

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ

Серия «Теоретическая и прикладная биофизика»

Г. Р. ИВАНИЦКИЙ,
В. И. КРИНСКИЙ, Е. Е. СЕЛЬКОВ

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА КЛЕТКИ



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА» * МОСКВА 1978

*И в а н и ц к и й Г. Р., К р и н с к и й В. И.,
С е л ь к о в Е. Е. Математическая биофизика клетки. М.,
«Наука», 1978. 308 с.*

В книге рассмотрены математическое моделирование ферментативных реакций и полиферментных систем, модели возбудимых мембран и тканей, моделирование и реконструкция различных внутриклеточных структур. Содержится теоретический и экспериментальный материал, основанный на методах электронной микроскопии, когерентной оптики, электрофизиологии, а также на качественных методах анализа в приложении к проблемам формальной химической кинетики, ионных токов мембран, распространения волн возбуждения, сокращения сердечной мышцы, машинного анализа биоструктур. Предназначена для широкого круга специалистов — математиков, физиков, физиологов и медицинских работников.

Табл. 11, ил. 124, список лит. на 20 с.

Редакционная коллегия серии

«Теоретическая и прикладная биофизика»:

академик Г. М. Франк (главный редактор),
кандидат физико-математических наук А. А. Замятин
(зам. главного редактора),
доктор физико-математических наук Л. А. Блюменфельд,
доктор биологических наук Б. Н. Вепринцев,
доктор биологических наук Ю. А. Владимиров,
доктор физико-математических наук С. В. Фомин,
доктор биологических наук С. Э. Шноль

Ответственные редакторы книги:

академик Г. М. Франк,
доктор биологических наук Б. Н. Вепринцев

ОТ АВТОРОВ

Что происходит в живой клетке? Как протекают внутриклеточные процессы в пространстве и во времени? Как они регулируются? Как состояние одной клетки влияет на соседние? Как возникают волны, распространяющиеся в возбудимых тканях? Как меняется пространственное расположение макромолекулярных комплексов в процессе работы отдельных клеточных компонентов?

В предлагаемой читателю книге авторы попытались показать, что дают для **решения** этих проблем методы математического моделирования и компьютерного анализа внутриклеточных процессов и структур.

В последние годы математические модели и методы, использующие вычислительную технику, стали незаменимыми практически во всех дисциплинах, соприкасающихся с клеточной биологией. И это совершенно понятно: математическая модель, такая например, как модель Ван дер Поля в теории нелинейных колебаний, модели Лотка в теории открытых (био)химических систем, модель Моно, Уаймена и Шанжё в кинетике ферментативного катализа, модель Ходжкина — Хаксли в теории мембранного возбуждения и др., позволяет сэкономить месяцы и годы труда, подсказывая, что и каким именно образом следует изменять в исследовании для расшифровки изучаемого явления. Кроме того, математические модели подчас позволяют сделать то, что нельзя сделать экспериментально.

В предлагаемой читателям книге обсуждаются четыре относительно самостоятельные темы: моделирование ферментативных реакций и полиферментных систем (часть I), моделирование динамики возбудимых мембран (часть II), анализ автоволновых процессов в возбудимых, сильно нелинейных биологических средах (часть III) и, наконец, математическое исследование пространственной организации макромолекул, макромолекулярных комплексов и внутриклеточных структур (часть IV). Эти темы представляют иллюстрацию приложения математических методов к клеточной биологии. В книгу вошли результаты работы трех лабораторий Института биологической физики АН СССР.

В подготовке материала к печати участвовали многие сотрудники Института биологической физики АН СССР. Авторы особенно благодарны В. П. Гартштейну, В. В. Дынику, И. М. Единцову, Н. П. Каймачникову, Ю. М. Кокозу, А. С. Кунискому, В. Г. Назаренко, А. М. Перцову, С. В. Поповой, А. Н. Решетлову, Я. С. Сметаничу, А. А. Фрейдину и Б. Х. Юдман.

ВВЕДЕНИЕ

Современные представления о процессах, протекающих в живой клетке, позволяют сравнивать ее с хорошо организованным и ритмично работающим заводом, поставляющим другим клеткам «изделия» своей специализации и постоянно обновляющим собственное, в основном белковое, оборудование. Жизнедеятельность клетки зависит как от регулярного поступления извне сырья, а с ним и запасенной в нем энергии, так и от безотказной работы всех звеньев химического производства. В настоящее время известны тысячи химических превращений, протекающих в клетке, причем многие из них несовместимы друг с другом. Такие несовместимые биохимические превращения должны быть изолированы соответствующей организацией их во времени и пространстве.

Пространственная организация ферментов в клетке осуществляется многими способами: агрегацией функционально связанных ферментов в крупные макромолекулярные комплексы, присоединением ферментов в определенном порядке к внутриклеточным мембранам, разнесением несовместимых ферментов и полиферментных систем в различные отсеки (компарменты), разделенные мембранами, обладающими селективной проницаемостью, и т. д. В частности, в клетке многие чисто анаболические (биосинтетические) или чисто катаболические (разлагающие внутриклеточные вещества) процессы разнесены в различные клеточные органеллы.

Однако в клетке имеются биохимические процессы, протекающие в зависимости от условий внутри или внеклеточной среды либо в анаболическом, либо в катаболическом направлении. Такие процессы, называемые амфиболическими, в принципе не могут быть эффективно организованы в пространстве, так как ферменты, катализирующие противоположно направленные процессы (например, ферменты, синтезирующие и расщепляющие гликоген), должны находиться в одном и том же компартменте. Для таких биохимических процессов единственно возможной формой или, по крайней мере, основной формой организации является временная организация, т. е. определенный (как правило, периодический) порядок работы несовместимых биохимических процессов во времени.

Пытаясь ответить на вопрос, какова организация работы клетки, целесообразно поставить ряд более простых вопросов.

1. Каким образом регулируются сложные открытые полиферментные системы в бесструктурной гомогенной среде?

2. Какими свойствами обладают клеточные мембраны, разделяющие полиферментные системы и клетки друг от друга?

3. К каким следствиям приводит пространственная распределенность биохимических, в частности возбудимых мембранных систем?

4. Каким образом можно получить трехмерные реконструкции внутриклеточных структур по данным оптической или электронной микроскопии, дающим практически лишь двумерные сечения или проекции?

Теоретическое решение этих вопросов и составляет основную цель нашей книги.

Материал, посвященный математическому моделированию биохимических систем, содержится в части 1, состоящей из трех глав.

Глава 1 посвящена выводу уравнений, описывающих зависимость квазистационарной (или так называемой начальной) скорости ферментативной реакции от концентрации реагентов (субстратов, продуктов, модификаторов и т. п.). Основное внимание здесь уделено выводу и анализу уравнений, описывающих регуляторные ферменты. Такие ферменты имеют олигомерную (субъединичную) структуру, включающую несколько активных и регуляторных (аллостерических) центров. До сих пор теоретическое рассмотрение кинетики действия таких ферментов не выходило за рамки простых моделей (модель Моно — Уаймена — Шанжё, модель Кошланда, модели Фридена — Курганова), описывающих моносубстратную необратимую реакцию. Между тем подавляющее большинство биохимических реакций, катализируемых регуляторными олигомерными ферментами, представляют собой многосубстратные, часто легкообратимые реакции. Поэтому в главе 1 приводится вывод уравнений, описывающих скорости реакций, имеющих произвольное число реагентов. Эти уравнения, являющиеся существенным обобщением модели Моно, Уаймена и Шанжё и модели Фридена — Курганова, могут быть использованы для описания очень широкого класса биохимических реакций.

Глава 2 посвящена описанию динамических свойств открытых ферментативных реакций. Описанию предпослан вводный раздел 2.1, кратко знакомящий с основными методами качественного исследования математических моделей, используемых в этой главе и в некоторых главах части 2. Хотя в последние годы математические исследования динамики проточных химических и биохимических реакций довольно популярны, очень мало сделано для того, чтобы сформулировать достаточно общую теорию таких реакций. Поэтому часто публикуются работы, результаты которых можно было бы заранее предсказать на основании того, что многие кинетические модели открытых (био)химических и мембранных систем математически топологически эквивалентны. Целесообразно под-

робно изучить лишь одну из множества эквивалентных моделей, а затем ограничиваться установлением принадлежности новой, еще неизученной модели к некоторому классу эквивалентных моделей. Если удастся доказать такую принадлежность, то все свойства наиболее детально изученной модели, которую можно считать эталонной моделью данного класса, автоматически переносятся на новую, еще неизученную модель. С учетом этих соображений в разделах 2.2 и 2.3 проведено весьма детальное исследование математических моделей двух типов открытых ферментативных реакций — обратимой реакции с субстратным угнетением и необратимой двухсубстратной реакции с субстратным угнетением. Обе эти реакции, несмотря на несходство кинетических схем, математически эквивалентны: они имеют одинаковое строение параметрических и фазовых портретов. Эти модели можно рассматривать как эталонные модели широкого класса (био)химических систем — систем, квазистационарные характеристики (входные или выходные характеристики, главные изоклины) которых имеют гистерезис. В частности, в разделах 2.4 и 2.6 показано, что различные варианты моделей открытых реакций эквивалентны моделям, разобранным в разделах 2.2 и 2.3.

Суммированные в разделе 2.5 основные результаты показывают, каким богатством динамического поведения обладают даже очень простые ферментативные реакции. При подходящих условиях они способны генерировать устойчивые или неустойчивые автоколебания и однократные спайкообразные импульсы стандартной формы (после действия соответствующего сверхпорогового возмущения); способны переходить из одного устойчивого режима в другой, причем альтернативные устойчивые режимы могут иметь как колебательный, так и неколебательный характер, а период колебаний в открытых биохимических системах из-за эффекта депонирования (раздел 2.7) может быть очень большим — порядка суток.

В главе 3 рассматривается математическое моделирование полиферментных систем. В литературе, посвященной этому типу моделирования, очень часто приводятся исключительно сложные математические модели, насчитывающие многие десятки переменных и параметров. Можно показать, что такие модели содержат много лишней информации, обременяющей их исследование, и много «шума», вызванного неточностью экспериментального определения параметров, неизбежной произвольностью в части допущений о механизмах реакций и условиях их протекания, а также некоторой неустойчивостью вычислительного алгоритма, используемого при анализе модели на компьютере. Поэтому подобные модели создают лишь иллюзию высокой точности описания полиферментной системы, подобную той, какая возникает при распечатке результатов вычислений, производившихся на компьютере, скажем, с десятью значащими цифрами: из-за малейшей неточ-

ности в исходных данных или программе сомнительными могут оказаться не только первые цифры, но и порядок величин результата.

После обзора математических моделей полиферментных систем, проведенного в разделах 3.1 и 3.2, вводится представление о трех иерархических уровнях организации полиферментных систем, последовательно возникших в ходе биологической эволюции. Эти уровни названы первичной, вторичной (стехиометрической) и третичной (нестехиометрической) структурами полиферментных систем. На основе этой классификации предлагается метод теоретического анализа механизма регуляции клеточного метаболизма, основанный на последовательном рассмотрении свойств различных уровней. В качестве примера использования этого метода в разделах 3.3 и 3.4 показано, что исследование вторичной структуры энергетического метаболизма позволяет выявить ряд существенных его свойств и предсказать множество регуляторных связей, принадлежащих более молодой (в эволюционном отношении) и существенно более сложной третичной структуре. Обосновывается утверждение, что третичная структура полиферментных систем, содержащая всевозможные аллостерические регуляторные взаимодействия, может быть теоретически реконструирована, исходя из более древней, потому существенно более простой, вторичной структуры.

В разделе 3.3 показано, что кинетическая модель энергетического метаболизма при определенных условиях может быть редуцирована к модели одной эквивалентной реакции. Этот вывод означает, что математические модели полиферментных систем могут быть такими же простыми, как и модели отдельных ферментативных реакций, и что о свойствах большой полиферментной системы можно судить по свойству всего лишь одной эквивалентной реакции, вроде той, какие были рассмотрены в главе 2.

Часть 2 книги посвящена возбудимым мембранам. Мембраны в клетке выполняют весьма разнообразные функции: ионные каналы мембраны избирательно пропускают одни ионы и задерживают другие, насосы мембраны накачивают в клетку необходимые вещества против градиента концентрации, на мембранах локализованы многие важные ферменты. Возбудимые мембраны используются клеткой для передачи информации. Нарушения работы мембран приводят к различным заболеваниям — от небольших нервных расстройств до тяжелых психических нарушений, параличей и нарушений работы сердечной мышцы.

При исследовании возбудимых мембран сейчас много внимания уделяется их молекулярной организации. Но знание того, какие молекулы и в каком порядке стоят в каких каналах и рецепторах, вряд ли является окончательной целью. Для практического приложения в будущем результатов мембранных исследований важно

научиться сознательно воздействовать на феноменологические характеристики мембран, выработать принципы создания необходимых биологически активных и лекарственных веществ. Важно понять, на какие ионные токи и как необходимо воздействовать, чтобы изменять характеристики мембран в желательном направлении.

Для уяснения принципиальных механизмов связи ионных токов и электрофизиологических характеристик мембран, много дали работы Ходжкина и Хаксли. Но метод Ходжкина — Хаксли трудоемок, и вряд ли его целесообразно использовать в повседневной экспериментальной работе при изучении действия биологически активных веществ на мембраны. Важно иметь доступный для повседневной экспериментальной работы метод, позволяющий определять, какие из регистрируемых изменений ионных токов ответственны за определенные изменения характеристик и поведения мембран.

В настоящей книге для решения этой задачи предлагается следующий подход. Не составлять полных уравнений мембраны и вообще не составлять никаких уравнений. А связи между ионными токами и электрофизиологическими характеристиками мембраны устанавливать непосредственно по записям ионных токов при фиксации потенциала, используя для их обработки качественные методы теории колебаний (см. раздел 2.1). Этот подход применяется и проверяется сначала на математических моделях мембран (глава 4), а затем переносится на анализ «живых» возбудимых мембран (глава 5).

В главе 4 качественные методы анализа используются для исследования модели Ходжкина — Хаксли для мембраны аксона кальмара и модели Нобла для волокна сердца теплокровного. Уравнения типа Ходжкина — Хаксли с помощью методов малого параметра сводятся к уравнениям второго порядка (типа уравнения Ван дер Поля), после чего они легко исследуются методом фазового портрета и качественными методами по нуль-изоклинам. В результате применения качественных методов теоретический анализ моделей мембран стал менее трудоемким и более мощным.

Особенно важно, что использование качественных методов позволяет значительно упростить экспериментальную работу при исследовании мембран. Этому вопросу посвящена глава 5, где излагается применение качественных методов для анализа записей ионных токов при фиксации потенциала. Качественные методы позволяют легко и быстро определить в экспериментах с фиксацией потенциала, за счет изменения каких компонент мембранного тока происходит изменение тех или иных электрофизиологических характеристик. Особенно большое значение эти методы могут иметь при поиске биологически активных веществ с заданными свойствами,

В главе 5 также описываются разработанные методы построения уравнений типа Ван дер Поля для исследуемых мембран непосредственно по записям ионного тока при фиксации потенциала. Такие модели были построены для ряда объектов: волокна предсердия лягушки, волокна Пуркинье сердца теплокровного, волокна поперечнополосатой мышцы, гигантского аксона кальмара, перехвата Ранвье, нейрона улитки.

Часть 3 книги посвящена волнам в возбудимых (активных) средах, в частности в возбудимых мембранах. Волны здесь распространяются без затухания, заново генерируясь каждой точкой мембраны. Волны возбуждения являются сильно нелинейными волнами; при столкновении они гаснут, отражения от границ среды отсутствуют. Эти свойства обеспечивают их важное отличие от аддитивных волн (электромагнитных, звуковых), хорошо изученных в математической физике.

Наибольшее внимание уделяется процессам возникновения волн, так называемым автоволновым процессам, аналогичным автоколебательным процессам в сосредоточенных системах. Автоволновые процессы лежат в основе функционирования самых различных активных сред — распределенных экологических, электрохимических и химических систем, физических систем с инверсной населенностью (рабочие тела лазеров), различных технических устройств — цепочек мультивибраторов, линий из туннельных диодов и нейристоров, а также распределенных систем, образованных возбудимыми биологическими мембранами, нейронных структур, нервных и мышечных волокон, сердечной ткани.

В Институте биологической физики АН СССР была предсказана возможность возникновения источников спиральных волн и источников периодических концентрических волн в неоднородных активных средах, состоящих из неавтоколебательных элементов; теоретически изучены свойства этих источников волн; здесь же были выполнены первые эксперименты по наблюдению этих источников волн в распределенной химической активной среде. Результаты, полученные при анализе автоволновых процессов в возбудимых средах, нашли широкое применение для исследования концентрационных волн в химических системах, а также для анализа механизмов аритмий сердечной мышцы.

Главы 6 и 7 посвящены исследованию новых типов источников волн, специфических для возбудимых сред — вращающейся спиральной волны, так называемого ревербератора (глава 6), и источника эха (глава 7).

В главе 8 рассматриваются процессы, происходящие в возбудимых средах при взаимодействии источников волн, и их приложение к анализу сердечных аритмий.

В главе 6 рассмотрены процессы, приводящие к возникновению источников волн в возбудимых средах. Показано, что распро-

странение волн в возбудимых средах с размерностью $n \geq 1$ качественно мало отличается от распространения импульса в волокне, если среда однородна, и рассматриваются «естественные» начальные условия (соответствующие состоянию покоя элементов среды). Качественно новые режимы возникают в неоднородных средах, где могут происходить разрывы волн. При эволюции разрыва его края скручиваются, что приводит к формированию вращающихся спиральных волн. Большое число спиральных волн создает картину, внешне похожую на турбулентность.

Детально изучены свойства и поведение источников спиральных волн (ревербераторов). Обнаружено, что в неоднородных средах эти источники волн имеют конечное время жизни; они исчезают в результате того же процесса образования разрывов волн, который привел к их возникновению. Время жизни спиральной волны оказывается тем больше, чем больше длительность возбужденного состояния элементов среды и чем меньше степень неоднородности среды; в однородных средах ревербератор устойчив и имеет неограниченное время жизни. Однако в однородных средах распространение волн не приводит к формированию ревербераторов.

Одно из важнейших свойств источников волн — их способность размножаться в неоднородных средах. Размножение источников возможно в результате того, что волны, посылаемые ими, в неоднородной среде разрываются (так как эти источники посылают волны с максимальной частотой, которую способна пропустить данная среда); из разрывов возникают новые источники волн. Изучены условия, при которых возможно размножение. Отмечены аналогии с цепными или автокаталитическими реакциями: тип режима в среде зависит от соотношения скоростей двух противоположных процессов — размножения источников волн и их исчезновения. Если скорость размножения источников волн превышает скорость их исчезновения, в среде возникает нерегулярный режим, связанный с большим числом источников волн, работающих с разными частотами, исчезающими в одних местах и появляющимися в других. Ставится задача о нахождении критических значений параметров возбудимой среды, при превышении которых в среде становятся возможными нерегулярные режимы. Полученные результаты используются для создания нового подхода к поиску сердечных противоаритмических лекарственных средств.

В части 4 представлены работы, которые иллюстрируют различные области применения новых методов исследования пространственной организации клеточных структур:

трехмерную реконструкцию по электронно-микроскопическим снимкам биологических структур, обладающих определенными видами симметрии (на примере реконструкции хвоста фага);

голографический синтез объемных биологических объектов по их ракурсным снимкам, полученным в режиме вторичных электронов (на примере восстановления поверхностного рельефа мембраны нейрона);

моделирование гипотетической молекулярной структуры объекта путем расчета плоского изображения и сопоставления с истинным электронномикроскопическим изображением (на примере изучения структуры лейцинаминопептидазы);

машинное исследование изображений клеточных структур, наблюдаемых в оптический микроскоп, путем их сканирования с помощью телевизионных автоматов (на примере определения геометрических параметров глиальных клеток и метафазных хромосом);

восстановление первичной структуры биополимеров по набору их фрагментов (на примере анализа первичной последовательности РНК).

В просвечивающем электронном микроскопе имеют дело с проекциями клеточных структур. В световой микроскопии в зависимости от глубины резкости объектива наблюдают либо сечение клетки, либо ее проекцию на плоскость. Проекции и сечения биологических структур описываются двумерными функциями оптической плотности.

Дальнейший путь исследования может состоять либо в том, что ограничиваются плоскими представлениями о пространственной структуре, либо определяются некоторые количественные характеристики трехмерной структуры по имеющемуся в наличии набору плоских картин.

Иной подход состоит в том, чтобы, набрав достаточное количество плоских представлений объемной клеточной структуры, построить ее пространственную модель (аналогично тому, как на основе трех ортогональных проекций детали конструктор воссоздает ее пространственную форму).

Если объект симметричен, то для его моделирования в ряде случаев достаточно одной проекции. Например, при исследовании спиральных структур (таких, как волокна биополимеров или чехлы бактериофагов) можно избежать трудоемких операций съемки объекта в разных ориентациях в электронной микроскопии. Модель структуры чехла бактериофага, реконструированная таким методом, рассмотрена в разделе 9.3. Следует заметить, что организация отростка бактериофага, являющегося простейшей структурой, способной к сокращению, представляет исключительный интерес.

Возможны и другие применения этих методов. Часто бывает достаточно найти внешнюю форму структуры, например поверхность клетки, рельеф этой поверхности. Изменение внешней мембраны клеток отражает как метаболические процессы, происходя-

щие внутри клеток, так и характер контакта между клетками. Рельеф клетки сравнительно легко поддается наблюдению. Прогресс этих исследований стал заметен с распространением растровых электронных микроскопов, работающих на отражение во вторичных электронах. Однако, несмотря на заметный «эффект объемности», возникающий при рассмотрении изображений, полученных в растровом электронном микроскопе, количественная оценка размеров деталей рельефа затруднительна. Связано это с отсутствием параллакса в рассматриваемом изображении.

Здесь оказались полезными методы голографии, которые позволили объединить на одной голограмме информацию о различных ракурсах объекта. Эта информация содержится в наборе снимков, сделанных в растровом электронном микроскопе под различными углами.

Изображение, восстановленное с голограммы, отражает особенности поверхности клетки, так как объект выглядит объемным. Такой метод позволяет перенести изображение клетки размерного диапазона электронного микроскопа в размерный диапазон обычных оптических наблюдений, где возможны прямые измерения ее рельефа с помощью светящихся меток, сопряженных с измерительными механизмами. Этот метод рассмотрен в разделе 9.4.

При исследовании трехмерных клеточных структур по их сечениям и проекциям исследователь обычно сталкивается с проблемой некорректности обратных задач, т. е. задач, которые решаются в обратном порядке причинно-следственных отношений (по следствию необходимо выяснить причину). Почти все научные исследования — это решение обратных задач; наблюдается эффект, производимый изучаемой системой (следствие), а восстанавливается ее строение (причина).

Такие задачи часто не имеют решения. Иногда решение можно найти, но из-за неоднородности структуры возникает его неоднозначность, т. е. необходимая информация имеется, но ее недостаточно. Наконец, возможен третий случай: если удалось измерить интенсивность, поляризацию и фазу световых волн, рассеянных структурой клетки по отношению к падающему свету, как функцию углов рассеяния, то согласно формальной постановке обратной задачи этой информации, в принципе, достаточно для получения количественного описания микроструктуры объекта. Однако вычислительная схема подобных задач очень чувствительна к небольшим ошибкам регистрируемых данных. Если интегральные значения измеряются с ошибкой (а при измерениях погрешность всегда существует), то вычисляемая подынтегральная функция может сильно отличаться от истинного значения.

Механизм такой слабой помехозащищенности очевиден. Параметры объемной клеточной структуры вычисляются как разности близких и больших величин, измеряемых на сечениях или

проекциях. Чтобы уменьшить ошибку, необходимо увеличивать точность и статистику измерений при определении параметров клетки, описываемых интегральным выражением.

Однако существует еще один путь борьбы с некорректностью обратных задач. Это моделирование путем использования априорной дополнительной информации о структуре объекта. Если что либо известно об организации структуры подынтегральной функции, то можно попытаться найти решение, перебирая варианты подынтегральной функции и вычисляя каждый раз интеграл, значение которого сравнивается с измеренным до их совпадения. Такая прямая схема вычислений путем моделирования клеточной структуры более помехоустойчива, но требует предварительной, хотя бы приближенной, информации о характере этой структуры. Одному из простейших вариантов такого моделирования клеточных структур посвящен раздел 9.5.

Опыт показывает, что при опознавании объектов их контур — одна из наиболее информативных частей изображения. Основная математическая проблема, возникающая при машинном анализе изображений клеток и их частей, состоит в получении исходного словаря, в терминах которого можно моделировать строение объекта, и набора правил машинного конструирования из его слов трехмерной структуры клеток.

В качестве примера рассмотрен словарь, в основе которого лежит контурное описание структурных клеточных элементов на срезах или проекциях.

Целью анализа контура является вычисление геометрических параметров структурных клеточных элементов или нахождение характерных точек, позволяющих определить их форму. Эти вопросы освещены в главе 10.

Глава 11 посвящена анализу биологических клеточных структур, описываемых одномерными функциями.

Для расшифровывания цепи нуклеиновых кислот длиной в несколько сот нуклеотидов необходима разработка алгоритмов, позволяющих восстанавливать первичную структуру по отдельным перекрывающимся блокам разорванной цепи. «Интуитивного» перебора вариантов для определения длинных последовательностей оказывается недостаточно. Математическая постановка этой задачи может быть сформулирована в терминах восстановления неизвестного слова по известному набору его фрагментов, полученных определенным способом. В разделе 11.5 даны рекомендации для планирования биохимического эксперимента по расшифровке первичной последовательности нуклеотидов.

1 * МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Глава первая

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ НЕПРОТОЧНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

1.1. Два направления в моделировании ферментативных реакций

Ферментативные реакции давно являются излюбленными объектами математического моделирования в различных областях биохимии, биофизики и теоретической биологии. Существуют два подхода в математическом моделировании ферментативных реакций, отличающиеся друг от друга по целям и требованиям, предъявляемым к моделям.

Основной целью одного подхода служит выяснение механизма действия отдельных ферментов — определение порядка взаимодействия реагентов с ферментом, нахождение численных значений параметров, характеризующих отдельные элементарные стадии, из которых складывается ферментативная реакция, и т. д. При таком подходе ферменты или катализируемые ими реакции рассматриваются изолированно друг от друга без учета взаимодействий, существующих между ними в живой клетке. Второй подход преследует совсем иную цель — выяснение свойств полиферментных систем. При этом именно взаимодействия между ферментативными реакциями являются основным объектом моделирования, а моделирование отдельных реакций, составляющих исследуемую полиферментную систему, проводится лишь как подготовительный этап в построении модели полиферментной системы.

Упрощенно эти различия можно представить следующим образом. Для изучения механизма действия одиночного фермента обычно нужна детальная модель, описывающая по возможности все элементарные процессы, из которых складывается ферментативный катализ, тогда как для изучения закономерностей работы полиферментных систем нужны максимально простые модели отдельных реакций, из которых должны быть исключены все детали, не представляющие интереса для понимания работы всей полиферментной системы.

Заметив какую-то особенность в кинетике действия изучаемого фермента, исследователь, использующий первый подход в модели-

ровании ферментативных реакций, обычно рассматривает ее как источник зашифрованной информации о механизме действия фермента и стремится найти теоретическое объяснение этой особенности в терминах процессов более элементарных, чем ферментативная реакция. С этой целью он формулирует гипотетический механизм действия фермента, представляющий собой кинетическую модель реакции. Затем по кинетической модели он выводит математическую модель и сравнивает ее с экспериментальными данными. Обычно после такого сравнения в кинетическую модель приходится вносить изменения для того, чтобы устранить расхождения между свойствами ферментативной реакции, предсказываемыми математической моделью, и свойствами, наблюдаемыми в эксперименте. Этот итерационный процесс последовательного уточнения кинетической и математической моделей продолжается до тех пор, пока не будет достигнута желаемая точность теоретического описания экспериментальных данных. Так как одну и ту же кривую могут описывать различные математические модели, а одной и той же математической модели могут соответствовать различные кинетические модели, то исследователь, добившийся хорошего согласия между математической моделью и экспериментом, никогда не уверен в том, что использованная им кинетическая модель единственно верная.

Отношение к той же особенности у исследователей, использующих второй подход, совершенно иное. Основной вопрос, на который они стремятся ответить, столкнувшись с новым свойством ферментативной реакции, заключается в выяснении роли, какую может играть это свойство в поведении сложной полиферментной системы, частью которой является данная реакция. С этой целью они, как и все исследователи, формулируют кинетическую, а затем и математическую модели реакции. При этом, однако, ни точный молекулярный механизм, вызывающий заинтересовавшую их особенность кинетики реакции, ни решение проблемы множественности кинетических моделей не представляют для них существенного интереса. Предмет их особой заботы — предельная простота математической модели данной реакции, так как модель полиферментной системы создается из многих моделей ферментативных реакций, составляющих эту систему. Поэтому из множества эквивалентных кинетических моделей они выбирают лишь такую, которая достаточно хорошо описывает ферментативную реакцию, имея при этом минимальное число переменных и параметров.

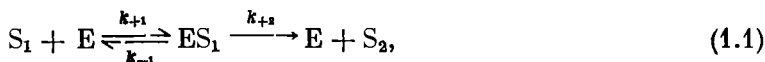
1.2. Ферменты — белковые катализаторы и регуляторы

Ферменты [1—9] представляют собой высокоэффективные белковые катализаторы, ускоряющие течение биохимических реакций в 10^8 — 10^{14} раз по сравнению со скоростью тех же реакций, идущих без ферментов при прочих равных условиях [10]. Молекулы ферментов имеют обычно глобулярное строение [6, с. 65] и молекулярный вес от $M \sim 10^4$ до $M \sim 10^7$ [11]. Непосредственно в катализе биохимических реакций принимает участие лишь очень небольшая часть молекулы фермента, называемая активным, или каталитическим, центром. Активным центром называется каталитически активный участок молекулы фермента, образованный специфическим взаимным пространственным расположением нескольких боковых групп остатков аминокислот полипептидных цепей (или одной цепи) [6, с. 62] и небольших молекул, ковалентно связанных с полипептидными цепями (или с одной цепью) молекулы фермента.

Любое ферментативное превращение начинается со связывания молекул субстратов с несколькими группами активного центра и завершается разрывом связей, удерживающих молекулы продуктов с активным центром. Между двумя этими событиями фермент находится в форме лабильного активного фермент-субстратного комплекса, который, в отличие от активированного комплекса элементарной химической реакции [10], представляет собой очень неустойчивые химические соединения субстратов реакции с ферментом.

Гипотеза об образовании лабильного фермент-субстратного комплекса в ходе ферментативной реакции была впервые высказана в 1902 г. Брауном [12] и Анри [13].

Пытаясь дать количественное толкование явлению насыщения амилазных (КФ 3.2.1.1¹, КФ 3.2.1.2) реакций субстратами, Анри [14] в 1904 г. рассмотрел кинетическую модель



в которой S_1 — полисахарид, S_2 — продукты его гидролиза, E — амилаза, ES_1 — фермент-субстратный комплекс. Для упрощения анализа модели (1.1) Анри допустил, что реакция образования фермент-субстратного комплекса



¹ Здесь и далее приводятся коды ферментов, утвержденные Международной комиссией по ферментам (см. Enzyme Nomenclature. Amsterdam, Elsevier Publ. Co., 1973).

находится в равновесии, определяемом константой диссоциации комплекса $K_{S_1} = k_{-1}/k_{+1}$. Это позволило ему вывести уравнение начальной скорости реакции (1.1) в следующем виде:

$$v = V \frac{[S_1]}{K_{S_1} + [S_1]}. \quad (1.3)$$

Уравнение (1.3) описывает достижение максимальной скорости $v = V$ при $[S_1] \rightarrow \infty$. К такому же уравнению (1.3) и при тех же допущениях пришли в 1913 г. Михаэлис и Ментен [15], обобщив свои наблюдения над кинетикой действия фруктофуранозидазы (КФ 3.2.1.26). Работа [15] приобрела широкую известность — уравнение (1.3) стали называть уравнением Михаэлиса — Ментен, а комплекс ES_1 — комплексом Михаэлиса.

В 1925 г. Бриггс и Холдейн [16] рассмотрели кинетическую модель (1.1) при более общем допущении. Они приняли, что в реакции (1.1) выполняется условие $e_0/s_0 \ll 1$, в котором $e_0 = [E] + [ES_1]$, $s_0 = [S_1] + [ES_2] + [S_2]$. Считая, что из-за малости отношения $e_0/s_0 \ll 1$ скорость изменения концентрации фермент-субстратного комплекса ES_1 должна быть много больше скорости изменения концентрации субстрата S_1 , Бриггс и Холдейн приняли, что в реакции (1.1) быстро устанавливается квазистационарное состояние, в котором $d[ES_1]/dt = 0$. Это допущение привело их к следующему выражению для квазистационарной начальной скорости реакции (1.1):

$$v = \frac{V [S_1]}{K_m + [S_1]}, \quad (1.4)$$

где $K_m = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$ — константа Михаэлиса, а $V = k_{+2}e_0$ — максимальная скорость. K_m имеет размерность концентрации. Этот параметр может быть определен, как концентрация: $[S_1] = K_m$, при которой $v = V/2$.

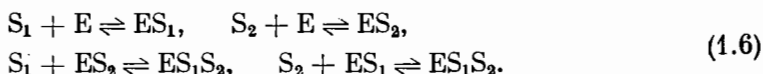
Гипотеза о существовании фермент-субстратного комплекса долгое время не находила прямого экспериментального подтверждения. Малые концентрации, в которых образуется комплекс в ходе ферментативного катализа и нестойкость комплекса, затрудняли его экспериментальное обнаружение. В 1943 г. Чансу [17] удалось спектрофотометрически продемонстрировать образование фермент-субстратного комплекса и проследить за изменением его концентрации в ходе реакции, катализируемой гемосодержащим [6, с. 437] ферментом пероксидазой (КФ 1.11.1.7). Он исследовал поведение математической модели этой реакции на механическом дифференциальном анализаторе и показал, что теория этой реакции, основанная на допущении существования фермент-субстратного комплекса и законе действующих масс, способна с высокой точностью описать динамику пероксидазной реакции, наблюдавшуюся в эксперименте [17]. В 1962 г. Яги и Озава [18, 19] получили

стабильные в анаэробных условиях кристаллы фермент-субстратного комплекса оксидазы *D*-аминокислот (КФ 1.4.3.3). В настоящее время существует множество различных экспериментальных доказательств реальности существования фермент-субстратных комплексов в ферментативных реакциях [4, с. 177; 6, с. 203].

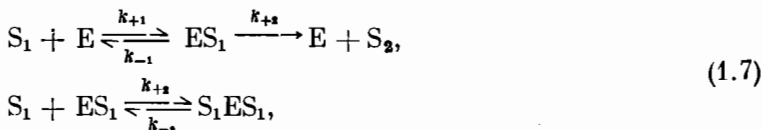
В 1930 г. Холдейн [20], распространив теоретические представления о фермент-субстратном комплексе [12—15] на случай двухсубстратных и обратимых реакций, постулировал существование различных фермент-субстратных, фермент-продуктных и фермент-ингибиторных промежуточных комплексов. Так, для объяснения механизма двухсубстратной реакции



Холдейну пришлось ввести предположение о существовании трех различных фермент-субстратных комплексов: двух бинарных ES_1 и ES_2 и одного тройного комплекса ES_1S_2 , образующихся в реакциях



Для объяснения механизма субстратного угнетения Холдейн [20] предложил кинетическую модель



согласно которой активный фермент-субстратный комплекс ES_1 , присоединяя к себе избыточную молекулу субстрата S_1 , превращается в пассивный фермент-субстратный комплекс S_1ES_1 , не способный распадаться с образованием продукта S_2 . Используя метод квазистационарных концентраций, Холдейн получил следующее выражение для квазистационарной начальной скорости v реакции $S_1 \xrightarrow{E} S_2$, описываемой кинетической моделью (1.7):

$$v = \frac{V[S_1]}{K_m + [S_1] \left(1 + \frac{[S_1]}{K_i}\right)}, \quad (1.8)$$

где $V = k_{+2}e_0$ — максимальная скорость реакции, достигаемая только при $[S_1] \rightarrow \infty$ и $K_i \rightarrow \infty$, $K_m = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$ — константа Михаэлиса, $K_i = k_{-3}/k_{+3}$ — константа субстратного угнетения, $e_0 = [E] + [ES_1] + [S_1ES_1]$ — полная концентрация фермента.

Явление субстратного угнетения, теоретически проанализированное Холдейном с помощью модели (1.8), было впервые обна-

ружено в 1924 г. Диксоном и Терлоу [21] при исследовании кинетики действия ксантиноксидазы (КФ 1.2.3.2). Этот фермент сильно угнетался высокими концентрациями субстрата (ксантина или гипоксантина).

После работы Холдейна [20] стало ясно, что для объяснения механизмов сложных реакций — реакций с большим числом реагентов — следует допустить, что в ходе таких реакций образуется не один, а множество различных фермент-субстратных комплексов. И действительно, по данным В. И. Иванова и М. Я. Карпейского [22], в реакции трансаминирования, катализируемой аспаратами-нотрансферазой (КФ 2.6.1.1) — ферментом, механизм действия активного центра которого изучен в настоящее время весьма детально, образуется более десяти различных форм фермент-субстратных комплексов.

Следует заметить, что экспериментальное обнаружение и идентификация всех теоретически мыслимых форм ферментных комплексов в каждой изучаемой реакции представляют собой нерешенную до сих пор проблему. Поэтому число и порядок взаимопревращений ферментных комплексов в подавляющем большинстве известных в настоящее время ферментативных реакций неясны.

Специфическое расположение атомов и атомных группировок, взаимодействующих в активном центре с молекулами реагентов, обеспечивается определенной пространственной укладкой полипептидных цепей фермента, характерной для данного фермента и называемой конформацией фермента [6, с. 65]. Изменения химического состава и физических характеристик среды, окружающей молекулу фермента, могут вызывать конформационные изменения — изменения взаимного расположения атомов и групп атомов в молекуле фермента. Эти конформационные изменения часто сопровождаются деформацией структуры активного центра, следствием чего может быть существенное изменение его активности и даже специфичности по отношению к реагентам.

Вещества, вызывающие изменения активности и (или) специфичности каталитических центров ферментов, называются модификаторами, регуляторами или модуляторами. Природные модификаторы ферментов, обладающие высокой специфичностью и эффективностью воздействия на фермент, называют также регуляторами или эффекторами ферментов. Модификаторы, если они не являются участниками катализируемой ферментом реакции, в реакции не расходуются.

Различают два класса модификаторов — активаторы и ингибиторы. Молекулы активаторов, присоединяясь к ферменту, вызывают увеличение скорости катализируемой ферментом реакции или сродства фермента к субстрату, а молекулы ингибиторов — уменьшение скорости или этого сродства.

Молекулы модификаторов могут связываться как в активном центре фермента, так и в участках молекулы фермента, находящихся на значительном удалении от активного центра. Основной причиной того, что модификатор связывается в активном центре, является структурное сходство (иначе стерическое соответствие) между молекулой модификатора и субстрата. Поэтому модификаторы, присоединяющиеся к активному центру фермента, называются изостерическими.

В противоположность изостерическим модификаторам модификаторы, молекулы которых присоединяются к ферменту в участке, отличном от активного центра, называются аллостерическими модификаторами [23, 24]; место связывания такого модификатора называется аллостерическим, или регуляторным, центром, а фермент, имеющий аллостерический центр — аллостерическим, или регуляторным, ферментом.

Очевидно, что присоединение модификатора к аллостерическому центру может вызвать изменение активности и специфичности каталитического центра лишь путем изменения конформации фермента. Это допущение и лежит в основе теории механизма действия аллостерических ферментов, предложенной в 1965 г. Моно, Уайменом и Шанжё [25].

Регуляторные ферменты выполняют разнообразные нехимические функции в системах клеточной авторегуляции. Авторегуляцией [26, 27] называется процесс закономерного изменения или поддержания в заданных пределах определенных биологических величин, таких, как концентрация, скорости синтеза и распада различных клеточных веществ, активности ферментов и генов, рН, осмотическое давление, мембранная проницаемость, трансмембранная разность электрических потенциалов и т. д. Типичным механизмом биохимической авторегуляции является механизм угнетения ферментов конечным продуктом, открытый в 1954 г. Новиком и Сциллардом [28] в форме угнетения триптофаном одного из ферментов, участвующих в синтезе предшественников триптофана. Подобные механизмы были обнаружены впоследствии практически во всех участках обмена бактериальных, растительных и животных клеток [23, 24, 29—34]. Основное назначение механизмов угнетения ферментов конечным продуктом — стабилизация концентраций важнейших промежуточных веществ клеточного обмена.

Молекулы ферментов могут иметь один или несколько активных центров и один или несколько регуляторных центров. Условимся называть ферменты, имеющие только один активный центр, одноцентровыми, а ферменты с несколькими активными центрами — многоцентровыми ферментами.

Участие в ферментативной реакции нескольких субстратов, продуктов и модификаторов неизбежно приводит к тому, что уравне-

ние, описывающее зависимость квазистационарной скорости такой реакции от концентраций реагентов и модификаторов, оказывается очень сложным и непригодным для использования в моделях полиферментных систем. Учитывая это обстоятельство, при разработке математических моделей ферментативных реакций приходится сознательно идти на ряд упрощений, вводящих некоторую погрешность в математическое описание кинетики реакций. Эта погрешность в описании реакций есть неизбежная плата за возможность представления многостадийных полиферментных систем математическими моделями обзримой сложности. Насколько должна быть упрощена модель той или иной ферментативной реакции, можно решить лишь в процессе анализа модели всей полиферментной системы, когда становится ясным, какие из свойств реакции существенны для понимания свойств изучаемой полиферментной системы. Поэтому многие из выводимых в последующих разделах моделей ферментативных реакций приводятся с некоторой избыточной подробностью, от которой легко избавиться, внося в них необходимые упрощения.

1.3. Метод графов

При выводе уравнений скоростей ферментативных реакций используется ряд упрощающих допущений. В частности, как правило, принимают, что ферментативная реакция протекает в условиях идеального перемешивания, термо- и рН-статирования и что в реакции очень быстро устанавливается квазистационарное состояние (см. раздел 2.1), в котором все промежуточные формы фермента пахотятся в равновесии друг с другом. Приставка «квази» означает, что лишь часть переменных достигает стационарных значений, тогда как остальные продолжают медленно меняться. Использование допущения о достижении частью концентраций (био)химической системы квазистационарных значений известно в литературе как метод Боденштейна — Семенова [35, 36]¹. Этот метод позволяет резко упростить анализ (био)химических систем. Вместо решения систем нелинейных дифференциальных уравнений, описывающих изменение промежуточных веществ в ходе реакции, в соответствии с этим методом удастся решать лишь системы алгебраических уравнений, связывающих друг с другом квазистацио-

¹ Несмотря на широкое применение этого метода, он длительное время оставался математически необоснованным. Это вызывало и вызывает многочисленные недоразумения. Строгое математическое обоснование стало возможным лишь сравнительно недавно [37—43], после того, как А. Н. Тихоновым [37, 38] была доказана теорема о предельном переходе $\varepsilon \rightarrow 0$ в системе дифференциальных уравнений, содержащих малый параметр при некоторых производных.

нарные концентрации промежуточных веществ. Основная причина, из-за которой в ферментативной реакции устанавливается квазистационарное состояние, заключается в том, что концентрация фермента обычно на несколько порядков меньше, чем концентрации субстратов, взаимодействующих с ферментом [44, 45].

