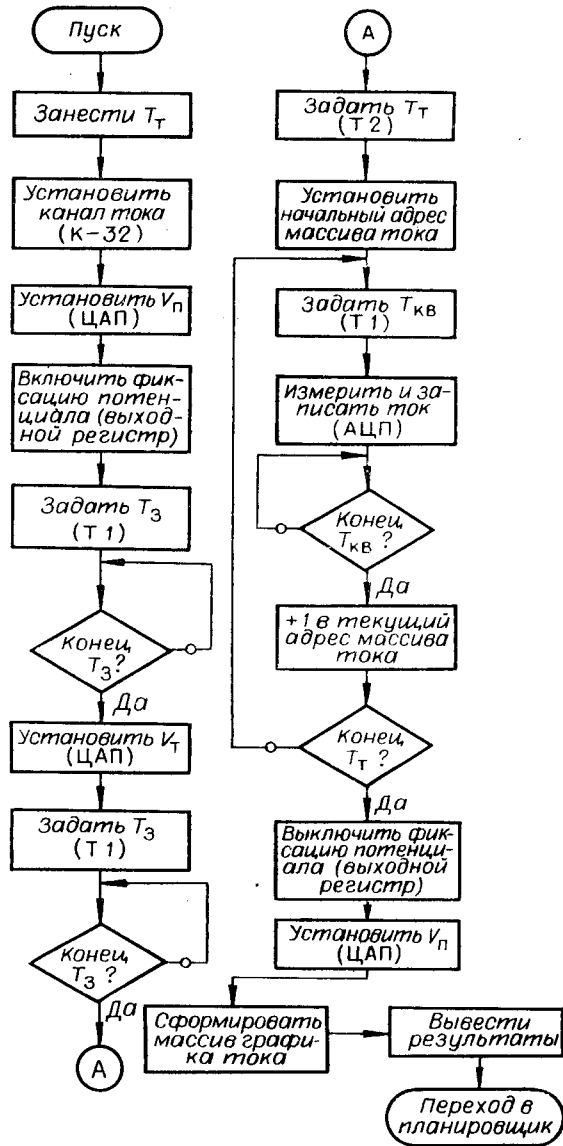
**Определение стационарного уровня активации входящего тока  $A_1(V_T, \infty)$ .** Эта характеристика вычисляется по данным ВАХ для входящего тока после вычитания тока утечки:

$$A_1^3(V_T, \infty) = \frac{I_1^{\max}(V_T^* - \bar{V}_1)}{I_1^{\max*}(V_T - \bar{V}_1)}, \quad (12)$$

где  $I_1^{\max*}$  и  $V_T^*$  соответствуют точке, когда  $\frac{dI_1^{\max}}{dV_T}$  принимает максимальное значение.

**Определение стационарного уровня инактивации входящего тока  $B_1(V_{кв}, \infty)$ .** На мембрану подаются две ступеньки напряжения (см. рис. 3, б): первая ( $V_{кв}$ ) изменяется для каждой двойной ступеньки из области гиперполяризации в область деполяризации мембраны. Амплитуда второй ступеньки  $V_T$  выбирается по ВАХ такой, чтобы входящий ток был максимальным. Из уравнений (2)–(5) можно определить ток во время второй ступени ( $V_T = \text{const}$ ) при  $A_1(V_T, \infty) \approx 1$  и  $B(V_T, \infty) = 0$ :

$$I_1 = \bar{g}_1 B_1(V_{кв}, \infty) \left(1 - e^{-t/\tau A_1}\right)^3 e^{-t/\tau B_1(V_T - \bar{V}_1)}. \quad (13)$$