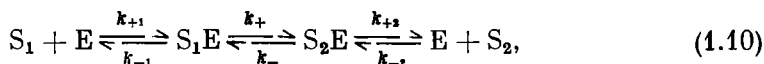
Как правило, системы алгебраических уравнений, описывающих квазистационарные состояния ферментативных реакций, линейны, так как взаимопревращения между промежуточными формами и комплексами представляются мономолекулярными реакциями. Поэтому для определения квазистационарных концентраций промежуточных веществ используются методы линейной алгебры. В последние годы для этой цели стали широко применяться методы теории графов [2, 46, 47].

Графом ферментативной реакции называется совокупность узлов, соответствующих квазистационарным концентрациям всех ферментных комплексов X_i ($i = 0, 1, 2, \dots, n$), и соединяющих их направленных ветвей, характеризуемых некоторой величиной k_{ij} , равной константе скорости превращения $X_i \xrightarrow{k_{ij}} X_j$. При этом k_{ij} , называемая величиной или передачей ветви, может быть функцией концентрации вещества, участвующего в данном превращении. Концентрация этого вещества считается в квазистационарном состоянии постоянной.

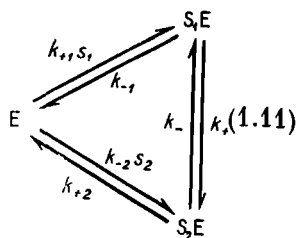
Например, ферментативная реакция



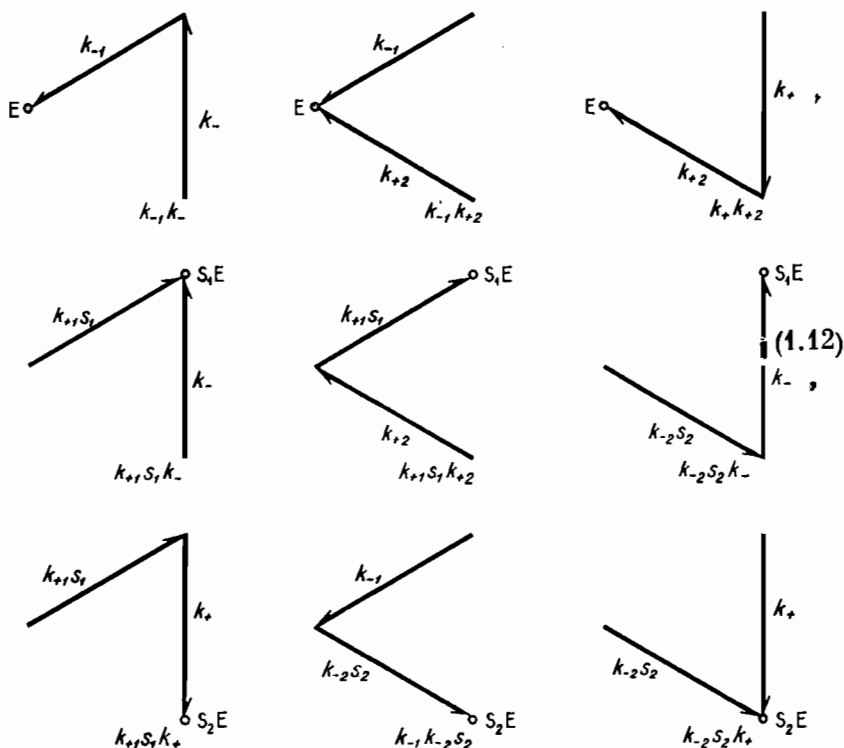
протекающая через промежуточное образование двух фермент-субстратных комплексов S_1E и S_2E :



может быть представлена в квазистационарном состоянии графом, имеющим три узла и шесть направленных ветвей. На графе (1.11) указаны величины ветвей; две из них ($k_{+1}s_1$ и $k_{-2}s_2$) зависят от концентраций $s_1 \equiv [S_1]$ и $s_2 \equiv [S_2]$, считающихся в квазистационарном состоянии постоянными.



Деревом графа, направленным в i -й узел, называется незамкнутая совокупность ветвей, направленных от всех узлов графа к i -му узлу. Дерево не имеет замкнутых или параллельных последовательностей. Величиной дерева D_i называется произведение величин всех его ветвей. Например, узлы графа (1.11) имеют следующие деревья (их величины приведены):

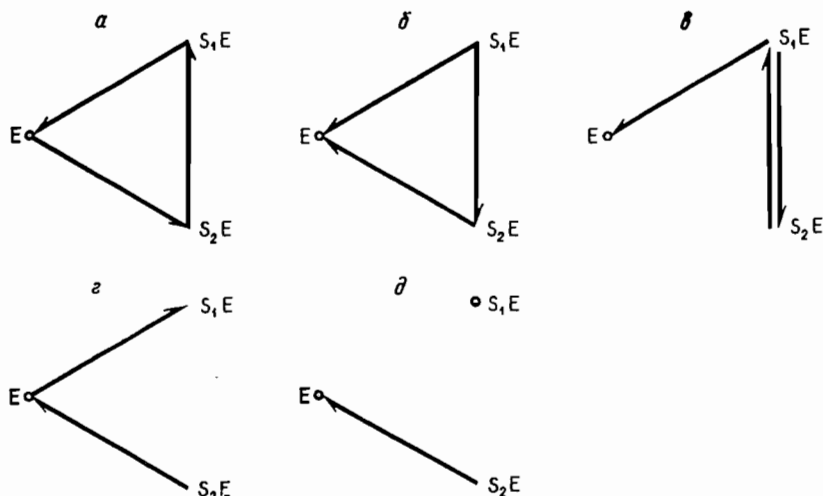


Так как в исходном графе имеется вся информация, необходимая для расчетов, при вычерчивании деревьев обычно не используют обозначения узлов и величин ветвей. Более того, при достижении некоторого навыка величины деревьев выписывают прямо по исходному графу — без вычерчивания деревьев.

Совокупности (на стр. 24) не являются деревьями узла E , так как a представляет собой замкнутую последовательность ветвей (цикл), b имеет две параллельные последовательности ветвей ($S_1E \rightarrow E$ и $S_1E \rightarrow S_2E \rightarrow E$), соединяющих узлы S_1E и E , c имеет цикл $S_1E \rightleftharpoons S_2E$, в g ветвь $E \rightarrow S_1E$ направлена от узла E , в d узел S_1E не связан с узлом E .

Базовым определителем Δ_i i -го узла называется сумма величин всех деревьев, направленных в i -й узел — базу. Определителем графа Δ называется сумма всех базовых определителей графа. Например, определителями узлов E , S_1E и S_2E в графе (1.11) являются следующие суммы величин деревьев (1.12):

$$\begin{aligned}\Delta_E &= k_{-1}k_{-} + k_{-1}k_{+2} + k_{+}k_{+2}, \\ \Delta_{S_1E} &= k_{+1}s_1k_{-} + k_{+1}s_1k_{+2} + k_{-2}s_2k_{-}, \\ \Delta_{S_2E} &= k_{+1}s_1k_{+} + k_{-1}k_{-2}s_2 + k_{-2}s_2k_{+},\end{aligned}\tag{1.13}$$



а определитель этого графа равен сумме трех базовых определителей:

$$\Delta = \Delta_E + \Delta_{S_1E} + \Delta_{S_2E}. \quad (1.14)$$

Начальная квазистационарная скорость ферментативной реакции выражается через определители графа реакции [2,47] следующим образом:

$$v = e_0 \frac{\sum_i k_i \Delta_i}{\Delta}, \quad (1.15)$$

где k_i — константа скорости образования или связывания продукта узлом X_i , Δ_i — базовый определитель узла X_i , e_0 — полная концентрация фермента. При вычислении v в случае обратимого образования продукта используется следующее соглашение о знаках: $k_i > 0$, если узел X_i выбрасывает продукт, и $k_i < 0$, если узел X_i связывает продукт.

Например, для графа (1.11) по формуле (1.14) следует записать

$$v = e_0 \frac{k_{+2} \Delta_{S_1E} - k_{-2} S_2 \Delta_E}{\Delta}. \quad (1.16)$$

Первый член в числителе положителен, так как распад S_2E освобождает S_2 , а второй член отрицателен, так как S_2 связывается с E .

Квазистационарные концентрации промежуточных комплексов находятся по формуле

$$[X_i] = e_0 \Delta_i / \Delta. \quad (1.17)$$

Так, в графе (1.11) концентрации свободного фермента и комплексов определяются выражениями

$$[E] = e_0 \Delta_E / \Delta, \quad [S_1 E] = e_0 \Delta_{S_1 E} / \Delta, \quad [S_2 E] = e_0 \Delta_{S_2 E} / \Delta.$$

Используя некоторые особенности структуры графа, его можно упростить [47]. Например, несколько ветвей, соединяющих узлы $i \rightarrow j$, можно слить в одну с величиной

$$k_{ij} = \sum_a k_{ija}. \quad (1.18)$$

Симметричные узлы с равными величинами ведущих от них ветвей можно слить в один узел. При этом концентрация комплекса, соответствующего образовавшемуся от слияния узлу, равная сумме концентраций исходных комплексов, а величины ветвей, ведущих к новому узлу q от узлов i , равны:

$$k_{iq} = \sum_a k_{ia}. \quad (1.19)$$

Определитель направленного графа, состоящего из двух подграфов A и B , имеющих одну общую точку i , можно найти по правилу

$$\Delta = \Delta^A \cdot \Delta_i^B + \Delta_i^A \cdot \Delta^B, \quad (1.20)$$

где Δ_i^A и Δ_i^B — базовые определители общего узла i подграфов A и B , а Δ^A и Δ^B — определители этих подграфов.

Стоит обратить внимание на то, что графы каталитических и, в частности, ферментативных реакций отличаются от обычных топологических графов, широко используемых в различных приложениях [48—51]. Это отличие обусловлено двумя особенностями (био)химических графов: во-первых, для каждого узла химического графа выполняется закон сохранения массы — сумма токов, сходящихся в узле, должна быть равна нулю, а, во-вторых, узловые переменные (концентрации) также связаны законом сохранения — сумма всех узловых концентраций равна полной концентрации фермента e_0 . Поэтому все правила преобразований обычных графов неприменимы к химическим графам без их переформулировки.

1.4. Модели реакций, катализируемых одноцентровыми ферментами

В этом разделе мы выведем уравнения квазистационарной скорости для нескольких ферментативных реакций, катализируемых одноцентровыми ферментами. Эти уравнения мы используем позднее для вывода уравнений, описывающих скорости реакций, катализируемых олигомерными ферментами,

Обратимая реакция $S_1 \xrightleftharpoons{E} S_2$

Раскрыв определители в формуле (1.16) с помощью выражений (1.13) и (1.14), получим после несложных преобразований следующее выражение для скорости реакции (1.9), протекающей по механизму (1.10):

$$v = \frac{V_+ s_1 / K_1 - V_- s_2 / K_2}{1 + s_1 / K_1 + s_2 / K_2}, \quad (1.21)$$

где

$$V_+ = e_0 k_+ k_{+2} / (k_+ + k_- + k_{-2}), \quad V_- = e_0 k_- k_{-1} / (k_+ + k_- + k_{-1})$$

— максимальные скорости прямой и обратной реакций,

$$K_1 = \frac{k_+ k_{+2} + k_- k_{+2} + k_- k_{-1}}{k_{+1} (k_+ + k_- + k_{+2})},$$

$$K_2 = \frac{k_+ k_{+2} + k_- k_{+2} + k_- k_{-1}}{k_{-2} (k_+ + k_- + k_{-1})}$$

— константы Михаэлиса.

При введении безразмерных концентраций $\sigma_1 = s_1 / K_1$, $\sigma_2 = s_2 / K_2$, безразмерной скорости $v = v / V_+$ и параметра $\kappa = V_- / V_+$ уравнение (1.21) принимает вид

$$v = (\sigma_1 - \kappa \sigma_2) / (1 + \sigma_1 + \sigma_2). \quad (1.22)$$

Если в графе (1.11) положить $k_- = 0$, то $\kappa = 0$ и уравнение скорости в этом случае

$$v = \sigma_1 / (1 + \sigma_1 + \sigma_2) \quad (1.23)$$

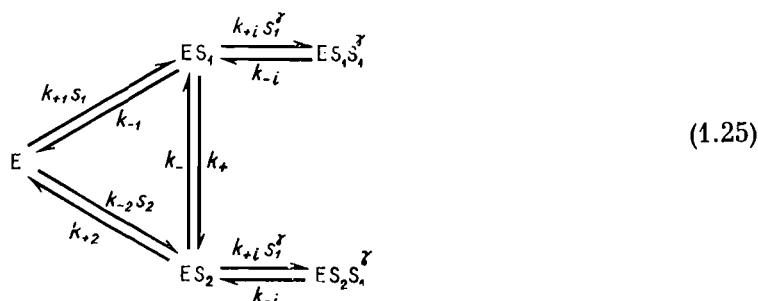
описывает конкурентное угнетение [3, с. 280] продуктом или аналогом субстрата S_2 . Кажущаяся константа Михаэлиса для S_1 в этом случае является функцией s_2 :

$$K_{1 \text{ app}} = K_1 (1 + s_2 / K_2). \quad (1.24)$$

Кинетические кривые $v(\sigma_1)$, описываемые уравнениями (1.22) и (1.23), представляют собой равнобочные гиперболы, либо пересекающие ось абсцисс в точке $\sigma_1 = \kappa \sigma_2$ [модель (1.22)], либо выходящие из начала координат [модель (1.23)].

Обратимая моносубстратная реакция с субстратным угнетением

Рассмотрим следующий механизм субстратного угнетения:



Применение формулы (1.15) к графу (1.25) дает следующее выражение для квазистационарной скорости реакции:

$$v = \frac{V_+ s_1 / K_1 - V_- s_2 K_2}{1 + (s_1 / K_1 + s_2 / K_2) (1 + (s_1 / K_i)^{\gamma})}, \quad (1.26)$$

где

$$\begin{aligned}
 V_+ &= k_+ k_{+2} / (k_+ + k_- + k_{+2}), & V_- &= k_- k_{-1} / (k_+ + k_- + k_{-1}), \\
 K_1 &= (k_+ k_{+2} + k_- k_{+2} + k_- k_{-1}) / k_{+1} (k_+ + k_- + k_{+2}), \\
 K_2 &= (k_+ k_{+2} + k_- k_{+2} + k_- k_{-1}) / k_{-2} (k_+ + k_- + k_{-1}), \\
 K_i &= \sqrt[\gamma]{k_{-i} / k_{+i}}, & s_1 &= [S_1], \quad s_2 = [S_2].
 \end{aligned}
 \quad (1.27)$$

Здесь K_i — константа субстратного угнетения.

Если ввести безразмерные переменные и параметры

$$\begin{aligned}
 \sigma_1 &= [S_1] / K_1, & \sigma_2 &= [S_2] / K_2, & v &= v / V_+, & \alpha &= (K_1 / K_i)^{\gamma}, \\
 \kappa &= V_- / V_+,
 \end{aligned}
 \quad (1.28)$$

то уравнение (1.26) примет вид

$$v = (\sigma_1 - \kappa \sigma_2) / (1 + (\sigma_1 + \sigma_2) (1 + \alpha \sigma_1^{\gamma})). \quad (1.29)$$

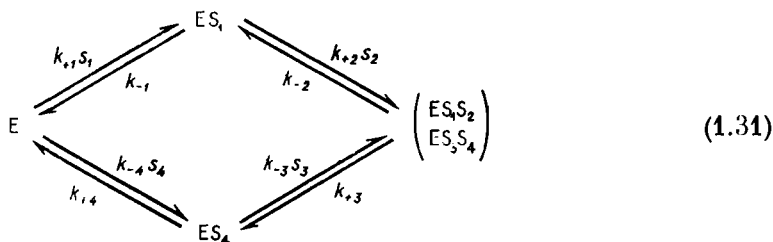
Зависимость скорости от концентрации первого субстрата v ($\sigma_1, \sigma_2 = \text{const}$) описывает кривую с максимумом, а зависимость v ($\sigma_1 = \text{const}, \sigma_2$) представляет собой гиперболу.

Обратимая двухсубстратная реакция с упорядоченным присоединением субстратов

Рассмотрим двухсубстратную обратимую реакцию



Граф такой реакции имеет вид



Согласно формуле (1.15), примененной к графу (1.31), квазистационарная скорость реакции (1.30) определяется выражением

$$v = \frac{V_+ \frac{s_1 s_2}{K_1 K_2} - \frac{\alpha_1}{\alpha_4} V_- \frac{s_3 s_4}{K_3 K_4}}{\left[\alpha_1 + \frac{s_1}{K_1} + \frac{s_2}{K_2} + \frac{s_1 s_2}{K_1 K_2} + \frac{\alpha_1}{\alpha_4} \left(\frac{s_3}{K_3} + \frac{s_4}{K_4} + \frac{s_3 s_4}{K_3 K_4} \right) + \right. \\ \left. + \frac{1}{\alpha_4} \left(\frac{s_1 s_3}{K_1 K_3} + \frac{s_2 s_4}{K_2 K_4} \right) + \frac{1}{\alpha_2 \alpha_4} \left(\frac{s_1 s_2 s_3}{K_1 K_2 K_3} + \frac{V_- s_2 s_3 s_4}{V_+ K_2 K_3 K_4} \right) \right]}, \quad (1.32)$$

в котором

$$V_+ = k_{+3} k_{+4} e_0 / (k_{+3} + k_{+4}), \quad V_- = k_{-1} k_{-2} e_0 / (k_{-1} + k_{-2}) \quad (1.33)$$

— максимальные скорости превращений $S_1 \rightarrow S_2$ и $S_2 \rightarrow S_1$,

$$K_1 = V_+ / k_{+1}, \quad K_2 = V_+ (k_{-2} + k_{+3}) / k_{+2} k_{+3},$$

$$K_3 = V_- (k_{-2} + k_{+3}) / k_{-2} k_{-3}, \quad K_4 = V_- / k_{-4} \quad (1.34)$$

— константы Михаэлиса для соответствующих субстратов, а α_i представляют собой отношения констант диссоциации фермент-субстратных комплексов к константам Михаэлиса:

$$\alpha_i = k_{-i} / k_{+i} K_i, \quad i = 1, 2; \quad (1.35)$$

$$\alpha_i = k_{+i} / k_{-i} K_i, \quad i = 3, 4. \quad (1.36)$$

Введение безразмерных концентраций

$$\sigma_i = [S_i] / K_i, \quad i = 1, 2, 3, 4, \quad (1.37)$$

приводит уравнение (1.32) к более простой форме:

$$v = \frac{\sigma_1 \sigma_2 - \kappa \frac{\alpha_1}{\alpha_4} \sigma_3 \sigma_4}{\left[\alpha_1 + \sigma_1 + \sigma_2 + \sigma_1 \sigma_2 + \frac{\alpha_1}{\alpha_4} (\sigma_3 + \sigma_4 + \sigma_3 \sigma_4) + \right. \\ \left. + \frac{1}{\alpha_4} (\sigma_1 \sigma_3 + \sigma_2 \sigma_4) + \frac{1}{\alpha_2 \alpha_4} (\sigma_1 \sigma_2 \sigma_3 + \kappa \sigma_2 \sigma_3 \sigma_4) \right]}, \quad (1.38)$$

где

$$v = v/V_+, \quad \kappa = V_-/V_+.$$

Рассмотрим кинетические кривые, описываемые уравнением (1.38) при $\sigma_3 = 0$:

$$v(\sigma_3 = 0) = \sigma_1 \sigma_2 / \left(\alpha_1 + \sigma_1 + \sigma_2 + \sigma_1 \sigma_2 + \frac{\alpha_1}{\alpha_4} \sigma_4 + \frac{1}{\alpha_4} \sigma_2 \sigma_4 \right). \quad (1.39)$$

Заметим, что согласно уравнению (1.39)

$$\lim_{\sigma_1, \sigma_2 \rightarrow \infty} v(\sigma_3 = 0) = 1. \quad (1.40)$$

Следовательно, субстрат S_4 , присоединяющийся непосредственно к свободному активному центру фермента, является конкурентным ингибитором для превращения $S_1 + S_2 \rightarrow S_3 + S_4$, так как он не изменяет максимальной скорости реакции. Пусть $\sigma_4 = 0$. В таком случае

$$v(\sigma_4 = 0) = \frac{\sigma_1 \sigma_2}{\left[\alpha_1 + \sigma_1 + \sigma_2 + \sigma_1 \sigma_2 + \frac{\alpha_1}{\alpha_4} \sigma_3 + \right. \\ \left. + \frac{1}{\alpha_4} \sigma_1 \sigma_3 + \frac{1}{\alpha_2 \alpha_4} \sigma_1 \sigma_2 \sigma_3 \right]}. \quad (1.41)$$

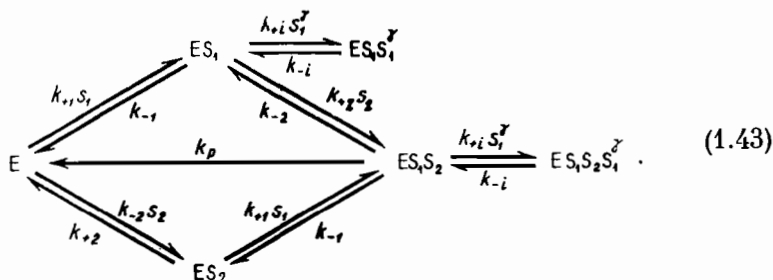
Теперь согласно уравнению (1.41)

$$\lim_{\sigma_1, \sigma_2 \rightarrow \infty} v(\sigma_4 = 0) = 1/(1 + \sigma_3/\alpha_2 \alpha_4). \quad (1.42)$$

Таким образом, в отличие от S_4 , S_3 выступает как неконкурентный ингибитор прямой реакции. С помощью подобной процедуры можно определить порядок присоединения всех субстратов реакции (1.30) к активному центру фермента. Кинетические зависимости, описываемые моделью (1.36), представляют собой гиперболы, начальный наклон и уровень насыщения которых зависят от концентраций остальных субстратов и их аналогов, способных связываться с активным центром.

Необратимая двухсубстратная реакция с субстратным угнетением

Представим двухсубстратную реакцию с субстратным угнетением графом, отражающим случайное и независимое присоединение субстратов к активному центру:



Применение уравнения (1.15) к графу (1.43) приводит к очень громоздкому выражению для v . Однако оно существенно упрощается, если принять, что $k_p \ll k_{-1}, k_{-2}$. При этом допущении скорость реакции (1.43)

$$v = \frac{Vs_1s_2}{(K_1 + s_1 + s_1^{\gamma+1}/K_1^{\gamma})(K_2 + s_2)} \quad (1.44)$$

В уравнении (1.44) максимальная скорость $V = k_p e_0$, а константы диссоциации фермент-субстратных комплексов определяются выражениями

$$K_1 = k_{-1}/k_{+1}, \quad K_2 = k_{-2}/k_{+2}, \quad K_i = \sqrt[\gamma]{k_{-i}/k_{+i}} \quad (1.45)$$

Зависимость $v(s_1 = \text{const}, s_2)$ описывается гиперболическими кривыми, а зависимость $v(s_1, s_2 = \text{const})$ представляет собой кривую с максимумом.

1.5. Модели реакций, катализируемых олигомерными ферментами

При теоретическом обсуждении свойств регуляторных ферментов и катализируемых ими реакций наиболее часто используются модели Моно, Уаймена и Шанжё [25] (эта модель далее сокращенно называется моделью МУШ), Кошлэнда [52] и Фридена—Курганова [53, 54]. Эти модели учитывают олигомерную четвертичную структуру регуляторного фермента и способность протомеров менять свою конформацию при присоединении к ним аллостерических модификаторов.

Модель МУШ [25] выведена в предположении, что олигомерный фермент имеет n идентичных протомеров, которые могут ме-

нять свое конформационное состояние только совместно. Принято, что существуют только два альтернативных конформационных состояния — активное состояние R и неактивное состояние T , между которыми происходят переходы, индуцированные аллостерическими модификаторами. Каждый протомер имеет один активный центр и один или несколько аллостерических центров, причем все центры (активные и аллостерические) считаются идентичными, а присоединение к ним молекул субстратов или модификаторов происходит статистически независимо. Присоединение субстратов к активным центрам фиксирует одно из двух конформационных состояний.

Согласно модели Кошлэнда [52], присоединение субстрата к активному центру одной субъединицы способно изменять конформацию соседних субъединиц. По этой причине число всех возможных конформационных состояний молекулы фермента, а следовательно, и число параметров, определяющих эти состояния и вероятность переходов между ними, могут быть очень большими, что делает эту модель бесполезной для анализа свойств полиферментных систем.

Модель Фридена — Курганова [53, 53] отличается от модели МУШ лишь тем, что совместные конформационные переходы сопровождаются обратимой диссоциацией молекулы фермента на идентичные субъединицы.

Все упомянутые модели были выведены для описания простейшей ферментативной реакции, катализируемой отдельным активным центром олигомера, а именно необратимой односубстратной реакции. Между тем подавляющее большинство регуляторных ферментов катализирует двух- и трехсубстратные реакции, многие из которых существенно обратимы.

Первая попытка обобщения модели МУШ на случай двухсубстратной необратимой реакции была предпринята Гольдштейном и Волькенштейном [55]. Недавно Поповой и Сельковым модель МУШ была обобщена на случай обратимой односубстратной реакции [56], а затем и на случай ферментативной реакции произвольной сложности [57]. Аналогичное обобщение выведено и для модели Фридена — Курганова [57].

Обобщение модели Моно — Уаймена — Шанжэ на многосубстратные реакции

Основываясь на результатах работы [57], рассмотрим ферментативное превращение s субстратов S_i ($1 \leq i \leq s$) в $N-s$ продуктов S_j ($1 + s \leq j \leq N$):

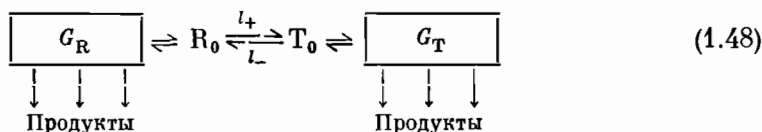
$$\sum_i S_i \xrightleftharpoons{E(R,T)} \sum_j S_j, \quad (1.46)$$

катализируемое ферментом-олигомером $E(R, T)$, относительно которого примем несколько упрощающих допущений.

Молекула фермента состоит из n протомеров (не обязательно идентичных), причем каждый i -й протомер имеет два устойчивых конформационных состояния g_i и t_i , соответствующие конформациям R и T фермента E . Конформационные переходы происходят совместно и только между формами фермента, свободными от субстратов:



Из сказанного следует, что кинетическую схему ферментативной реакции (1.46) можно представить в весьма общем виде — в виде графа:



Здесь G_R и G_T — подграфы, описывающие всевозможные взаимодействия субстратов с ферментом в конформации R и T . Если все $[S_i] \gg e_0$ (e_0 — полная концентрация фермента), то к графу (1.48) применимо предположение о квазистационарности (см. раздел 1.3). В этом случае, используя формулу (1.15) и правило (1.20), можно записать выражение для начальной квазистационарной скорости реакции, описываемой графом (1.48):

$$v = e_0 \frac{l_- \Delta_{T_0} \sum_p k_p \Delta_{R_p} + l_+ \Delta_{R_0} \sum_p k'_p \Delta_{T_p}}{l_- \Delta_{T_0} \Delta_R + l_+ \Delta_{R_0} \Delta_T}. \quad (1.49)$$

Здесь R_p и T_p — фермент-субстратные комплексы, распадающиеся с константами скорости k_p и k'_p на продукты реакции, Δ_{R_p} и Δ_{T_p} — определители подграфов G_R и G_T с базой в узлах R_p и T_p соответственно, Δ_R и Δ_T — определители подграфов G_R и G_T . Введем функцию отношения

$$\begin{aligned} Q &= \frac{\sum [T_i]}{\sum [R_i]} = e_0 \frac{l_+ \Delta_{R_0} \Delta_T}{l_+ \Delta_{R_0} \Delta_T + l_- \Delta_{R_0} \Delta_{T_0}} \bigg/ e_0 \frac{l_- \Delta_{T_0} \Delta_R}{l_+ \Delta_{R_0} \Delta_T + l_- \Delta_{R_0} \Delta_{T_0}} = \\ &= \frac{l_+ \Delta_{R_0} \Delta_T}{l_- \Delta_{R_0} \Delta_{T_0}} = L \left(\frac{\Delta_{R_0}}{\Delta_R} \bigg/ \frac{\Delta_{T_0}}{\Delta_T} \right). \end{aligned} \quad (1.50)$$

где $L = l_+/l_-$ — константа равновесия изомерных переходов (1.47), или аллостерическая функция. С учетом равенства (1.50)

перепишем выражение (1.49):

$$v = e_0 \frac{\sum_p k_p \Delta_{R_p}}{\Delta_R} \cdot \frac{1 + Q \frac{\sum_p k'_p \Delta_{T_p}}{\Delta_T}}{1 + Q \frac{\sum_p k_p \Delta_{R_p}}{\Delta_R}}. \quad (1.51)$$

Рассмотрим первый сомножитель в выражении (1.51). Сравнивая выражения (1.50) и (1.51), нетрудно заметить, что

$$\Phi_R \equiv e_0 \frac{\sum_p k_p \Delta_{R_p}}{\Delta_R} = \lim_{L \rightarrow 0} v. \quad (1.52)$$

Из определения (1.52) ясно, что функция скорости Φ_R есть скорость катализа реакции (1.46) ферментом, представленным только конформацией R. Аналогично введем

$$\Phi_T \equiv e_0 \frac{\sum_p k'_p \Delta_{T_p}}{\Delta_T} = \lim_{L \rightarrow \infty} v. \quad (1.53)$$

Условимся считать, что R — более активная конформация, чем T, т. е.

$$\max \Phi_R \geq \max \Phi_T. \quad (1.54)$$

Введем регуляторную функцию Ψ как отношение

$$\Psi \equiv \frac{v}{\lim_{L \rightarrow 0} v} = \frac{v}{\Phi_R} = \frac{1 + Q \Phi_T / \Phi_R}{1 + Q}. \quad (1.55)$$

Из выражения (1.50) для Q видно, что

$$Q = L \frac{\lim_{L \rightarrow 0} [R_0]}{\lim_{L \rightarrow \infty} [T_0]} = L \frac{\{R_0\}_R}{\{T_0\}_T}. \quad (1.56)$$

Таким образом, для получения выражения (1.46) для начальной квазистационарной скорости реакции достаточно рассмотреть три независимые реакции:



Из реакций (1.57) и (1.58) определяются функции скорости Φ_R и

Φ_T и стационарные концентрации $[R_0]_R$ и $[T_0]_T$, а из реакции (1.59) — аллостерическая функция L [25].

Итак, с учетом введенных обозначений (1.52), (1.53) и (1.56) уравнение (1.51) можно переписать теперь в следующем виде:

$$v = \Phi_R \left(1 + \frac{\Phi_T}{\Phi_R} L \frac{[R_0]_R}{[T_0]_T} \right) / \left(1 + L \frac{[R_0]_R}{[T_0]_T} \right). \quad (1.60)$$

Вывод функций Φ_R , Φ_T , $[R_0]_R$ и $[T_0]_T$ может оказаться довольно сложной задачей. Она упрощается, если предположить, что присоединение субстратов и продуктов к активным центрам фермента происходит статистически независимо.

В этом случае

$$\Phi_R = \sum_i f_i, \quad \Phi_T = \sum_i f'_i, \quad (1.61)$$

где f_i и f'_i — функции скорости активных центров i -го протомера в конформации r и t . Показано [57], что при сделанном предположении функция отношения

$$Q = L \left(\prod_i [r_{oi}]_R \right) / \left(\prod_i [t_{oi}]_T \right). \quad (1.62)$$

где r_{oi} и t_{oi} — свободные активные центры i -го протомера в конформации r и t . Начальная квазистационарная скорость на основе принятых предположений определяется как

$$v = \sum_i f_i \left(1 + \frac{\sum_i f'_i}{\sum_i f_i} L \frac{\prod_i [r_{oi}]_R}{\prod_i [t_{oi}]_T} \right) / \left(1 + L \frac{\prod_i [r_{oi}]_R}{\prod_i [t_{oi}]_T} \right). \quad (1.63)$$

Выражение (1.63) еще более упрощается, если принятые ранее допущения дополнить еще одним — протомеры фермента E идентичны.

При удовлетворении всех принятых допущений

$$\begin{aligned} \Phi_R &= nf, & \Phi_T &= nf', \\ Q &= (L [r_0]_R / [t_0]_T)^n, \end{aligned} \quad (1.64)$$

а скорость описывается простым уравнением

$$v = nf (1 + (f'/f) Q) / (1 + Q). \quad (1.65)$$

В выражении (1.65) функции f , f' , $[r_0]_R$ и $[t_0]_T$ выводятся для одного активного центра. В этом случае весьма полезным может оказаться метод графов, если для выбранного механизма взаимодействия

субстратов с активным центром в литературе [3,58] нет готовых формул для f и $[r_0]$.

В качестве примера приведем выражения для начальной квазистационарной скорости обратимой моносубстратной реакции $S_1 \xrightleftharpoons{E(R,T)} S_2$, протекающей по механизму (1.10). Согласно формуле (1.22) запишем выражения для f и f' в безразмерных переменных, определяемых соотношением (1.21):

$$f = nV_+ \frac{\sigma_1 - \kappa\sigma_2}{1 + \sigma_1 + \sigma_2}, \quad f' = nV'_+ \frac{c_1\sigma_1 - \kappa'c_2\sigma_2}{1 + c_1\sigma_1 + c_2\sigma_2}. \quad (1.66)$$

Здесь V'_+ — максимальная скорость прямой реакции, катализируемой одним протомером в форме t (по условию $V'_+ \ll V_+$), а

$$c_1 = K_1/K'_1, \quad c_2 = K_2/K'_2 \quad (1.67)$$

— коэффициенты неисключающего присоединения [25]. Предполагая, что фермент не меняет константу равновесия реакции, потребуем одновременного выполнения двух условий:

$$\sigma_1 - \kappa\sigma_2 = 0, \quad c_1\sigma_1 - \kappa'c_2\sigma_2 = 0. \quad (1.68)$$

Отсюда вытекает термодинамическое ограничение на параметры

$$\kappa = \kappa'c_2/c_1, \quad (1.69)$$

или в размерной форме

$$V_-V'_+/(V_+V_-) = K_2K'_1/(K_1K'_2). \quad (1.70)$$

С учетом выражения (1.69) можно записать:

$$f' = nV'_+c_1(\sigma_1 - \kappa\sigma_2)/(1 + c_1\sigma_1 + c_2\sigma_2) = af(1 + \sigma_1 + \sigma_2)/(1 + c_1\sigma_1 + c_2\sigma_2), \quad (1.71)$$

где

$$a = c_1V'_+/V_+ \leq c_1. \quad (1.72)$$

Из графа (1.11) находим

$$[r_0]_R = e_0\Delta_E/(\Delta_E + \Delta_{ES_1} + \Delta_{ES_2}) = e_0/(1 + \sigma_1 + \sigma_2), \quad (1.73)$$

$$[t_0]_T = e_0\Delta'_E/(\Delta'_E + \Delta'_{ES_1} + \Delta'_{ES_2}) = e_0/(1 + c_1\sigma_1 + c_2\sigma_2). \quad (1.74)$$

Теперь с учетом выражений (1.64), (1.66), (1.69) и (1.71) — (1.74) уравнение (1.65) для скорости реакции $S_1 \xrightleftharpoons{E(R,T)} S$ принимает вид [56]:

$$v = \frac{v}{nV_+} = \frac{\sigma_1 - \kappa\sigma_2}{1 + \sigma_1 + \sigma_2} \cdot \frac{1 + aL \left(\frac{1 + c_1\sigma_1 + c_2\sigma_2}{1 + \sigma_1 + \sigma_2} \right)^{n-1}}{1 + L \left(\frac{1 + c_1\sigma_1 + c_2\sigma_2}{1 + \sigma_1 + \sigma_2} \right)^n}. \quad (1.75)$$

Обобщение модели Фридена — Курганова
для переходов типа тетрамер — димер

Пусть реакция (1.46) катализируется ферментом-олигомером Е (R, T), удовлетворяющим основным требованиям модели МУШ, с той разницей, что согласованные конформационные переходы связаны с обратимой диссоциацией субъединиц. Рассмотрим частный случай такой диссоциации — диссоциацию активного фермента на две менее активные субъединицы



В положении равновесия реакции (1.76) имеем

$$[R_0] = L [T_0]^2. \quad (1.77)$$

Введя функции Φ_R и Φ_T , аналогичные функциям (1.52) и (1.53), запишем начальную квазистационарную скорость реакции

$$\begin{aligned} v &= \Phi_R \frac{\sum [R_i]}{\sum [R_i] + \sum [T_i]} + \Phi_T \frac{\sum [T_i]}{\sum [R_i] + \sum [T_i]} = \\ &= \Phi_R \frac{1 + \frac{\Phi_T}{\Phi_R} \cdot \frac{\sum [T_i]}{\sum [R_i]}}{1 + \frac{\sum [T_i]}{\sum [R_i]}} = \Phi_R \frac{1 + \frac{\Phi_T}{\Phi_R} Q}{1 + Q} \end{aligned} \quad (1.78)$$

в виде, аналогичном предыдущему случаю:

$$v = \Phi_R \Psi. \quad (1.79)$$

Функция отношения Q при этом имеет вид:

$$Q = \frac{\sum [T_i]}{\sum [R_i]} = \frac{[T_0]}{[R_0]} \frac{\Delta_T \Delta_{R_0}}{\Delta_T \Delta_R} = \frac{1}{L [T_0]} \cdot \frac{\Delta_T \Delta_{R_0}}{\Delta_T \Delta_R}. \quad (1.80)$$

Стационарную концентрацию $[T_0]$ определим из соотношения:

$$e_0 = 2 [R_0] \Delta_R / \Delta_{R_0} + [T_0] \Delta_T / \Delta_T. \quad (1.81)$$

или

$$[T_0]^2 + [T_0] \Delta_T \Delta_{R_0} / (2L \Delta_T \Delta_R) - e_0 \Delta_R / (2L \Delta_R) = 0.$$

Решив получившееся уравнение относительно $[T_0]$ и подставив выражение для $[T_0]$ в выражение (1.80), получим

$$Q = \frac{4}{\sqrt{1 + \frac{8e_0 L \Delta_T^2 \Delta_R}{\Delta_T^2 \Delta_{R_0}} - 1}}. \quad (1.82)$$

Пусть фермент удовлетворяет также и принятым ранее допущениям. В этом случае начальная квазистационарная скорость

$$v = nf \frac{1 + (j'/2f) Q}{1 + Q}, \quad (1.83)$$

где

$$Q = 4/(\sqrt{1 + 8e_0 L (\Delta_t \Delta_r / \Delta_t \Delta_r)^n} - 1). \quad (1.84)$$

Для рассмотренного в разделе 1.3 примера обратимой односубстратной реакции (1.14) выражения (1.83) и (1.84) принимают вид:

$$v = nV_+ \frac{\sigma_1 - \kappa\sigma_2}{1 + \sigma_1 + \sigma_2} \left(1 + a \frac{1 + \sigma_1 + \sigma_2}{1 + c_1\sigma_1 + c_2\sigma_2} Q \right) / (1 + Q), \quad (1.85)$$

$$Q = \frac{4}{\left(\sqrt{1 + 8e_0 L \left(\frac{1 + \sigma_1 + \sigma_2}{1 + c_1\sigma_1 + c_2\sigma_2} \right)^n} - 1 \right)}.$$

Полученные при довольно простых предположениях относительно механизма взаимодействия субстратов с активными центрами модели реакций, катализируемых олигомерными регуляторными ферментами, отличаются от одноцентровых моделей существенной нелинейностью. Такие модели способны описать многие характерные особенности поведения регулируемых ферментативных реакций при самой простой кинетике катализа, осуществляемого отдельным активным центром протомера.

1.6. Свойства реакции $S_1 \xrightleftharpoons{E(R,T)} S_2$

Рассмотрим реакцию



катализируемую ферментом $E(R, T)$, удовлетворяющим всем трем требованиям, изложенным в разделе 1.5. Примем, что стерические аналоги субстратов A_i ($i = 1, 2, \dots$) могут конкурентно связываться с активными центрами, а метаболиты-регуляторы связываются аллостерическими центрами фермента.

Не производя математических выкладок (они аналогичны выкладкам, проведенным в разделе 1.5), запишем выражение для безразмерной квазистационарной скорости реакции (1.86):

$$v = \frac{v}{nV_+} = \frac{\sigma_1 - \kappa\sigma_2}{1 + \sigma_1 + \sigma_2 + a} \times$$

$$\times \frac{\left(1 + aL \left(\frac{1 + c_1\sigma_1 + c_2\sigma_2 + da}{1 + \sigma_1 + \sigma_2 + a} \right)^{n-1} \right)}{\left(1 + L \left(\frac{1 + c_1\sigma_1 + c_2\sigma_2 + da}{1 + \sigma_1 + \sigma_2 + a} \right)^n \right)}. \quad (1.87)$$

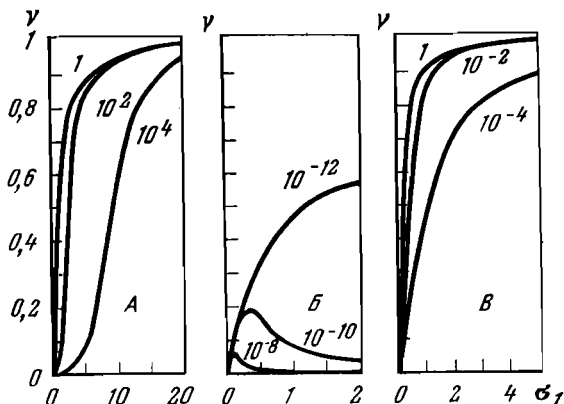


Рис. 1. Зависимость безразмерной скорости $v = v/V$ реакции (1.86) от безразмерной концентрации субстрата $\sigma_1 = [S_1]/K_1$, построенная с помощью модели (1.88) при различных значениях аллостерической функции L (цифры на кривых) и при $n = 4$, $a = c_1 = 0$ (А), $a = 0$, $c_1 = 10^3$ (Б) и $a = c_1 = 10$ (В)

Здесь $\alpha = A/K_A$ — безразмерная концентрация аналога субстрата А, нормированная на свою константу диссоциации, $a = K_A/K'_A$ — константа неисключающего присоединения для А. Рассмотрим частные случаи модели (1.87).

Односубстратная необратимая реакция

При $\sigma_2 = \alpha = 0$ модель (1.87) редуцируется к виду

$$v = \frac{\sigma_1}{1 + \sigma_1} \left(1 + aL \left(\frac{1 + c_1\sigma_1}{1 + \sigma_1} \right)^{n-1} \right) / \left(1 + L \left(\frac{1 + c_1\sigma_1}{1 + \sigma_1} \right)^n \right), \quad (1.88)$$

который с точностью до обозначений совпадает с моделью МУШ [25]. Анализ этой модели, проведенный в работах [59, 60], показал, что помимо гиперболических кривых $v(\sigma_1)$ она может описывать сигмоидальную кривую, а также кривую с максимумом. Основным параметром в модели (1.88), ответственным за эффект субстратной активации или угнетения, является коэффициент неисключающего присоединения c_1 : при $c_1 < 1$ возможна сигмоидальная или гиперболическая зависимость v от σ_1 , при $c_1 > 1$ — гиперболическая кривая или кривая с максимумом. При выполнении условий

$$n \geq 2, \quad c_1 < (n-1)/n, \quad 0 \leq a < c_1, \quad (1.89)$$

$$1/(n(1 - c_1) - 1) < L < (n-1)/(ac_1^{n-1})$$

уравнение (1.88) может описывать сигмоидальную зависимость v от σ_1 (рис. 1, А), при выполнении условий

$$\begin{aligned} n &\geq 2, \quad c_1 > n/(n-1), \\ 0 &\leq a < c_1 (c_1 - n/(n-1))/(c_1 n/(n-1) - 1), \\ L &> 1/(c_1^{n-1} (n-1)(c_1 - n/(n-1))) \end{aligned} \quad (1.90)$$

— кривую с максимумом (рис. 1, В), отражающую субстратное угнетение, а при невыполнении условий (1.89) и (1.90) зависимость $v(\sigma_1)$ может носить гиперболический или квазигиперболический характер (рис. 1, В). Условия (1.89) и (1.90) являются необходимыми, но недостаточными. Для получения достаточных условий необходимо решить систему нелинейных уравнений, определяющих граничные значения параметров.