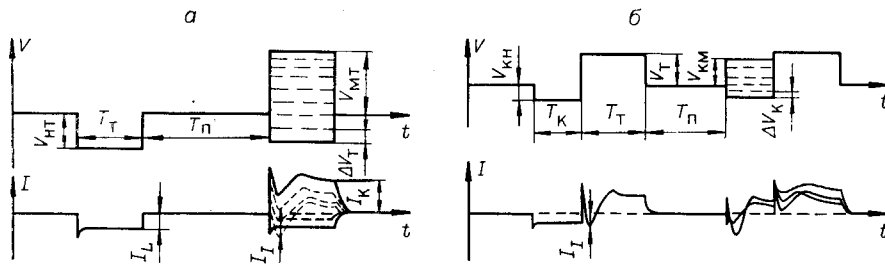


Рис. 3. Схематическое изображение измерения вольт-амперных (а) и инактивационных (б) характеристик мембраны:

$V$  — заданные напряжения на мембране,  $I$  — мембранные токи, возникающие в ответ на  $V$ ,  $I_L$  — ток утечки,  $I_I$  — входящий ток,  $I_K$  — выходящий ток,  $V_{HT}$  и  $V_{KH}$  — начальная амплитуда для  $V_T$  и  $V_K$  соответственно,  $V_{MT}$  и  $V_{KM}$  — конечная амплитуда для  $V_T$  и  $V_K$  соответственно,  $\Delta V$  — шаг ступенчатого изменения амплитуды  $V_T$  и  $V_K$ ,  $T_P$  — время паузы между  $V_T$ . (Остальные обозначения приведены на рис. 2.)