Необратимая изомеризация фермент-субстратных комплексов

При $\kappa = 0$ модель (1.87) описывает необратимую изомеризацию фермент-субстратных комплексов, происходящую в каждом активном центре олигомера. В этом случае модель (1.87) принимает вид:

$$v = \frac{\sigma_1}{1 + \sigma_1 + \sigma_2 + \alpha} \frac{\left(1 + aL \left(\frac{1 + c_1\sigma_1 + c_2\sigma_2 + d\alpha}{1 + \sigma_1 + \sigma_2 + \alpha}\right)^{n-1}\right)}{\left(1 + L \left(\frac{1 + c_1\sigma_1 + c_2\sigma_2 + d\alpha}{1 + \sigma_1 + \sigma_2 + \alpha}\right)^n\right)}. \quad (1.91)$$

Хотя реакция протекает необратимо, продукт S_2 точно так же, как и аналоги A_i , конкурирует с субстратом S_1 за свободные активные центры. Введем новый масштаб измерения концентрации субстрата:

$$\bar{\sigma}_1 = \sigma_1 / (1 + \sigma_2 + \alpha) \quad (1.92)$$

и новые параметры

$$\bar{a} = ba, \quad \bar{c}_1 = bc_1, \quad \bar{L} = L/b^n, \quad (1.93)$$

где

$$b = (1 + \sigma_2 + \alpha)/(1 + \tilde{c}_2\sigma_2 + d\alpha). \quad (1.94)$$

Замена переменных и параметров (1.92)—(1.94) приводит модель (1.91) к виду

$$v = \frac{\bar{\sigma}_1}{1 + \bar{\sigma}_1} \left(1 + \bar{a}\bar{L} \left(\frac{1 + \bar{c}_1\bar{\sigma}_1}{1 + \bar{\sigma}_1}\right)^{n-1}\right) / \left(1 + L \left(\frac{1 + \bar{c}_1\bar{\sigma}_1}{1 + \bar{\sigma}_1}\right)^n\right), \quad (1.95)$$

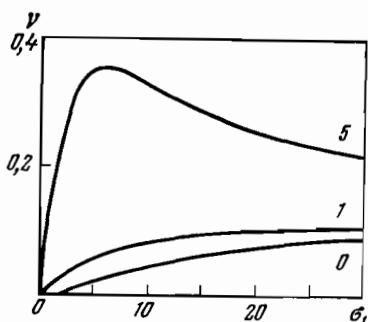


Рис. 2. Зависимость безразмерной скорости v реакции (1.86) от безразмерной концентрации субстрата σ_1 при различных концентрациях продукта σ_2 (цифры на кривых)

Кривые построены по модели (1.91) при $\alpha = 0$, $c_1 = 4$, $c_2 = 0$, $L = 10^4$ и $n = 8$

аналогичному модели (1.88). При $\sigma_2 = \text{const}$ модель (1.95) может описывать один из трех типов кривых: сигмоидальную кривую при

$$n \geq 2, \quad c_1 < (n-1)/(nb), \quad 0 \leq a < c_1, \quad (1.96)$$

$$b^n/(n(1-bc_1)-1) < L < 1/(ac_1^{n-1}),$$

кривую с максимумом при

$$n \geq 2, \quad c_1 > n/(b(n-1)), \quad (1.97)$$

$$0 \leq a < c_1(c_1 - n/(b(n-1)))/(c_1n/(n-1) - 1/b),$$

$$b^n > L > 1/((c_1^{n-1}(n-1)(c_1 - n/(b(n-1))))).$$

и гиперболическую кривую при невыполнении условий (1.96), (1.97). Условия (1.96) и (1.97), как и условия (1.89) и (1.90), являются лишь необходимыми. Так как выполнение условий (1.96) и (1.97) зависит от концентраций S_2 и A , то с изменением этих концентраций может меняться тип кинетической зависимости. Например, для одних и тех же параметров: $a = 0$, $c_1 = 0,4$, $L = 10^4$, $n = 8$ и $c_2 = 0$, $\alpha = 0$ зависимость $v(\sigma_1)$ может описываться сигмоидальной кривой при $\sigma_2 = 0$, гиперболической — при $\sigma_2 = 1$ и кривой с максимумом — при $\sigma_2 = 5$ (рис. 2). Такая же эволюция типа зависимости $v(\sigma_1)$ возможна и при изменении концентрации аналога A . Из рис. 2 видно, что с увеличением концентрации продукта скорость его образования резко возрастает. Такая изостерическая продуктная активация является частным случаем изостерической активации олигомерных ферментов аналогами субстрата [25, 60, 61]. Заметим, что изостерическая активация в отличие от аллостерической, возникающей при уменьшении L , наблюдается в определенном диапазоне концентраций аналога субстрата и при больших концентрациях аналога сменяется изостерическим угнетением вследствие конкуренции с субстратом за активные центры фермента.

Общий случай

Для его рассмотрения удобно представить скорость (1.87) в виде разности

$$v = v_+ - v_-, \quad (1.98)$$

где

$$v_+ = \frac{\sigma_1}{1 + \sigma_1 + \sigma_2 + a} \Psi, \quad v_- = \frac{\kappa \sigma_2}{1 + \sigma_1 + \sigma_2 + a} \Psi \quad (1.99)$$

— безразмерные скорости прямой и обратной реакций. По определению (1.98), скорость v может быть как положительной ($v > 0$, если $v_+ > v_-$), так и отрицательной ($v < 0$, если $v_+ < v_-$).

В случае обратимой реакции большие концентрации продукта ($\sigma_2 \geq \sigma_1/\kappa$) угнетают прямую реакцию v (σ_1). Не столь очевидно, что малые концентрации продукта ($\sigma_2 \ll \sigma_1/\kappa$) способны изостерически активировать прямую реакцию. Необходимые условия существования эффекта изостерической продуктной активации [56, 61] определяются неравенствами

$$n \geq 2, \quad 0 < a < c_1,$$

$$0 \leq c_2 < (n - 1 - \kappa)/n,$$

$$(1 + \kappa)/(n(1 - c_2) - 1 - \kappa) < L < (1 + \kappa)/(\kappa c_1 + c_2)^{n-1}/a. \quad (1.100)$$

Если в этих неравенствах положить $\kappa = 0$, то они будут определять условия существования сигмоидальной зависимости начальной квазистационарной скорости обратной реакции v_- (σ_2). Отсюда вытекает простое правило для обратимых реакций, катализируемых олигомерными ферментами: субстрат, активирующий реакцию в прямом направлении, при обращении реакции становится продуктом-активатором. Это правило справедливо и в том случае, когда субстрат является аллостерическим активатором фермента. На рис. 3 показана зависимость скорости реакции v от σ_2 при различных σ_1 (рис. 3, а) и различных значениях L (рис. 3, б). Продуктная изостерическая активация наблюдается лишь в определенном диапазоне значений σ_2 и L . В противоположность ей аллостерическая продуктная активация не сменяется угнетением фермента при больших концентрациях σ_2 .

Из рис. 3 видно, что прямая и обратная реакции ведут себя различно в зависимости от добавок продукта и аллостерических эффекторов. Так, если прямая реакция активируется своим продуктом S_2 , то обратная реакция только угнетается своим продуктом S_1 (см. рис. 3, а). Прямая и обратная реакции различаются и по чувствительности к действию аллостерических эффекторов, описываемому функцией L : прямая реакция очень чувствительна к из-

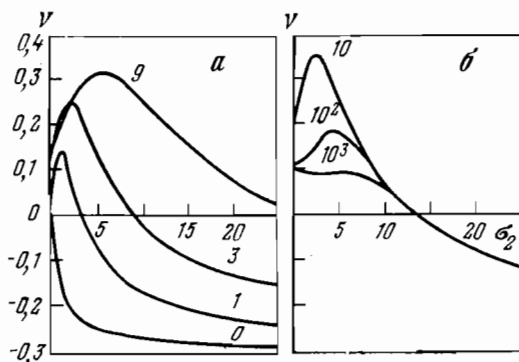


Рис. 3. Зависимость безразмерной скорости v реакции (1.86) от концентрации продукта σ_2 при различных значениях концентрации субстрата σ_1 (цифры на кривых) (а) и аллостерической константы L (цифры на кривых) (б)

Кривые построены по модели (1.87) при $a=0,1$, $c_1=1$, $c_2=0$, $n=6$, $\kappa=0,3$, $L=10$ (а) и $\sigma_1=3$ (б)

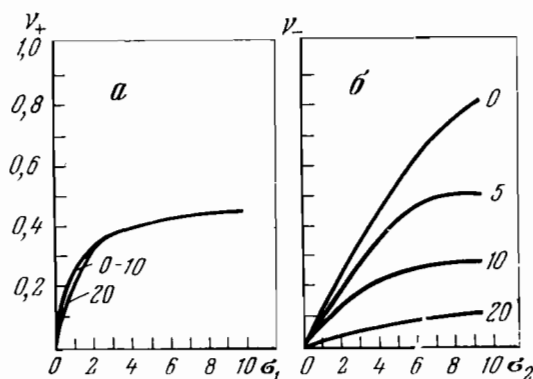
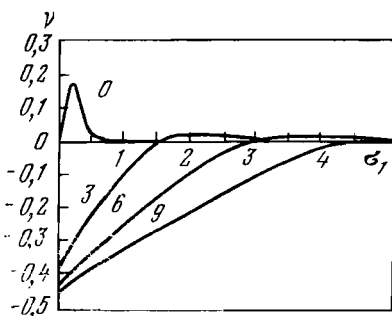


Рис. 4. Зависимости безразмерной скорости v_+ прямой реакции (1.86) (а) и безразмерной скорости v_- обратной реакции (б) от безразмерных концентраций σ_1 (а) и σ_2 (б) при $n=4$, $c_1=1$, $c_2=0$, $d=0$, $\kappa=0,2$, $a=0,5$, $\bar{L}=5 \cdot 10^4$; цифры на кривых — значения α

менениям L , обратная реакция практически нечувствительна к изменениям L в данных условиях (см. рис. 3, б). При $L > 10^6$ прямая реакция уже не чувствительна к добавкам аллостерических ингибиторов, а обратная реакция угнетается по конкурентному типу. Подобное свойство обратимой реакции наблюдалось экспериментально [62, 63] в форме так называемого однонаправленного действия ингибиторов на обратимую НАДФ-зависимую глутаматдегидрогеназную (КФ 1.4.1.3) реакцию. Это явление объясняется сильным различием в сродстве субстратов S_1 и S_2 к активным центрам конформаций R и T. Однонаправленное действие аналога A на реакцию (1.86) при $c_1=1$ (S_1 одинаково хорошо присоединяется к конформациям R и T) и $c_2=0$ (S_2 связывается лишь конформацией R) показано на рис. 4. На рис. 4, а показана зависимость скорости прямой реакции v_+ от σ_1 , построенная при различных концентрациях аналога α и при $\sigma_2=0$, а на рис. 4, б — аналогичная зависимость скорости обратной реакции v_- при $\sigma_1=0$. Как видно из рисунка, аналог A практически не влияет на скорость прямой реакции в интервале концентраций

Рис. 5. Зависимость безразмерной скорости v реакции (1.86) от концентрации субстрата σ_1 при различных значениях концентрации продукта σ_2 (цифры на кривых), построенная по модели (1.87) при $n = 10$, $c_1 = 20$, $c_2 = 0$, $a = 0$, $\kappa = 0,5$, $L = 2,5 \cdot 10^{-8}$

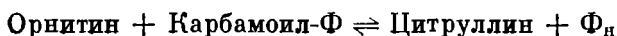


$0 \leq \alpha \leq 20$, но оказывает сильное угнетающее воздействие на обратную реакцию в том же интервале значений α .

Кривые на рис. 4 построены для $\kappa = 0,2$. При таком значении κ обратная реакция термодинамически менее выгодна, чем прямая. Тем не менее, как видно из сопоставления двух семейств, представленных на рисунке, максимальная скорость обратной реакции при $\sigma_1 = \alpha = 0$ больше, чем максимальная скорость прямой реакции при аналогичных условиях ($\sigma_2 = \alpha = 0$). Таким образом, олигомерный фермент может при определенных условиях катализировать термодинамически менее выгодное направление реакции $S_2 \xrightarrow{v_-} S_1$ с большей эффективностью и большей чувствительностью к действию изо- и аллостерических эффекторов, чем направление $S_1 \xrightarrow{v_+} S_2$.

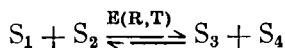
Еще один пример способности олигомерных ферментов эффективно катализировать термодинамически невыгодные превращения показан на семействе кривых $v(\sigma_1)$, построенных на рис. 5 при различных значениях σ_2 и при $c_1 = 20$ (предпочтительное связывание S_1 конформацией Т), $c_1 = 0$ (конформация Т не способна связывать S_2), $a = 0$ (конформация Т каталитически неактивна), $\kappa = 0,5$ (V_+ в два раза выше, чем V_-) и $L = 2,5 \cdot 10^{-8}$ (равновесие $R_0 \rightleftharpoons T_0$ сильно смещено в пользу R_0). Как видно из рис. 5, из-за субстратного угнетения прямой реакции термодинамически выгодное превращение $S_1 \rightarrow S_2$ происходит с заметной скоростью лишь при малых концентрациях субстрата и при отсутствии продукта, тогда как обратное превращение $S_2 \rightarrow S_1$ протекает с большой скоростью при любых значениях концентрации продукта $\sigma_2 > \sigma_1/\kappa$.

Подобными же свойствами олигомерного фермента можно объяснить парадоксальное сосуществование в клетках двух различных карбоамилфосфат-трансфераз (КФ 2.1.3.3), катализирующих реакцию



в противоположных направлениях. Анаболическая трансфераза, имеющая в различных организмах от 2 до 3 протомеров [11], катализирует термодинамически выгодную реакцию карбамоилирования орнитина. Анаболический фермент имеет гиперболическую кинетику по отношению к своим субстратам и конкурентно угнетается своими продуктами [64]. Катаболическая карбамоилфосфат-трансфераза, имеющая восемь протомеров и молекулярный вес $M = 400\,000$, катализирует, как полагают [64], преимущественно термодинамически невыгодную обратную реакцию — фосфолиз цитруллина. Катаболический фермент характеризуется исключительно высокой кооперативностью взаимодействий со всеми реагентами: $n = 8$, $L \sim 10^6$, $c \approx 0$ — для любого субстрата в анаболическом или катаболическом направлении [64]. Именно этой высокой кооперативностью и объясняется «антитермодинамическое» действие катаболического фермента. Действительно, в соответствии со сформулированным выше правилом катаболический фермент должен кооперативно изостерически активироваться своими продуктами при протекании реакции в любом направлении. По этой причине при высокой концентрации субстратов и низкой концентрации продуктов анаболической реакции катаболический фермент не в состоянии катализировать эту реакцию из-за недостатка цитруллина и Φ_n — продуктов-активаторов. В этих же условиях анаболический фермент, напротив, максимально активен — субстратов достаточно, а продукты-ингибиторы практически не угнетают его. При высокой концентрации цитруллина и Φ_n анаболический фермент изостерически угнетен упомянутыми продуктами, а катаболический фермент переводится в активную конформацию, способную в этих условиях катализировать фосфолиз цитруллина. Переходу в активное конформационное состояние способствуют как большие концентрации цитруллина и Φ_n , так и повышение концентраций орнитина и карбамоилфосфата, вызванное угнетением анаболического фермента.

1.7. Свойства двухсубстратной реакции



Разобранные в предыдущем параграфе свойства модели реакции $S_1 \xrightleftharpoons{E(R,T)} S_2$ справедливы и для более сложных реакций. Рассмотрим, например, двухсубстратную реакцию



со случайным присоединением субстратов к каждому активному центру. Предполагая, что промежуточные фермент-субстратные

комплексы находятся в равновесии друг с другом [3, с. 68], и используя общее уравнение (1.65), приходим к следующей модели реакции (1.101):

$$v = \frac{v}{nV_+} = \frac{\sigma_1\bar{\sigma}_2 - \kappa\sigma_3\bar{\sigma}_4}{1 + \sigma_1 + \sigma_2 + \sigma_1\sigma_2 + \sigma_3 + \sigma_4 + \sigma_3\sigma_4} \frac{1 + aLq^{n-1}}{1 + Lq^n}, \quad (1.102)$$

$$q = \frac{1 + c_1\sigma_1 + c_2\sigma_2 + c_1c_2\sigma_1\sigma_2 + c_3\sigma_3 + c_4\sigma_4 + c_3c_4\sigma_3\sigma_4}{1 + \sigma_1 + \sigma_2 + \sigma_1\sigma_2 + \sigma_3 + \sigma_4 + \sigma_3\sigma_4}. \quad (1.103)$$

Заменой переменных

$$\bar{\sigma}_1 = \sigma_1(1 + \sigma_2)/(1 + \sigma_2 + \sigma_4), \quad \bar{\sigma}_3 = \sigma_3(1 + \sigma_4)/(1 + \sigma_2 + \sigma_4), \quad \bar{v} = v(1 + \sigma_2)/\sigma_2 \quad (1.104)$$

и параметров

$$\begin{aligned} \bar{\kappa} &= \kappa\sigma_4(1 + \sigma_2)/\sigma_2(1 + \sigma_4), \quad \bar{c}_1 = c_1(1 + \sigma_2 + \sigma_4)(1 + c_2\sigma_2)/(1 + c_2\sigma_2 + c_4\sigma_4)(1 + \sigma_2), \\ \bar{c}_3 &= c_3(1 + \sigma_2 + \sigma_4)(1 + c_4\sigma_4)/(1 + \sigma_4)(1 + c_2\sigma_2 + c_4\sigma_4), \\ \bar{L} &= L((1 + c_2\sigma_2 + c_4\sigma_4)/(1 + \sigma_2 + \sigma_4))^n, \\ \bar{a} &= a(1 + \sigma_2 + \sigma_4)/(1 + c_2\sigma_2 + c_4\sigma_4) \end{aligned} \quad (1.105)$$

модель (1.102) при $\sigma_2 > 0$ приводится к виду

$$\dot{v} = \frac{\bar{\sigma}_1 - \bar{\kappa}\bar{\sigma}_3}{1 + \bar{\sigma}_1 + \bar{\sigma}_3} \frac{\left(1 + \bar{a}\bar{L} \left(\frac{1 + \bar{c}_1\bar{\sigma}_1 + \bar{c}_3\bar{\sigma}_3}{1 + \bar{\sigma}_1 + \bar{\sigma}_3}\right)^{n-1}\right)}{\left(1 + \bar{L} \left(\frac{1 + \bar{c}_1\bar{\sigma}_1 + \bar{c}_3\bar{\sigma}_3}{1 + \bar{\sigma}_1 + \bar{\sigma}_3}\right)^n\right)}, \quad (1.106)$$

аналогичному модели односубстратной обратимой реакции (1.87) со всеми ее свойствами: различными типами кинетических зависимостей $v(\sigma_1)$ или $v(\sigma_3)$ при различных значениях концентрации остальных субстратов, продуктной активацией, субстратным угнетением, различной чувствительностью прямой и обратной реакций к действию изо- и аллостерических метаболитов.

В этой главе были рассмотрены математические модели, описывающие зависимости скоростей ферментативных реакций от концентраций реагентов и модификаторов в квазистационарном состоянии. При этом основное внимание было уделено очень важной для моделирования полиферментных систем теме — выводу и анализу уравнений, описывающих квазистационарные скорости сложных ферментативных реакций, т. е. реакций с большим числом реагентов, катализируемых олигомерными ферментами. Такие ферменты имеют множество идентичных или неидентичных активных центров, а их протомеры способны совершать конформа-

ционные перестройки, изменяющие каталитическую активность фермента, а иногда и его агрегатное состояние. Выведенные уравнения для сложных реакций записаны в такой форме, которая позволяет по известным (или выводимым с помощью приведенного в этой главе метода графов) выражениям, описывающим механизм действия одиночного активного центра, легко получить уравнение квазистационарной скорости для многоцентрового фермента.

В следующей главе мы используем выведенные выше уравнения для анализа поведения ферментативных реакций в нестационарных проточных условиях — в условиях, характерных для живой клетки.

Глава вторая

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОТОЧНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

2.1. *Общие методы исследования системы обыкновенных дифференциальных уравнений второго порядка*

Динамика ферментативных реакций, полиферментных систем, процессов мембранного транспорта и любых других биологических процессов описывается системами нелинейных дифференциальных уравнений. В тех случаях, когда пространственной протяженностью моделируемой системы можно пренебречь, ее динамика описывается системой обыкновенных дифференциальных уравнений.

Современные методы численного анализа и применение мощных электронно-вычислительных машин позволяют получить при заданных начальных условиях решение систем нелинейных дифференциальных уравнений очень высокого порядка, содержащих десятки и даже сотни независимых переменных. Однако, решая систему при различных начальных условиях, удастся найти далеко не все качественно различные типы динамического поведения, поскольку всегда существует вероятность того, что при других начальных условиях поведение системы будет совершенно иным. Качественные же методы наиболее полно разработаны только для систем двух дифференциальных уравнений. Очень часто, однако, многие математические модели ферментативных реакций, полиферментных и мембранных систем удастся свести именно к системам дифференциальных уравнений второго порядка. Обычно после нормализации переменных и параметров такая модель второго

порядка принимает вид:

$$\frac{dx}{dt} = P(x, y), \quad \varepsilon \frac{dy}{dt} = Q(x, y), \quad (2.1)$$

где x и y — безразмерные переменные, ε — безразмерный масштабный множитель, который иногда оказывается функцией переменных. Нормализацию, т. е. выбор единиц измерения переменных, стремятся провести таким образом, чтобы в некоторой области определения переменных x и y , представляющей наибольший интерес для моделирования, переменные и правые части имели бы одинаковые порядки величин: $x \sim y, |P(x, y)| \sim |Q(x, y)|$. После такой нормировки относительное изменение переменных определяется параметром ε :

$$\frac{dy}{dx} = \frac{1}{\varepsilon} \frac{Q(x, y)}{P(x, y)} \sim \frac{1}{\varepsilon}. \quad (2.2)$$

Подробное изложение методов качественного анализа моделей второго порядка можно найти в классических работах математической школы А. А. Андропова [65 — 67].

Чтобы не отсылать читателя слишком часто к этим работам, ниже коротко описаны те из качественных методов анализа, которые используются в последующих разделах.

Для изображения движений представляющей или фазовой точки системы (2.1) пользуются плоскостью (x, y) , которая называется фазовой плоскостью. Стационарные состояния системы (2.1) определяются из условий

$$\frac{dx}{dt} = P(x, y) = 0, \quad (2.3a)$$

$$\varepsilon \frac{dy}{dt} = Q(x, y) = 0 \quad (2.3б)$$

и являются особыми точками фазовой плоскости. Значения переменных $x = \bar{x}$ и $y = \bar{y}$, удовлетворяющие системе уравнений (2.3), называются стационарными. В особых точках фазовой плоскости не определен угол наклона $\varphi = \arctg(dy/dx)$ касательных к фазовым траекториям — траекториям, описываемым представляющей точкой с изменением времени t при различных начальных значениях переменных x и y . Совокупность фазовых траекторий образует фазовый портрет системы (2.1). На фазовой плоскости уравнения (2.3) определяют две линии — изоклины горизонтальных ($Q(x, y) = 0, dy/dx = 0$) и вертикальных ($P(x, y) = 0, dy/dx = \infty$) касательных к фазовым траекториям. Эти изоклины иначе называются главными или нуль-изоклинами.

Для многих приложений большой интерес представляют так называемые релаксационные или жесткие модели второго порядка — модели вида (2.1), в которых $\varepsilon \ll 1$. При $\varepsilon \ll 1$ x представляет собой медленную переменную, а y — быструю перемен-

ную, так как при движении представляющей точки вдали от нуль-изоклин скорости изменения переменных различаются в $1/\varepsilon$ раз: $dx/dt \sim 1$, $dy/dt \sim 1/\varepsilon$. Благодаря этому различию в модели существуют два типа движений: быстрое движение в течение времени $t \sim \varepsilon$, в ходе которого представляющая точка движется по фазовой траектории к изоклине $Q(x, y) = 0$, и медленное движение (или медленный дрейф) представляющей точки вдоль узкой окрестности изоклины $Q(x, y) = 0$. Это медленное движение осуществляется по направлению к одной из устойчивых особых точек или к одному из экстремумов этой изоклины, где оно обычно теряет устойчивость и сменяется быстрым движением. При $\varepsilon \ll 1$ все фазовые траектории вдали от изоклины $Q(x, y) = 0$ представляют собой почти прямые линии, угол наклона которых $\varphi = \arctg(dy/dx) \sim \arctg(1/\varepsilon) \approx 90^\circ$. В фазе медленного движения с высокой точностью выполняется условие (2.36). Значение быстрой переменной $y = \tilde{y}$, удовлетворяющее условию (2.36), называют квазистационарным, фазу медленного движения — квазистационарным состоянием, а изоклину $Q(x, y) = 0$ — квазистационарной кривой.

Устойчивость и характер стационарного состояния в большинстве случаев можно определить из анализа корней характеристического уравнения системы, линеаризованной в окрестности стационарного состояния [65]. Характеристическое уравнение имеет вид

$$\lambda^2 - Sp\lambda + \Delta = 0, \quad (2.4)$$

где

$$Sp = \frac{\partial P}{\partial x} + \frac{\partial Q'}{\partial y}, \quad \Delta = \frac{\partial P}{\partial x} \frac{\partial Q'}{\partial y} - \frac{\partial Q'}{\partial x} \frac{\partial P}{\partial y}, \quad Q' = \frac{Q}{\varepsilon}$$

Частные производные в формулах для Sp и Δ являются коэффициентами линейных членов разложения правых частей системы (2.1) в ряд Тейлора в окрестности стационарной точки $x = \bar{x}$, $y = \bar{y}$.

Уравнение (2.4) имеет корни

$$\lambda_{1,2} = Sp/2 \pm \sqrt{D}, \quad (2.5)$$

где

$$D = (Sp/2)^2 - \Delta.$$

При $\Delta < 0$ оба корня действительны и имеют разные знаки. Такая точка неустойчива и является седлом. Случай комплексных корней (подкоренное выражение уравнения (2.5) отрицательно) соответствует точке типа фокуса, а при $D > 0$ особая точка является узлом. Как фокус, так и узел устойчивы, если $Sp < 0$, и неустойчивы при $Sp > 0$.

Если линейное приближение дает $Sp = 0$ или $\Delta = 0$, то характер особой точки остается неопределенным в рамках линейного приближения. В том случае, когда $Sp = 0$, точка может быть

центром или устойчивым (неустойчивым) сложным фокусом кратности $k = (n - 1)/2$, где n — наименьший номер фокусной величины α_n ($n = 3, 5, 7 \dots$), отличной от нуля [67]. Для нахождения фокусных величин необходимо использовать коэффициенты при нелинейных членах разложения правых частей системы (2.1). Значения $Sp = 0$ или $\Delta = 0$ в отличие от других значений Sp и Δ соответствуют негрубым, или сложным особым точкам и бифуркационным значениям параметров. При сколь угодно малом возмущении системы из k -кратного фокуса могут родиться не более k предельных циклов, а сложная точка с $\Delta = 0$ может либо распасться на несколько точек, либо исчезнуть, так как $\Delta = 0$ соответствует касанию кривых (2.2) на плоскости (x, y) [65]. В случае одновременного равенства нулю Sp и Δ топологию сложной (или вырожденной) особой точки можно исследовать при помощи замены переменных, расщепляющих сложную точку на ряд простых [67].

Для знания качественной структуры фазового портрета необходимо определить взаимное расположение конечного числа особых траекторий — особых точек, сепаратрис и предельных циклов [65—67]. Устойчивые предельные циклы соответствуют устойчивым незатухающим колебаниям, а неустойчивые предельные циклы и сепаратрисы седел играют роль «водораздела» между областями фазовой плоскости с различным поведением фазовых траекторий.

За редкими исключениями, расположение предельных циклов определяется только численным интегрированием. Однако иногда можно сделать вывод о наличии предельного цикла (устойчивого или неустойчивого), если на фазовой плоскости удастся найти циклы без контакта [65—67], т. е. замкнутые кривые, которые пересекаются фазовыми траекториями в одном направлении — внутрь или наружу. Так, внутри цикла без контакта должен существовать по крайней мере один устойчивый предельный цикл, если на цикле без контакта фазовые траектории направлены внутрь, а в ограничиваемой им области нет устойчивых особых точек. Устойчивый предельный цикл существует и тогда, когда на фазовой плоскости все особые точки и бесконечность системы неустойчивы. Для некоторых систем неустойчивость бесконечности показывается весьма просто (см. разделы 2.2 и 2.3). Если же на бесконечности могут быть особые точки, то исследование этих точек проводят с использованием преобразования Пуанкаре [65, с. 366], которое отображает бесконечно удаленные точки на экватор сферы.

В зависимости от значений параметров системы (2.1) ее фазовый портрет может качественно меняться. Бифуркационные значения параметров, при которых $Sp = 0$ или $\Delta = 0$, делят пространство параметров на ряд областей, различающихся числом и устойчивостью особых точек. Иногда помимо границ $Sp = 0$ и $\Delta = 0$ используется граница $D = 0$, которая разделяет особые

точки типа узла и фокуса. Из соображений наглядности при большом числе параметров эти границы наносятся на плоскость двух параметров, а значения остальных параметров фиксируются. Такая плоскость параметров называется параметрическим портретом. Практически построение параметрического портрета по линейному приближению сводится к построению в плоскости двух выбранных параметров системы, — скажем, параметров α и β , — границ, определяемых критическими или бифуркационными значениями параметров.

Важнейшими границами параметрического портрета являются следующие:

линия нейтральности — граница устойчивости стационарного состояния, определяемая системой алгебраических уравнений

$$\begin{aligned} S_P(x, y; \alpha, \beta) &= 0, & P(x, y; \alpha, \beta) &= 0, \\ Q(x, y; \alpha, \beta) &= 0; \end{aligned} \quad (2.6)$$

линия моностационарности — граница области существования однократного стационарного состояния (вне этой области существуют три стационарных состояния — одно седло и два узла или фокуса), определяемая системой

$$\begin{aligned} \Delta(x, y; \alpha, \beta) &= 0, & P(x, y; \alpha, \beta) &= 0, \\ Q(x, y; \alpha, \beta) &= 0; \end{aligned} \quad (2.7)$$

линия кратности корней характеристического уравнения — граница области существования стационарного состояния типа фокуса (вне этой границы стационарное состояние представляет собой узел), определяемая системой

$$\begin{aligned} D(x, y; \alpha, \beta) &= 0, & P(x, y; \alpha, \beta) &= 0, \\ Q(x, y; \alpha, \beta) &= 0. \end{aligned} \quad (2.8)$$

Если системы (2.6), (2.7) и (2.8) не разрешаются в явном виде относительно параметров α и β , то можно воспользоваться параметрическим заданием границ, взяв в качестве свободного параметра стационарное значение x или y .

Построенный с помощью этих границ параметрический портрет в общем случае не позволяет установить все возможные для данной модели типы фазовых портретов, так как существуют качественные изменения фазового портрета вдали от стационарных точек. Такие нелокальные изменения вызываются слиянием сепаратрис седел, слиянием или расщеплением предельных циклов, слиянием предельного цикла с петлей сепаратрис и т. д. [65—67]. Для выявления нелокальных бифуркаций обычно используются численные методы, позволяющие существенно дополнить параметрический портрет границами существования устойчивых или неустойчивых предельных циклов — границами, на которых происходят слияния различных пар сепаратрис и т. п.

Иногда при исследовании моделей специального вида оказывается выгодным использовать не фазовую плоскость, а другую систему координат. Так, например, математические модели открытых ферментативных реакций часто имеют следующую структуру:

$$\frac{dx}{dt} = v_{xm} - k_x x - v(x, y), \quad (2.9a)$$

$$\varepsilon \frac{dy}{dt} = v_{ym} - k_y y + v(x, y), \quad (2.9б)$$

где $v(x, y)$ — скорость некоторой реакции $X \rightarrow Y$, v_{xm} и v_{ym} — скорости образования веществ X и Y , а члены $k_x x$ и $k_y y$ учитывают расхождение X и Y в других реакциях.

При $\varepsilon \ll 1$ модель (2.9) допускает простое графическое исследование, если использовать координаты концентрация — скорость. Нахождение квазистационарных значений $y = \tilde{y}$ и $v = v(x, \tilde{y})$ производится по точкам пересечений кривой $v(x, y)$ с прямой $v_y = v_{ym} - k_y y$ в плоскости (y, v) , концентрация x при этом считается постоянной. Меняя значение x и определяя для каждого нового x значение скорости v , можно построить зависимость $\tilde{v}(x)$ — квазистационарную входную (или выходную) характеристику реакции. Точки пересечения прямой $v_x = v_{xm} - k_x x$ с квазистационарной характеристикой $\tilde{v}(x)$, построенной в плоскости (x, v) , определяют стационарные точки модели (2.9). Такой метод позволяет очень быстро без трудоемких компьютерных расчетов определить не только возможное число стационарных точек, но и их устойчивость. Так, если единственная стационарная точка располагается на неустойчивом участке квазистационарной характеристики, то она оказывается неустойчивой. Если характеристика $\tilde{v}(x)$ имеет гистерезис (S- или Z-образный характер), а все стационарные точки расположены на неустойчивом участке характеристики, то в модели (2.9) имеется разрывный предельный цикл. Такой графический анализ эквивалентен рассмотрению вырожденной системы

$$\frac{dx}{dt} = v_{xm} - k_x x - v(x, y), \quad (2.10)$$

$$0 = v_{ym} - k_y y + v(x, y)$$

или эквивалентного ей уравнения

$$\frac{dx}{dt} = v_{xm} - k_x x - \tilde{v}(x), \quad (2.11)$$

к которым редуцируется модель (2.9) с помощью предельного перехода $\varepsilon \rightarrow 0$. Справедливость замены модели (2.9) моделью (2.10) основана на теореме Тихонова [37, 38] о предельном переходе

Возвращаясь к общей модели (2.1), стоит заметить, что очень часто такие модели имеют S- или Z-образную нуль-изоклину $Q(x, y) = 0$. Квазистационарные значения $y = \tilde{y}$, соответствующие ординатам точек, расположенных между двумя экстремумами этой изоклины, неустойчивы. Это приводит к тому, что любая стационарная точка модели (2.1), расположенная на неустойчивом участке изоклины $Q(x, y)$ (на участке, где $dy/dx > 0$), при $\varepsilon \ll 1$ оказывается неустойчивой.

Субстратное угнетение — широко распространенный тип регуляторного воздействия на активность ферментов [3, с. 72; 68; 69]. Однако трактовка физиологической роли такой регуляции долгое время встречала затруднения, за исключением, может быть, угнетения аденозинтрифосфатом фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11), которое, как считают [69], способно предотвращать бесполезный синтез АТФ в гликолитической системе, когда его уровень достаточно высок. Математический анализ особенностей кинетики открытых ферментативных реакций при наличии субстратного угнетения показал возможность существования нескольких стационарных состояний с различной устойчивостью, гистерезиса и незатухающих колебаний [70—73].

$$\begin{array}{c} \xrightarrow{v_1} S_1 \xrightleftharpoons[\vec{v}]{\vec{E}} S_2 \xleftarrow{v_2} \end{array}, \quad (2.12)$$
$$v_1 = v_{1m} - k_1 [S_1], \quad v_2 = v_{2m} - k_2 [S_2] \quad (2.13)$$
$$\frac{d[\text{S}]}{dt} = v_{1m} - k_1[\text{S}] - v, \quad \frac{d[\text{P}]}{dt} = v_{2m} - k_2[\text{P}] + v. \quad (2.14)$$

Для удобства анализа приведем эту модель к безразмерному виду:

$$\begin{aligned} \varepsilon \frac{d\sigma_1}{d\tau} &= v_{1m} - \beta_1 \sigma_1 - v \equiv \varepsilon P(\sigma_1, \sigma_2), \\ \frac{d\sigma_2}{d\tau} &= v_{2m} - \beta_2 \sigma_2 + v \equiv Q(\sigma_1, \sigma_2). \end{aligned} \quad (2.15)$$

Здесь

$$v = (\sigma_1 - \alpha \sigma_2) / (\xi + (\sigma_1 + \sigma_2)(\xi + \sigma_1^\gamma)) \quad (2.16)$$

— безразмерная скорость реакции (2.12).

Безразмерные переменные и параметры модели связаны с размерными следующим образом:

$$\begin{aligned} \sigma_1 &= [S_1]/K_1, & \sigma_2 &= [S_2]/K_2, & \tau &= V_+ (K_1/K_i)^{-\gamma}/K_2, \\ \alpha &= V_-/V_+, & \varepsilon &= K_1/K_2, & \xi &= (K_i/K_1)^\gamma, \\ v_{1m} &= v_{1m}/V_+ \xi, & \beta_1 &= k_1 K_1/V_+ \xi, \\ v_{2m} &= v_{2m}/V_+ \xi, & \beta_2 &= k_2 K_2/V_+ \xi, \end{aligned} \quad (2.17)$$

В соотношениях (2.17) использованы размерные параметры, входящие в выражение (1.26). Рассмотрим квазистационарную выходную характеристику $\tilde{v}(\sigma_2)$ модели (2.15), определяемую уравнением

$$v_{1m} - \beta_1 \sigma_1 - v = 0. \quad (2.18)$$

Из уравнений (2.16) и (2.18) следует, что

$$\sigma_2 = (\tilde{\sigma}_1 - \tilde{v}(\xi + \tilde{\sigma}_1(\xi + \tilde{\sigma}_1^\gamma))) / (\alpha + \tilde{v}(\xi + \tilde{\sigma}_1^\gamma)), \quad (2.19)$$

где $\tilde{\sigma}_1 = (v_{1m} - \tilde{v})/\beta_1$ и $\tilde{v}$ — квазистационарные значения. Семейство квазистационарных выходных характеристик $\tilde{v}(\sigma_2)$, построенное по формуле (2.19), показано на рис. 6. Из этого рисунка видно, что при больших значениях σ_2 квазистационарная скорость реакции $\tilde{v}$ становится отрицательной, т. е. реакция протекает в обратном направлении: $S_2 \rightarrow S_1$. Если значение α достаточно мало, то в некотором диапазоне значений σ_2 зависимость $\tilde{v}(\sigma_2)$ неоднозначна, что связано с наличием экстремумов у функции $\sigma_2(\tilde{v})$. На рис. 6 в экстремальных точках $\tilde{v}$ положительно. Покажем, что это имеет место при любых значениях параметров модели (2.15). Дифференцирование уравнения (2.18) дает

$$-\beta_1 d\sigma_1 - \frac{\partial v}{\partial \sigma_1} d\sigma_1 - \frac{\partial v}{\partial \sigma_2} d\sigma_2 = 0, \quad (2.20)$$

откуда

$$d\sigma_2 = - \frac{\beta_1 + \partial v / \partial \sigma_1}{\partial v / \partial \sigma_2} d\sigma_1. \quad (2.21)$$

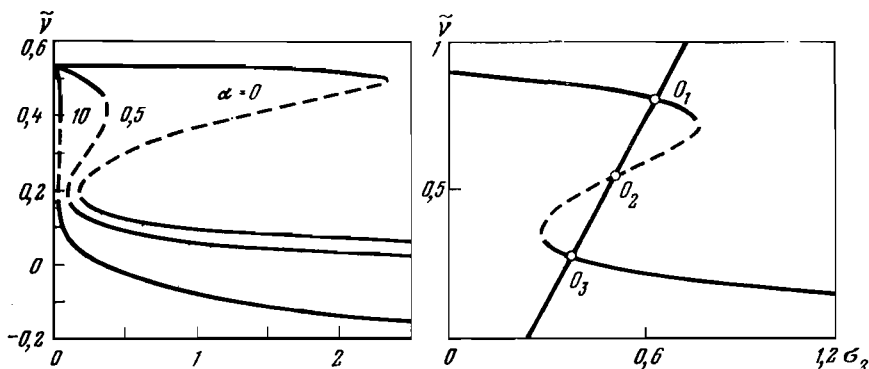


Рис. 6. Семейство квазистационарных выходных характеристик реакции (2.12), построенных по уравнению (2.19) при $v_{1m} = 0,55$, $\beta_1 = 0,165$, $\xi = 0,1$, $\gamma = 2$ и различных значениях α (цифры на кривых)

Здесь и на рис. 7, 10, 11 пунктиром отмечены участки, соответствующие неустойчивым квазистационарным состояниям при $\varepsilon = 0$

Рис. 7. Графическое нахождение стационарных состояний реакции (2.12)

Стационарные состояния O_1 , O_2 и O_3 представляют собой точки пересечения гистерезисной квазистационарной выходной характеристики $\tilde{v}(\sigma_2)$, построенной по уравнению (2.19), с линейной характеристикой стока (источника) продукта $v_2 = \beta_2 \sigma_2 - v_{2m}$. Параметры: $\alpha = 0,2$, $\gamma = 2$, $\beta_1 = 0,4$, $\beta_2 = 2,5$, $v_{1m} = 0,95$, $v_{2m} = 0,5$, $\xi = 0,1$

В экстремальных точках должно выполняться условие $\partial \sigma_2 / \partial \tilde{v} = 0$ и, учитывая уравнение (2.21),

$$\beta_1 = -\partial v / \partial \sigma_1. \quad (2.22)$$

Поскольку β_1 всегда неотрицательно, то экстремумы существуют лишь при

$$\partial v / \partial \sigma_1 \leq 0. \quad (2.23)$$

Однако скорость, определяемая выражением (2.16), может быть отрицательной только при $\sigma_1 - \alpha \sigma_2 < 0$, что приводит к неравенству

$$\frac{\partial v}{\partial \sigma_1} = \frac{(\xi + \sigma_1^Y)(\sigma_1 + \sigma_2) - (\sigma_1 - \alpha \sigma_2)(\gamma \sigma_1^{Y-1}(\sigma_1 + \sigma_2) + \xi + \sigma_1^Y)}{(\xi + (\sigma_1 + \sigma_2)(\xi + \sigma_1^Y))^2} > 0, \quad (2.24)$$

которое противоречит выражению (2.23).

Из этого следует, что в случае трех стационарных состояний каждое из них имеет $v > 0$ (как на рис. 7).