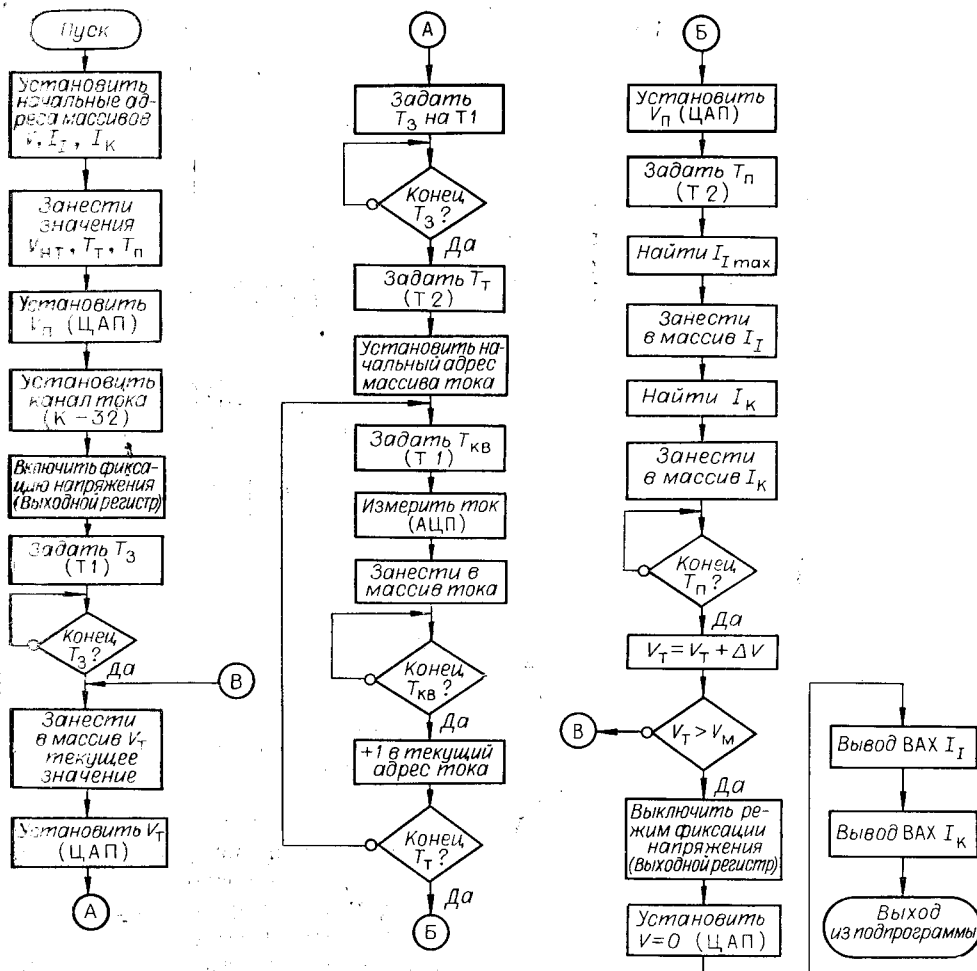


Рис. 4. Алгоритм программы измерения вольт-амперных характеристик (ВАХ) входящего и выходящего токов через мембрану. (Обозначения приведены на рис. 2 и 3).

Отсюда следует, что пиковое значение тока  $I_1^{\max}$  зависит только от  $B_1(V_k, \infty)$ , значение которой определяется потенциалом первой ступеньки  $V_k$ . Нормируя  $I_1^{\max}$  на максимальное значение тока  $I_1^{\max*}$ , которому соответствует  $B_1 = 1$ , найдем

$$B_1(V_k, \infty) = I_1^{\max} / I_1^{\max*}. \quad (14)$$

Необходимо отметить, что получение инактивационной кривой для входящего тока осложняется наличием в нейрональной мембране моллюска каналов быстрого выходящего тока.

Перечисленные алгоритмы измерения характеристик возбудимых мембран вместе с техническими средствами (см. рис. 1) и программным обеспечением составляют автоматизированную систему исследования методом фиксации потенциала, с использованием которой были проведены экспериментальные работы.

В настоящее время существуют доказательства того, что ионные каналы образованы белковыми молекулами, играющими ведущую роль в формировании электровозбудимых свойств клеточной мембраны [2, 3]. Одним из важных методов анализа механизмов участия белков в функционировании нейрональной мембраны является подавление их деятельности антителами (Ат), которые специфически связываются с антигенами поверхности клеток и таким образом исключают их из деятельности нейрона, что проявляется в изменении определенных характеристик мембраны [7, 8].

Экспериментальная часть этой работы посвящена изучению механизмов функционирования ионных каналов нервных клеток в условиях нарушения деятельности белков (антигенов) мембраны путем влияния на них Ат. Ранее нам удалось показать, что Ат к нервной ткани речного рака и нервноспецифическому белку S-100 оказывают преимущественно угнетающее действие на каналы входящего тока [8, 9]. В данной работе использовались Ат к нервной ткани виноградной улитки, имеющие по результатам наших предыдущих работ [10] иной характер действия на возбудимую мембрану.

Объектом экспериментального исследования служили гигантские нервные клетки виноградной улитки, обладающие спонтанной активностью. Для регистрации мембранного потенциала (МП) и управления им в нервную клетку одновременно вводили два стеклянных микроэлектрода, заполненные 2,5 М раствором хлористого калия, сопротивлением 5—20 МОм. Через один из них пропускали ток, второй служил для регистрации МП. После введения микроэлектродов в клетку все измерения проводились с помощью ЭВМ: измерялся потенциал покоя, ВАХ входящего и выходящего токов в пределах от  $-90$  до  $+30$  мВ с шагом 5 мВ. Затем из вольт-амперных характеристик вычитался ток утечки, вычислялись равновесный потенциал и проводимость тока утечки, равновесные потенциалы входящего и выходящего токов, максимальная проводимость входящего тока. Кроме того, отдельно определялся стационарный уровень инактивации входящего тока.