Выходная характеристика имеет форму, показанную на рис. 7, только в определенной области значений параметров. Эта область

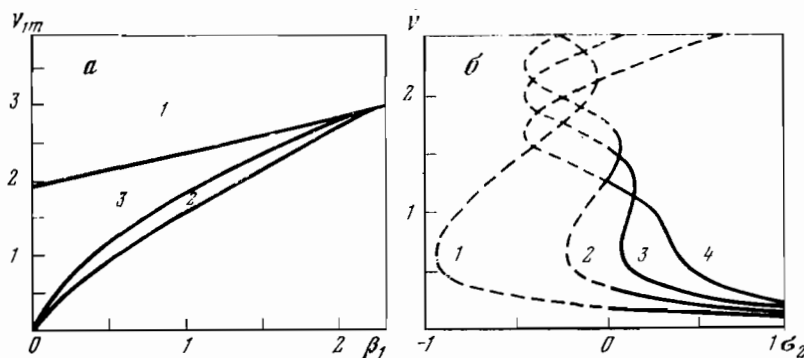


Рис. 8. Зависимость формы выходной характеристики реакции (2.12) от параметров

а — плоскость параметров (β_1, v_{1m}) источника субстрата реакции (2.12). На плоскости построены границы (2.25) и (2.26), отделяющие области, в которых выходная характеристика реакции $\tilde{v}(\sigma_2)$ имеет качественно различные формы;

б — качественно различные формы выходной характеристики реакции (2.12), соответствующие четырем областям, показанным на рис. а; v_{1m} : 1 — 2,55; 2 — 2,0; 3 — 1,75; 4 — 1,4; $\alpha = 0,5$; $\beta_1 = 1$; $\gamma = 2$; $\xi = 0,1$

ограничена с одной стороны границей

$$\frac{d\sigma_2}{d\tilde{v}} = 0, \quad \frac{d^2\sigma_2}{d\tilde{v}^2} = 0, \quad (2.25)$$

на которой экстремумы сливаются с образованием точки перегиба, а с другой стороны — границей

$$\frac{d\sigma_2}{d\tilde{v}} = 0, \quad \sigma_2 = 0, \quad (2.26)$$

при пересечении которой меняется знак σ_2 в одной из экстремальных точек. Границы, определяемые уравнениями (2.25) и (2.26) в плоскости параметров (β_1, v_{1m}) , изображены на рис. 8, а, а различные типы выходных характеристик — на рис. 8, б.

Уравнение линии нейтральности модели (2.15) имеет вид

$$-\frac{1}{\varepsilon} \left(\beta_1 + \frac{\partial v}{\partial \sigma_1} \right) + \frac{\partial v}{\partial \sigma_2} - \beta_2 = 0, \quad (2.27)$$

линии моностационарности —

$$\beta_1 \beta_2 - \beta_1 \frac{\partial v}{\partial \sigma_2} + \beta_2 \frac{\partial v}{\partial \sigma_1} = 0, \quad (2.28)$$

и линии кратности —

$$\left(-\frac{1}{\varepsilon} \left(\beta_1 - \frac{\partial v}{\partial \sigma_1} \right) + \beta_2 - \frac{\partial v}{\partial \sigma_2} \right)^2 - \frac{4}{\varepsilon} \frac{\partial v}{\partial \sigma_1} \frac{\partial v}{\partial \sigma_2} = 0. \quad (2.29)$$

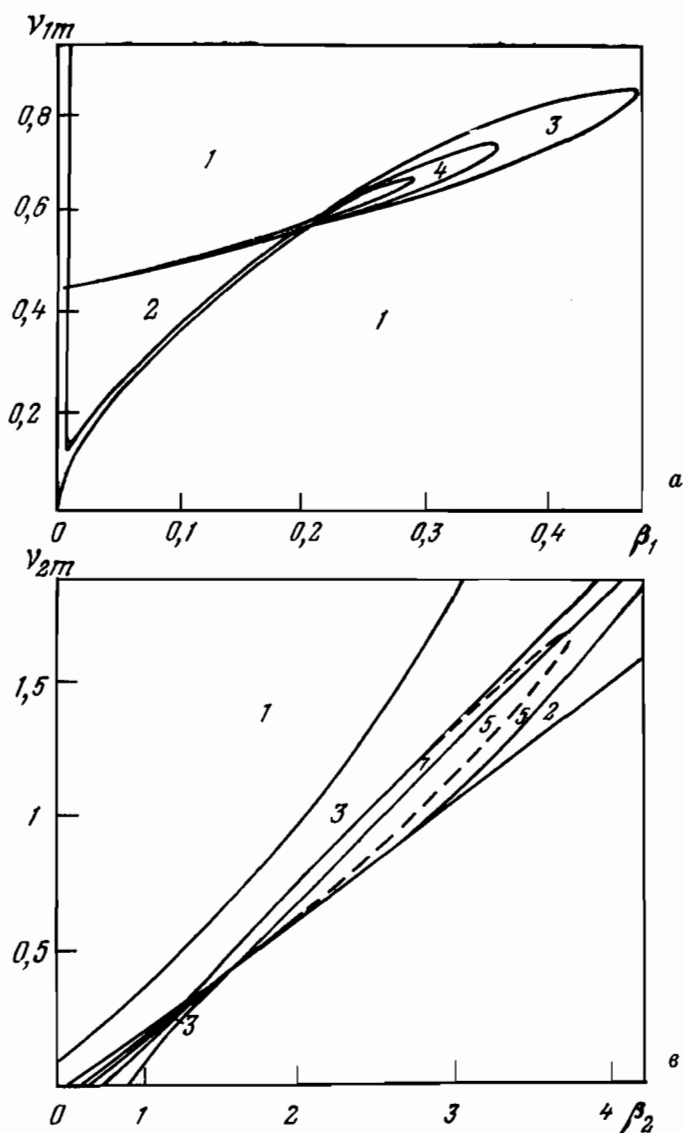


Рис. 9. Параметрические портреты реакции (2.12), построенные в двух различных плоскостях — (β_1, v_{1m}) и (β_2, v_{2m})

б, г — части портретов, а, е — в увеличенном масштабе. Стационарное состояние O_1 (см. рис. 7) является устойчивым узлом (УУ) в 2, 5, 19 областях; неустойчивым узлом (НУ) — в 11, 13, 15, 18; устойчивым фокусом (УФ) — в 6, 7, 10, 12 и неустойчивым фокусом (НФ) — в 8, 9, 14, 17 областях. Стационарное состояние O_2 представляет собой УУ в 2, 6, 17, 18

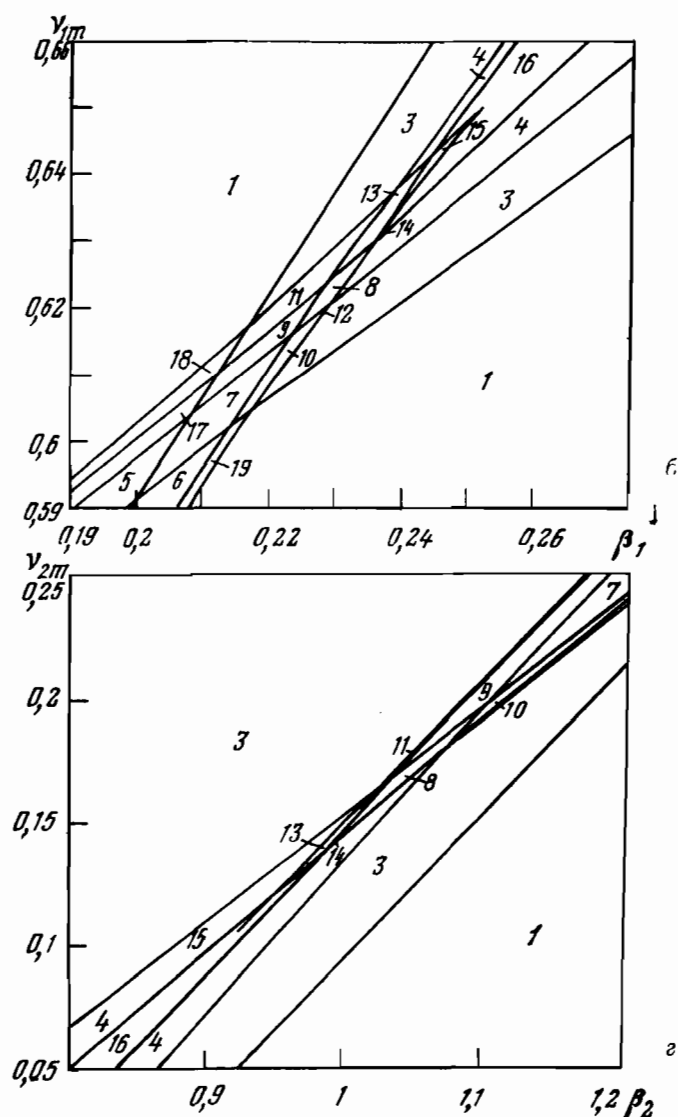


Рис. 9. Продолжение

я НУ — в 12, 14, 15 областях; оно является УФ в 5, 7, 9, 11 и НФ — в 8, 10, 13, 19 областях. Стационарное состояние O_2 — всегда седло. Единственное стационарное состояние — устойчивый узел в области 1, НУ — в 16, УФ — в 3 и НФ — в 4 области. Фиксированные значения параметров: $\alpha = 0.5$, $\gamma = 2$, $\xi = 0.1$; для а, б — $\varepsilon = 0.01$, $\beta_2 = 0.9$, $v_{2m} = 0.1$; для в, г — $\varepsilon = 0.03$, $v_{1m} = 0.65$, $\beta_1 = 0.25$

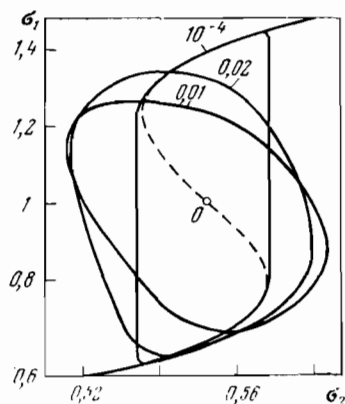


Рис. 10. Предельные циклы на фазовой плоскости (σ_1, σ_2) модели (2.15) реакции (2.12) при различных значениях параметра ε (цифры на кривых) и $\alpha = 0,5$, $\gamma = 2$, $\xi = 0,1$, $\nu_{2m} = 0,1$, $\beta_2 = 0,9$, $\nu_{1m} = 0,72$ и $\beta_1 = 0,32$

Решение уравнений (2.27)–(2.29) совместно с системой

$$P(\sigma_1, \sigma_2) = 0, \quad Q(\sigma_1, \sigma_2) = 0 \quad (2.30)$$

позволяет получить параметрическое задание всех трех линий в плоскостях (β_1, ν_{1m}) и (β_2, ν_{2m}) , причем в качестве свободного параметра удобно взять стационарное значение $\bar{\sigma}_1$. Результат построения параметрических портретов модели (2.15) показан на рис. 9. Из этих портретов видно, что реакция (2.12) может иметь одно, два (по линии $\Delta = 0$) или три стационарных состояния. Как единственное стационарное состояние, так и два из трех (промежуточное — всегда седло) способны менять устойчивость и характер.

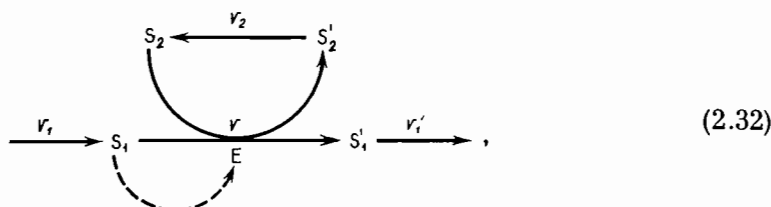
В ряде областей параметрических портретов выполняется условие существования устойчивого предельного цикла — неустойчивость всех стационарных состояний. Это условие является достаточным вследствие неустойчивости бесконечности модели (2.15) и вследствие того, что на осях σ_1 и σ_2 фазовые траектории входят внутрь положительного квадранта фазовой плоскости. Неустойчивость бесконечности вытекает из отрицательности правой части уравнения

$$\frac{1}{2} \frac{dr^2}{d\tau} = P(\sigma_1, \sigma_2)\sigma_1 + Q(\sigma_1, \sigma_2)\sigma_2 \quad (2.31)$$

при достаточно больших σ_1 и σ_2 [65], а направление фазовых траекторий на осях σ_1 и σ_2 можно получить, подставляя $\sigma_2 = 0$ и $\sigma_1 = 0$ соответственно в первое и второе уравнения системы (2.15). На рис. 10 показан пример устойчивого предельного цикла, окружающего единственную стационарную точку.

2.3. Модель двухсубстратной реакции с субстратным угнетением

Многие ферментативные реакции, как, например, реакции, протекающие с участием кофакторов АТФ или НАД, являются двухсубстратными. Поэтому после рассмотрения простейшей схемы субстратного угнетения в односубстратной реакции (2.12) целесообразно перейти к анализу реакции, число субстратов которой равно двум, а именно



где S_1 и S_2 — субстраты, S_1' и S_2' — продукты, E — фермент, v — скорость реакции, v_1 — скорость притока S_1 , v_2 — скорость регенерации S_2 в S_2' . Предположим, что суммарный пул S_2 и S_2' постоянен

$$[S_2] + [S_2'] = c_0, \quad (2.33)$$

а скорости v_1 и v_2 имеют вид:

$$v_1 = v_{1m} - k_1 [S_1], \quad v_2 = k_2 [S_2']. \quad (2.34)$$

В качестве выражения для скорости реакции v возьмем выражение (1.44). Схема (2.32) описывается следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\frac{d[S_1]}{dt} = v_{1m} - k_1 [S_1] - v, \quad \frac{d[S_2]}{dt} = k_2 (c_0 - [S_2]) - v. \quad (2.35)$$

Здесь учтены соотношения (2.33) и выражения для скоростей (2.34). После обезразмеривания модели (2.35) получаем

$$\varepsilon \frac{d\sigma_1}{d\tau} = v_{1m} - \beta_1 \sigma_1 - v, \quad \frac{d\sigma_2}{d\tau} = 1 - \sigma_2 - v, \quad (2.36)$$

где

$$\begin{aligned} v &= \alpha \sigma_1 \sigma_2 / ((1 + \delta \sigma_2)(\xi + \sigma_1(1 + \sigma_1))), \\ \sigma_1 &= [S_1]K_i, \quad \sigma_2 = [S_2]/c_0, \quad v = v/(k_2 c_0), \quad \tau = k_2 t, \\ \alpha &= V/(k_2, K_2), \quad \beta_1 = k_1 K_i/(k_2, c_0), \quad \delta = c_0/K_2, \\ \varepsilon &= K_i/c_0, \\ v_{1m} &= v_{1m}/(k_2 c_0), \quad \xi = K_i/K_i. \end{aligned} \quad (2.37)$$

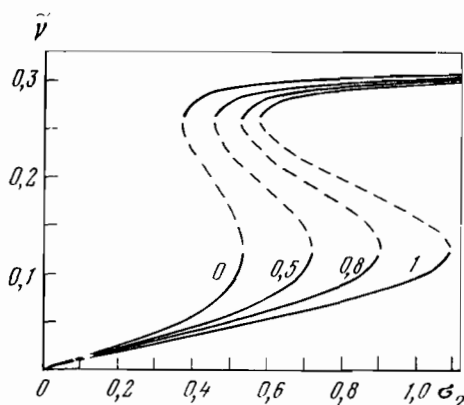


Рис. 11. Семейство квазистационарных входных характеристик реакции (2.32) при $\alpha = 1$, $\beta_1 = 0,1$, $\gamma = 2$, $v_{1m} = 0,3$, $\xi = 0,1$ и различных значениях δ (цифры на кривых)

Константы K_1 , K_2 и K_i имеют тот же смысл, что и в формуле (1.44). Из уравнения

$$v_{1m} - \beta_1 \sigma_1 - v = 0 \quad (2.38)$$

и формулы для v (2.37) можно получить следующее выражение для квазистационарной входной характеристики $\tilde{v}(\sigma_2)$:

$$\sigma_2 = \tilde{v}(\xi + \tilde{\sigma}_1(1 + \tilde{\sigma}_1^\gamma)) / (\alpha \sigma_1 - \tilde{v} \delta (\xi + \tilde{\sigma}_1(1 + \tilde{\sigma}_1^\gamma))), \quad (2.39)$$

где

$$\tilde{\sigma}_1 = (v_{1m} - \tilde{v}) / \beta_1. \quad (2.40)$$

На рис. 11 показано изменение формы входной характеристики при изменении значения параметра δ . При $\delta \rightarrow 0$ сохраняется гистерезисная форма кривой, поэтому для упрощения анализа можно считать, что $\delta \sigma_2 \ll 1$. Тогда математическая модель принимает вид

$$\varepsilon \frac{d\sigma_1}{d\tau} = v_{1m} - \beta_1 \sigma_1 - v, \quad \frac{d\sigma_2}{d\tau} = 1 - \sigma_2 - v, \quad (2.41)$$

где

$$v = \alpha \sigma_1 \sigma_2 / (\xi + \sigma_1 + \sigma_1^{\gamma+1}). \quad (2.42)$$

Для анализа числа стационарных состояний можно воспользоваться следующим приемом. Приравняем правые части системы (2.41) к нулю, найдем из второго уравнения σ_2 и подставим в первое. Получаем

$$f(\sigma_1) = \beta_1 \sigma_1^{\gamma+2} - v_{1m} \sigma_1^{\gamma+1} + \beta_1 (1 + \alpha) \sigma_1^2 + (\alpha + \beta_1 \xi - v_{1m} (1 + \alpha)) \sigma_1 - v_{1m} \xi = 0. \quad (2.43)$$

В уравнении (2.43) число перемен знака в ряду коэффициентов равно трем. Поэтому уравнение должно иметь не более трех положительных корней. Следовательно, система (2.41) может иметь

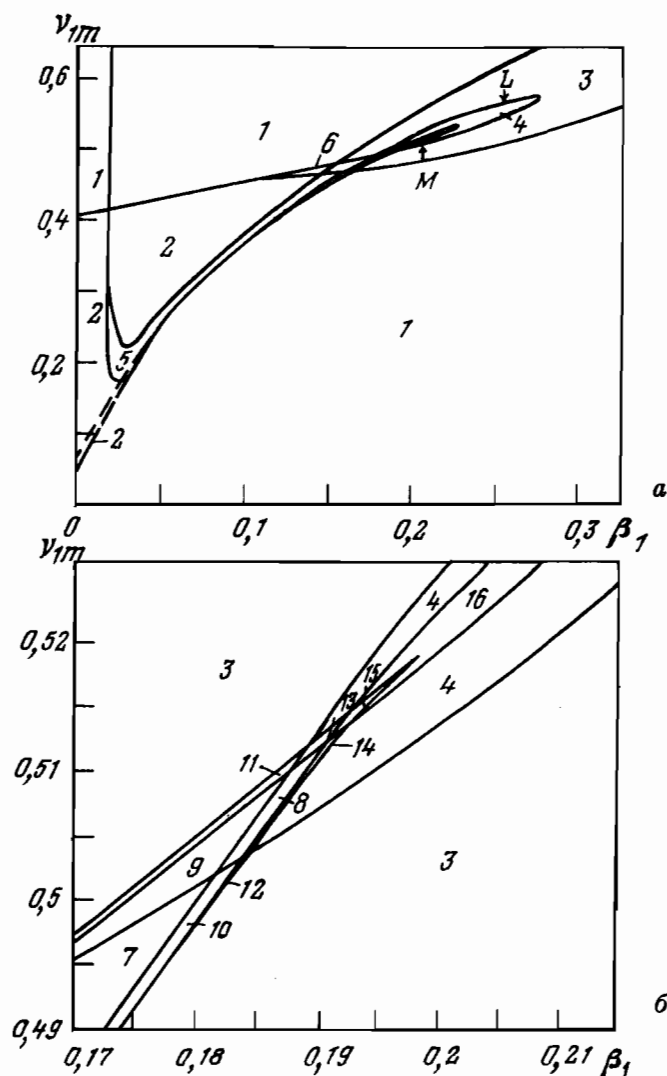


Рис. 12. Параметрический портрет модели (2.36) реакции (2.32) (б — в увеличенном масштабе) при $\alpha = 1$, $\gamma = 2$, $\varepsilon = 0,02$ и $\xi = 0,1$

Стационарное состояние (СС) с высоким значением стационарной скорости реакции (O_1) является устойчивым узлом (УУ) в 2, 5 областях, неустойчивым узлом (НУ) — в 11, 13, 15, устойчивым фокусом (УФ) — в 6, 7, 10, 12 и неустойчивым фокусом (НФ) — в 8, 9, 14 областях. СС с низким значением стационарной скорости реакции (O_2) — УУ во 2, 6 областях, НУ — в 12, 14, 15, УФ — в 5, 7, 11 и НФ — в 8, 10, 13 областях. СС O_2 (промежуточное) — всегда седло. СС O (единственное) — УУ в 1 области, УФ — в 3, НУ — в 16 и НФ — в 4 области

три, два или одно положительные стационарные состояния. В случае, если уравнение (2.43) имеет два корня, они могут быть кратными.

Условие кратности можно записать в виде

$$f(\sigma_1) = 0, \quad df(\sigma_1)/d\sigma_1 = 0. \quad (2.44)$$

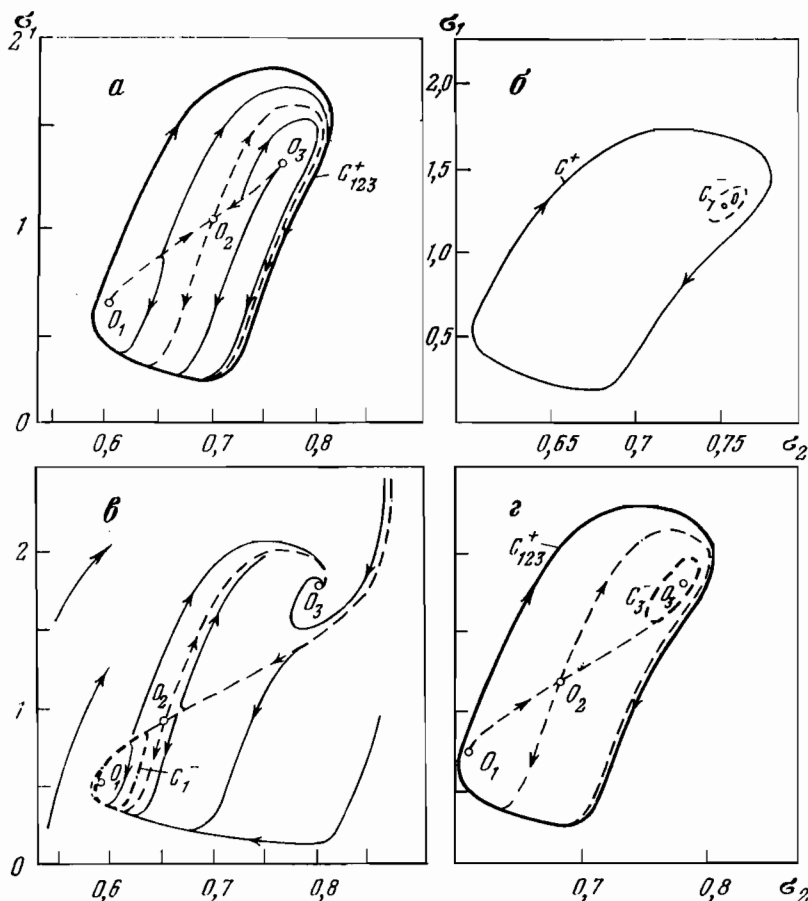


Рис. 13. Фазовые портреты модели (2.36) реакции (2.32) при $\gamma = 2$, $\xi = 0,1$ и $\alpha = 1$, $\varepsilon = 0,02$ (а — б), $\alpha = 5$, $\varepsilon = 0,08$ (в)

а — устойчивый предельный цикл (УПЦ) C_{123}^+ при $\beta_1 = 0,187$, $v_{1m} = 0,508$; б — неустойчивый предельный цикл (НПЦ) C_3 и УПЦ C_1^+ при $\beta_1 = 0,196$, $v_{1m} = 0,523$; в — НПЦ C_1 при $\beta_1 = 0,171745$, $v_{1m} = 0,4965$; г — НПЦ C_3 и УПЦ C_{123}^+ при $\beta = 0,1821$, $v_{1m} = 0,505$; б — НПЦ C_1 , C_3 и УПЦ C_{123}^+ при $\beta_1 = 0,179$, $v_0 = 0,5014$; в — УПЦ C_1^+ и НПЦ C_3^- при $\beta_1 = 0,1947$, $v_{1m} = 0,88813$

Из этой системы при $\alpha = 1$ и $\gamma = 2$ получаем параметрическое задание линии моностационарности для плоскости (β_1, ν_{1m}) :

$$\nu_{1m} = \bar{\sigma}_1^2(3\bar{\sigma}_1^2 + 2)/(\bar{\sigma}_1^3 + 2\bar{\sigma}_1 + \xi)^2, \quad \beta_1 = (2\bar{\sigma}_1^3 - \xi)/(\bar{\sigma}_1^3 + 2\bar{\sigma}_1 + \xi)^2, \quad (2.45)$$

где стационарное значение $\bar{\sigma}_1$ является свободным параметром. Те же уравнения (2.45) получаются, если линию моностационарности находить из условия $\Delta = 0$. Линия нейтральности задается формулами

$$\nu_{1m} = \bar{\sigma}_1(3\bar{\sigma}_1^3 + \bar{\sigma}_1 - \varepsilon(\bar{\sigma}_1^3 + 2\bar{\sigma}_1 + \xi)^2)/(\bar{\sigma}_1^3 + 2\bar{\sigma}_1 + \xi)(\bar{\sigma}_1^3 + \bar{\sigma}_1 + \xi), \quad (2.46)$$

$$\beta_1 = (2\bar{\sigma}_1^3 - \xi - \varepsilon(\bar{\sigma}_1^3 + 2\bar{\sigma}_1 + \xi)^2)/(\bar{\sigma}_1^3 + 2\bar{\sigma}_1 + \xi)(\bar{\sigma}_1^3 + \bar{\sigma}_1 + \xi).$$

На рис. 12 показан параметрический портрет системы (2.41), на котором помимо линий моностационарности (2.45) и нейтральности (2.46) нанесена граница $D = 0$. Этот портрет топологически эквивалентен портрету реакции (2.12) (см. рис. 9). Кроме того, бесконечность модели (2.41) неустойчива, как и модели (2.16). Действительно, приняв в первом уравнении (2.41) $\sigma_1 > \nu_{1m}/\beta_1$, получаем, что σ_1 со временем должно уменьшаться. Из второго

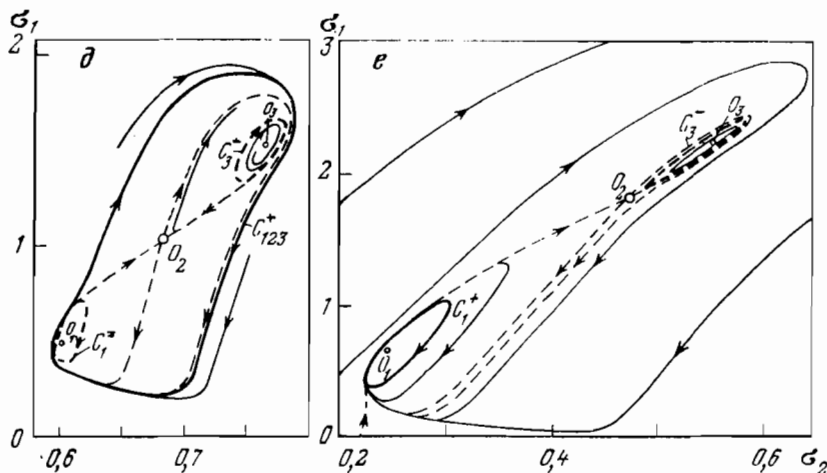


Рис. 13. (окончание)

уравнения следует уменьшение σ_2 при $\sigma_2 > 1$. На осях σ_2 и σ_1 фазовые траектории направлены внутрь положительного квадранта. Поэтому в случае неустойчивости стационарных состояний «сток» для фазовых траекторий служит устойчивый предельный цикл (рис. 13, а).

Более детальный анализ бифуркаций в модели (2.41) возможен с использованием третьего приближения. Из разложения правых частей системы общего вида (2.1) Баутиным [74] получены формулы для вычисления третьей фокусной величины α_3 , от которой зависит устойчивость сложного фокуса. При $\alpha_3 > 0$ сложный фокус неустойчив, при $\alpha_3 < 0$ — он устойчив, а при $\alpha_3 = 0$ фокус характеризуется значением следующей не равной нулю фокусной величины (т. е. α_5). Если представляющая точка параметрического портрета отклоняется от линии нейтральности, то из сложного фокуса рождается предельный цикл, устойчивость которого совпадает с устойчивостью сложного фокуса. Численное решение уравнения $\alpha_3 = 0$ совместно с системой (2.46) дает две точки линии нейтральности (точки M и L на рис. 12, a), между которыми $\alpha_3 < 0$, на остальных участках $\alpha_3 > 0$. Интегрированием системы (2.41) при значениях параметров, лежащих вблизи линии нейтральности, получен ряд фазовых портретов с родившимися предельными циклами (рис. 13, $b - z$). Эти портреты свидетельствуют о разнообразном динамическом поведении даже сравнительно простых ферментативных реакций.

2.4. Динамика открытых реакций, катализируемых олигомерными ферментами

В настоящее время большое внимание уделяется изучению свойств регуляторных ферментов, состоящих из нескольких субъединиц. Поскольку кинетика реакций, катализируемых такими ферментами, охватывает самые различные случаи угнетения и активации, то необходимо выяснить, каким образом каждая из этих регуляций сказывается на поведении реакции в проточных условиях.

Рассмотрим одностратную обратимую реакцию $S_1 \xrightleftharpoons[E(R_1T)]{} S_2$, для которой безразмерная скорость v была выведена в разделе 1.4 (уравнение 1.75). В проточных условиях реакция описывается системой, аналогичной (2.15):

$$\varepsilon \frac{d\sigma_1}{d\tau} = v_{1m} - \beta_1 \sigma_1 - v, \quad \frac{d\sigma_2}{d\tau} = v_{2m} - \beta_2 \sigma_2 + v, \quad (2.47)$$

где

$$v_{1m} = v_{1m}/V_+, \quad v_{2m} = v_{2m}/V_+, \quad \beta_1 = k_1 K_1/V_+, \\ \beta_2 = k_2 K_2/V_+, \quad \varepsilon = K_1/K_2, \quad \tau = tV_+/K_2. \quad (2.48)$$

Смысл констант V_+ , K_1 , K_2 раскрыт в разделе 1.4.

При некоторых условиях модель (2.47) может иметь три стационарных состояния. В этом случае одно из них обязательно является седлом, поэтому в качестве признака множественности ста-

ционарных состояний можно взять отрицательность определителя Δ , вычисленного при стационарных значениях $\sigma_1 = \bar{\sigma}_1$ и $\sigma_2 = \bar{\sigma}_2$.

Запишем в общем виде выражение для

$$\Delta = \Delta_1 + \Delta_2, \quad (2.49)$$

где

$$\Delta_1 = \beta_1 (\beta_1 + \partial v / \partial \sigma_1), \quad \Delta_2 = -\beta_1 \partial v / \partial \sigma_2. \quad (2.50)$$

Основываясь на линейном приближении (раздел 2.1), будем считать, что если во всех стационарных состояниях типа неседла $Sp > 0$, то система (2.47) имеет устойчивый предельный цикл. Иначе говоря, незатухающие колебания возможны либо при единственном неустойчивом стационарном состоянии, либо при трех неустойчивых стационарных состояниях, из которых одно всегда седло.

Выражение для Sp имеет вид:

$$Sp = Sp_1 + Sp_2, \quad (2.51)$$

где

$$Sp_1 = -\frac{1}{\varepsilon} \left(\beta_1 + \frac{\partial v}{\partial \sigma_1} \right), \quad Sp_2 = \frac{\partial v}{\partial \sigma_2} - \beta_2. \quad (2.52)$$

Из выражений (2.49, 2.50) видно, что $\Delta < 0$ может быть получено за счет каждого из слагаемых Δ_1 и Δ_2 , так как оба они могут принимать отрицательные значения. Для выполнения условия $\Delta_1 < 0$ необходимо субстратное угнетение ($\partial v / \partial \sigma_1 < 0$), а для условия $\Delta_2 < 0$ — продуктная активация ($\partial v / \partial \sigma_2 > 0$). Эти же регуляции могут приводить и к неустойчивости стационарных состояний, что вытекает из условия $Sp > 0$ и выражений (2.51), (2.52). Разумеется, из наличия субстратного угнетения или продуктной активации еще не следует существование множественности стационарных состояний или колебаний. Поэтому мы говорим о субстратном угнетении или продуктной активации лишь как о необходимых условиях.

Рассмотрим случай совместного действия этих двух регуляций. Угнетение субстратом проявляется в падении скорости реакции при достаточно больших σ_1 ($\partial v / \partial \sigma_1 < 0$). Если значение β_1 мало, то стационарная точка, расположенная на участке с $\partial v / \partial \sigma_1 < 0$, является седлом, поскольку Δ_1 отрицательно, а Δ_2 либо отрицательно, либо мало вследствие малости β_1 . Возможность колебаний в такой реакции зависит от характера влияния σ_2 на скорость v . При продуктном угнетении ($\partial v / \partial \sigma_2 < 0$) возможно существование неустойчивых состояний типа неседла ($Sp > 0$, $\Delta > 0$). Однако если в стационарных состояниях в результате субстратного угнетения $Sp_1 > 0$, а продукт активует реакцию ($\partial v / \partial \sigma_2 > 0$), то неустойчивое стационарное состояние не может быть неседлом,

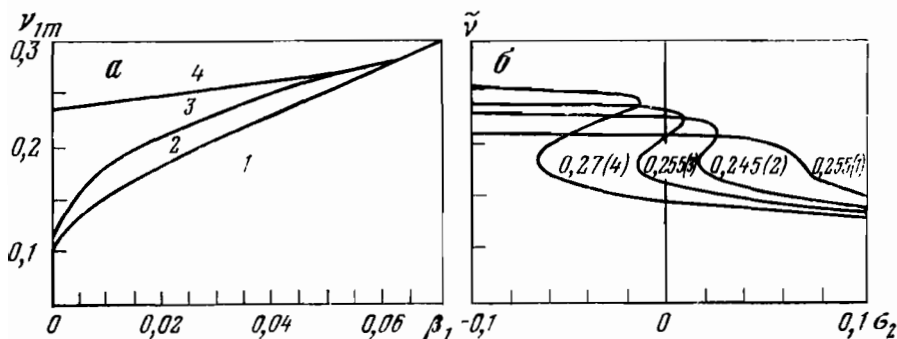
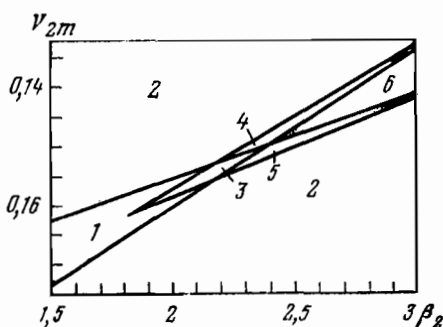


Рис. 14. Зависимость формы выходной характеристики реакции $S_1 \xrightleftharpoons{E(R,T)} S_2$ от параметров

a — различные области плоскости параметров модели (2.47) при $\kappa = 0$, $L = 10^{-1}$, $a = 0,2$, $c_1 = 6$ и $c_2 = 10$; b — форма выходной характеристики реакции при $\beta_1 = 0,04$ и значениях ν_{1m} , указанных на кривых. Цифры в скобках обозначают номер соответствующей области на рис. a . При указанных значениях параметров фермент $E(R, T)$ изостерически угнетается субстратом S_1

Рис. 15. Параметрический портрет модели (2.7) проточной реакции $S_1 \xrightleftharpoons{E(R,T)} S_2$ в случае изостерического угнетения олигомерного фермента $E(R, T)$ субстратом S_1

$\epsilon = 0,001$; значения остальных параметров см. рис. 14. В областях 1 и 2 имеется одно стационарное состояние, а в 3—6 — три стационарных состояния. Все стационарные состояния неустойчивы в областях 1, 3 и устойчивы в областях 4, 6. В областях 4, 5 неустойчиво одно из трех стационарных состояний



поскольку из $Sp_1 > 0$ следует: $\Delta_1 < 0$. Аналогично, если вследствие продуктивной активации $Sp_2 > 0$, то предположение о субстратном угнетении влечет за собой $\Delta < 0$.

Таким образом, субстратное угнетение и продуктивная активация, взятые в отдельности, могут быть причиной существования множественности стационарных состояний и незатухающих колебаний, но совместное действие этих регуляций делает автоколебания в моносубстратной реакции невозможными.

Из выражений (2.49) — (2.52) видно, что субстратная активация и гиперболическая зависимость ν от σ_1 эквивалентны по своему влиянию на Δ и Sp , поскольку в обоих случаях $\Delta_1 > 0$ и $Sp_1 < 0$. Если при этом продукт угнетает, то $\Delta_2 > 0$ и $Sp_2 < 0$, т. е.

в реакции возможно только одно устойчивое стационарное состояние.

Рассмотрим более подробно случай угнетения субстратом и продуктом и покажем, что свойства такой реакции аналогичны свойствам реакции (2.12). Выражение (1.75) для скорости реакции имеет вид более сложный по сравнению с феноменологической моделью (2.16), поэтому уравнение выходной характеристики в явном виде получить не удастся. На рис. 14, б показано семейство выходных характеристик, построенное по уравнению

$$v_{1m} - \beta_1 \sigma_1 - v = 0, \quad (2.53)$$

а на рис. 14, а представлены области плоскости параметров (β_1, v_{1m}) , в которых форма выходной характеристики имеет качественно различный вид. Параметрический портрет, представленный на рис. 15, получен численным решением неявных уравнений линий $Sp = 0$ и $\Delta = 0$. Из него видно, что в динамическом отношении (число стационарных состояний, устойчивость, возможность колебаний) рассматриваемая модель эквивалентна не только модели (2.15), но и модели (2.41) двухсубстратной реакции. Кроме того, в работе [75] были продемонстрированы сходные динамические свойства и для случая продуктивной активации в модели (2.47).

Если олигомерный фермент катализирует двухсубстратную открытую реакцию, то в ней возможны те же нелинейные эффекты. Покажем существование гистерезиса входной характеристики для реакции (2.32), скорость которой имеет вид выражения (1.102). Примем, что фермент аллостерически угнетается субстратом S_1 , т. е.

$$L = L_0 (1 + \mu_1 \sigma_1)^{n_i},$$

где $\mu_i = K_1/K_i$ — константа диссоциации комплекса субстрата с аллостерическим центром, n_i — число аллостерических центров на молекуле фермента. Пусть $\sigma_3 = \sigma_4 = 0$, форма T неактивна ($a = c_1 = c_2 = 0$) и $n = 4$, $n_i = 8$. Тогда выражение (1.102) существенно упрощается:

$$v = \frac{\sigma_1 \sigma_2 [(1 + \sigma_2)(1 + \sigma_2)]^3}{[(1 + \sigma_1)(1 + \sigma_2)]^4 + L_0 (1 + \mu_1 \sigma_1)^8}. \quad (2.54)$$

Учитывая скорости притока S_1 и регенерации S_2 (2.34), запишем в безразмерной форме математическую модель, аналогичную модели (2.36):

$$v \frac{d\sigma_1}{d\tau} = v_{1m} - \beta_1 \sigma_1 - v \equiv P(\sigma_1, \sigma_2), \quad (2.55)$$

$$\frac{d\sigma_2}{d\tau} = v_{2m} - \beta_2 \sigma_2 - v \equiv Q(\sigma_1, \sigma_2),$$

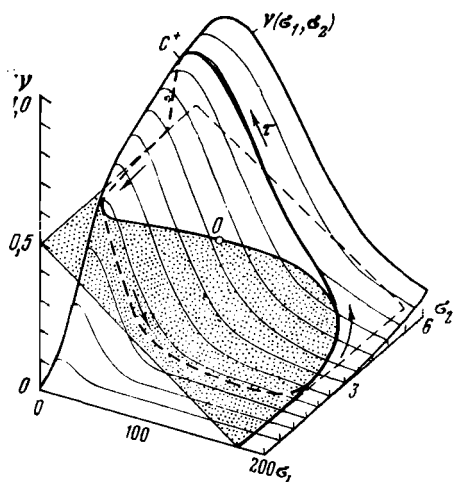


Рис. 16. Квазистационарная кривая в модели (2.55), полученная сечением поверхности скорости двухсубстратной проточной реакции $(S_1 + S_2 \xrightarrow{E(R,T)} \text{Продукты})$ плоскостью источника субстрата $(v_1 = v_{1m} - \beta_1 \sigma_1)$, и устойчивый предельный цикл C^+ при $v_{1m} = 0,5$, $\beta_1 = 0,5/180$, $\varepsilon = 0,001$, $L_0 = 10^{-3}$, $\mu_i = 0,1$

При указанных параметрах олигомер $E(R, T)$ аллостерически угнетается субстратом S_1 . Стрелками показано направление движения по предельному циклу

где

$$\begin{aligned} \beta_1 &= k_1 K_1 / (n V_+), & \beta_2 &= k_2 K_2 / (n V_+), & v_{1m} &= v_{1m} / (n V_+), \\ v_{2m} &= k_2 c_0 / (n V_+), & \varepsilon &= K_1 / K_2, & \tau &= n V_+ t / K_2. \end{aligned} \quad (2.56)$$

Константы V_+ , K_1 , K_2 использовались при выводе выражения скорости (1.102). На рис. 16 показан график скорости реакции (2.40) как функция переменных σ_1 и σ_2 , пересекаемый плоскостью $v = v_{1m} - \beta_1 \sigma_1$. Линия пересечения является квазистационарной характеристикой системы, поскольку на ней выполняется условие $P(\sigma_1, \sigma_2) = 0$. Как и следовало ожидать, при субстратном угнетении квазистационарная кривая имеет гистерезисный характер. Второе сечение плоскостью $v = v_{2m} - \beta_2 \sigma_2$ на рис. 16 не показано, а отмечена лишь стационарная точка O . Численное интегрирование системы (2.55) показывает, что точка O неустойчива, и в системе существует устойчивый предельный цикл C^+ (см. рис. 16). Можно показать, что аналогичная зависимость скорости реакции от σ_1 и σ_2 существует и в случае неаллостерического (изостерического) угнетения субстратом S_1 , если в выражении (1.102) взять достаточно малое значение константы L и $c_1 \neq 0$.

2.5. Разнообразие поведения открытых ферментативных реакций

Множество областей параметрического портрета открытой реакции (см. портреты на рис. 9, 12 и 15) означает множество качественно различных фазовых портретов реакции. К этому следует добавить, что каждый отрезок границы области параметрического

портрета, заключенный между двумя соседними пересечениями границ, каждая точка пересечения или касания таких границ, а также точки вырождения, лежащие на границах (например, точки, в которых $\alpha_3 = 0$ на границе $S_I = 0$, или точка возврата границы $\Delta = 0$), дают свои особые, качественно отличные от других фазовые портреты.

В свою очередь, каждый фазовый портрет обычно представляет собой совокупность фазовых траекторий различного типа — траекторий, представляющих различные типы поведения моделируемой реакции во времени в зависимости от начальных условий. В общей сложности открытая ферментативная реакция, имеющая гистерезисную квазистационарную входную (выходную) характеристику, может иметь в зависимости от значений параметров или начальных значений концентраций сотни качественно различных форм динамического поведения. Если реакция имеет больше чем три стационарных состояния и (или) описывается большим числом уравнений, то число возможных типов динамического поведения должно быть еще большим.

Каждая из исследованных ферментативных реакций отличается большим разнообразием динамического поведения даже тогда, когда имеет гистерезисную квазистационарную характеристику и лишь одно стационарное состояние (рис. 17).

Если единственное стационарное состояние устойчиво, то реакция обычно эквифинальна; при любых начальных условиях в ней устанавливается одно и то же стационарное значение скорости. Однако достижение этого значения при нестационарных начальных значениях концентраций реагентов имеет различный характер — это может быть либо монотонное приближение к стационарному значению (рис. 17, 1), либо немонотонное релаксационное приближение (рис. 17, 2), либо, наконец, релаксационное движение, сменяющееся затухающими колебаниями (рис. 17, 4).