Основные результаты представлены в виде графиков ВАХ, активационных и инактивационных характеристик, т. е. графиков зависимости величины ионного тока от значений МП при действии на поверхность нейронов антисыворотки к нервной ткани виноградной улитки (АС) в концентрации 1,2%. На рис. 5 показано, что действие АС на нейрональную мембрану характеризуется значительным снижением величины максимального входящего тока, которое обусловлено уменьшением максимальной проводимости каналов входящего тока. Проводимость и равновесный потенциал утечки существенно не меняются, при этом мембрана незначительно деполяризуется (примерно на 3 мВ). Основным эффектом АС

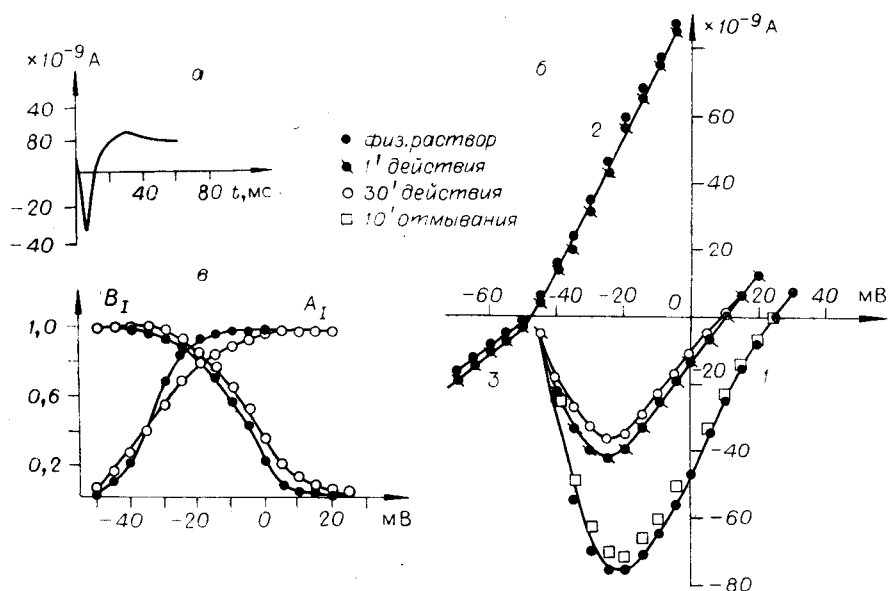


Рис. 5. Вольт-амперные и инактивационные характеристики нейрона виноградной улитки в норме и при действии антител к первой ткани этого моллюска:

а — запись мембранного тока; б — вольт-амперные характеристики входящего (1), выходящего (2) токов и тока утечки (3); в — кривые активации ( $A_I$ ) и инактивации ( $B_I$ ) каналов входящего тока.

развивается в течение 1 мин и сохраняется в дальнейшем. Достоверных сдвигов активационной и инактивационной кривых при аппликации Ат к первой ткани виноградной улитки не наблюдалось (см. рис. 5). Исходные характеристики нейрона при замене АС на физиологический раствор в основном восстанавливались. Контрольная неиммунная сыворотка заметных изменений ВАХ и инактивационных характеристик не вызывает.

Таким образом, автоматизированная система для исследований кинетики ионных токов методом фиксации потенциала повышает оперативность получения экспериментальных результатов работы. Так, построение ВАХ для входящего тока занимает около 30 с при шаге изменений фиксируемых уровней МП 5 мВ. Описанная в статье система, работающая в реальном масштабе времени, демонстрирует преимущество при определении инактивационной кривой входящего тока, состоящее в том, что значения тестирующего импульса задаются экспериментатором на основе анализа ВАХ, полученных непосредственно на данном объекте перед снятием инактивационной кривой. В наших опытах автоматизированная система обеспечила измерение времени развития эффекта (по ВАХ) влияния Ат к первой ткани виноградной улитки, равное примерно 1 мин (что в обычных условиях труднодостижимо). Набор типовых программ и быстрое определение системой характеристик мембран позволяют использовать ее для скрининга биологических активных веществ на уровне нейрональной мембраны. Управление от ЭВМ формой МП, обработка полученных данных в реальном масштабе времени создают предпосылки для проведения экспериментов, сложных и трудоемких для традиционных условий либо вообще невозможных вне автоматизированной системы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Armstrong C. M. Ionic Pores, Gates, and Gating Current.—Quart. Rev. Biophys., 1975, vol. 7, N 2, p. 179—210.
2. Ходоров Б. И. Общая физиология возбудимых мембран. М.: Наука, 1975.
3. Магура И. С., Замеховский И. З. Современные представления о принципах функционирования потенциалзависимых ионных каналов.— В кн.: Молекулярная биология. (Биол. мембраны). Вып. 15. Киев: Наукова думка, 1976, с. 3—11.
4. Hodgkin A. L., Huxley A. F. A Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction and Excitation in Nerve.—J. Physiol., 1952, vol. 117, p. 500—544.
5. Буш А. В., Васьков С. Т., Хиченко В. И., Штарк М. Б. Система автоматизации исследований характеристик возбудимых мембран.— В кн.: Автоматизация эксперимента. Новосибирск: изд. ИАиЭ СО АН СССР, 1976, с. 184—189.
6. Connor J. A., Stevens C. F. Inward and Delayed Outward Membrane Currents in Isolated Neural Somata.—J. Physiol., 1974, vol. 213, p. 31—53.
7. Ворновицкий Е. Г., Беллев В. И. Влияние гетерологичных антител на генерацию ПД в перехвате Ранвье изолированного нервного волокна.— Бюл. экспер. биол. мед., 1972, т. 74, № 9, с. 16—18.
8. Гайнутдинов Х. Л., Гендвилене В. И., Нарушевичус Э. В., Штарк М. Б. Действие антител против ЦНС ракообразных на потенциал покоя нейронов виноградной улитки.— В кн.: Биофизика мембран. Каунас: изд. Мед. ин-та, 1973, с. 172—177.
9. Гайнутдинов Х. Л., Хиченко В. И., Штарк М. Б. Влияние антител к нервноспецифическому белку S-100 на электрические характеристики мембран гигантских нейронов *Helix pomatia*.— ДАН, 1977, т. 236, № 5, с. 1267—1269.
10. Гайнутдинов Х. Л. Исследование роли нервноспецифических белков в функционировании нейрональных мембран. Автореф. дис. на соиск. учен. степени канд. биол. наук. Новосибирск: изд. ИАиЭ СО АН СССР, 1978.

*Поступила в редакцию 24 января 1981 г.*

УДК 681.3 : 612.172.2

**М. Ю. ГЕЛЬЦЕЛЬ, Б. Н. ДЕРИЙ, М. Б. ШТАРК, Е. И. ШУЛЬМАН**  
(Новосибирск)

### **СИСТЕМА АВТОМАТИЗАЦИИ ИССЛЕДОВАНИЙ РЕФЛЕКТОРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СЕРДЕЧНОГО РИТМА ЧЕЛОВЕКА ПРИ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ**

Регистрация сердечного ритма, наиболее доступного для измерения параметра функционирования сердечно-сосудистой системы, является непременным атрибутом исследований широкого круга вопросов, относящихся к различным разделам физиологии человека. В многочисленных работах изучались статистические характеристики сердечного ритма при физической и умственной работе, произвольном изменении дыхания, во время сна, при эмоциях и т. д. Однако при таких воздействиях, затрагивающих весь организм, анализ сердечного ритма, каким бы изощренным он ни был, не позволяет подойти к изучению механизмов его нейрорегуляции, так как изменения ритма происходят не только, а может быть, и не столько вследствие нервных влияний, сколько в результате гуморальных эффектов и изменений гемодинамических условий.

В последние годы намечается тенденция к использованию более «деликатных» способов воздействия на организм, при которых эффект раздражителя длится короткое время (менее одной секунды) и вызывает быстропроходящие сдвиги в сердечном ритме. В таком случае влияние распространяется только по нервным путям, и реакция сердечного ритма в виде