Единственное устойчивое стационарное состояние не всегда гарантирует эквифинальность реакции. Действительно, если состояние окружено двумя предельными циклами, как на фазовом портрете (см. рис. 13, е), то в зависимости от начальных условий реакция окажется после переходного процесса либо в неколебательном, либо в автоколебательном стационарном состоянии (рис. 17, 5). Форма автоколебаний может быть различной: от почти гармонической (рис. 17, 6) — такая форма характерна для случаев, в которых представляющая точка параметрического портрета находится вблизи линий нейтральности, до резко релаксационной (рис. 17, 7). Релаксационные колебания неизбежны для реакций, в которых концентрации реагирующих веществ отличаются на несколько порядков друг от друга, причем большие концентрации в таких случаях обычно изменяются во времени пилообразно (рис. 17, 8), а малые — разрывно (рис. 17, 7).

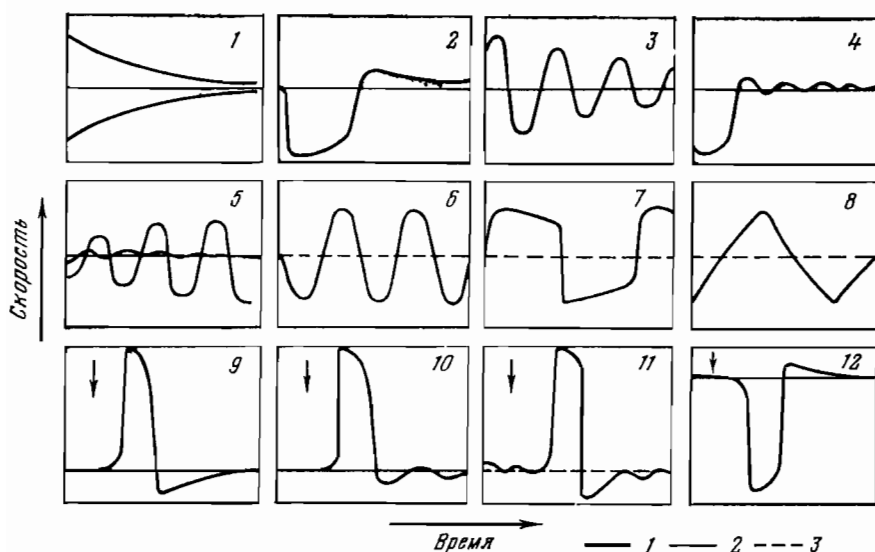


Рис. 17. Формы динамического поведения проточной реакции, имеющей одно стационарное состояние и гистерезисную квазистационарную характеристику, при различных начальных условиях (1—8) или при различной силе возмущения реакции (9—12)

1 — изменение скорости реакции во времени; 2 — устойчивое стационарное значение скорости; 3 — неустойчивое стационарное значение скорости.

Стрелками показаны моменты приложения возмущения

Особый интерес представляют переходные процессы, вызванные однократным импульсным возмущением одного из параметров, например возмущением скорости поступления субстрата. Если стационарная точка располагается на нижней устойчивой ветви гистерезисной входной характеристики, как на рис. 11 вблизи нижнего экстремума, то кратковременное увеличение скорости поступления субстрата может вызывать слабый всплеск скорости либо спайкообразное изменение большой амплитуды, завершающееся асимптотическим возвращением реакции в исходное стационарное состояние (рис. 17, 9). Процесс генерации спайкообразного импульса во всех деталях подобен генерации потенциала действия мембранами нервных и мышечных клеток (см. главу 4). В частности, возбуждающий стимул, отклоняющий реакцию от стационарного состояния на некоторое время, должен преодолеть некоторый порог возбуждения. Подпороговый стимул вызывает слабый всплеск скорости, сверхпороговый — импульс стандартной формы (спайк), возникающий через некоторый латентный период после начала действия стимула. Повторное возбуждение харак-

теризуется периодом рефрактерности: еще не пришедшая в стационарное состояние реакция имеет тем более высокий порог возбуждения, чем меньше времени истекло с момента генерации предыдущего спайка. Если стационарное состояние реакции представляется на фазовой плоскости устойчивым фокусом, то возвращение реакции к такому состоянию после возбуждения может носить характер затухающих колебаний (рис. 17, 10). Если же стационарное состояние неустойчиво, но так, что стационарная точка окружена малым предельным циклом, расположенным в окрестности нижнего экстремума входной характеристики, то реакция по-прежнему в состоянии генерировать импульс в ответ на сверхпороговый стимул (рис. 17, 11). Однако в этом случае порог возбуждения периодически изменяется во времени. Если устойчивая стационарная точка располагается на устойчивой верхней ветви близки верхнего экстремума входной характеристики, то кратковременное уменьшение скорости поступления субстрата в реакцию способно вызывать генерацию импульса отрицательной полярности (рис. 17, 12). Процессы возбуждения и генерации такого импульса не отличаются от тех же процессов в случае генерации положительного импульса.

На рис. 18 представлены некоторые типы динамического поведения открытой реакции, имеющей из-за гистерезиса квазистационарной характеристики три альтернативных стационарных состояния. В зависимости от начальных условий в такой реакции может монотонно (рис. 18, 1) или немонотонно устанавливаться одно из двух устойчивых альтернативных стационарных значений скорости. Одно из двух стационарных значений скорости может быть автоколебательным (рис. 18, 4, 5). Если одна из устойчивых стационарных точек окружена неустойчивым предельным циклом (см. рис. 13, в), то в зависимости от начальных условий в реакции устанавливается одно из двух устойчивых стационарных значений скорости (рис. 18, 6). Если фазовый портрет реакции подобен портрету на рис. 13, в, то в такой реакции при одних начальных условиях устанавливается устойчивое стационарное значение скорости, а при других — автоколебания скорости с большой амплитудой (рис. 18, 7). В случае, когда фазовый портрет реакции подобен портрету на рис. 13, д, в зависимости от начальных условий она может оказаться в одном из трех устойчивых состояний: в одном из двух неколебательных стационарных состояний, сильно отличающихся друг от друга стационарными значениями скорости реакции, либо в автоколебательном состоянии, в котором скорость колеблется с большой амплитудой (рис. 18, 8).

Для реакции с тремя стационарными состояниями характерно наличие порогов для внешних возмущений, вызывающих смену состояний: подпороговое возмущение вызывает лишь незначительное временное отклонение от устойчивого стационарного сос-

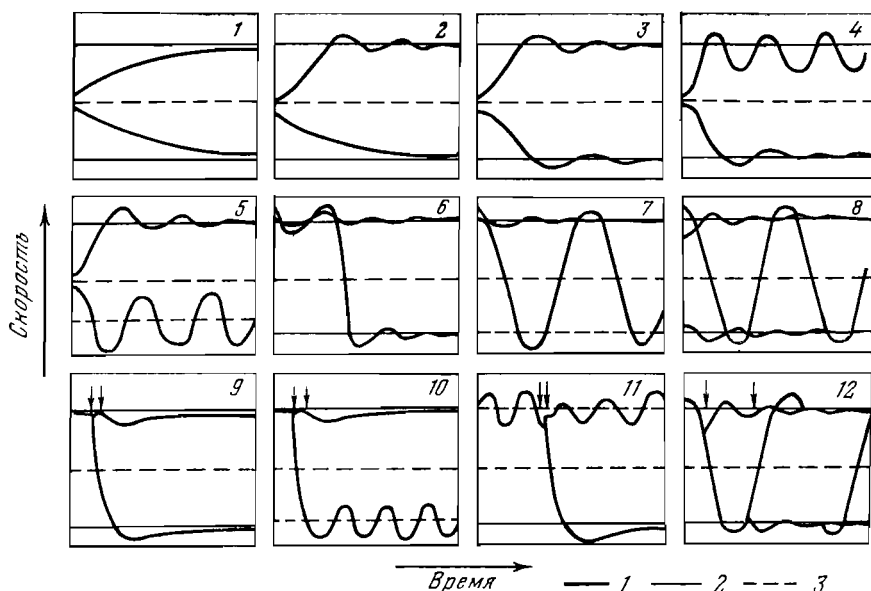


Рис. 18. Возможные типы динамического поведения проточной реакции, имеющей три альтернативных стационарных состояния

1 — изменения скорости реакции во времени, соответствующие трем стационарным точкам O_1 , O_2 и O_3 (см. рис. 7 и 13); 2 — устойчивое стационарное значение скорости; 3 — неустойчивое стационарное значение скорости. Стрелками показаны моменты приложения возмущений различной силы

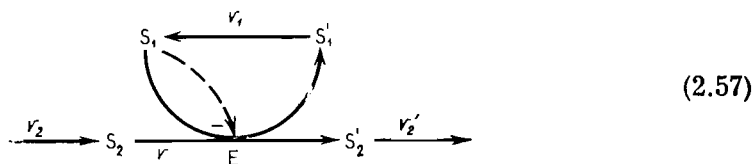
тояния, а сверхпороговое — переход реакции в новое состояние (рис. 18, 9—12). При этом возможны различные варианты переходов: из неколебательного в другое неколебательное состояние (рис. 18, 9), из неколебательного в колебательное (рис. 18, 10), из колебательного в неколебательное (рис. 18, 11), из колебательного состояния большой амплитуды в одно из двух неколебательных стационарных состояний, отличающихся установившимся значением скорости (рис. 18, 12).

Стоит подчеркнуть тот факт, что все перечисленные формы динамического поведения могут быть получены в математической модели любой открытой ферментативной реакции, имеющей гистерезисную квазистационарную характеристику, если только на величины параметров не наложены какие-либо физические ограничения. Иными словами, широкий спектр динамического поведения проточных реакций инвариантен по отношению к молекулярным механизмам, создающим гистерезис квазистационарной характеристики.

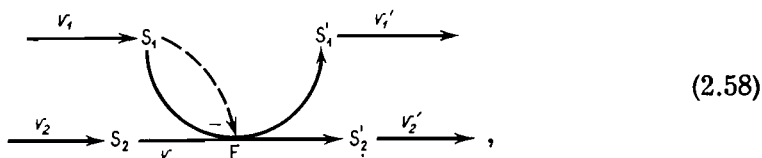
Выше упоминалось о большом сходстве между «возбуждением» открытой реакции и электрическим возбуждением биологических мембран. Это сходство основано на общей нелинейности — на гистерезисе квазистационарных характеристик, которые имеют возбуждаемые реакции и мембраны (см. главу 4). Между тем подобные гистерезисные характеристики (N- или S-образные характеристики, характеристики с падающим участком, характеристики с отрицательным сопротивлением, трением и т. п.) широко распространены в системах самой различной природы. И всякий раз, когда открытая система произвольной физической природы обнаруживает гистерезис квазистационарной характеристики, она обладает тем же набором динамических свойств, какие были выявлены у других гистерезисных систем. Прекрасные примеры таких систем, встречающихся в физике, электронике, физической химии, электрохимии, электронике и в химии открытых гомогенных реакций, а также доказательства сходства динамического поведения всех этих совершенно различных систем можно найти в публикациях Франка [76—79].

2.6. Эквивалентные математические и кинетические модели

Математическое сходство динамического поведения различных систем, имеющих гистерезис квазистационарной характеристики, можно интерпретировать как простое следствие эквивалентности их математических моделей. Например, если для описания кинетики действия фермента E, катализирующего реакцию



или реакцию

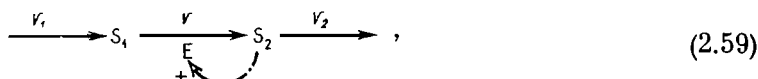


использовать уравнение вида (2.42), то математические модели этих реакций будут иметь тот же вид, что математическая модель (2.36) реакции (2.32). Если же фермент E в реакциях (2.57) и (2.58)

имеет олигомерную структуру и кинетика его действия описывается более сложным уравнением (2.54) или еще более сложным уравнением (1.102), то математические модели этих реакций, хотя и отличаются от модели (2.36) реакции (2.32) видом своих правых частей и количественными характеристиками взаимоотношений между переменными, все же остаются топологически эквивалентными более простой модели (2.36). Под топологической эквивалентностью здесь подразумевается одинаковое строение параметрических и, следовательно, фазовых портретов моделей.

Очевидно, что усилия, затрачиваемые на анализ новой, еще не изученной биохимической системы, можно резко сократить, если доказать, что ее математическая модель эквивалентна более детально изученной модели. В таком случае все свойства более полно изученной модели автоматически распространяются на новую модель. Таким образом, наиболее детально изученная модель некоторого множества эквивалентных моделей может служить эталоном, с которым сравниваются другие менее изученные модели, принадлежащие этому множеству.

Приведение данной модели к эталонной может быть осуществлено с помощью соответствующей замены переменных [72]. Так, например, математическую модель открытой реакции с продуктной активацией γ -го порядка



имеющей в безразмерных переменных вид [80—84]

$$\frac{d\sigma_1}{d\tau} = v_{1m} - \beta_1 \sigma_1 - v, \quad \varepsilon \frac{d\sigma_2}{d\tau} = v_{2m} - \beta_2 \sigma_2 + v, \quad (2.60)$$

где

$$v = \sigma_1(v_0 + \sigma_2^\gamma)/(1 + \alpha_1 \sigma_1 + \sigma_2^\gamma(1 + \sigma_1)), \quad \alpha_1 \geq 0, \quad \gamma > 1 \\ v_0 \ll 1, \quad (2.61)$$

с помощью простой замены переменных

$$\sigma'_2 = \sigma_{20} + \sigma_2, \quad v'_{2m} = \beta_2 \sigma_{20} - v_{2m} \quad (2.62)$$

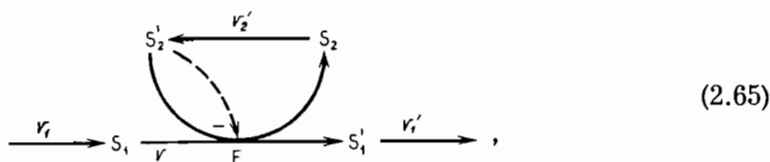
можно привести к эквивалентной форме

$$\frac{d\sigma_1}{d\tau} = v_{1m} - \beta_1 \sigma_1 - v, \quad \varepsilon \frac{d\sigma_2}{d\tau} = v'_{2m} - \beta_2 \sigma'_2 - v, \quad (2.63)$$

где

$$v = \sigma_1(v_0 + (\sigma_{20} - \sigma'_2)^\gamma)/(1 + \alpha_1 \sigma_1 + (\sigma_0 - \sigma'_2)^\gamma(1 + \sigma_1)). \quad (2.64)$$

Новую переменную σ'_2 можно рассматривать как концентрацию субстрата S'_2 некоторой эквивалентной реакции



в которой S_2' — ингибитор фермента E , связанный законом сохранения с продуктом S_2 ($\sigma_{20} = \sigma_2 + \sigma_2'$ — полная концентрация S_2 и S_2'). Правда, выражение (2.64) для безразмерной скорости реакции (2.65) является «нехимическим» — оно предсказывает $v \neq 0$ при $\sigma_2' = 0$. Однако этот недостаток легко устраняется малым возмущением уравнения (2.64) с помощью малого параметра δ :

$$v = \frac{\sigma_2'}{\delta + \sigma_2'} \frac{\sigma_1 (v_0 + (\sigma_{20} - \sigma_2')^Y)}{1 + a_1 \sigma_1 + (\sigma_{20} - \sigma_2')^Y (1 + \sigma_1)}. \quad (2.66)$$

Это уравнение описывает гиперболическую зависимость скорости от концентрации σ_1 и кривую с максимумом v (σ_2'), характерную для субстратного угнетения.

Из-за малости δ модели (2.63), (2.64) и (2.63), (2.66) имеют почти совпадающие фазовые портреты, различия существуют лишь в малой δ -полосе, примыкающей к оси σ_2' . Поэтому параметрические портреты этих моделей, построенные в плоскости параметров (β_1, v_{1m}) , не только топологически эквивалентны, но даже количественно почти совпадают. А так как модель (2.63) с уравнением для скорости реакции (2.66) с точностью до обозначений совпадает с эталонной моделью (2.36), то ее можно считать топологически эквивалентной эталонной модели.

Простейшие из эквивалентных моделей целесообразно использовать для замещения более сложных при моделировании полиферментных систем. При этом подгонкой параметров легко добиться хорошего количественного совпадения между моделью-объектом и моделью-заместителем. В работе [85], например, показано, что феноменологическая модель (2.60) с высокой точностью замещает существенно более сложную модель реакции (2.59), катализируемую олигомером [86].

В дальнейшем кинетические модели, описываемые топологически эквивалентными математическими моделями, будем называть эквивалентными. Эквивалентными будем называть и регуляторные связи, если они принадлежат таким кинетическим моделям. Так, например, только что было показано, что кинетические модели (2.59) и (2.65) описываются топологически эквивалентными моделями. Следовательно, эти кинетические модели и их регуляторные связи — субстратное угнетение в модели (2.65) и продуктная активация в модели (2.59) — также эквивалентны.

2.7. Эффект депонирования

При математическом моделировании механизма одночастотных гликолитических колебаний [87—100] было замечено, что участие быстрой обратимой реакции в биохимическом автогенераторе увеличивает период автоколебаний примерно в $K + 1$ раз (K — константа равновесия обратимой реакции) [72, 83, 84]. Это явление имеет важное значение для теории клеточных часов — еще не идентифицированной автоколебательной биохимической системы, создающей колебания с периодом $T_0 \sim 24$ ч [84, 101—104].

Эффект депонирования, или замедление колебаний, вызываемое быстрой обратимой реакцией, имеет простое объяснение.

Пусть в биохимической системе имеется вещество S , участвующее в различных обменных реакциях. Внесем в эту систему реакцию быстрого обратимого депонирования вещества в его резервную, метаболически неактивную форму S_d :



Здесь k_{+d} и k_{-d} — константы скорости. Теперь суммарная концентрация вещества S стала равной $[S] + [S_d]$. Если реакция (2.67) быстрая, то в ней за короткое время устанавливается равновесие, при котором

$$k_{+d} [S] - k_{-d} [S_d] = 0. \quad (2.68)$$

С участием условия (2.68) суммарная концентрация вещества S равна $[S] + K [S] = (K + 1) [S]$, где $K = k_{+d}/k_{-d}$ — константа равновесия реакции (2.67). Таким образом, внесение в биохимическую систему реакции (2.67) эквивалентно увеличению в $K + 1$ раз суммарной концентрации вещества S , а это означает увеличение во столько же раз постоянной времени для изменения $[S]$: для того чтобы синтезировать или расходовать увеличенное в $K + 1$ раз количество вещества, надо в $K + 1$ раз больше времени.

В клетках депонирование метаболитов и их превращение из резервной в метаболически активную форму осуществляется отдельными ферментами. Анализ эффекта депонирования в таких сложных случаях может быть проведен лишь с помощью математических моделей [72, 105], так как из-за нелинейности кинетики ферментативных реакций не удастся в явном виде вычислить фактор замедления, т. е. величину, на которую увеличивает-ся постоянная времени концентрации депонируемого вещества.

Детальное исследование моделей показывает, что ферментативные реакции в проточных условиях обладают большим разнообразием динамического поведения, которое никогда не наблюдает-

ся в непроточных условиях обычных биохимических экспериментов с выделенными из клетки ферментами. Сравнивая модели, описывающие совершенно различные молекулярные механизмы, контролирующие активности ферментов (механизмы активации и угнетения ферментов субстратами или продуктами), нетрудно заметить тем не менее поразительную общность динамического поведения реакций в проточных условиях. Эта общность объясняется тем, что все рассмотренные молекулярные механизмы регуляции активности ферментов, быть может совершенно не сопоставимые биохимически, создают однотипную нелинейность — гистерезис квазистационарной входной или выходной характеристики.

В главах 3 и 4 будет показано, что подобный гистерезис может возникать также и в полиферментных системах и возбудимых клеточных мембранах. И хотя молекулярные механизмы, создающие гистерезис в полиферментной системе и мембране, также совершенно различны, этот гистерезис приводит к тому же разнообразию форм динамического поведения, какое было продемонстрировано в этой главе.

Глава третья

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОЛИФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ

3.1. Полиферментные системы и их модели

Термин «полиферментная система» используется в биохимической литературе для обозначения совокупности взаимосвязанных реакций, выполняющих некоторую биохимическую функцию.

Важным для экспериментального и теоретического анализа свойством полиферментных систем является их относительная автономность. Это прежде всего относится к энергетическому метаболизму. Напротив, в анаэробных условиях гликолиз оказывается единственным процессом, обеспечивающим клетку энергией, и служит в основном источником пировиноградной кислоты, окисление которой в митохондриях обеспечивает клетку энергией. В отсутствие глюкозы образование АТФ митохондриями осуществляется за счет окисления кетонных тел, жирных кислот и аминокислот.

Существенная автономность позволяет проводить моделирование полиферментных систем по отдельности, без связей с остальным клеточным метаболизмом. Конечно, такое изолированное

рассмотрение полиферментных систем имеет смысл только до тех пор, пока не возникает необходимость исследования их взаимодействий друг с другом.

Важным этапом в теоретическом анализе полиферментной системы является изучение особенностей поведения реакций, составляющих эту систему. В предыдущей главе было показано, что угнетение проточной ферментативной реакции субстратом или активация продуктом могут приводить к автоколебаниям. Очевидно, что если одна из реакций полиферментной системы угнетается своим субстратом или активируется продуктом, то можно ожидать, что в такой полиферментной системе могут наблюдаться автоколебания, множественность стационарных состояний и гистерезисные переходы между ними. Так, например, одночастотные колебания в гликолитической системе [87—100] объясняются продуктивной активацией ключевой фосфофруктокиназной реакции посредством АМФ¹ или фруктозо-1,6-бисфосфатом [80—86, 90, 100, 106—108].

Однако нередко полиферментные системы проявляют свойства, отсутствующие у составляющих их реакций. В гликолитической системе, например, наблюдаются при определенных условиях двухчастотные колебания [89, 90, 92, 94]. Исследование этого явления с помощью математических моделей [109—113] показало, что двухчастотные колебания объясняются взаимодействием двух гликолитических одночастотных генераторов. Одним из них служит фосфофруктокиназная реакция, активируемая аденозинмонофосфатом, другим — сложная система реакций, вся нижняя часть гликолитической системы, в которой колебания возникают в результате активации пируваткиназы фруктозо-1,6-бисфосфатом или(и) субстратного угнетения глицеральдегидфосфатдегидрогеназы [110, 113]. Таким образом, двухчастотные колебания в гликолизе — типичный «системный эффект». Как бы мы детально не изучали свойства отдельных гликолитических реакций, мы не поймем механизм этого явления до тех пор, пока не рассмотрим, как взаимодействуют друг с другом реакции в гликолитической системе.

Другим примером системного эффекта может служить множественность стационарных состояний, возникающая в полиферментной системе при наличии в ней перекрестного угнетения ферментов своими продуктами. Это явление впервые было рассмотрено на простой кинетической модели в 1948 г. Дельбрюком [114]. Позднее Спэнглер и Снелл [115, 116], несколько модифицировав эту кинетическую модель, показали, что перекрестное угнетение может вызывать также и автоколебания. Жакоб и Моно [117], развив идею

¹ АМФ не является продуктом фосфофруктокиназной реакции, но находится в равновесии с АДФ, одним из продуктов этой реакции. Равновесие поддерживается в результате действия аденилаткиназы — фермента, катализирующего превращение $2 \text{ АДФ} \rightleftharpoons \text{АМФ} + \text{АТФ}$.

Дельбрюка, предложили целую серию кинетических моделей для объяснения триггерных и колебательных явлений, связанных с механизмами генетической регуляции. В последние годы различные варианты моделей, описывающих взаимоотношения между генами-регуляторами и генами-операторами, были предметом тщательного теоретического анализа. Такие исследования проводились Андреевым [118], Чернавским и сотр. [119—121], Ратнером [122, 123] и другими исследователями [124—128]. Еще одним известным из теоретических расчетов системы эффектом являются автоколебания в системах реакций, контролируемых механизмом отрицательной обратной связи [129—140].

Во всех цитированных до сих пор теоретических работах [106—140] неустойчивость стационарных состояний, необходимая для существования колебаний или переключений между альтернативными состояниями, была результатом специфической аллостерической регуляции активности ферментов и генов. В еще более яркой форме системный эффект проявляется тогда, когда полиферментная система вовсе не имеет аллостерических регуляторных механизмов и все взаимодействия между ее реакциями чисто стехиометрические. Как показали исследования [145—149] моделей механизмов стехиометрической регуляции энергетического метаболизма, на стехиометрическом уровне взаимоотношений между реакциями могут создаваться практически все важнейшие свойства полиферментных систем, которые ранее приписывались исключительно механизмам аллостерической регуляции.

Поскольку энергетический метаболизм и в особенности его анаэробная часть — гликолиз — изучены в экспериментальном отношении значительно более подробно, чем любая другая часть клеточного обмена, в этой главе будут рассмотрены лишь математические модели энергетического метаболизма.

3.2. Уровни функциональной организации полиферментных систем

Превращение исходных субстратов клеточного метаболизма, поступающих из окружающей клетку среды, в конечные продукты, выбрасываемые в среду, и в резервные вещества осуществляется через сеть взаимосвязанных ферментативных реакций, имеющую очень сложную функциональную организацию. Эта функциональная организация представляет собой определенный порядок взаимодействия веществ клетки друг с другом на основе стерического (структурного) соответствия микро- и макромолекул. Такое стерическое соответствие лежит в основе специфичности действия ферментов на субстраты, специфичности изо- и аллостерических регуляторных взаимодействий и, наконец, специфичности взаимодей-

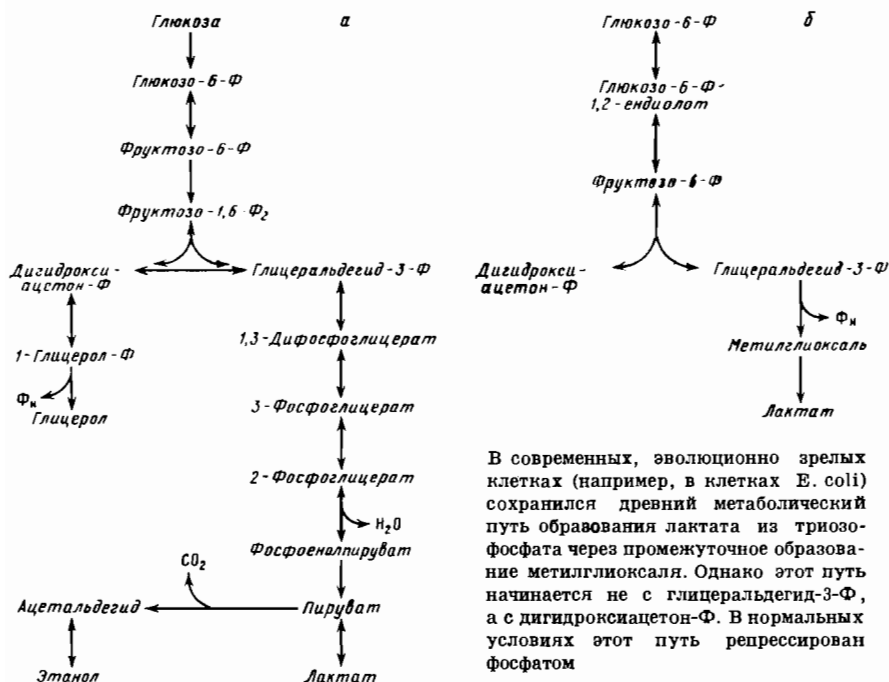


Рис. 19. Первичная структура гликолитической системы (а) и схема реакций, обнаруженная Дегани и Холмемом [159] при щелочной деградации глюкозо-6-Ф при $\text{pH} \geq 8,7$ (б)

ствий белков и нуклеиновых кислот между собой и друг с другом. Эта организация, названная Диксоном [3, с. 467] организацией на основе специфичности, может существовать даже в условиях идеального перемешивания внутриклеточной среды.

Функциональная организация клетки эволюционировала, по-видимому, на протяжении 3 млрд. лет [155—158]. Длительная эволюция создала хорошо различимую иерархию взаимодействий в функциональной организации метаболизма современных клеток. В этой иерархии мы выделим три иерархические структуры: первичную, вторичную и третичную.

Первичная структура клеточного метаболизма представляет собой скелет метаболизма, образованный взаимодействиями между смежными реакциями через общие промежуточные вещества. Широко известная карта Никольсона «Метаболические пути» представляет собой именно первичную структуру клеточного метаболизма. Изображение первичной структуры гликолиза по-

казано на рис. 19, а. Как показали Дегани и Холтен [159], неферментативный гликолиз глюкозо-6-фосфата, наблюдаемый в слабощелочной среде (рН 8,7), проходит по пути (рис. 19, б), сохранившемуся в современных клетках. На этом основании авторы пришли к выводу, что метаболические пути (т. е. первичная структура, по нашей классификации) возникли в ходе эволюции раньше, чем ферменты, катализирующие эти пути.

Вторичная структура, или стехиометрическая, клеточного метаболизма образуется из первичной структуры и взаимодействий между реакциями через общие кофакторы. Вторичная структура — это совокупность всех стехиометрических взаимодействий между реакциями. Альбом Дэгги и Никольсона «Метаболические пути» [160] содержит изображения стехиометрической структуры различных полиферментных систем.

Интересно отметить аналогии между вторичной структурой макромолекул и стехиометрической структурой полиферментных систем: повторяющиеся взаимодействия реакций через общие кофакторы могут вызывать частичную спирализацию вторичной структуры полиферментных систем. Известными примерами этого явления служат спиральные стехиометрические структуры полиферментных систем, участвующих в синтезе и окислении жирных кислот.

На рис. 20 показана вторичная структура гликолитической системы. Как видно из рисунка, взаимодействия четырех фосфотрансферазных реакций вызывают спирализацию первичной структуры (выделена толстой линией).

Множество ферментативных реакций, связанных общим кофактором, образует ядро реакций. На рис. 20 показаны два ядра, образованных четырьмя фосфотрансферазными и тремя дегидрогеназными реакциями. Благодаря таким ядрам осуществляется очень тесная связь между отдельными частями первичной структуры. Если резко изменить концентрацию глюкозы, то это вызовет следующую цепь событий: изменение скорости гексокиназной реакции $\rightarrow$ изменение отношения $[АТФ]/[АДФ] \rightarrow$ изменение скоростей всех фосфотрансферазных реакций. Таким образом, пируваткиназная реакция, отстоящая в первичной структуре очень далеко от гексокиназной реакции, получает сигнал об изменении в первой гликолитической реакции очень быстро — одновременно с другими фосфотрансферазными реакциями.

Стоит заметить, что вторичная структура полиферментной системы может быть реконструирована на основании первичной структуры — точно так же, как и вторичная структура макромолекулы может быть предсказана исходя из ее первичной структуры.

Замечательно то, что эволюция не уничтожила более примитивные варианты стехиометрической структуры. Это позволяет

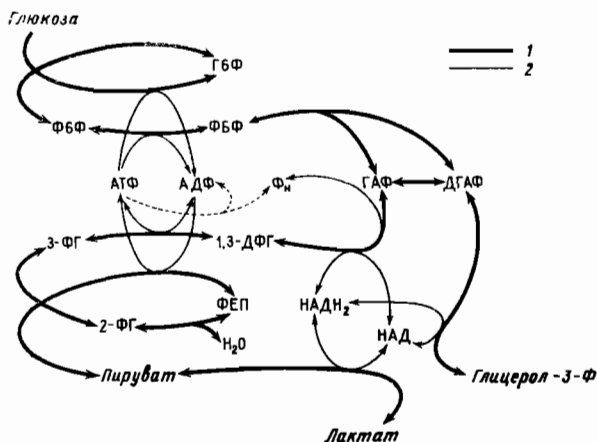


Рис. 20. Вторичная, или стехиометрическая, структура гликолитической системы

1 — первичная структура; 2 — взаимодействия между реакциями через общие кофакторы; Г6Ф — глюкозо-6-Ф; Ф6Ф — фруктозо-6-Ф; ФБФ — фруктозо-1,6-Ф₂; ДГАФ — дигидроксиацетонфосфат; ГАФ — глицеральдегид-3-Ф; 1,3-ДФГ — 1,3-дифосфоглицерат; 3-ФГ — 3-фосфоглицерат; 2-ФГ — 2-фосфоглицерат; ФЕП — фосфоенолпироват. Пунктирной стрелкой показана АТФазная реакция

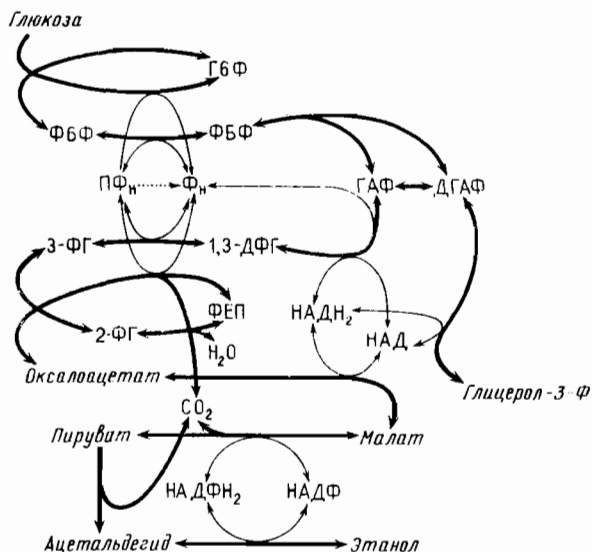


Рис. 21. Вторичная структура гликолитической системы в случае, когда кофактором фосфотрансферазных реакций является неорганический пиррофосфат (ПФ_н) или фосфат (Ф_н)

Обозначения те же, что на рис. 20.

проследить путь, по которому развивался клеточный метаболизм. Так, например, у некоторых микроорганизмов существуют ферменты гликолитического пути, которые вместо АТФ или АДФ используют неорганические полифосфаты ПФ_{n+1} и ПФ_n соответственно ($n \geq 1$ — число ортофосфатных групп в одной молекуле полифосфата) [161—165]. Полифосфаты относительно легко образуются в растворе ортофосфорной кислоты в условиях, близких к тем, которые, как полагают, существовали на Земле 3 млрд. лет назад [157, 158]. Поэтому они являются несомненными эволюционными предшественниками АТФ и других нуклеотидов, выполняющих роль переносчиков энергии в различных биохимических процессах. Имеющиеся в настоящее время энзимологические данные [161—165] позволяют реконструировать древнюю вторичную структуру гликолитической системы так, как это показано на рис. 21. Сравнение этой древней вторичной структуры с более молодой, в которой роль переносчика энергии выполняет АТФ (см. рис. 20), показывает, что вторичная структура гликолиза сохранилась прежней, несмотря на сильное изменение химической структуры кофактора фосфотрансферазных реакций.

Третичная структура клеточного метаболизма представляет собой совокупность всех стехиометрических и нестехиометрических взаимодействий, контролирующих активности ферментов. К нестехиометрическим взаимодействиям относятся любые изо- и аллостерические взаимодействия между ферментами и модификаторами их каталитической активности. На рис. 22 в качестве примера показана третичная структура гликолитической системы. Регуляторные связи третичной структуры, по-видимому, возникли в ходе эволюции и улучшили свойства вторичной структуры. Если это так, то в наших руках оказывается очень простой метод математического анализа полиферментных систем. Суть его состоит в следующем. Для выяснения роли многочисленных регуляторных взаимодействий третичной структуры данной полиферментной системы необходимо сначала изучить свойства значительно более простой и поэтому легко доступной для анализа вторичной структуры этой системы. На основании анализа вторичной структуры можно теоретически предсказать, какие нестехиометрические регуляторные взаимодействия следует внести во вторичную структуру, чтобы улучшить ее свойства. Если предсказанные регуляторные связи действительно существуют, то это указывает на то, что улучшаемое ими свойство полиферментной системы, обнаруженное на уровне вторичной структуры, так сказать, *in statu nascendi*, играет важную роль в функциональной организации клетки.

В последующих разделах иллюстрируется применение этого метода для анализа энергетического метаболизма.

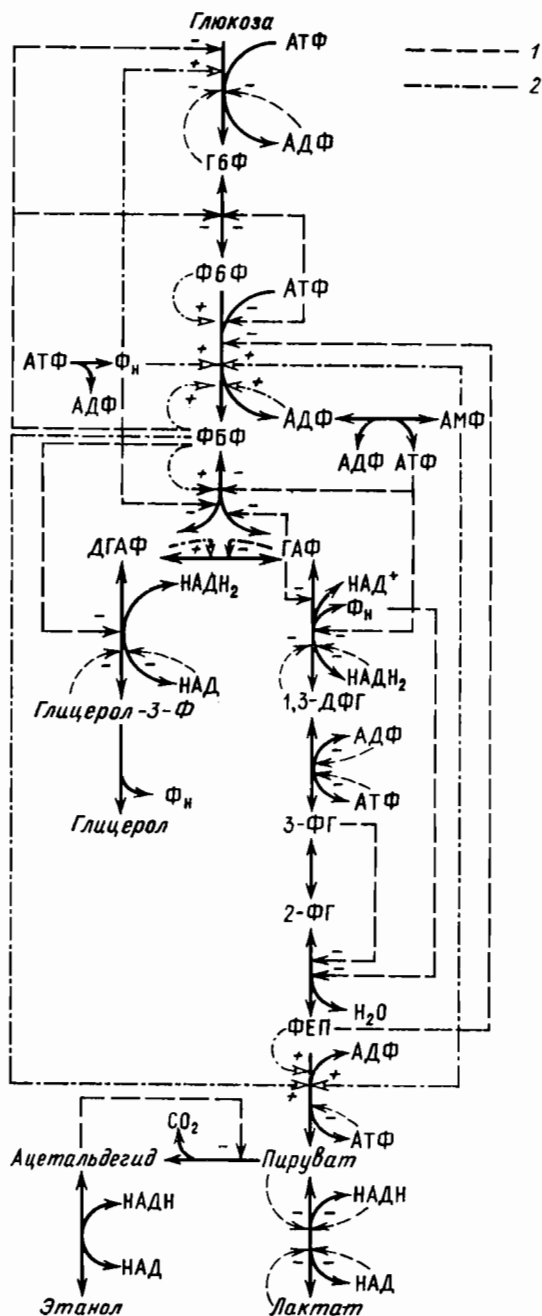


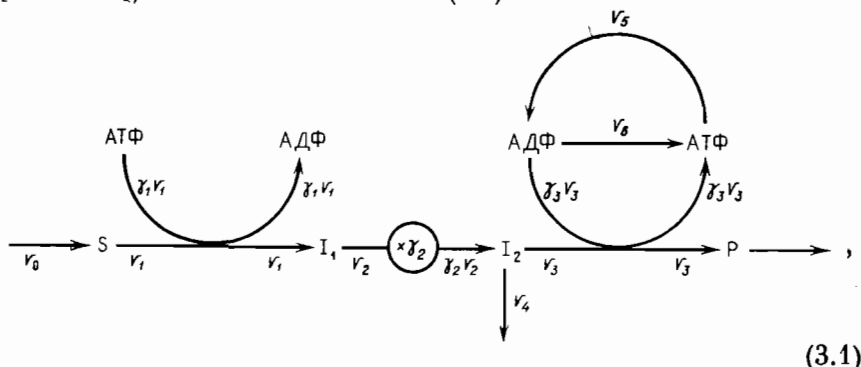
Рис. 22. Третичная структура гликолитической системы

1, 2 — нестехиометрические (изо- и аллостерические) регуляторные взаимодействия. Остальные обозначения те же, что на рис. 20

3.3. Простая модель стехиометрической структуры энергетического метаболизма

Гликолиз и окислительное фосфорилирование имеют автокаталитическую, точнее рефлексивно-каталитическую, стехиометрическую структуру: их продукт АТФ участвует в «активации» субстратов окисления, используемых для фосфорилирования АДФ. В гликолизе активация заключается в фосфорилировании гексоз, в окислительном фосфорилировании — в ацилировании кофермента А (липолииз) или карбоксилировании пирувата. Энергозависимый транспорт субстратов окисления через клеточную или митохондриальную мембраны также можно рассматривать как один из этапов активации.

Совокупность реакций, участвующих в энергетическом метаболизме, можно упрощенно представить кинетической моделью [141—143], показанной на схеме (3.1)



В этой модели S — субстрат, I_1 и I_2 — интермедиаты, P — продукт окисления, v_0 — скорость источника, v_1 — скорость инициаторной ступени, в которой на активацию одной молекулы S расходуется γ_1 молекул АТФ, v_2 — скорость распада I_1 на γ_2 молекул I_2 , v_3 — скорость генераторной ступени, в которой окисление одной молекулы I_2 до P сопровождается фосфорилированием γ_3 молекул АДФ, v_4 — скорость утечки, v_5 — скорость гидролиза АТФ нагрузкой, v_6 — скорость образования АТФ альтернативным источником. При анализе схемы (3.1) примем, что неорганический фосфат и окисляющий I_2 кофактор имеются в избытке. Примем также, что скорости реакций схемы (3.1) могут быть описаны простыми выражениями

$$\begin{aligned} v_0 &= v_{om} - k_0[S], & v_1 &= k_1[ATP][S]/(K_1 + [S]), \\ v_2 &= k_2[I_1], & v_3 &= k_3[I_2][ADP], & v_4 &= k_4[I_2], \\ v_5 &= V_5[ATP]/(K_5 + [ATP]), & v_6 &= k_6[ADP] \end{aligned} \quad (3.2)$$

и что существует линейный интеграл

$$[\text{АТФ}] + [\text{АДФ}] = A_0 = \text{const.} \quad (3.3)$$

Учитывая допущения (3.2), (3.3) и считая, что реакции протекают в среде идеального перемешивания, термо- и рН-стапирования, можно получить следующую безразмерную форму математической модели энергетического метаболизма:

$$\frac{d\sigma}{d\tau} = v_0 - v_1, \quad \frac{d\alpha_3}{d\tau} = \frac{\gamma_3}{\gamma_1} v_3 - v_1 - v_5 + v_6, \quad (3.4)$$

$$\varepsilon_1 \frac{d\iota_1}{d\tau} = v_1 - v_2, \quad \varepsilon_2 \frac{d\iota_2}{d\tau} = \gamma_2 v_2 - v_3 - v_4,$$

где

$$\begin{aligned} v_0 &= v_{0m} - \beta\sigma, & v_1 &= \alpha_3\sigma/(1 + \sigma), & v_2 &= \iota_2, \\ v_3 &= \iota_2\alpha_2 \\ v_4 &= \beta_4\iota_2, & v_5 &= \alpha_3/(\kappa_5 + \alpha_3), & v_6 &= \beta_6\alpha_2. \end{aligned} \quad (3.5)$$

В модели (3.4) использованы безразмерные переменные и параметры:

$$\begin{aligned} \sigma &= [S]/K_1, & \alpha_3 &= [\text{АТФ}]/A_0, & \alpha_2 &= [\text{АДФ}]/A_0 = 1 - \alpha_3, \\ \iota_1 &= k_2[I_1]/k_1A_0, & \iota_2 &= k_3[I_2]/k_1, & \tau &= k_1A_0t/K_1, \\ \varepsilon &= A_0/K_1\gamma_1, & \varepsilon_1 &= k_3A_0/k_2K_1, & \varepsilon_2 &= k_1/k_3K_1, \\ v_{0m} &= v_{0m}/k_1A_0, & \beta &= k_0K_1/k_1A_0, & \beta_4 &= k_4/k_3A_0, \\ \beta_5 &= V_5/\gamma_1k_1A_0, & \beta_6 &= k_6/\gamma_1k_1, & \kappa_5 &= K_5/A_0. \end{aligned} \quad (3.6)$$

Если значения ε_1 и ε_2 достаточно малы, то при помощи предельного перехода $\varepsilon_1, \varepsilon_2 \rightarrow 0$ модель (3.4) сводится к системе двух дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{d\sigma}{d\tau} &= v_0 - v \equiv P(\sigma, \alpha_3), \\ \varepsilon \frac{d\alpha_3}{d\tau} &= v_{\text{out}} - v_5 + v_6 \equiv \varepsilon Q(\sigma, \alpha_3), \end{aligned} \quad (3.7)$$

в которой

$$v_{\text{out}} = \left(\frac{\eta\alpha_2 - \beta_4}{\alpha_2 + \beta_4} \right) \frac{\alpha_3\sigma}{1 + \sigma} \quad (3.8)$$

— выходная характеристика и

$$\eta = \gamma_2\gamma_3/\gamma_1 - 1 \quad (3.9)$$

— стехиометрическая эффективность источника энергии, состоящего из реакций первой — четвертой схемы (3.1). График выход-

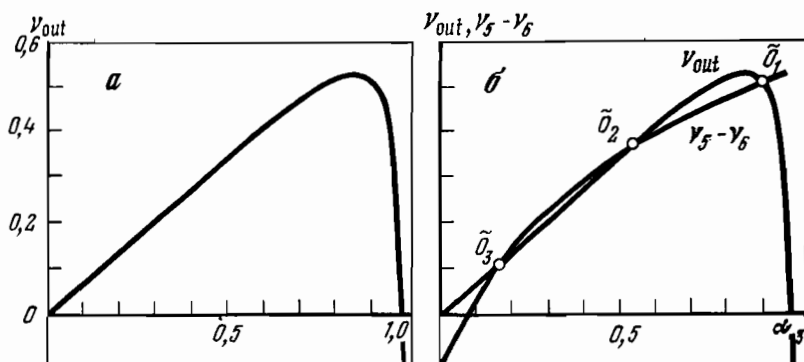


Рис. 23. Выходная характеристика стехиометрической структуры энергетического метаболизма (3.1)

а — выходная характеристика, построенная по уравнению (3.8) при фиксированной концентрации субстрата $\sigma = 2,5$ и при $\beta_4 = 0,01$, $\eta = 1$; б — определение квазистационарных состояний в энергетическом метаболизме (3.1). Квазистационарные состояния $\tilde{O}_1$, $\tilde{O}_2$ и O_3 представляют собой точки пересечений выходной характеристики и кривой разностной скорости $v_5 - v_6$. Нетрудно заметить, что состояние O_2 всегда неустойчиво, а состояния $\tilde{O}_1$ и $\tilde{O}_3$ устойчивы. Параметры: $\beta = 0,8$, $\beta_5 = 0,1$, $\kappa_5 = 0,5$; остальные параметры те же, что на рис. а

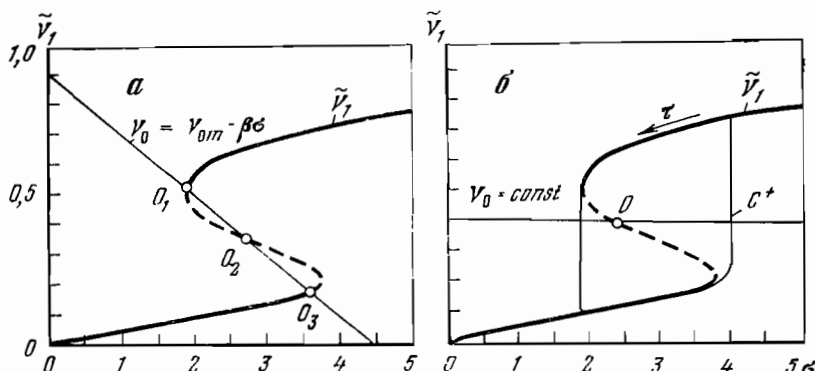


Рис. 24. Квазистационарная входная характеристика инициаторной ступени энергетического метаболизма (3.1). $\tilde{v}_1$ — значение скорости $\tilde{v}_1$, соответствующее квазистационарному состоянию, в котором $ed\alpha_3/dt = 0$, σ — безразмерная концентрация субстрата S . Кривая $\tilde{v}_1(\sigma)$ построена с помощью уравнения $\tilde{v}_1 = \tilde{\alpha}_3\sigma/(1 + \sigma)$, в котором $\tilde{\alpha}_3$ — корень уравнения $Q(\alpha_3, \sigma) = 0$ модели (3.7). Участок кривой $v_1(\sigma)$, соответствующий неустойчивому квазистационарному состоянию $\tilde{O}_2$ (см. рис. 23), показан штриховой линией. Параметры: $\beta_4 = 0,01$, $\beta_5 = 0,1$, $\eta = 1$, $\kappa_5 = 0,5$

а — пересечение характеристики источника субстрата $v_0 = v_{0m} - \beta\sigma$ с квазистационарной входной характеристикой $\tilde{v}(\sigma)$ дает три стационарные точки O_1 , O_2 и O_3 . Параметры источника: $\beta = 0,2$, $v_{0m} = 0,4$; б — пересечение характеристики источника с входной характеристикой в единственной стационарной точке O , расположенной на устойчивом участке входной характеристики, C^+ — предельный цикл, полученный интегрированием модели (3.7) при $\beta = 0$, $\kappa = 0,08$, $v_{0m} = 0,4$

ной характеристики при фиксированном значении σ показан на рис. 23, а. Из рисунка видно, что с возрастанием α_3 скорость продукции АТФ вначале возрастает, а затем, достигнув максимума, падает. При больших α_3 скорость v_{out} может принимать отрицательные значения, т. е. энергетический метаболизм становится потребителем АТФ. Это связано с тем, что при большом α_3 скорость v_3 мала (α_2 мало) и фосфорилированный интермедиат I_2 оттекает без синтеза АТФ. Уравнение для квазистационарных состояний $Q(\sigma, \alpha_3) = 0$ легко решается графически посредством нахождения точек пересечения графика выходной характеристики с линией $v = v_5 - v_6$ (рис. 23, б). На рис. 23, б показаны три квазистационарных состояния, а при больших или, напротив, малых σ должно быть только одно квазистационарное состояние. Следовательно, квазистационарная кривая в плоскости (σ, v_1) должна иметь гистерезисный характер (рис. 24). S-образность квазистационарной входной характеристики делает возможным существование не только одного (рис. 24, а), но и трех (рис. 24, б) стационарных состояний, которые находятся проведением на плоскости (σ, v_1) прямой $v_1 = v_{om} - \beta\sigma$ в соответствии с уравнением $P(\sigma, \alpha_3) = 0$. На параметрическом портрете в плоскости (β, v_{om}) область существования трех альтернативных стационарных состояний имеет клинообразный вид (рис. 25). Граница этой области

$$\Delta \equiv \frac{\partial P}{\partial \sigma} \frac{\partial Q}{\partial \alpha_3} - \frac{\partial P}{\partial \alpha_3} \frac{\partial Q}{\partial \sigma} = 0 \quad (3.10)$$

и граница нейтральности

$$S_P \equiv \frac{\partial P}{\partial \sigma} + \frac{\partial Q}{\partial \alpha_3} = 0 \quad (3.11)$$

построены при помощи параметрического задания в виде

$$v_{om} = v_{om}(\alpha_3), \quad \beta = \beta(\alpha_3). \quad (3.12)$$

В областях 1 и 3 параметрического портрета все стационарные состояния неустойчивы и модель (3.7) имеет устойчивый предельный цикл (см. рис. 24, а).

При исследовании модели энергетического метаболизма были использованы методы, рассмотренные в главе 2 для случая открытых ферментативных реакций. Такие методы, как графическое исследование стационарных состояний, анализ их устойчивости и построение параметрического портрета, оказываются полезными для анализа самых различных процессов, протекающих в проточных условиях.

Важнейшей количественной характеристикой любого энергетического метаболизма является его нагрузочная характеристика [144, 147]. Под нагрузочной характеристикой подразумевается зависимость стационарной концентрации АТФ от активности

Рис. 25. Параметрический портрет модели (3.7) энергетического метаболизма (3.1), построенный в плоскости параметров источника β и v_{om} при $\beta_4 = 0,01, \beta_8 = 0,1, \epsilon = 0,05, \eta = 1, \kappa_8 = 0,5$

На портрете проведены линии нейтральности ($S_p = 0$) и линии моностационарности ($\Delta = 0$). Стационарное состояние O (см. рис. 24, б) неустойчиво в области 1 и устойчиво в областях 4 и 6. Состояние O_2 (см. рис. 24, а) неустойчиво в областях 3 и 4 и устойчиво в областях 5 и 6. Состояние O_2 будучи седлом неустойчиво во всех областях (3—6) своего существования

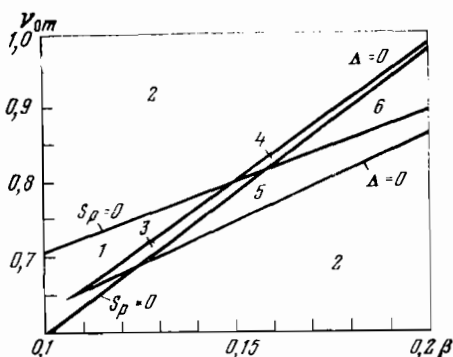
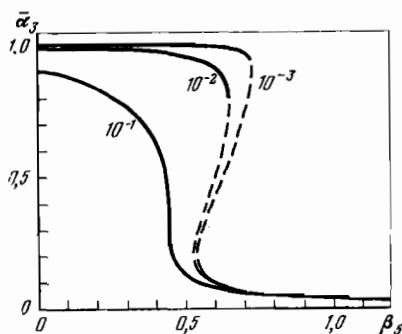


Рис. 26. Семейство стационарных нагрузочных характеристик энергетического метаболизма (3.1), полученных с помощью модели (3.7) при различных активностях утечки β_4 (цифры на кривых)

α_3 — безразмерная стационарная концентрация АТФ, удовлетворяющая условию $d\sigma/dt = d\alpha_3/dt = 0$; β_5 — относительная активность АТФазы (нагрузки). Параметры: $\beta = 0,2, \beta_8 = 0,1, \eta = 1, \kappa_8 = 0,25, v_{om} = 0,9$.

Пунктир — неустойчивый участок нагрузочной характеристики

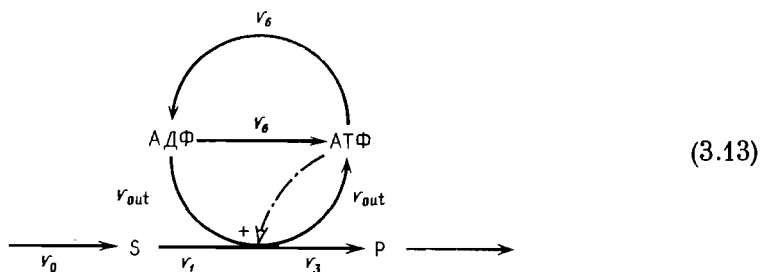


обобщенной АТФазы (нагрузки), представляющей суммарную активность всех биохимических процессов, потребляющих АТФ. Семейство таких нагрузочных характеристик, построенных с помощью модели (3.7) для энергетического метаболизма (3.1), приведено на рис. 26. На этом рисунке показана зависимость стационарной концентрации АТФ (α_3) от безразмерной активности АТФазы (β_5) при различных относительных активностях утечки (β_4). Кривые $\alpha_3(\beta_5)$ получены на основании условия стационарности ($P(\sigma, \alpha_3) = Q(\sigma, \alpha_3) = 0$) для модели (3.7). Как видно из рис. 26, при малой активности утечки нагрузочная характеристика обладает важной особенностью: с изменением нагрузки в широком диапазоне ($0 < \beta_5 < \beta_{кр}$, где $\beta_{кр} \approx v_{om}(\eta - \beta_4)/(1 + \beta_4)$ — критическое значение нагрузки) стационарная концентрация АТФ меняется очень слабо ($\alpha_3 \approx 1$). Таким образом, стехиометрическая структура энергетического метаболизма (3.1) способна без участия каких-либо аллостерических регуляторных связей с высокой точностью поддерживать стабильную концентрацию АТФ в широком диапазоне изменений нагрузки.

Другой заметной особенностью нагрузочной характеристики является ее гистерезис. Этот гистерезис приводит к тому, что при перегрузке (т. е. при $\beta_5 \geq \beta_{5\text{кр}}$) в энергетическом метаболизме скачком устанавливается очень низкая стационарная концентрация АТФ, определяемая лишь активностью альтернативного источника (β_6). Для возвращения перегруженного энергетического метаболизма в рабочее состояние — в состояние активной стабилизации [АТФ] — необходимо резко уменьшить нагрузку ($\beta_5 \ll \ll \beta_{5\text{кр}}$).

Модель энергетического метаболизма (3.7) является обобщением различных модификаций модели Лотки [166—167]. При $\beta_4 = 0$ модель сводится к модификации модели Лотки, рассмотренной Павлидисом и Козменом [156], при $\beta_4 \approx \beta_5 = 0$ — к модели Хиггинса [107] и, наконец, при $\beta_4 = \beta_5 = 0$, $\sigma \ll 1$, $\alpha_3 \ll 1$ — к оригинальной модели Лотки [167].

Нетрудно заметить, что двойной предельный переход $\varepsilon_1 \rightarrow 0$ и $\varepsilon_2 \rightarrow 0$, использованный при выводе модели (3.7) и исключаящий концентрации интермедиатов I_1 и I_2 как несущественные быстрые переменные, редуцирует кинетическую модель (3.1) до существенно более простой модели, показанной на схеме:



Здесь штрих-пунктирной стрелкой обозначено автокаталитическое участие АТФ в собственном синтезе. Подобное свертывание сложной полиферментной системы к одной эквивалентной реакции открывает большие возможности для упрощения анализа клеточного метаболизма.

При выводе модели (3.7) использовали простейшие гипотезы относительно скоростей $v_1 - v_6$, считая, что скорости этих реакций линейно зависят от концентраций соответствующих интермедиатов и коферментов. Кроме того, при выводе не учитывалось, что в клетке имеется фермент, аденилаткиназа (АДК), катализирующий быструю обратимую реакцию



В работе [144] была проанализирована модель стехиометрической структуры энергетического метаболизма, учитывающая как насыщение всех реакций субстратами, так и реакцию (3.14). Исследование этой более полной модели показало, что ее нагрузочная характеристика также имеет четко выраженное плато и гистерезис. При этом гистерезис нагрузочной характеристики может возникать по независимым причинам: 1) из-за дополнительной нелинейности, вносимой в модель реакцией (3.14), 2) из-за конкуренции между генераторной ступенью и утечкой за интермедиат I_2 и 3) из-за насыщения нагрузки аденозинтрифосфатом, как и в модели (3.7). В работах [145—154] было продолжено исследование различных вариантов кинетической модели (3.1) и было показано, что во всех ее вариантах неизменно обнаруживается плато нагрузочной характеристики и что в энергетическом метаболизме имеется множество различных стехиометрических взаимодействий, порождающих гистерезис этой характеристики. В некоторых вариантах модели (3.1) была учтена зависимость скорости генераторной ступени от концентрации неорганического фосфата [145—149]. В таких вариантах плато нагрузочной характеристики в широком диапазоне нагрузок имеет положительный наклон, т. е. АТФ растет с увеличением нагрузки. Таким образом, участие фосфата в работе энергетического метаболизма в качестве стехиометрического регулятора приводит к своеобразной перекомпенсации нагрузки: чем больше активность обобщенной АТФазы, тем больше неорганического фосфата и, следовательно, тем интенсивнее работает генераторная ступень. В итоге, в некотором диапазоне нагрузок концентрация АТФ не только не уменьшается, но даже растет с увеличением нагрузки.

В публикациях [152—154] были проанализированы варианты модели (3.1), детально описывающие рециркуляцию интермедиатов, существующую в цикле Кребса. Анализ этих вариантов модели (3.1) показал, что нагрузочная характеристика аэробного энергетического метаболизма в условиях интенсивного протока субстратов через цикл Кребса также имеет плато и гистерезис.

Таким образом, из анализа стехиометрической структуры энергетического метаболизма, проведенного здесь с помощью модели (3.1), а также с помощью различных обобщений этой модели [141—154], следует, что плато и гистерезис нагрузочной характеристики являются фундаментальными свойствами любого энергетического метаболизма, имеющего автокаталитическую природу.

3.4. Два класса аллостерических регуляторных связей, контролирующих энергетический метаболизм

На основании анализа стехиометрической структуры энергетического метаболизма можно высказать предположение, что плато и гистерезис нагрузочной характеристики должны быть объектами тонкой регуляции, осуществляемой на уровне третичной структуры. Это предположение основано на том, что оба свойства имеют очевидную ценность для клеточного обмена. Действительно, наличие четко выраженного плато означает точную стабилизацию уровня АТФ, необходимую для независимой и поэтому стабильной работы систем, потребляющих АТФ. Что же касается гистерезиса нагрузочной характеристики, то он может быть основой для временной организации не только энергетического метаболизма, но и всего клеточного обмена.

Предположение о существовании регуляторных механизмов, контролирующих плато и гистерезис нагрузочной характеристики энергетического метаболизма, легко теоретически проверить, используя известные экспериментальные данные, относящиеся к механизмам аллостерической регуляции ферментов метаболизма [31—34].

Рассмотрим, каким образом влияют различные аллостерические связи на выходную нагрузочную характеристику (3.8) кинетической модели (3.1).

Регуляторные связи, снижающие плато нагрузочной характеристики

Для упрощения анализа вариантов кинетической модели (3.1), содержащих аллостерические регуляторные связи, примем, что субстрат S имеется в избытке, т. е. что $\sigma \gg 1$. В этом случае инициаторная ступень насыщена субстратом и ее скорость зависит только от концентрации АТФ

$$v_1 = \alpha_3 \sigma / (1 + \sigma) \approx \alpha_3. \quad (3.15)$$

Наиболее распространенным механизмом аллостерической регуляции в энергетическом метаболизме различных клеток является угнетение аденозинтрифосфатом инициаторной ступени:



В гликолизе такой связью контролируется активность фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11), в липолизе — активность АТФ-зависимых ацил-КоА-синтетаз (КФ 6.2.1.2, 6.2.1.3), в системе окислительного фосфорилирования — активность пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1) и ацетил-КоА-синтетазы (КФ 6.2.1.2) при окислении пирувата или ацетата соответственно. Регуляция (3.15) феноменологически может быть описана регуляторной функцией

$$\Psi_1 = 1/(1 + c_i \alpha_3^{n_i}) \quad (c_i \geq 0, \quad n_i > 1), \quad (3.17)$$

на которую должна быть помножена скорость инициаторной ступени

$$v_1 = \alpha_3 \sigma \Psi_1 / (1 + \sigma) \approx \alpha_3 \Psi_1. \quad (3.18)$$

В выражении (3.17) c_i — безразмерный коэффициент угнетения (при $c_i = 0$ угнетение отсутствует) и n_i — порядок угнетения.

С учетом выражений (3.17) и (3.18) выходная характеристика (3.8) принимает вид

$$v_{out} = \alpha_3 \Psi_1 \left(\frac{\eta(1 - \alpha_3) - \beta_4}{1 - \alpha_3 + \beta_4} \right) \quad (3.19)$$

или

$$v_{out} = \frac{\alpha_3}{1 + c_i \alpha_3^{n_i}} \left(\frac{\eta(1 - \alpha_3) - \beta_4}{1 - \alpha_3 + \beta_4} \right). \quad (3.10)$$

В стационарном состоянии

$$v_5 = v_{out} + v_6 \quad (3.21)$$

или с учетом выражений (3.5) для v_5 и v_6 и выражения (3.20)

$$\beta_5 = (\kappa_5 + \alpha_3) \left(\frac{1}{1 + c_i \alpha_3^{n_i}} \left(\frac{\eta(1 - \alpha_3) - \beta_4}{1 - \alpha_3 + \beta_4} \right) + \beta_6 \left(\frac{1}{\alpha_3} - 1 \right) \right). \quad (3.22)$$

Уравнение (3.22) позволяет построить стационарную нагрузочную характеристику $\bar{\alpha}_3(\beta_5)$ для кинетической модели (3.1), имеющей регуляцию (3.16). Для этой цели в уравнение (43.22) следует подставить заданное стационарное значение $\alpha_3 = \bar{\alpha}_3$ и заставить его пробежать интервал значений

$$0 < \bar{\alpha}_3 \leq \bar{\alpha}_{3max}, \quad (3.23)$$

ограниченный максимальным значением $\bar{\alpha}_3 = \bar{\alpha}_{3max}$, при котором $\beta_5 = 0$.

На рис. 27, а показано семейство нагрузочных характеристик, построенных при различных значениях порядка угнетения n_i . Из рисунка видно, что при высоких порядках угнетения плато нагрузочной характеристики снижается. Заметим, что снижение плато сопровождается ухудшением формы нагрузочной характеристики: при малых нагрузках концентрация АТФ сильно изме-

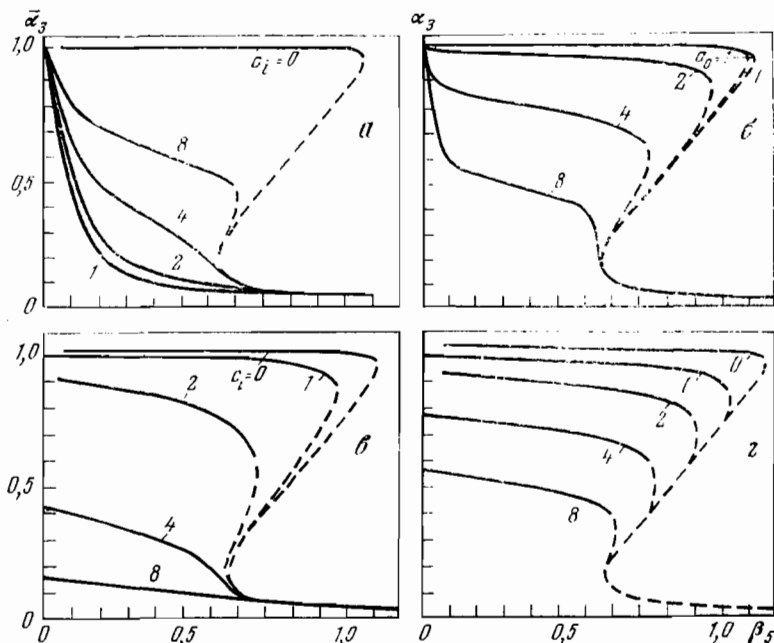
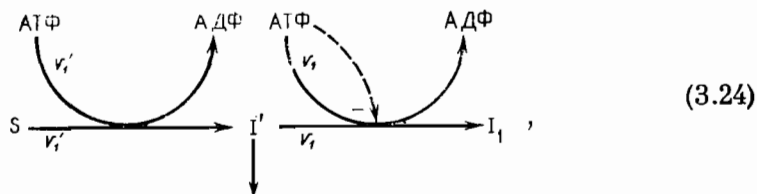


Рис. 27. Влияние различных аллостерических механизмов на форму стационарной нагрузочной характеристики энергетического метаболизма (3.1) при $\beta_4 = 10^{-3}$, $\beta_6 = 0,1$, $\eta = 1$, $\kappa_5 = 0,25$ и $\sigma \gg 1$

а — угнетение инициаторной ступени АТФ. Характеристики построены по уравнению (3.22) при различных значениях порядка угнетения n_i (цифры на кривых) и при $c_i = 10^2$; б — активация инициаторной ступени АДФ. Характеристики построены по уравнению (3.27) при различных значениях порядка активации n_a (цифры на кривых), при $c_a = 10^2$ и $a_6 = 0,01$; в — угнетение генераторной ступени АТФ. Характеристики построены с помощью уравнений (3.30) и (3.33) при различных порядках угнетения n_i (цифры на кривых) и $c_i = 10$; г — активация генераторной ступени АДФ. Характеристики построены с помощью уравнений (3.31) и (3.33) при различных порядках активации n_a (цифры на кривых). Пунктир — неустойчивый участок нагрузочной характеристики

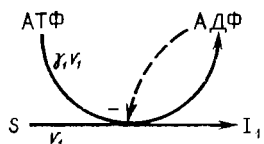
няется с изменением β_4 . Это свойство, однако, является в значительной степени артефактом моделирования: если расщепить затравочную ступень (3.16) на две последовательные ступени, связанные через общий интермедиат



то в таком случае угнетение второй затравочной ступени (аналогичной фосфофруктокиназной реакции) приводит к простому снижению плато нагрузочной характеристики, как это показано на рис. 27, а.

Влияние аллостерической регуляции вида (3.16) на механизм стабилизации концентрации АТФ в гликолитической системе эритроцитов было подробно проанализировано Рапопортом и соавт. [169] с помощью модели, являющейся обобщением модели (3.1). Эта обобщенная модель при значениях параметров, определенных экспериментально, как и более простая модель (3.1), имеет нагрузочную характеристику с четко выраженными плато и гистерезисом. Из-за угнетающего действия АТФ на фосфофруктокиназу плато расположено ниже уровня, стабилизируемого стехиометрической структурой. Аналогичные результаты были описаны в работе Жаботинского [170].

Кинетическая схема (3.16) при постоянном пуле аденилатов ($\alpha_2 + \alpha_3 = 1$) качественно эквивалентна активации затравочной ступени АДФ



$$(3.25)$$

Эта регуляция может быть представлена в уравнении (3.18) для v_1 функцией вида

$$\Psi_1 = (a_0 + c_a \alpha_2^{n_a}) / (1 + c_a \alpha_2^{n_a}) \quad (a_0 < 1, c_a > 0, n_a \geq 1), \quad (3.26)$$

где c_a и n_a — коэффициент и порядок активации, a_0 — безразмерная активность инициаторной ступени без активатора (при $\alpha_2 = 0$).

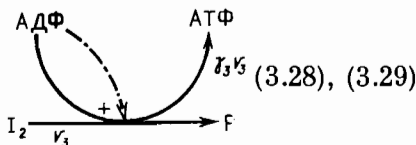
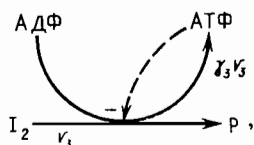
С учетом функции (3.26) уравнение нагрузочной характеристики принимает вид

$$\beta_5 = (\kappa_5 + \bar{\alpha}_3) \left(\frac{a_0 + c_a \bar{\alpha}_2^{n_a}}{1 + c_a \bar{\alpha}_2^{n_a}} \left(\frac{\eta \bar{\alpha}_2 - \beta_4}{\bar{\alpha}_2 + \beta_4} \right) + \beta_6 \left(\frac{1}{\bar{\alpha}_3} - 1 \right) \right). \quad (3.27)$$

Семейство нагрузочных характеристик, построенных по уравнению (3.2) при различных порядках активации, показано на рис. 27, б.

Другими аналогами регуляторной связи (3.16) являются угнетение генераторной ступени АТФ и активация этой же ступени

АДФ



Эти регуляторные связи могут быть феноменологически описаны функциями

$$\Psi_3 = 1/(1 + c_i \alpha_3^{n_i}) \text{ и } \Psi_3 = \alpha_2^{n_a}, \quad (3.30), (3.31)$$

на которые следует помножить скорость генераторной ступени

$$v_3 = v_2 \alpha_2 \Psi_3. \quad (3.32)$$

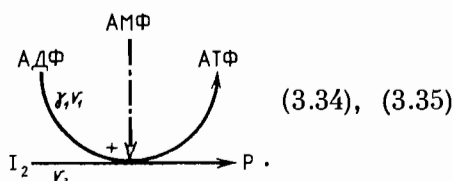
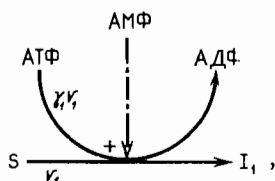
Нагрузочные характеристики с учетом функций (3.30) и (3.31) описываются уравнениями вида

$$\beta_5 = (\kappa_5 + \alpha_3) / \left(\left(\frac{\eta \Psi_3 \alpha_2 - \beta_4}{\Psi_3 \alpha_3 + \beta_4} \right) + \beta_6 \left(\frac{1}{\alpha_3} - 1 \right) \right). \quad (3.33)$$

Как видно из семейств нагрузочных характеристик, построенных с помощью уравнений (3.30), (3.33) и (3.31), (3.33) на рис. 27, в и г, регуляции типа (3.28), (3.29), как и регуляции (3.16) и (3.25), снижают плато нагрузочной характеристики.

Отметим, что регуляции вида (3.28) и (3.29) обеспечивают значительно лучшую форму нагрузочной характеристики, чем регуляции, контролирующие инициаторную ступень. Именно этим, по-видимому, можно объяснить широкое распространение в энергетическом обмене различных клеток связей вида (3.28) и (3.29). В гликолизе регуляция типа (3.28) представлена угнетением АТФ пируваткиназы (КФ 2.7.1.40), в системе окислительного фосфорилирования — угнетением посредством АТФ или НАДН цитратсинтазы (КФ 4.1.3.7), изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.41) и α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса (КФ 1.2.4.2 и другие ферменты комплекса). В окислительном фосфорилировании многих клеток регуляция типа (3.29) представлена кооперативной активацией изоцитратдегидрогеназы посредством НАД.

Распространенными и эффективными аналогами регуляций вида (3.25) и (3.29) являются аллостерические воздействия АМФ на инициаторную и (или) генераторную ступень:



Эффективность этих регуляций объясняется тем, что в области плато нагрузочной характеристики при $\alpha_3 \approx \text{const}$ концентрация АМФ в результате быстрой реакции (3.14) оказывается пропорциональной квадрату концентрации АДФ. Эта квадратичная зависимость [АМФ] от [АДФ] делает АМФ одним из ведущих аллостерических регуляторов энергетического метаболизма [31, 32], контролирующего стабилизируемый уровень АТФ в клетке.

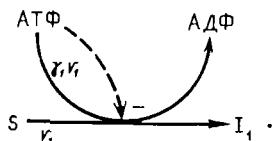
Заметим, что со снижением плато нагрузочной характеристики в энергетическом метаболизме происходит замещение чисто стехиометрического механизма стабилизации концентрации АТФ аллостерическим механизмом. Действительно, стехиометрическая стабилизация [АТФ] в автокаталитическом механизме типа (3.1) объясняется нехваткой АДФ для генераторной ступени и компенсирующим эту нехватку накоплением интермедиата I_2 по мере стремления [АТФ] $\rightarrow A_0$ [146]. При действии любой из рассмотренных аллостерических связей концентрация АДФ уже не падает так низко, как в случае чисто стехиометрической регуляции, и это предотвращает сильное накопление I_2 .

По принципу действия каждая из аллостерических регуляций, снижающих плато, представляет собой механизм отрицательной обратной связи [26], стремящийся стабилизировать не только концентрацию АТФ, но и концентрации любых других веществ, через которые замыкается петля обратной связи. Эффективность такой стабилизации тем выше, чем больше соответствующие константы угнетения или активации c_i или $c_{\perp}$ и чем выше порядки аллостерических взаимодействий n_i или $n_{\perp}$.

Регуляторные связи, создающие гистерезис нагрузочной характеристики

Если поменять знаки аллостерических воздействий, снижающих плато нагрузочной характеристики, то мы, очевидно, получим регуляторные механизмы, образующие петли положительной обратной связи. Как известно [26], механизмы положительной обратной связи дестабилизируют системы и служат причиной различных автономных движений — автоколебаний, гистерезисных переходов и т. п.

Рассмотрим как пример одну из таких дестабилизирующих связей — угнетение инициаторной ступени посредством АДФ



$$(3.36)$$

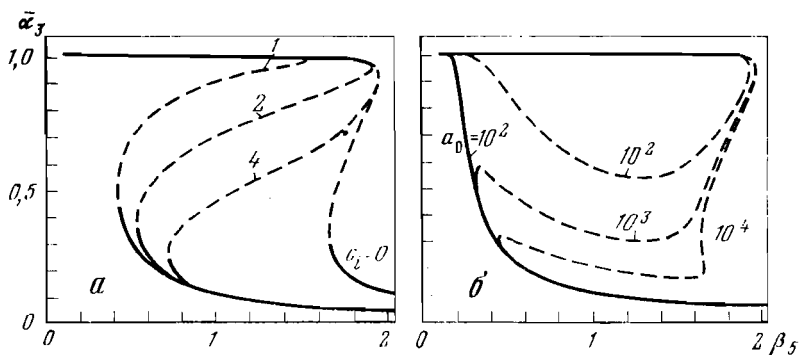


Рис. 28. Нагрузочная характеристика энергетического метаболизма (3.1) при угнетении инициаторной ступени АДФ (а) или активации интермедиатом $L_i(б)$ при $\beta_4 = 10^{-3}$, $\beta_6 = 0,1$, $\eta = 1$, $\kappa_5 = 0,5$ и $\sigma \gg 1$

а — семейство кривых, построенных с помощью уравнения (3.38) при различных порядках угнетения n_i (цифры на кривых) и при $c_i = 10$; б — семейство кривых, построенных с помощью уравнений (3.42) и (3.43) при различных значениях коэффициента активации c_a (цифры на кривых) и при $a_0 = 0,1$, $n_a = 4$. Пунктир — неустойчивый участок нагрузочной характеристики

Такое угнетение эквивалентно угнетению посредством АДФ, или чаще АМФ, фосфофруктокиназы растений, ацетил- и ацил-КоА-синтетаз и пируваткарбоксилазы. Регуляция (3.36) может быть описана функцией

$$\Psi_1 = 1/(1 + c_i \alpha_2^{n_i}), \quad (3.37)$$

с учетом которой уравнение нагрузочной характеристики принимает вид

$$\beta_5 = (\kappa_5 + \bar{\alpha}_3) \left(\frac{1}{1 + c_i \bar{\alpha}_2^{n_i}} \left(\frac{\eta \bar{\alpha}_2 - \beta_4}{\bar{\alpha}_2 + \beta_4} \right) + \beta_6 \left(\frac{1}{\bar{\alpha}_3} - 1 \right) \right). \quad (3.38)$$

На рис. 28, а приведено семейство нагрузочных характеристик, построенное по этому уравнению для различных значений коэффициента угнетения c_i и при таком значении параметра κ_5 , при котором гистерезис нагрузочной характеристики для стехиометрической структуры (3.1) выражен слабо.

Тем не менее из рис. 28, а следует, что характеристика $\bar{\alpha}_3(\beta_5)$ из-за действия дестабилизирующей связи (3.36) имеет очень сильный гистерезис.

Другой весьма распространенный дестабилизирующий аллостерический механизм — продуктная активация фосфофруктоки-

назы фруктозо-1,6-бисфосфатом. Эта связь может быть представлена в кинетической модели (3.1) в следующем виде:



Феноменологически продуктная активация (3.39) может быть представлена регуляторной функцией вида

$$\Psi_1 = (a_0 + c_a I_1^{n_a}) / (1 + c_a I_1^{n_a}) \quad (a_0 < 1, c_a > 0, n_a > 0). \quad (3.40)$$

Для построения нагрузочной характеристики из условия стационарности для концентрации интермедиата I_1

$$\frac{dI_1}{d\tau} = v_1 - v_2 = \frac{\alpha_3 \sigma}{1 + \sigma} \Psi_1 - \tau_1 \cong \alpha_3 \Psi_1 - I_1 = 0 \quad (3.41)$$

находим стационарное значение α_3 , считая стационарное значение $I_1 = \bar{I}_1$ заданным:

$$\bar{\alpha}_3 = \bar{I}_1 (1 + c_a \bar{I}_1^{n_a}) / (a_0 + c_a \bar{I}_1^{n_a}). \quad (3.42)$$

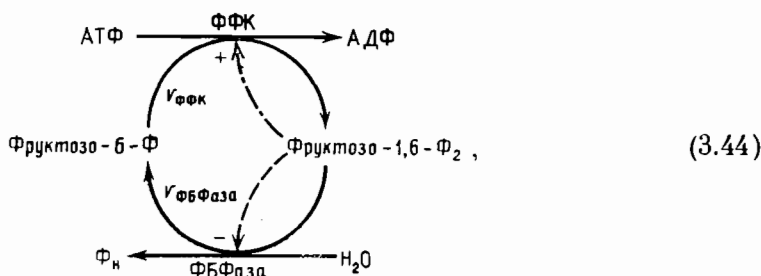
С учетом условия (3.41) и $\alpha_3 = \bar{\alpha}_3$, определяемого уравнением (3.42), нагрузочная характеристика описывается уравнением

$$\beta_5 = (\kappa_5 + \bar{\alpha}_3) \left(\frac{\bar{I}_1}{\bar{\alpha}_3} \left(\frac{\eta \bar{\alpha}_2 - \beta_4}{\bar{\alpha}_2 + \beta_4} \right) + \beta_6 \left(\frac{1}{\bar{\alpha}_3} - 1 \right) \right). \quad (3.43)$$

На рис. 28, б построено семейство характеристик $\bar{\alpha}_3$ (β_5) с помощью уравнения (3.43) при различных значениях коэффициента активации c_a . Как следует из рисунка, связь (3.39) создает исключительно сильный гистерезис нагрузочной характеристики. Как и в предыдущем случае, значение κ_5 выбрано таким, чтобы вторичная структура имела лишь незначительный гистерезис нагрузочной характеристики.

Предстоит проделать большую теоретическую работу для того, чтобы выяснить возможные физиологические функции дестабилизирующих аллостерических регуляторных связей энергетического метаболизма и других метаболических путей. Однако в тех случаях, когда такие связи оказываются вовлеченными в регуляцию реакций, составляющих так называемые футильные (или субстратные) циклы [31, 32], важная роль дестабилизирующих связей совершенно ясна. Как показано в работах [171, 172], дестабилизи-

рующие аллостерические связи, контролирующие футильный цикл:



катализируемый фосфофруктокиназой (ФФК) и фруктозо-1,6-бисфосфатазой (ФБФаза), совершенно необходимы для предотвращения паразитной рециркуляции субстратов цикла. Эта рециркуляция вызывает бесполезное рассеяние энергии АТФ и лишает гликолиз фруктозо-1,6-бисфосфата, необходимого для фосфорилирования АДФ, а глюконеогенез — фруктозо-6-фосфата, необходимого для образования гексоз и(или) гликогена (крахмала). Две эквивалентные регуляторные связи цикла (3.44) делают неустойчивым опасное для энергетического метаболизма состояние, в котором нетто-скорость цикла

$$v = v_{\text{ФФК}} - v_{\text{ФБФаза}} \approx 0. \quad (3.45)$$

Эта неустойчивость приводит к автоколебаниям концентраций субстратов и реципрокным изменениям скоростей $v_{\text{ФФК}}$ и $v_{\text{ФБФаза}}$. В ходе колебательного процесса направление нетто-тока в цикле (3.44) периодически меняется с гликолитического ($\text{Ф6Ф} \xrightarrow{v} \text{ФБФ}$) на антигликолитическое ($\text{Ф6Ф} \xleftarrow{v} \text{ФБФ}$), соответствующее ресинтезу гексоз и гликогена (крахмала).

Более того, стехиометрическая и аллостерическая связи автоколебательного цикла (3.44) с другими футильными циклами энергетического обмена подавляют паразитную рециркуляцию и в других циклах, обеспечивая тем самым нормальное функционирование энергетического метаболизма. Таким образом, дестабилизирующие связи цикла (3.44), создающие гистерезис нагрузочной характеристики энергетического метаболизма, обеспечивают генерацию автоколебаний, являющихся единственно возможной формой длительного существования энергетического метаболизма [172]. Участие гликогена и, по-видимому, других резервных веществ в таких автоколебаниях приводит к тому, что период колебаний по предварительной оценке оказывается порядка суток [171, 172]. Это обстоятельство позволяет думать, что клеточные

часы [101—104] есть не что иное, как энергетический метаболизм в котором центральную роль играет цикл (3.44).

Проведенный анализ модели (3.1) и ее обобщений, а также известные энзимологические данные действительно подтверждают существование в третичной структуре энергетического метаболизма аллостерических регуляторных связей, контролирующих плато и гистерезис его нагрузочной характеристики. Важно отметить, что для подобного теоретического анализа нет необходимости знать а priori, какие аллостерические связи существуют на самом деле. Все возможные типы аллостерических регуляторных связей могут быть предсказаны заранее на основании теоретических расчетов, в которых используются различные гипотезы относительно вида регуляторных функций, подобных функциям ψ_1 и ψ_3 , использованным нами. При анализе влияния аллостерических регуляций различного вида на нагрузочную характеристику мы ссылались на экспериментальные данные лишь для того, чтобы указать, что по крайней мере некоторые из таких регуляций уже были экспериментально обнаружены.

Можно надеяться, что в будущем развитие теории полиферментных систем позволит реконструировать третичную структуру всего клеточного метаболизма исходя из его простейшей и древнейшей по эволюционному происхождению первичной структуры. В ходе такой реконструкции, безусловно, будут вскрыты фундаментальные закономерности клеточной организации.

2 * МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ВОЗБУДИМЫХ МЕМБРАН

Глава четвертая

КАЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ МОДЕЛЕЙ МЕМБРАН

На основе записей ионных токов при фиксации потенциала Ходжкин и Хаксли построили феноменологическую модель мембраны аксона кальмара в виде системы дифференциальных уравнений четвертого порядка [1]. Эта модель до сих пор является одним из наиболее точных описаний процессов возбуждения в мембране. Впоследствии были построены аналоги уравнений Ходжкина — Хаксли и для других возбудимых мембран: волокна Пуркинье сердца [2, 3], перехвата Ранвье [4], скелетного мышечного волокна [5] и др.

Модель Ходжкина — Хаксли и ее аналоги — сложные нелинейные системы не ниже четвертого порядка. Отсутствие аналитических подходов к изучению в таких моделях вопросов, представляющих интерес для электрофизиологии, в значительной степени сводило исследование модели Ходжкина — Хаксли на уровень численного эксперимента на ЦВМ [6—13].

Важный шаг в применении качественных методов для исследования моделей возбудимых мембран сделан в работе Фитц-Хью [11]. Им показано, что основные типы поведения мембран могут быть описаны на основе уравнений Ван дер Поля. Однако эти модели слишком абстрактны — они исходят лишь из самого факта существования N -образной характеристики и не связаны с ионными токами реальных мембран. Для того чтобы получать более содержательное описание, необходимо исходить из данных экспериментального исследования мембран.

В главах 4, 5 описывается подход, сочетающий преимущества качественных методов математического анализа с детальным электрофизиологическим исследованием мембраны по записям ионных токов. В основе этого подхода лежит построение уравнений второго порядка и их анализ с помощью качественных методов, разработанных в теории колебаний. В частности, многие из интересующих экспериментатора сведений о мембране содержатся в одном простом графике — двух главных изоклинах уравнений мембраны — изоклинах $\dot{E} = 0$ и $\dot{g} = 0$ (E — мембранный потенциал, g — проводимость для медленной компоненты ионного тока). По-

сколько нуль-изоклины для релаксационной системы определяют ее фазовый портрет, то мы далее будем называть этот график фазовым портретом мембраны. Главы 4 и 5 посвящены в сущности построению фазового портрета мембраны и решению с его помощью самых различных задач. Глава 4 отражает постановку задачи в виде, обычном для теории — здесь исходными считаются заданные уравнения мембран. В главе 5 анализ проводится с точки зрения экспериментатора.

В главе 4 с помощью разделения быстрых и медленных движений уравнения мембран упрощаются до уравнений второго порядка. Анализ их фазовых портретов позволяет исследовать многие электрофизиологические характеристики моделей мембран, которые ранее изучались лишь численными методами. Этот подход демонстрируется на двух конкретных примерах — модели аксона кальмара и модели сердечного волокна, являющимися в некотором смысле «крайними»: большинство реальных возбудимых мембран обладает характеристиками, промежуточными между ними.

В главе 5 этот подход применяется уже не для анализа моделей, а для исследования реальных мембран. Здесь исходными считаются записи ионных токов, получаемые экспериментатором. В этом случае анализ оказывается особенно простым — для решения многих вопросов построения уравнений мембраны (даже уравнений второго порядка!) оказывается излишним. Основной инструмент анализа — графики нуль-изоклин строятся по записям токов.

Перейдем теперь к анализу уравнений мембран.

4.1. Построение уравнений второго порядка для моделей Ходжкина — Хаксли и Нобла

Построение систем второго порядка для возбудимых мембран основано на разделении быстрых и медленных переменных. Понижение порядка достигается за счет исключения дифференциальных уравнений для быстрых компонент. Строгое обоснование этой процедуры дано в работах [14—17]. Ее применение для сведений уравнений типа Ходжкина — Хаксли к системам второго порядка проще всего проследить на примере уравнений Нобла.

Построение системы N_2 по уравнениям Нобла

Модифицировав уравнения Ходжкина — Хаксли так, чтобы они описывали волокно Пуркинье, Нобл [2] получил систему четвертого порядка:

$$-C\dot{E} = [(g_{Na}m^3h + d)(E - E_{Na}) + (g_{K1}(E) + g_{K2}n^4)(E - E_K) + g_l(E - E_l)] - I_{ex},$$

$$\begin{aligned}\dot{m} &= [\bar{m}(E) - m]/\tau_m(E), & \dot{h} &= [\bar{h}(E) - h]/\tau_h(E), \\ \dot{n} &= [\bar{n}(E) - n]/\tau_n(E).\end{aligned}\quad (4.1)$$

Здесь E — потенциал мембраны, m и h — переменные активации и инактивации натриевой проводимости, n — переменная активация калиевой проводимости. Функции $\bar{m}(E)$, $\bar{n}(E)$, $\bar{h}(E)$ — определяемые экспериментально установившиеся значения соответствующих переменных; $\tau_m(E)$, $\tau_n(E)$, $\tau_h(E)$ — их постоянные времени, I_{ex} — внешний ток. Константы E_{Na} , E_K , E_l — равновесные потенциалы натриевого и калиевого токов и тока утечки. Константы g_{Na} , d , g_{K2} , g_l и функция $g_{K1}(E)$ имеют смысл максимальных проводимостей токов, C — удельная емкость мембраны.

Для упрощения анализа воспользуемся тем, что переменные m и h оказываются быстрыми по сравнению с переменной n ($\tau_m \sim \sim 10^{-4}$ с, $\tau_h \sim 5 \cdot 10^{-3}$ с, $\tau_n \sim 10^{-1}$ с). Сделаем замену времени $t' = t/\tau_0$, где $\tau_0 = 10^{-1}$ с. Тогда второе и третье уравнения системы (4.1) примут вид: $\epsilon_1 \dot{m} = \bar{m}(E) - m$; $\epsilon_2 \dot{h} = \bar{h}(E) - h$, где $\epsilon_1 = \tau_m(E)/\tau_0$, $\epsilon_2 = \tau_h(E)/\tau_0$. Перейдя к пределу при $\epsilon_1, \epsilon_2 \rightarrow 0$ и заменив переменные m и h их квазистационарными значениями $\bar{m}(E)$ и $\bar{h}(E)$ (правомерность такого перехода обосновывается теоремой Тихонова [14]), получим систему второго порядка:

$$\begin{aligned}-C\dot{E} &= [(g_{Na}\bar{m}^3(E)\bar{h}(E) + d)(E - E_{Na}) + (g_{K1}(E) + \\ &+ g_{K2}n^4)(E - E_K) + g_l(E - E_l) - I_{ex}], \\ \dot{n} &= [\bar{n}(E) - n]/\tau_n(E).\end{aligned}\quad (4.2)$$

Полученная система (4.2) все еще релаксационна: переменная E гораздо более быстрая, чем n ($\tau_E \sim 10^{-4}$ с $\div 10^{-2}$ с, $\tau_n \sim 10^{-1}$ с). Несмотря на это, переменную E из системы (4.2) исключить аналогично переменным m и h нельзя, так как первое уравнение не удовлетворяет условию устойчивости теоремы Тихонова. Тем не менее релаксационность полученной системы обеспечивает простоту и точность ее анализа качественными методами. Поскольку уравнения системы (4.2) получены за счет пренебрежения постоянными времени τ_m , τ_h , то они правильно описывают процессы лишь на больших временах: $t \gg \tau_m, \tau_h$. При замене $m \rightarrow \bar{m}(E)$ и $h \rightarrow \bar{h}(E)$ быстрый натриевый ток оказался уменьшенным (заменен на свое квазистационарное значение, соответствующее стационарной инактивации), и соответственно уменьшилась степень релаксационности модели. Введя в первое уравнение системы (4.2) регулирующий релаксационность множитель α перед dE/dt и положив $\alpha = 1/3$, можно улучшить и описание быстрых движений. Полученную таким образом систему далее будем называть системой N_2 .

Любопытно, что Зиман [18] доказал теорему о том, что модели второго порядка нельзя описать возбуждение сердечных клеток, а для этого требуется система минимум третьего порядка (чтобы описать нерелаксационный (гладкий) возврат к состоянию покоя). Этот вывод был получен при анализе систем с фиксированным малым параметром. Но при редуцировании уравнений Нобла возникает система другого вида — в ней оставшийся малый параметр $\epsilon = \tau_E(E, n)/\tau_n(E)$ не фиксирован, а является функцией переменных!

Построение системы $H - H_2$ по уравнениям Ходжкина — Хаксли

В уравнениях Ходжкина — Хаксли медленными переменными являются n и h ($\tau_m \sim 10^{-4}$ с, $\tau_n \sim \tau_h \sim 2 \cdot 10^{-3}$ с), и между $\bar{n}(E)$ и $\bar{h}(E)$ имеется приближенное соотношение

$$\bar{n}(E) + \bar{h}(E) \approx G = \text{const} (\approx 0,85). \quad (4.3)$$

Упрощение уравнений Ходжкина — Хаксли оказывается несколько отличным от упрощения уравнений Нобла. Формально все сводится к тому, что переменная m заменяется на $\bar{m}(E)$ (как и в уравнениях Нобла), а переменная h заменяется на $(G - n)$, и из исходных уравнений Ходжкина — Хаксли ($H - H_2$)

$$\begin{aligned} C\dot{E} &= -[g_{Na}m^3h(E - E_{Na}) + g_Kn^4(E - E_K) + \\ &\quad + g_l(E - E_l)] + I_{ex}, \\ \dot{m} &= [\bar{m}(E) - m]/\tau_m(E), \\ \dot{n} &= [\bar{n}(E) - n]/\tau_n(E), \\ \dot{h} &= [\bar{h}(E) - h]/\tau_h(E) \end{aligned} \quad (4.4)$$

получается система

$$\begin{aligned} \alpha C\dot{E} &= -[g_{Na}\bar{m}^3(E)(G - n)(E - E_{Na}) + g_Kn^4(E - E_K) + \\ &\quad + g_l(E - E_l)] + I_{ex}, \\ \dot{n} &= [\bar{n}(E) - n]/\tau_n(E). \end{aligned} \quad (4.5)$$

Здесь в отличие от уравнений Нобла фронты импульсов оказываются ускоренными, и улучшить описание быстрых процессов можно, положив $\alpha = 3$. Эту систему (при $\alpha = 3$) далее будем называть системой $H - H_2$ (обоснование этого перехода см. в разделе 4.5).

Точность аппроксимации

Близость решений исходных и редуцированных систем при $\varepsilon \rightarrow 0$ гарантирует теорема Тихонова. Теорема дает основание ожидать хорошего соответствия и для ненулевых значений малых параметров. Однако величина возникающей при этом ошибки может быть определена только численными методами.

Таблица 1

Сравнение электрофизиологических характеристик модели Ходжкина — Хаксли ($H-H_1$) и построенной по ней редуцированной модели $H-H_2$

Характеристики	$H-H_1$	$H-H_2$	Различие, %
Потенциал покоя, мВ	-60	-60,1	0,2
Реобазный ток (I_0), мкА/см ²	2,5	2,35	6,4
Длительность потенциала действия (ПД), мс	3,0	2,62	12,6
Длительность переднего фронта ПД, мс	0,71	0,73	2,8
Амплитуда ПД, мВ	107,7	111,2	3,2
Следовый потенциал, мВ	11,2	10,7	4,5
Пороговый потенциал, мВ	-53,3	-54,0	1,5
Потенциал устойчивой деполяризации *, мВ	38,5	34,5	10,4
Ток возникновения повторных ответов, мкА/см ²	6,1	5,5	9,8
Амплитуда повторных ответов **, мВ	90,5	100,5	11,5
Период повторных ответов **, мс	10,5	10,4	1

* При внешнем токе $I_{ex} = 500$ мкА/см².

** При внешнем токе $I_{ex} = 25$ мкА/см².

Таблица 2

Границы изменения параметров, при которых наблюдаются автоколебания в модели Ходжкина — Хаксли и редуцированной модели $H-H_2$

Параметр	$H-H_1$	$H-H_2$	Различие, мВ
Сдвиг графика $\bar{m}(E)$ *, мВ	2—11	3—11	1
Сдвиг графика $\bar{n}(E)$ *, мВ	3—24	4—15	9
Изменение калиевого равновесного потенциала E_K , мВ	-7—15	-2—+17	5

* Использовалось преобразование $E \rightarrow E - \Delta E$.

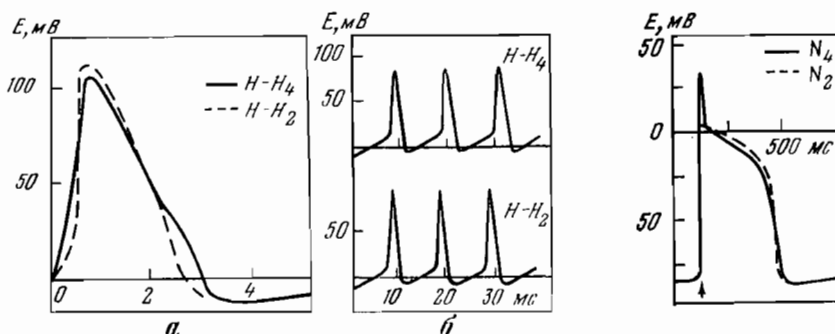


Рис. 29. Решения исходной системы Ходжкина — Хаксли ($H-H_4$) и модели второго порядка ($H-H_2$)

a — одиночные потенциалы действия; b — повторные ответы при внешнем токе $I_{ex} = 25 \text{ мкА/см}^2$

Рис. 30. Потенциалы действия в исходной модели Нобла (N_4) и системе второго порядка (N_2)

Различные электрофизиологические характеристики модели Ходжкина — Хаксли и полученной из нее системы $H-H_2$ приведены в табл. 1,2. Расчеты показали также, что стационарные вольт-амперные кривые обеих моделей различались не более чем на $0,5 \text{ мВ}$ в диапазоне токов от -10 до $+5 \text{ мкА/см}^2$; характерные

Таблица 3

Сравнение электрофизиологических характеристик модели Нобла (N_4) и построенной по ней редуцированной модели N_2

Характеристики	N_4	N_2	Различие, %
Потенциал покоя, мВ	-82,1	-82,5	1
Реобазный ток, мкА/см ²	0,96	0,97	1
Пороговый потенциал, мВ	-72,5	-73	1
Следовый потенциал, мВ	11,8	11,6	2
Ток возникновения повторных ответов, мкА/см ²	0,96	0,97	1
Ток возникновения устойчивой деполяризации, мкА/см ²	14,3	14,6	2,5
Потенциал устойчивой деполяризации*, мВ	-20,2	-20	1
Длительность потенциала действия, мс	360	375	4

* При внешнем токе $I_{ex} = 15 \text{ мкА/см}^2$.

времена заряда емкости мембраны отличались не более чем на $5 \cdot 10^{-3}$ мс во всем диапазоне потенциалов; тип аккомодационной кривой совпадал в обеих системах; ответ на выключение гиперполяризующего тока наблюдался в обеих системах.

Аналогичные оценки были получены и для модели Нобла (рис. 30, табл. 3, 4).

Таблица 4

Границы изменения параметров, при которых наблюдаются автоколебания в модели Нобла и редуцированной модели N_2

Параметры	N_1	N_2	Различие
Сдвиг графика $\bar{m}(E)^*$, мВ	1,0—2,9	1,1—3,1	0,2
Сдвиг графика $P_{Na} = g_{Na} \bar{m}^3 h^*$, мВ	1,3—7,3	1,4—7,5	0,2
Изменение калиевого равновесного потенциала E_K , мВ	от—99 до—84	от—98,5 до—85,5	1,5
$g_{K1}(E)$, % от нормы	5—44	6—46	2
Внешний ток, мкА/см ²	0,96—14,3	0,97—14,6	0,3

* Использовалось преобразование $E \rightarrow E - \Delta E$.

Эти оценки показали, что построенные системы второго порядка описывают электрофизиологические характеристики мембран с хорошей точностью (10—15% для модели Ходжкина — Хаксли и 1—3% для модели Нобла), и поэтому имеет смысл анализировать характеристики мембран с помощью этих упрощенных уравнений. Перейдем к исследованию мембран качественными методами.

4.2. Фазовые портреты систем второго порядка

Модель $N - N_2$

В системе $N - N_2$ переменная E оказывается более быстрой, чем n ($\tau_E/\tau_n \sim 10^{-1}$). Траектории решений таких систем на фазовой плоскости определяются расположением изоклин $\dot{n} = 0$ и $\dot{E} = 0$. Изоκлина $\dot{n} = 0$ находится из второго уравнения системы (4.5) и имеет вид

$$n = \bar{n}(E). \quad (4.6)$$

Изоклина $\dot{E} = 0$ находится из первого уравнения системы (4.5). Ее уравнение

$$g_K n^4 (E - E_K) + g_{Na} (G - n) \bar{m}^3 (E) (E - E_{Na}) + g_I (E - E_I) - I_{ex} = 0. \quad (4.7)$$

Рассчитанные на ЦВМ нуль-изоклины приведены на рис. 31. Они похожи на изоклины уравнения Фитц-Хью [11] — модифицированного уравнения Ван дер Поля. Изоклина $\dot{E} = 0$ имеет N -образную форму, что обеспечивает генерацию импульса. Особая точка расположена на левой ветви изоклины $\dot{E} = 0$ и устойчива. Это соответствует отсутствию спонтанной активности в исходных уравнениях Ходжкина — Хаксли четвертого порядка ($H - H_4$).

Модель N_2

Эта система также релаксационная ($\tau_E/\tau_n \sim 10^{-2}$), и ее фазовый портрет определяется нуль-изоклинами:

$$\begin{aligned} g_{K2} (E - E_K) n^4 + g_{K1} (E - E_K) + (g_{Na} \bar{m}^3 \bar{h} + \bar{d}) (E - E_{Na}) + \\ + g_I (E - E_I) - I_{ex} = 0 \quad (\text{изоклина } \dot{E} = 0), \\ n = \bar{n}(E) \quad (\text{изоклина } \dot{n} = 0). \end{aligned} \quad (4.8)$$

Нуль-изоклина $\dot{E} = 0$, как и в случае уравнений $H - H_2$, имеет вид, характерный для колебательных систем типа Ван дер Поля (рис. 32). В отличие от модели $H - H_2$ уравнение N_2 для покоящейся мембраны имеет три стационарные точки (S, S_1, S_2) (рис. 32, б).

4.3. Исследование основных режимов мембраны аксона кальмара с помощью качественных методов

Свойства полной модели Ходжкина — Хаксли, как правило, изучались с помощью расчетов на ЦВМ. Так как модели второго порядка хорошо описывают свойства моделей четвертого порядка, оценки свойств решений исходных уравнений можно легко получить по графикам нуль-изоклин уравнений второго порядка. Ниже будет продемонстрировано, как самые различные электрофизиологические явления могут быть объяснены не только качественно, но и количественно в терминах фазовых портретов редуцированных моделей.

Спонтанная активность. Известно, что в клетках, не обладающих спонтанной активностью, последняя может быть вызвана, например, увеличением натриевой или уменьшением калиевой

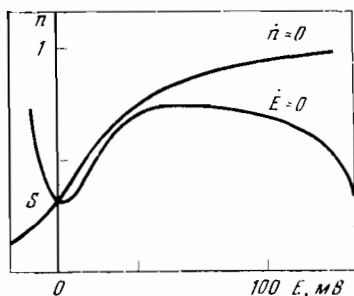


Рис. 31. Нуль-изоклины ($\dot{E} = 0$, $\dot{n} = 0$) модели Н—Н₂. Стационарная точка S лежит на левой ветви и устойчива

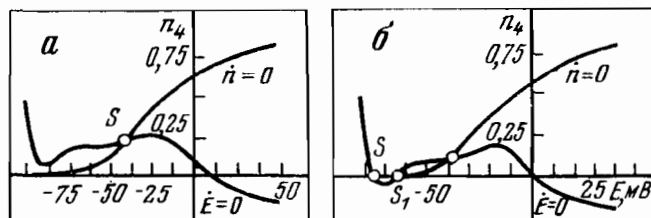


Рис. 32. Нуль-изоклины модели Н₂

a — исходная модель Нобла (N₄) спонтанно активна (в модели Н₂ особая точка S лежит на средней ветви изоклины $\dot{E} = 0$ и неустойчива); $б$ — модель Н₄ без спонтанной активности (в модели Н₂ имеется устойчивая особая точка S , она определяет потенциал покоя)

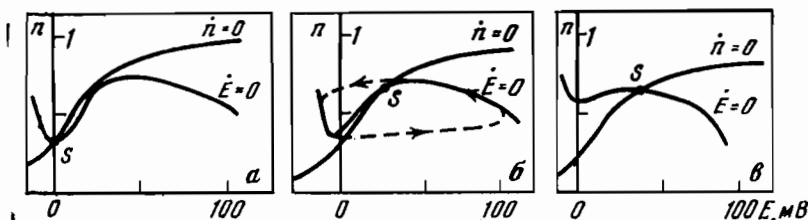


Рис. 33. Нуль-изоклины системы Н—Н₂, соответствующие трем различным состояниям мембраны, описываемой уравнениями Н—Н₄

a — покой (особая точка S устойчива, лежит на левой ветви изоклины $\dot{E} = 0$); $б$ — спонтанная активность (особая точка S неустойчива, лежит на средней ветви), пунктиром показана проекция предельного цикла системы Н—Н₄ на плоскость (n, E) ; $в$ — устойчивая деполяризация (особая точка S устойчива, расположена на правой ветви).

a : — параметры системы соответствуют нормальной мембране; $б, в$: — график функции $m(E)$ сдвинут соответственно на 5 и 20 мВ влево

проводимости [13]. Однако при этом автоколебания возникают далеко не всегда; например, значительное увеличение натриевой проводимости может и не привести к появлению спонтанной активности [19]. Система Н—Н₂ позволяет легко определить, когда какой случай реализуется.

Анализ основан на том, что спонтанная активность в модели четвертого порядка $H - H_4$ возникает тогда, когда в модели второго порядка $H - H_2$ точка покоя теряет устойчивость (при этом появляется предельный цикл, и возникают автоколебания). Для релаксационных систем с достаточной для анализа степенью точности устойчивость может быть определена по нуль-изоклинам: особые точки, расположенные на средней ветви изоклины $\dot{E} = 0$, неустойчивы; расположенные на левой или правой ветви — устойчивы.

Изоклины системы $H - H_2$ при параметрах, соответствующих модели аксона, показаны на рис. 33, а. Особая точка устойчива (расположена на левой ветви), и мембрана не обладает спонтанной активностью. При изменении параметров изоклины деформируются. Если при этом особая точка станет неустойчивой (сместится с левой ветви изоклины $\dot{E} = 0$ на среднюю и не появится новых устойчивых особых точек), то возникает спонтанная активность (рис. 33, б).

Обратим внимание, что, как следует из формулы (4.6), на форму изоклины $\dot{n} = 0$ влияет только зависимость $\bar{n}(E)$, остальные параметры влияют на форму изоклины $\dot{E} = 0$. На рис. 33, б приведен пример возникновения спонтанной активности при сдвиге графика $\bar{n}(E)$, как целого (такие сдвиги возникают, например, при уменьшении концентрации ионов Ca^{2+} в наружном растворе). Точно так же можно проследить влияние на спонтанную активность и других входящих в систему (4.4) параметров [24] (некоторые из примеров см. на рис. 34).

Устойчивая деполяризация мембраны. Увеличение натриевого тока (например, за счет сдвига $t(E)$ на 5 мВ влево) приводит к появлению спонтанной активности. Однако если натриевый ток увеличить еще значительно, то спонтанная активность исчезает, и возникает бесконечно длящийся потенциал действия с затухающими колебаниями на плато. Этот эффект называется устойчивой деполяризацией мембраны.

Исследование устойчивости деполяризации в модели Ходжкина — Хаксли, в принципе, ничем не отличается от исследования спонтанной активности. Здесь необходимо определить, при каких изменениях параметров модели мембраны $H - H_4$ в модели $H - H_2$ возникает устойчивая особая точка (фокус или узел) на правой ветви (рис. 33в, 34). При этом удастся не только качественно проследить появление устойчивой деполяризации, но и оценить значения параметров, при которых она возникает.

Повторные ответы. Известно [21, 22], что в гигантском аксоне кальмара и в других мембранах автоколебания могут возникать под действием внешнего тока; в этом случае их называют повторными ответами. А возможны ли повторные ответы в модели Ходжкина — Хаксли? В каком диапазоне токов? Каков их механизм?

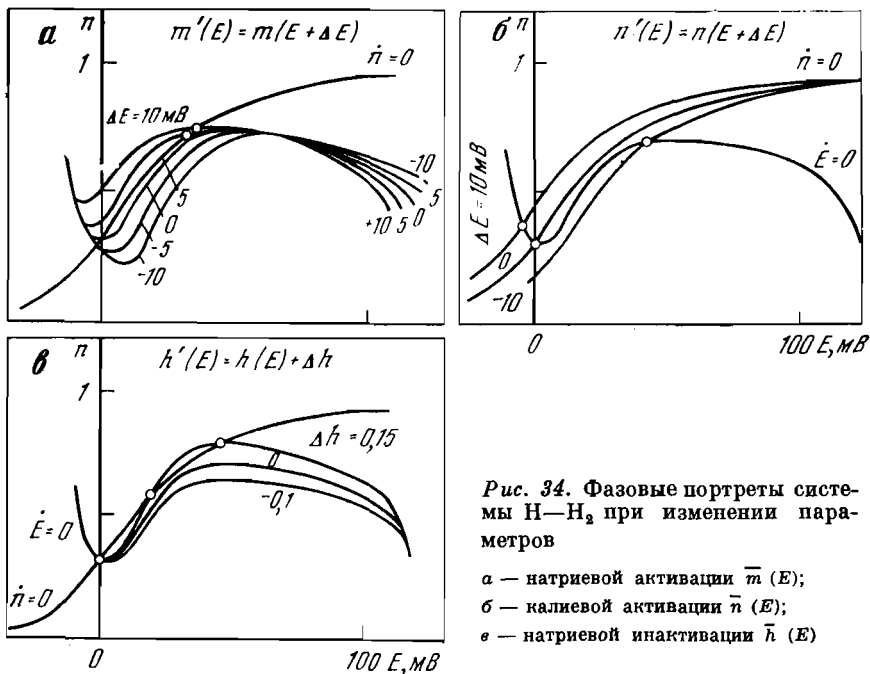


Рис. 34. Фазовые портреты системы Н—Н₂ при изменении параметров

а — натриевой активации $\bar{\pi}(E)$;
б — калиевой активации $\bar{n}(E)$;
в — натриевой инактивации $\bar{h}(E)$

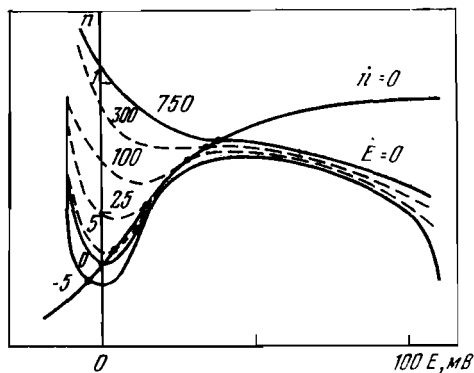


Рис. 35. Нуль-изоклины системы Н—Н₂ при изменении внешнего тока I_{ex} (в мкА/см²) (цифры на кривых)

Пунктиром показано положение нуль-изоклины $\dot{E} = 0$ при токах, вызывающих повторные ответы

Ответы на эти вопросы можно легко получить с помощью семейства нуль-изоклин модели Н—Н₂. Внешний ток I_{ex} входит только в выражение для изоклины $\dot{E} = 0$. Поэтому при увеличении внешнего тока изменяется лишь она (рис. 35). Повторные ответы возникают, когда особая точка, смещаясь с левой ветви изоклины $\dot{E} = 0$ на среднюю, становится неустойчивой. При дальнейшем увеличении тока особая точка смещается со средней ветви на

правую и вновь становится устойчивой. Повторные ответы прекращаются, возникает устойчивая деполяризация под током (рис. 35).

Интересно, что на некоторых биологических мембранах (перехват Ранвье, модифицированный аконитином [36], препараты папиллярной мышцы сердца [37] и др.) повторные ответы не удается вызвать ни при каких внешних токах. Фазовый портрет модели второго порядка показывает, что возможны две причины отсутствия повторных ответов: 1. При увеличении тока особая точка все время остается на левой ветви изоклины $\dot{E} = 0$. Однако вряд ли этот случай имеет место в мембранах: обычно можно подать столь большой внешний ток, что особая точка покидает левую ветвь (об этом можно судить по появлению скачка потенциала). 2. Хотя при увеличении тока особая точка и покидает левую ветвь, но автоколебания не возникают, так как раньше успела возникнуть еще одна особая точка на правой ветви (устойчивая). Этот случай обычно и реализуется в мембранах.

Скачкообразная деполяризация. При плавном повышении концентрации KCl во внешней среде потенциал покоя аксона кальмара и других возбудимых мембран может изменяться скачком (феномен Тасаки [30]). Пока ставились лишь численные эксперименты на ЦВМ, считалось, что классической теорией Ходжкина — Хаксли скачкообразную деполяризацию объяснить нельзя [31]. Однако фазовый портрет редуцированной системы позволяет легко подобрать параметры, при которых этот эффект воспроизводится в полных уравнениях Ходжкина — Хаксли (рис. 36, а): необходимо, чтобы при изменении калиевого равновесного потенциала (E_K) особая точка, определяющая потенциал покоя, скачком переходила с левой ветви на правую ветвь изоклины $\dot{E} = 0$, минуя неустойчивую ветвь.

Триггерные свойства мембраны. Аксон кальмара при некоторых экспериментальных условиях, например при внутриклеточной перфузии CsF [32], может вести себя как триггер с двумя устойчивыми состояниями: раздражение током, направленным попеременно наружу и внутрь, приводит к перебросу из одного устойчивого состояния в другое. Это настолько отличается от поведения нормальной мембраны, что Тасаки [31] был вынужден искать объяснение вне рамок теории Ходжкина — Хаксли. Однако и здесь с помощью нуль-изоклин модели $H-H_2$ легко найти параметры, при которых этот эффект воспроизводится в модели Ходжкина — Хаксли (рис. 37).

Аккомодация. Этим термином называют свойство мембраны увеличивать порог возбуждения при длительном действии тока. Выделяют три типа мембран [33]: абсолютно аккомодирующие (при стимуляции линейно нарастающим током $I = \alpha t$ с малым

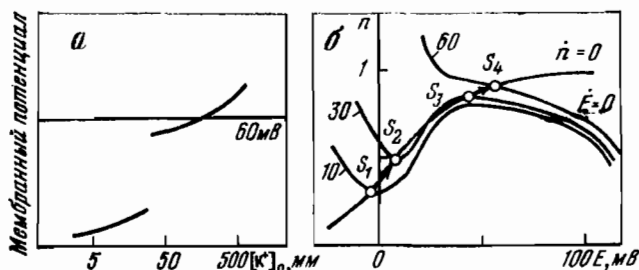


Рис. 36. Скачкообразная деполяризация в модели Н—Н₄ при увеличении внеклеточной концентрации $[K^+]_0$

α — зависимость потенциала покоя в модели Н—Н₄ от $[K^+]_0$ (в исходной модели $\bar{m}(E)$ и $\bar{h}(E)$ сдвинуты на -7 и $+35$ мВ соответственно); б — нуль-изоклины системы Н—Н₂ при тех же значениях параметров. Стрелками показана траектория особой точки при изменении $[K^+]_0$, определяющая потенциал покоя. При $[K^+]_0 < 36$ мМ мембрана находится в покое, при $[K^+]_0 \approx 36$ мМ стационарная точка на левой ветви исчезает, и мембрана скачком переходит в устойчиво деполяризованное состояние. Цифры на кривых — $[K^+]_0$ (в мМ)

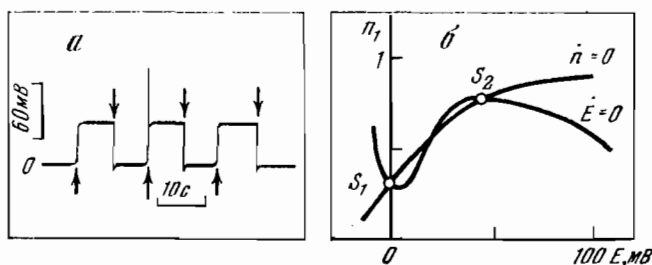


Рис. 37. Триггерные свойства в модели Н—Н₄. Потенциалы мембраны в модели Н—Н₄ ($\bar{m}(E)$, $\bar{h}(E)$, $\bar{n}(E)$ сдвинуты на $+2$, $+35$ и -2 мВ соответственно) (а); нуль-изоклины системы Н—Н₂ при тех же значениях параметров (б)

Имеются два устойчивых значения потенциала покоя мембраны: $-0,9$ мВ (особая точка S_1) и $+47,2$ мВ (особая точка S_2). Из покоего состояния в устойчиво деполяризованное и обратно мембрана переводится импульсами тока противоположной полярности (показано стрелками)

наклоном $\alpha < \alpha_0$ ответ не возникает; α_0 называют минимальным градиентом); частично аккомодирующие (порог срабатывания растет лишь в некотором диапазоне изменений α , а затем постоянен); неаккомодирующие (порог срабатывания постоянен и не зависит от α).

Тип аккомодационной кривой и зависимость аккомодации от параметров в уравнениях Н—Н₄ просто определяется по семейству нуль-изоклин уравнений Н—Н₂, построенному при различных токах I_{ex} [24]. Если особая точка системы для всех исследуе-

мых значений I_{ex} остается на левой ветви изоклины $\dot{E} = 0$, то мембрана абсолютно аккомодирующая. Если при увеличении I_{ex} особая точка покидает левую ветвь, то тип аккомодационной кривой зависит от соотношения между током реобазы (I_0) и током возникновения повторных ответов (I_{rf}). При $I_{rf} > I_0$ наблюдается частичная аккомодация, при $I_{rf} = I_0$ аккомодация отсутствует.

4.4. *Исследование основных режимов мембраны волокна Пуркинье сердца с помощью качественных методов*

Для мембраны аксона кальмара качественные методы оказались довольно эффективным инструментом исследования. В сердечной мышце потенциал действия примерно в 100 раз продолжительнее, чем в аксоне кальмара, а релаксационность значительно больше (длительность потенциала действия ~ 300 мс, а длительность переднего фронта ~ 5 мс). Это дает основание ожидать, что и здесь применение качественных методов окажется успешным, а точность анализа по нуль-изоклинам редуцированных моделей будет еще выше.

Покой, спонтанная активность, повторные ответы, устойчивая деполяризация и триггерные свойства в модели мембраны волокна Пуркинье анализируются точно так же, как и в модели аксона кальмара. Границы изменения параметров, при которых в уравнениях Нобла возникают эти режимы, определяются по графикам нуль-изоклин системы N_2 с точностью до долей мВ (см. табл. 2, рис. 38). Ввиду того, что эти эффекты качественно те же, что и для модели Ходжкина — Хаксли, далее основное внимание будет уделено специфическим явлениям, характерным именно для модели Нобла.

Два типа автоколебаний. В мембране волокна Пуркинье экспериментально обнаружены два типа автоколебаний [34]: нормальные (потенциал меняется в диапазоне от -100 до $+40$ мВ) и колебания на уровне плато потенциала действия (от -50 до $+10$ мВ).

Их появление просто объясняется с помощью системы N_2 . На фазовом портрете видно, что кроме исходного предельного цикла (рис. 39, а, в) при изменении параметров в системе N_2 может рождаться «малый» предельный цикл (рис. 39, б, г). Колебания потенциала мембраны на этих предельных циклах качественно соответствуют экспериментально наблюдаемым (рис. 40, а).

«Аконитиновые» потенциалы действия. Известно, что алкалоид аконитин вызывает потенциалы действия (рис. 40, а) с колебаниями на плато [35]. Ионный механизм этого явления до конца неясен, поскольку аконитин одновременно меняет несколько различных характеристик мембраны [36].

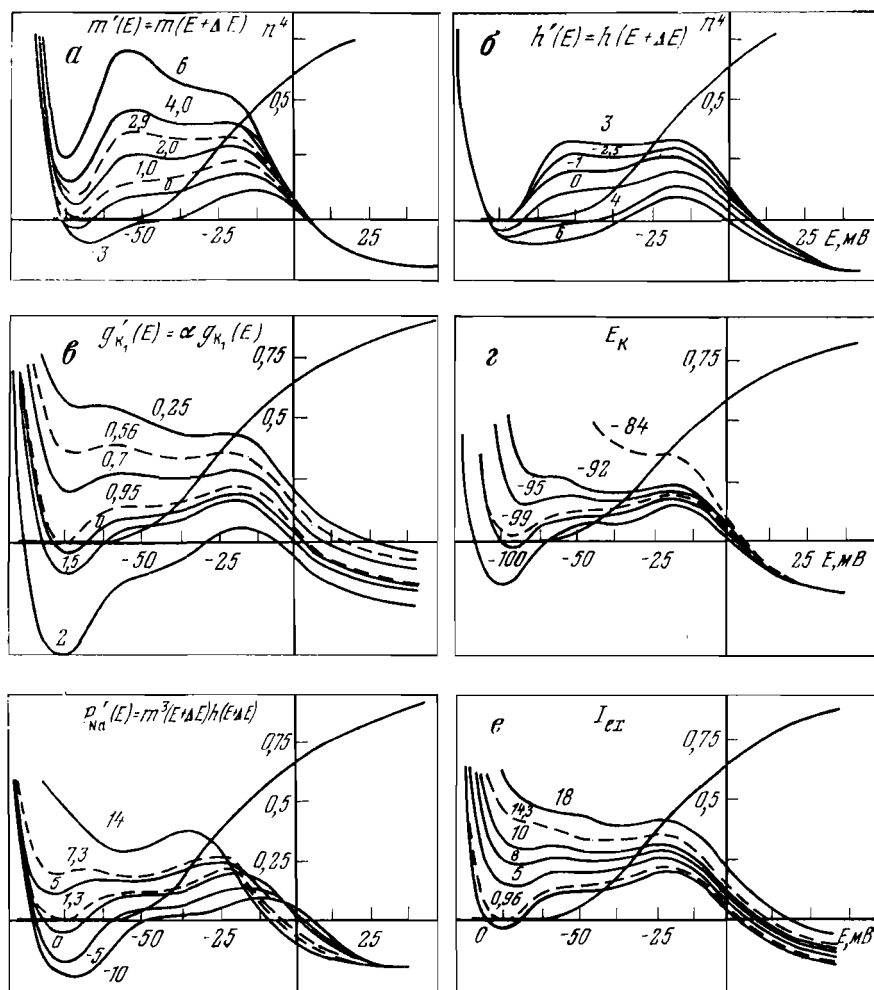


Рис. 38. Определение границ спонтанной активности в уравнениях Нобла (N_4) по семейству нуль-изоклин системы N_2

Изменяется: а — натриевая активация $\bar{m}(E)$ (цифры на кривых — величины ΔE); б — натриевая инактивация $\bar{h}(E)$ (цифры на кривых — величины ΔE); в — мгновенная калиевая проводимость $g_{K1}(E)$ (цифры на кривых — величины α); г — равновесный калиевый потенциал E_K (цифры на кривых — величины E_K); д — натриевая проводимость $P_{Na} = \bar{m}^3 h$ (цифры на кривых — величины ΔE); е — внешний ток I_{ex} (цифры на кривых); пунктирными кривыми ограничены области автоколебаний в системе N_4 .

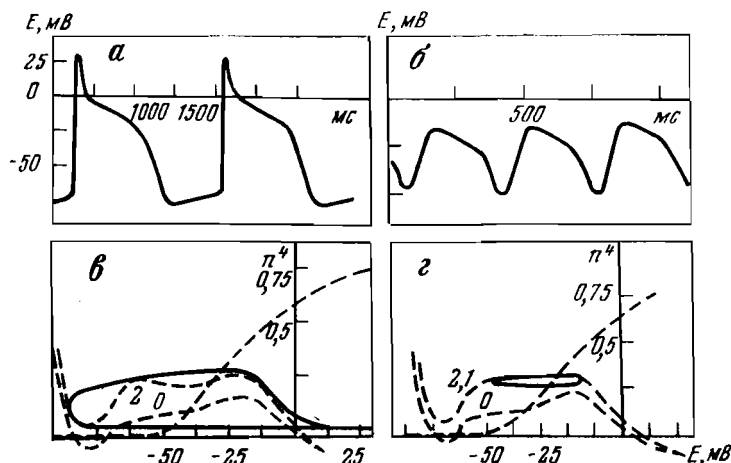


Рис. 39. Рождение нового предельного цикла в уравнениях N_3 , соответствующее скачкообразной смене типов автоколебаний в модели N_4

a, *б* — потенциалы действия в N_4 (m (E) — сдвинута на 2 и 2,1 мВ соответственно); *в*, *г* — проекции предельных циклов системы N_4 на плоскость (n^4, E) (цифры на кривых — величины ΔE в мВ); пунктирные кривые — нуль-изоклины уравнений N_3

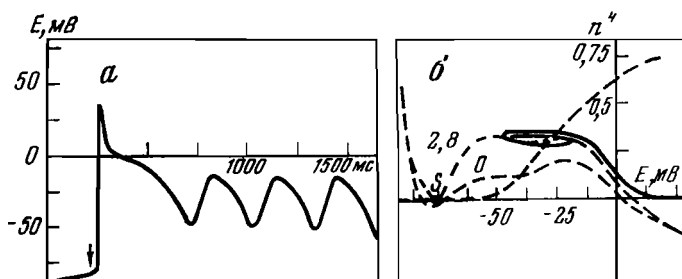


Рис. 40. «Аконитиновые» потенциалы действия, связанные с жестким режимом возбуждения в уравнениях Нобла (N_4)

a — мембранный потенциал (стрелкой указан момент стимуляции); *б* — нуль-изоклины уравнений N_3 (пунктирные кривые) в норме и при сдвиге $\bar{h}$ (E) на 2,8 мВ (цифры на кривых — величины ΔE в мВ). Сплошная кривая — проекция траектории изображающей точки в N_4 на фазовую плоскость. В системе N_2 стационарная точка S устойчива, и существует предельный цикл

Система N_2 позволяет исследовать механизмы возникновения аконитиновых потенциалов действия. Потенциалы действия такой формы появляются, если на фазовой плоскости системы есть «малый» предельный цикл и в отличие от случая, рассмотренного в предыдущем пункте, на левой ветви сохраняется стационарная точка (рис. 40, б). Поскольку такой фазовый портрет возникает

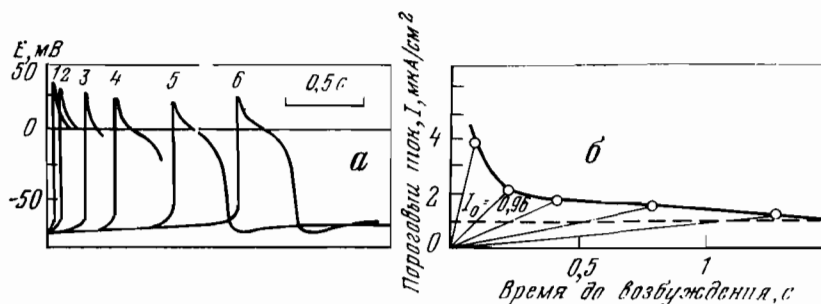


Рис. 41. Отсутствие аккомодации в модели волокна Пуркинье

a — рассчитанные на ЦВМ изменения мембранного потенциала в ответ на прямоугольный толчок (1) и на линейно нарастающие токи $I = \alpha t$ различной крутизны (2—6) (крутизна $\alpha = 5 \cdot 10^{-1}, 10^{-1}, 10^{-2}, 5 \cdot 10^{-3}, 2 \cdot 10^{-3}$ соответственно); b — аккомодационная кривая; при уменьшении крутизны линейно нарастающего тока повышения порога срабатывания не наблюдается

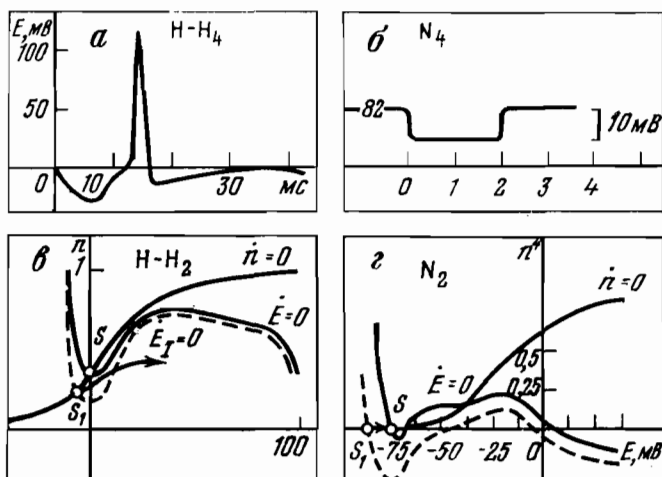


Рис. 42. Отсутствие анодно-размыкательного ответа в модели Нобля N_4 (б). Для сравнения показано возникновение ответа в модели Ходжкина — Хаксли $H-H_4$ (а)

a, c — фазовые портреты редуцированных уравнений Ходжкина—Хаксли $H-H_4$ и Нобля N_4 при действии гиперполяризующего тока (пунктирная кривая — изоклина $\dot{E} = 0$). Траектория представляющей точки после замыкания тока показана стрелкой

лишь при уменьшении $\bar{h}(E)$, можно сделать вывод, что основным механизмом, ответственным за появления «эконитиновых» ПД, является уменьшение инактивации натриевого тока.

Аккомодация. По фазовому портрету системы N_2 видно, что в модели Нобля повторные ответы возникают при токах, равных

току реобазы ($I_0 = I_{rf} = 0,96$ мкА/см²). Поэтому (см. раздел 4.3) аккомодация в этой модели должна отсутствовать.

Прямые расчеты на ЦВМ системы N_4 подтвердили этот вывод (рис. 41). Экспериментальная проверка показала [37], что в волокнах Пуркинье аккомодация выражена очень слабо либо отсутствует вовсе.

Анодное размыкательное возбуждение. В большинстве возбудимых мембран потенциал действия возникает не только в ответ на включение катодного тока, но и при размыкании анодного тока. Однако нуль-изоклины системы N_2 предсказывают, что в мембране Нобла в отличие от других мембран анодное размыкательное возбуждение должно отсутствовать. Расчеты на ЦВМ полной системы N_4 подтверждают и этот вывод (рис. 42).

Аналогично по фазовому портрету, построенному по записям ионных токов (глава 5), было предсказано отсутствие анодного размыкательного возбуждения в мембране волокна предсердия лягушки. В дальнейшем это экспериментально подтвердилось [45].

Причина различного поведения моделей Ходжкина — Хаксли и Нобла при выключении анодного тока легко устанавливается при сравнении фазовых портретов редуцированных систем. В мембране Ходжкина — Хаксли при большом гиперполяризующем токе новое состояние равновесия оказывается ниже минимума изоклины $\dot{E} = 0$, и после выключения тока изображающая точка попадает в область притяжения правой ветви нуль-изоклины $\dot{E} = 0$ (рис. 42, в), а в мембране Нобла это невозможно ни при каких токах (рис. 42, г). Ионный механизм отсутствия анодного размыкательного возбуждения в мембране Нобла заключается в том, что после выключения гиперполяризующего тока потенциал покоя достигается с таким же калиевым током, какой имеет место в покоем мембране.

Аналогично с помощью качественных методов по фазовому портрету системы N_2 анализируются зависимость формы ответов мембраны Нобла от момента раздражения, латентность θ (T) возникновения ответов, жесткие режимы автоколебаний, возникающие при взаимодействии двух мембран (эхо), и другие явления [26].

4.5. Математические детали асимптотического сведения уравнений Ходжкина — Хаксли к системе второго порядка $N - N_2$

1. В уравнениях Ходжкина — Хаксли выполнены соотношения

$$\tau_m(E) \ll \tau_n(E), \quad \tau_h(E), \quad (4.9)$$

$$\tau_n(E) \simeq \tau_h(E), \quad (4.10)$$

$$\bar{n}(E) + \bar{h}(E) \simeq G = \text{const} = 0,85. \quad (4.11)$$

Эти соотношения использовались Фитц-Хью [11] для построения так называемой (E, t) системы, в которой оставались быстрые переменные E и t , а медленные переменные h и n фиксировались. Такой подход позволяет анализировать лишь быстрые движения (передний фронт ПД), но не весь ПД.

Систему второго порядка, описывающую весь ПД, мы получили для уравнений Нобла, исключив быстрые переменные t и h (раздел 4.1). Для уравнений Ходжкина — Хаксли так удастся исключить лишь переменную t (здесь постоянные времени τ_n и τ_h одного порядка). Соотношения (4.10) — (4.11) указывают, как можно исключить еще одну переменную: объединить описание переменных n и h . Но при этом необходимо позаботиться о решении двух вопросов. Соотношение (4.11) задает связь между установившимися значениями $\bar{n}(E)$ и $\bar{h}(E)$. Что делать при произвольных начальных условиях? Соотношения (4.10), (4.11) выполняются приближенно. Можно ли быть уверенным, что при этом решения систем $N - N_2$ и $N - N_4$ разойдутся мало?

2. Введем малые параметры

$$\varepsilon_1(E) = [\bar{n}(E) + \bar{h}(E)]/G - 1, \quad (4.12)$$

$$\varepsilon_2(E) = \tau_h(E)/\tau_n(E) - 1$$

и рассмотрим сначала случай, когда

$$\varepsilon_1(E) = \varepsilon_2(E) \equiv 0. \quad (4.13)$$

Покажем, что тогда в системе $N - N_4$ при начальных условиях, лежащих в области

$$h_0 = G - n_0, \quad E_0, m_0, n_0 - \text{произвольные}, \quad (4.14)$$

имеется закон сохранения

$$n(t) + h(t) = G. \quad (4.15)$$

Используя равенство (4.15), можно построить систему третьего порядка $N - N_3$

$$\begin{aligned} CE &= -[g_{Na}m^3(G - n)(E - E_{Na}) + g_Kn^4(E - E_K) + \\ &\quad + g_l(E - E_l)] + I_{ex}, \\ \dot{m} &= [\bar{m}(E) - m]/\tau_m(E), \\ \dot{n} &= [\bar{n}(E) - n]/\tau_n(E). \end{aligned} \quad (4.16)$$

Система (4.16) эквивалентна уравнениям $N - N_4$ в области (4.14).

Для доказательства существования закона сохранения (4.15) введем в систему $N - N_4$ вместо переменной h переменную

$$\eta = G - n - h \quad (4.17)$$

и покажем, что $\eta(t) \equiv 0$ при $\eta_0 = 0$. С учетом равенства (4.12) уравнения Н — Н₄ после замены (4.17) примут вид

$$\begin{aligned} C\dot{E} &= -[g_{Na}m^3(G - n - \eta)(E - E_{Na}) + g_Kn^4(E - E_K) + \\ &\quad + g_l(E - E_l)] + I_{ex}, \\ \dot{m} &= [\bar{m}(E) - m]/\tau_m(E), \\ \dot{n} &= [\bar{n}(E) - n]/\tau_n(E), \\ \dot{\eta} &= -\eta/\tau_n(E). \end{aligned} \quad (4.18)$$

Начальные условия (4.14) в новых переменных имеют вид:

$$\eta_0 = 0, E_0, m_0, n_0 — \text{произвольные.}$$

Уравнение четвертое системы (4.18) при фиксированном $E = E_0$ и произвольных начальных условиях η_0 имеет решение

$$\eta = \eta_0 \exp(-t/\tau_n(E_0)). \quad (4.19)$$

Выбрав любое $\tau_0 \geq \max \tau_n(E)$ (достаточно $\tau_0 \approx 5 \cdot 10^{-3}$ с), получим, что решение четвертого уравнения Е системы (4.18) удовлетворяет неравенству

$$|\eta(t)| < |\eta_0| \exp[-t/\tau_0]. \quad (4.20)$$

Отсюда следует, что $\eta_0 = 0$ влечет $\eta(t) \equiv 0$, и равенство (4.15) доказано.

Отметим, что ограничения (4.14) на начальные условия не сужают область применения системы Н — Н₃ для анализа экспериментальных данных, так как при отсутствии внешних воздействий мембрана довольно быстро ($\tau_0 \sim 5 \cdot 10^{-3}$ с) переходит в состояние покоя. Поэтому любой эксперимент начинается из состояния покоя. А в силу условия $\varepsilon_1 \equiv 0$ состояние покоя лежит в области (4.14).

3. Покажем теперь, что и в случае, когда $\varepsilon_1(E) \neq 0$ и $\varepsilon_2(E) \neq 0$, решения системы второго порядка близки к решениям исходных уравнений Н — Н₄.

Для этого докажем, что если начальное значение переменной удовлетворяет условию $|\eta_0| < \varepsilon_0$, где ε_0 задается соотношением (4.24), то при всех t выполнено неравенство

$$\eta(t) < \varepsilon_0. \quad (4.21)$$

В системе (4.18) при условии $\varepsilon_1(E) \neq 0$ и $\varepsilon_2(E) \neq 0$ последнее уравнение заменяется уравнением

$$\dot{\eta} = -(\eta + G\varepsilon_1(E) + \varepsilon_2(E)(\bar{n}(E) - n))/\tau_h(E), \quad (4.22)$$

и поскольку в $H - H_4$ выполнено неравенство $|\bar{n}(E) - n| < 1$, то

$$|G\varepsilon_1(E) + \varepsilon_2(E)(\bar{n}(E) - n)| < \varepsilon_0. \quad (4.23)$$

где

$$\varepsilon_0 = \max [G\varepsilon_1(E) + \varepsilon_2(E)]. \quad (4.24)$$

Рассмотрим область $|\eta| \leq \varepsilon_0$. Как следует из уравнений (4.22) и (4.23), на границе области (т. е. при $|\eta| = \varepsilon_0$) выполнено условие $d|\eta|/dt < 0$. Но, чтобы $\eta(t)$ вышла за пределы области $|\eta| \leq \varepsilon_0$, необходимо, чтобы $d|\eta|/dt > 0$. Отсюда следует неравенство (4.21).

Теорема о непрерывной зависимости решений от параметра для первых трех уравнений системы (4.18) (параметр η) показывает, что решения систем $H - H_4$ и $H - H_3$ различаются на величину $\sim \varepsilon_0 t_{ex}$, где t_{ex} — время эксперимента.

На этом заканчивается обоснование перехода от уравнений $H - H_4$ к уравнениям $H - H_2$, поскольку переход от системы $H - H_3$ к системе $H - H_2$ обосновывается так же, как и для модели Нобла в разделе 4.1.

Таким образом, рассмотренные в этой главе примеры демонстрируют, что широкий класс электрофизиологических явлений с достаточно хорошей для эксперимента точностью может быть описан и даже предсказан на основе очень простых моделей второго порядка, полученных предельными переходами из моделей типа Ходжкина — Хаксли.

Глава пятая

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА, ИОННЫЕ ТОКИ И ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕМБРАН

Результаты, приведенные в предыдущей главе, показывают, что с помощью качественных методов удастся определить основные характеристики математических моделей мембран и проанализировать их поведение при различных изменениях параметров. Поэтому естественно попытаться перенести эти методы на исследование живых мембран. Однако для этого необходимо уметь получать нуль-изоклины непосредственно в эксперименте. Рассмотрим один из подходов к решению этой задачи.

В работах [27—29] описывается метод, позволяющий строить нуль-изоклины и фазовые портреты исследуемых мембран непосредственно по записям токов при фиксации потенциала на мембране. Этот метод отличается простотой: для построения нуль-изоклин достаточно экспериментально определить две вольт-амперные характеристики (для быстрой и медленной компонент мембранного тока) вместо большого числа кривых, которые необходимы для идентификации параметров модели Ходжкина—Хаксли.

Проиллюстрируем этот метод на примерах различных возбудимых мембран (гигантского аксона кальмара, нервного волокна омара, перехвата Ранвье нервного волокна лягушки, волокна портняжной мышцы лягушки, клеток сердца). В конце главы рассмотрим применение этого метода для поиска биологически активных веществ.

5.1. Построение фазового портрета мембраны по записям ионных токов при фиксации потенциала

Модель мембраны. Как показано в главе 4, уравнения Ходжкина—Хаксли и Нобла с хорошей точностью аппроксимируются системами уравнений второго порядка.

Для анализа реальных мембран преобразуем системы (4.2), (4.5) к виду, удобному для обработки записей ионных токов:

$$-C\dot{E} = I_f(E) + I + I_{ex}, \quad \dot{g} = \varphi(g, E). \quad (5.1)$$

Здесь E — мембранный потенциал, g — проводимость для медленного тока I , определяемая как

$$g = I/(E - E_0) \quad (5.2)$$

(E_0 — потенциал реверсии медленного тока), $I_f(E)$ — экспериментально определяемая вольт-амперная характеристика для установившегося быстрого ионного тока, I_{ex} — внешний ток, $\varphi(g, E)$ — некоторая неизвестная функция, описывающая динамику проводимости медленного тока. Для построения нуль-изоклин знание функции φ не потребуется; нужно будет лишь экспериментально определить зависимость установившегося значения $\bar{g}$ от E (при $\varphi = 0$).

Построение нуль-изоклин. Для построения фазового портрета исследуемой мембраны необходимо восстановить по экспериментальным данным только нуль-изоклины ($\dot{E} = 0$, $\dot{g} = 0$) системы (5.1). Удобно рассматривать их отображение на плоскость (I, E) с помощью уравнения (5.2), поскольку в эксперименте измеряются

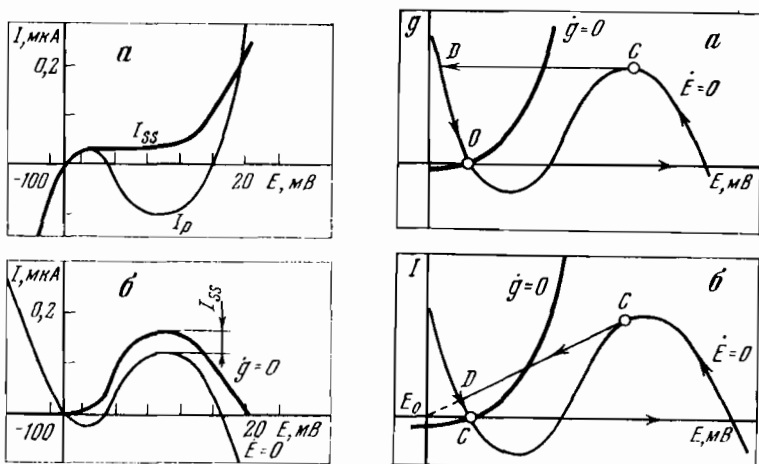


Рис. 43. Построение фазового портрета мембраны по записям токов при фиксации потенциала

а — вольт-амперные характеристики для пикового I_p и установившегося I_{ss} токов; б — построенные по ним нуль-изоклины уравнений мембраны ($I = -I_p(E)$ — изоклина $\dot{E} = 0$; $I = -I_p(E) + I_{ss}(E)$ — изоклина $\dot{g} = 0$)

Рис. 44. Траектория движения изображающей точки во время потенциала действия

а — в переменных (g, E) ; б — отображение на плоскость (I, E) . Граница устойчивой и неустойчивой областей (например, точка C) смещена по сравнению с ее положением на плоскости (g, E)

непосредственно ионные токи. В результате уравнения изоклин принимают вид:

$$I = -\bar{I}_f(E) - I_{ex} \quad (\text{изоклина } \dot{E} = 0), \quad (5.3)$$

$$I = -\bar{I}_f(E) + I_{ss}(E) \quad (\text{изоклина } \dot{g} = 0),$$

где $I_{ss}(E)$ — вольт-амперная кривая полного установившегося тока.

Уравнение первое системы (5.3) следует непосредственно из первого уравнения системы (5.1). Уравнение второе системы (5.3) получается следующим образом. Из равенств $\dot{g} = 0$ и (5.2) следует, что медленный ток I равен своему установившемуся значению I :

$$I = I, \quad (5.4)$$

а I находится из очевидного равенства

$$I_{ss} = I_f + I \quad (5.5)$$

(полный установившийся ток I_{ss} равен сумме установившихся быстрого I_f и медленного $\bar{I}$ токов). Из равенств (5.5) и (5.4) следует второе уравнение системы (5.3).

Фазовый портрет мембраны строится следующим образом. Меняя фиксируемый потенциал E , экспериментатор получает записи ионных токов $I(t)$ и по ним строит вольт-амперные характеристики для полного установившегося тока $I_{ss}(E)$ и для быстрого установившегося (пикового) тока $I_f(E)$. Построенные по ним с помощью уравнения (5.3) нуль-изоклины показаны на рис. 43.

5.2. Техника анализа мембран по записям ионных токов

Построенный по записям ионных токов фазовый портрет позволяет многое сказать о мембране. Поведение мембраны в значительной степени определяется устойчивостью особых точек соответствующего дифференциального уравнения. А устойчивость может быть приближенно оценена по виду нуль-изоклин, входящих в уравнение (даже не зная функций). Это позволяет судить о характеристиках мембран по фазовому портрету.

Быстрые движения в системе (5.1) на плоскости (g, E) имеют вид прямых $g = \text{const}$ (рис. 44, а). На плоскости (I, E) , как следует из уравнения (5.2), быстрые движения осуществляются вдоль пучка прямых $I = \text{const} \cdot (E - E_0)$, проходящих через точку E_0 (рис. 44, б). Поэтому на плоскости (I, E) границами устойчивых и неустойчивых ветвей изоклины $\dot{E} = 0$ являются не ее экстремумы, как на рис. 44, а, а точки касания с прямой, проведенной через E_0 (рис. 44, б). Эти утверждения сразу же следуют из формулы (5.2). Рассмотрим характерные типы фазовых портретов мембран, которые могут возникать в эксперименте.

Мембраны, не обладающие спонтанной активностью. На рис. 45, а, б показаны фазовые портреты мембран, отвечающих одиночным импульсом на внешний стимул. Такое поведение определяется тем, что на обоих фазовых портретах имеется устойчивая особая точка, расположенная на левой ветви. На рис. 45, б показан пример мембраны, также не обладающей спонтанной активностью. Здесь имеются три особых точки, из которых две неустойчивы (O_2 и O_3) и не влияют на потенциал покоя (E_r на рис. 45, а), который определяется устойчивой особой точкой O_1 .

Спонтанно активные мембраны характеризуются тем, что все особые точки располагаются на неустойчивом участке изоклины $\dot{E} = 0$. Пример такой мембраны приведен на рис. 45, в, где неустойчивая особая точка окружена предельным циклом и наблюдаются автоколебания.

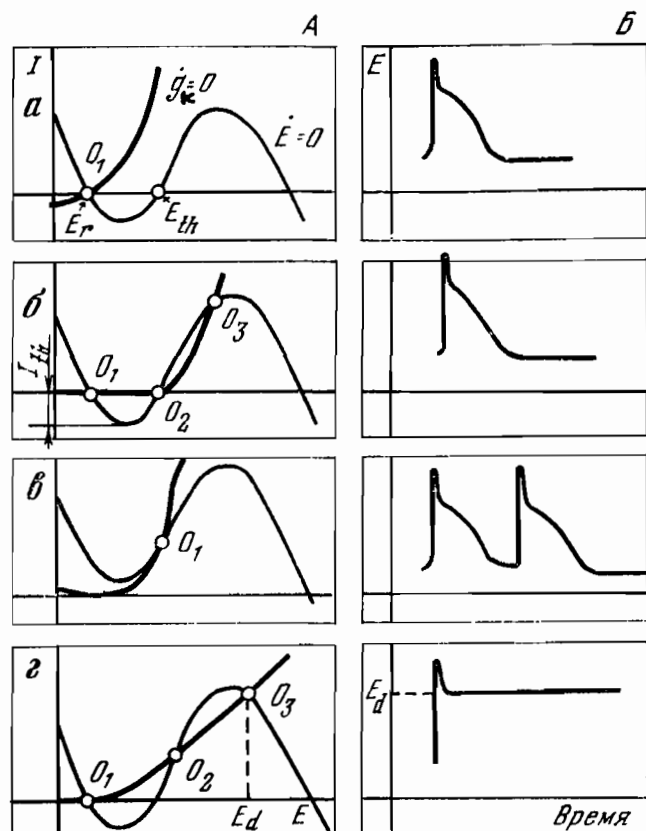


Рис. 45. Фазовые портреты мембран (А) и их электрическая активность (Б)

а, б — нормальные мембраны без спонтанной активности; в — спонтанно активная мембрана; г — мембрана с устойчивой деполяризацией. E_r — потенциал покоя, E_{th} — пороговый потенциал, E_d — потенциал устойчивой деполяризации, I_{th} — пороговый ток (ток реобазы)

Мембраны с устойчивой деполяризацией. Второе устойчивое состояние потенциала (устойчивая деполяризация) вызвано появлением устойчивой особой точки O_3 , расположенной на правой ветви (рис. 45, г). Эта точка определяет потенциал устойчивой деполяризации E_d .

Заметим, что в реальной мембране устойчивая особая точка на правой ветви может соответствовать не только устойчивой деполяризации, но и потенциалам действия с увеличенной в несколько раз длительностью. Причиной их появления могут быть так называемые сверхмедленные переменные, не учитываемые ни этой моделью, ни уравнениями Ходжкина—Хаксли.

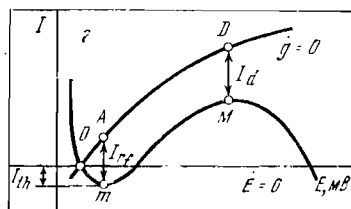
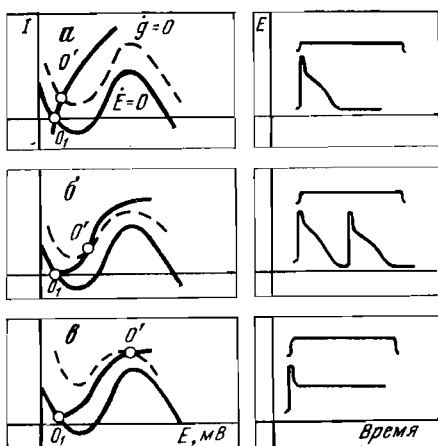
Определение электрофизиологических характеристик мембран по фазовым портретам

Как следует из уравнений системы (5.1), при пропускании внешнего тока I_{ex} изоклина $\dot{E} = 0$ смещается без деформации по оси I на величину I_{ex} , а изоклина $\dot{g} = 0$ не меняется (рис. 46). Это позволяет определить основные характеристики мембран, связанные с действием внешнего тока.

Пороговый ток. Если изоклина $\dot{E} = 0$ поднимется настолько, что ее минимум окажется выше точки O_I , мембрана возбудится. Необходимая для этого величина порогового тока I_{th} отмечена на рис. 45, б, она равна разности ординат особой точки O_I и минимума кривой $\dot{E} = 0$.

Пороговый потенциал. Пороговый потенциал E_{th} для случая, когда внешний ток имеет вид короткого прямоугольного импульса, отмечен на рис. 45, а. Если к моменту выключения внешнего тока потенциал мембраны окажется выше E_{th} , возникает импульс, а если меньше E_{th} , то возникает только abortивный ответ.

Повторные ответы (автоколебания, вызванные током). При пропускании постоянного тока I_{ex} вместо особой точки O появляется новая особая точка O' . Она может оказаться устойчивой (рис. 46, а)



а — одиночный импульс; б — повторные ответы; в — устойчивая деполяризация; g — фазовый портрет, отмечены токи: I_{th} — ток реобазы (разность ординат точек O и m); I_{rf} — ток повторных ответов (разность ординат точек A и m); I_d — ток устойчивой деполяризации (разность ординат точек D и M). m и M — границы неустойчивой ветви изоклины $\dot{E} = 0$

Рис. 46. Анализ по фазовому портрету реакции мембраны на внешний ток (ток показан над потенциалом действия)

или неустойчивой, несмотря на то, что исходная точка была устойчивой (рис. 46, б). В первом случае автоколебания не возникают, и мембрана выдает один импульс только при включении тока. Во втором случае возникают автоколебания под током.

Устойчивая деполяризация под током. Если внешний ток достигнет такой величины, что особая точка O' окажется на правой ветви и станет устойчивой (рис. 46, в), то повторные ответы прекратятся. Определение по фазовому портрету тока устойчивой деполяризации I_d и тока повторных ответов показано на рис. 46, г.

Аккомодация также может оцениваться по фазовому портрету [24]. Фазовый портрет мембраны с сильной аккомодацией показан на рис. 46, а (особая точка O_1 остается устойчивой при достаточно больших внешних токах, и медленно нарастающий ток не может возбудить мембрану).

Фазовый портрет мембраны, не обладающий аккомодацией, показан на рис. 46, б (медленно нарастающий ток может возбудить мембрану).

Анализ нуль-изоклин и ионные токи. Результаты анализа нуль-изоклин легко перевести на язык вольт-амперных характеристик ионных токов, более удобный для физиологов.

Покажем, например, как сформулировать в терминах ионных токов условие возникновения повторных ответов (автоматия под током). Это условие формулируется следующим образом. Если установившийся ток $I_{ss}(E)$ на интервале mM (рис. 47) возрастает (кривая 1), то могут наблюдаться повторные ответы. Если $I_{ss}(E)$ в интервале mM убывает или остается постоянным (кривая 2), то повторные ответы не возникнут ни при каких значениях внешнего тока.

Объясняется это следующим. Повторные ответы не возникнут ни при каких токах, если новая устойчивая особая точка (вне интервала mM , рис. 47) возникнет раньше, чем исчезнет устойчивая особая точка на левой ветви. В этом случае при увеличении внешнего тока вместо повторных ответов будет наблюдаться скачкообразная деполяризация. Этот случай реализуется, если $I_{ss}(E)$ не возрастает на интервале mM , так как $I_{ss}(E)$ есть разность между быстрой и медленной нуль-изоклинами [см. формулу (5.3)].

Стоит отметить, что особым точкам на фазовом портрете соответствует обращение $I_{ss}(E)$ в нуль. Неустойчивым особым точкам соответствуют нули $I_{ss}(E)$, расположенные на падающем участке пикового тока $I_p(E)$ (интервал mM , рис. 47). Устойчивые особые точки расположены вне этого участка. При ненулевом внешнем токе I_{ex} особые точки определяются равенством $I_{ss}(E) = -I_{ex}$. Эти утверждения следуют из уравнений системы (5.3), так как

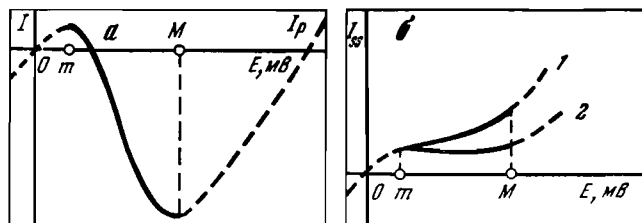


Рис. 47. Анализ повторных ответов

a — пиковый ток, *mM* — интервал неустойчивых особых точек; *б* — установившийся ток; *1* — повторные ответы возможны, *2* — повторные ответы невозможны ни при каких значениях внешнего тока

особая точка есть точка пересечения нуль-изоклин, а нуль-изоклины пересекаются при $I_{ss}(E) = -I_{ex}$.

Если $I_{ss}(E)$ возрастает в интервале *mM*, то при увеличении внешнего тока точка пересечения нуль-изоклин (особая точка) плавно смещается. При ее попадании в область *mM* возникают повторные ответы. Аналогичным образом можно переформулировать в терминах ионных токов условия, определяющие аккомодацию, наличие или отсутствие анодноразмыкательного возбуждения, существование второго предельного цикла на фазовом портрете, «аконитиновые» спайки и другие эффекты.

5.3. Фазовые портреты мембран сердечной, нервной и мышечной клеток

Описываемый метод настолько прост, что позволяет извлечь много дополнительной информации из уже опубликованных экспериментальных данных. В качестве примера на рис. 49—52 приведены фазовые портреты мембран волокна предсердия лягушки, волокна Пуркинье миокарда овцы, папиллярной мышцы морской свинки, портяжной мышцы и миелинизированного волокна лягушки, нервного волокна омара, построенные по приведенным в литературе [40—44] записям ионных токов, на рис. 48 — фазовый портрет модели аксона кальмара, построенный по тем записям ионных токов, которые легли в основу модели Ходжкина—Хаксли.

На рис. 49 представлены фазовые портреты мембран, не обладающих спонтанной активностью; на рис. 50, *в* — мембрана с продленным потенциалом действия; на рис. 52, *а* — спонтанно активная мембрана. Нуль-изоклина быстрой переменной $\dot{E} = 0$ имеет типичную для большинства возбудимых мембран *N*-образную форму.

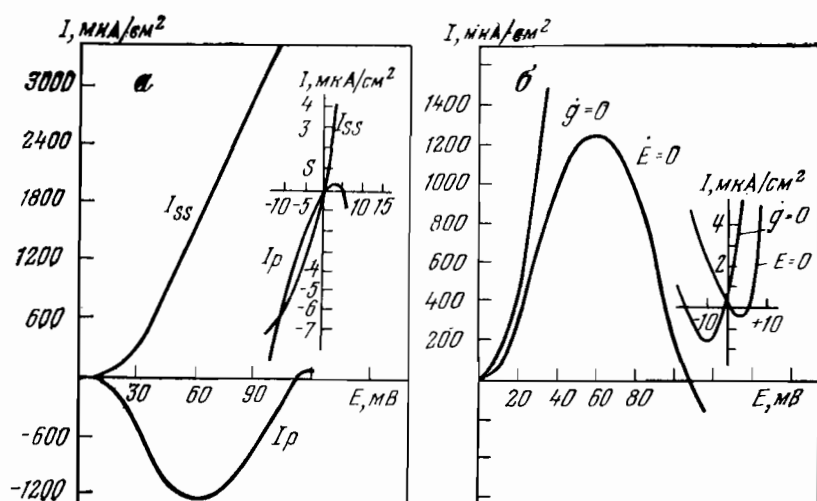


Рис. 48. Фазовый портрет модели аксона кальмара, построенный по записям токов при фиксации потенциала

а — вольт-амперные кривые для пикового [$I_p(E)$] и установившегося [$I_{ss}(E)$] токов; б — фазовый портрет, на вставках показан участок вблизи нуля в увеличенном масштабе

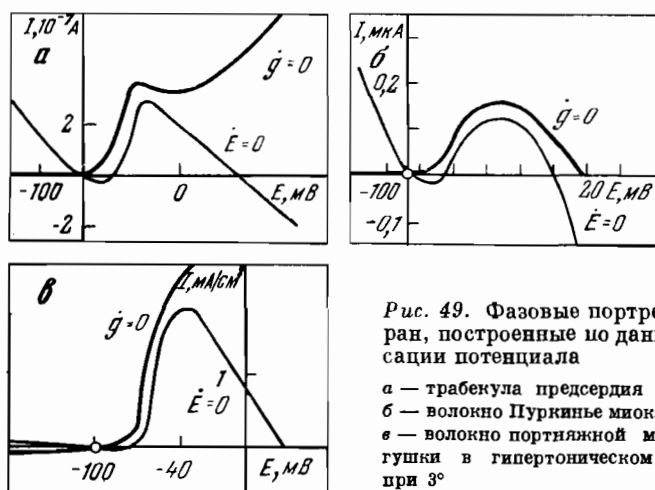


Рис. 49. Фазовые портреты мембран, построенные по данным фиксации потенциала

а — трабекула предсердия лягушки; б — волокно Пуркинье миокарда овцы; в — волокно портняжной мышцы лягушки в гипертоническом растворе при 3°

Падающий участок лежит в диапазоне деполяризаций 10—20 мВ. Нуль-изоклина медленной переменной $g = 0$ имеет S-образную форму.

Фазовый портрет мембраны волокна (трабекулы) предсердия лягушки, показанный на рис. 49, а, позволяет сделать следующие качественные оценки: мембрана не является спонтанно активной (особая точка устойчива), при возбуждении мембрана отвечает спайком без устойчивой деполяризации (нет особой точки на правой ветви).

Фазовый портрет позволяет также сделать некоторые количественные оценки: потенциал покоя $E_r = -70$ мВ, величина порогового тока приблизительно равна $2 \cdot 10^{-8}$ А, пороговый потенциал около -50 мВ. Оценки, полученные по нуль-изоклинам, хорошо согласуются с прямыми экспериментальными измерениями.

Фазовые портреты волокна Пуркинье миокарда овцы и портняжной мышцы лягушки показаны на рис. 49, б, в. Оценки, полученные по ним, также хорошо согласуются с данными, полученными в эксперименте.

5.4. Анализ действия веществ на мембраны

Рассмотрим другое применение описанного метода. Ниже будет показано, что построение нуль-изоклин и фазовых портретов по записям ионных токов открывает новые возможности для исследования действия биологически активных веществ на мембраны.

Метод нуль-изоклин значительно облегчает расшифровку ионных механизмов действия веществ, что в последнее время становится все более актуальным. Обычно лекарственное или биологически активное вещество (не являющееся специфическим блокатором или ингибитором) влияет одновременно на несколько характеристик ионных токов, и тогда интерпретация экспериментальных данных оказывается неоднозначной.

Метод фазового портрета позволяет достаточно просто устанавливать, какие из регистрируемых в эксперименте изменений ионных токов ответственны за изменения феноменологических характеристик мембраны.

Этот метод может быть использован и для целенаправленного поиска биологически активных веществ. С его помощью просто и быстро строится математическая модель мембраны, модифицированной исследуемым веществом. При этом появляется возможность на возникающие вопросы отвечать с помощью уже построенной математической модели без новых трудоемких экспериментов. Хотя, в принципе, возможность построения моделей дали уже

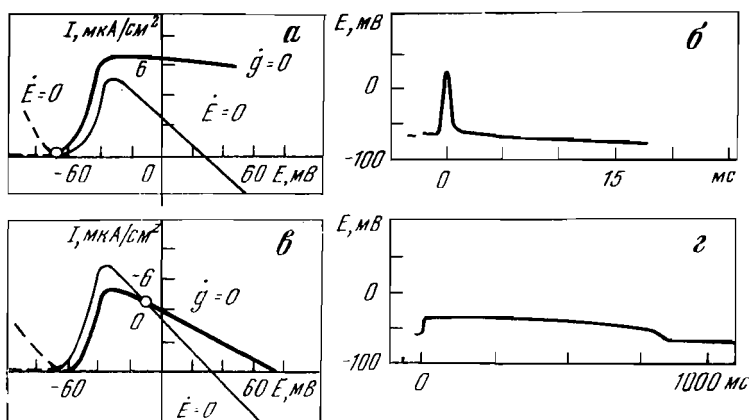


Рис. 50. Фазовые портреты и потенциалы действия нервного волокна омара а, б — норма; в, г — $5 \cdot 10^{-4}$ М ДДТ; видно появление под действием ДДТ устойчивой особой точки O , приводящее к удлинению потенциала действия в несколько сотен раз (построено по записям ионных токов и потенциалов действия из [43])

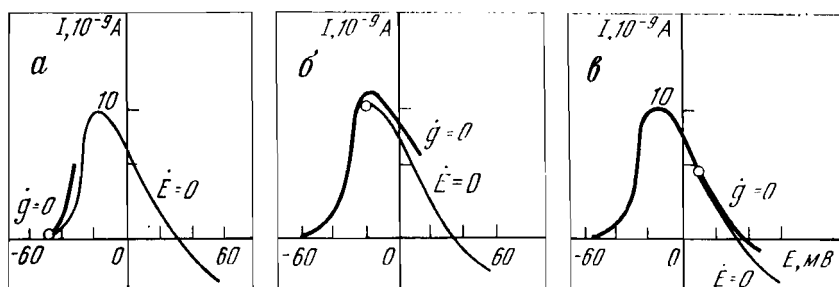


Рис. 51. Фазовые портреты мембраны миелинизированного волокна лягушки а — норма; б — 0,5 мМ ТЕА; в — 6 мМ ТЕА

уравнения Ходжкина-Хаксли, но строить подобную модель для каждого исследуемого вещества весьма трудоемко, и поэтому для исследования действия веществ такой подход, естественно, не применяется. Напротив, качественные методы (метод нуль-изоклин) делают эту возможность легко осуществимой.

Здесь будет приведено несколько примеров изменения фазовых портретов под действием веществ.

Действие ДДТ на нервное волокно омара. Фазовый портрет волокна в норме и под действием ДДТ показан на рис. 50, а, в.

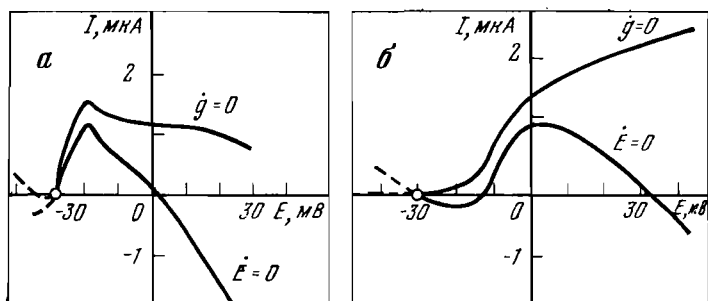


Рис. 52. Фазовые портреты мембраны папиллярной мышцы морской свинки *а* — спонтанная активность в бескальциевом растворе; *б* — исчезновение спонтанной активности при добавлении 5 мМ Mn^{2+}

Под действием ДДТ на фазовом портрете появляется дополнительная устойчивая особая точка O , расположенная на правой ветви изоклины $\dot{E} = 0$ (рис. 50, *е*). Эта точка предсказывает устойчивую деполяризацию мембраны (второе устойчивое состояние мембранного потенциала и появление очень длинных спайков), что и наблюдается в эксперименте (рис. 50, *з*).

Действие тетраэтиламония (ТЕА). Фазовый портрет мембраны перехвата Ранвье миелинизированного волокна лягушки в норме и под действием ТЕА в разной концентрации показан на рис. 51. Видно, что при большой концентрации ТЕА (6 мМ) появляется устойчивая особая точка на правой ветви, что соответствует устойчивой деполяризации и продленным потенциалам действия. При меньшей концентрации ТЕА особая точка располагается вблизи границы устойчивой и неустойчивой областей, при этом возможны колебания на вершине плато потенциала действия. Эти феномены под действием ТЕА действительно имеют место [40].

Действие Mn^{2+} . Фазовый портрет мембраны папиллярной мышцы морской свинки (рис. 52, *а*) в бескальциевом растворе предсказывает спонтанную активность (особая точка расположена на средней ветви и неустойчива). После добавления 5 мМ Mn^{2+} (блокатор медленного $Na-Ca$ входящего тока) особая точка становится устойчивой (рис. 52, *б*), что соответствует исчезновению автоматии. Действительно, в этом препарате автоматия возникает в бескальциевых растворах и устраняется использованной концентрацией Mn^{2+} .

5.5. Предсказание электрофизиологических эффектов с помощью качественных методов

Построение фазового портрета по ионным токам может быть использовано для предсказания новых электрофизиологических эффектов.

Ниже это иллюстрируется на примере мембраны трабекулы предсердия лягушки.

Фазовый портрет мембраны (рис. 53) построен по записям токов в режиме фиксации потенциала [45]. В качестве установившегося быстрого тока выбран пиковый ток I_p ; значения установившегося тока I_{ss} отсчитывались через 400 мс после начала скачка потенциала. На основе этого фазового портрета можно сделать следующие предсказания: 1. Отсутствие аккомодации (независимость порога возбуждения от крутизны возбуждающего тока). 2. Отсутствие анодного размыкательного возбуждения — ответа на гиперполяризующий импульс. 3. Совпадение тока возникновения повторных ответов с током реобазы.

Экспериментальная проверка [46] показала, что эти эффекты действительно наблюдаются на мембране трабекулы предсердия лягушки (рис. 54, 55).

Приведем еще один пример подобного предсказания. Под действием деполяризующего внешнего тока на падающей ветви нуль-изоклины $\dot{E} = 0$ появляется неустойчивая особая точка. Это приводит к возникновению автоколебаний — хорошо известному феномену повторных ответов (рис. 56). Однако у целого ряда мембран при внешнем токе, незначительно превышающем пороговый ток I_0 , возникает устойчивая особая точка O_I на правой ветви изоклины $\dot{E} = 0$ (рис. 57, а).

Это означает, что если на такую мембрану подать скачок тока, превышающий I_0 , то потенциал не вернется к потенциалу покоя и установится на новом уровне. Такой эффект, аналогичный феномену Тасаки, на нормальной мембране не наблюдался. Эксперименты показали [46], что он действительно имеет место, но в чистом виде наблюдается сравнительно редко. Чаще вместо ожидаемого ступенчатого изменения потенциала возникают продленные потенциалы действия (рис. 57, б). Появление продленных потенциалов уже обсуждалось в разделе 5.4. «Сверхмедленные» процессы, такие, например, как возрастание калиевого тока с постоянной времени около 5 с [46], приводят к постепенному увеличению крутизны нуль-изоклины $\dot{g} = 0$ во времени и к медленному смещению особой точки O_I , которая в конце концов теряет устойчивость.

Этим и объясняются появление продленных потенциалов действия вместо устойчивой деполяризации и постепенное изменение частоты автоколебаний (рис. 56, б).

Рис. 53. Вольт-амперные характеристики (а) и фазовый портрет (б) мембраны трабекул предсердия лягушки [45]

Стрелками показана траектория представляющей точки (за нуль принят потенциал покоя)

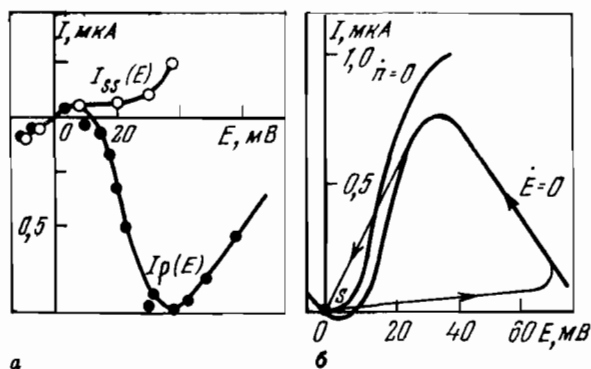


Рис. 54. Отсутствие аккомодации в мембране трабекулы предсердия лягушки

а — изменение мембранного потенциала при пропускании линейно нарастающего тока различной крутизны; б — зависимость порога от времени возникновения возбуждения

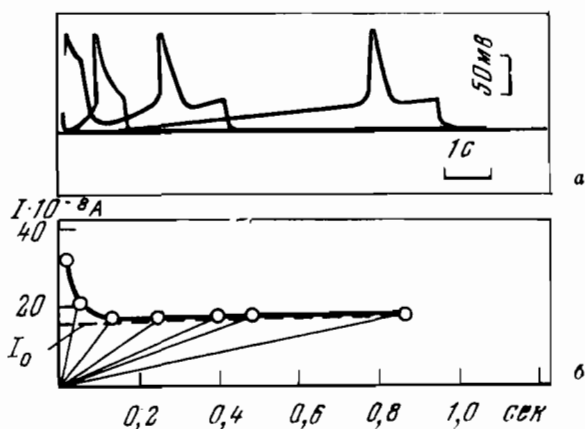
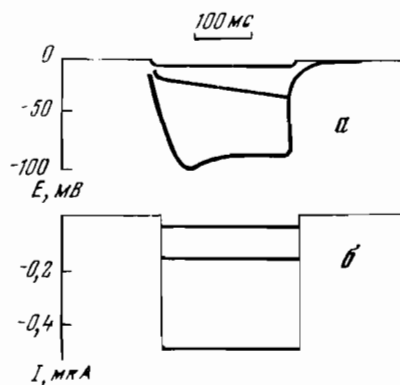


Рис. 55. Отсутствие анодно-размыкательного возбуждения в мембране трабекулы предсердия лягушки

а — ответ мембраны; б — гиперполяризующий ток



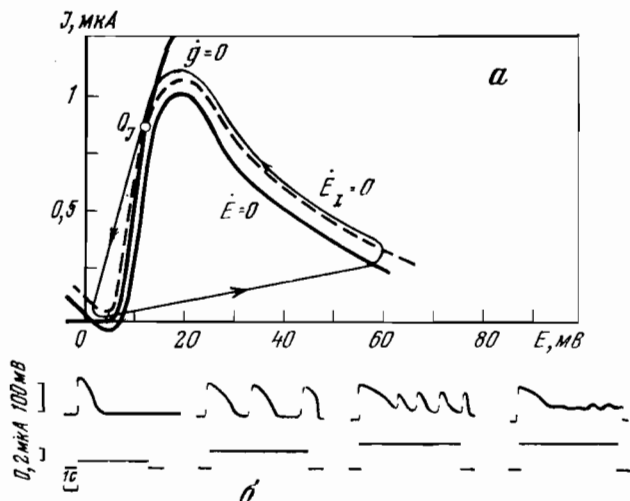


Рис. 56. Повторные ответы в мембране трабекулы предсердия лягушки
 а — фазовый портрет; особая точка O_I неустойчива. ФП предсказывает возникновение автоколебаний под током (предельный цикл показан стрелкой); б — ответы мембраны на внешний ток различной амплитуды

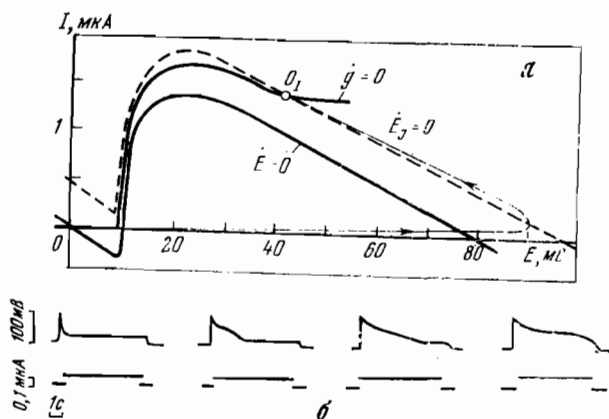


Рис. 57. Продленные потенциалы действия в мембране предсердия лягушки
 а — фазовый портрет, особая точка O_I устойчива. ФП предсказывает возникновение второго устойчивого значения потенциала (~ 40 мВ); б — ответы мембраны на внешний ток. При увеличении тока от 0,09 мкА (крайняя левая запись) до 0,12 мкА (крайняя правая запись) длительность ответа возрастает примерно в 7 раз

5.6. Границы применимости анализа мембран по фазовому портрету

При работе с реальными мембранами можно считать, что метод фазового портрета не приведет к значительным ошибкам, если суммарный ионный ток четко разделяется на быстрые и медленные компоненты. Это утверждение основано на хорошо известных свойствах систем с малыми параметрами. Так, например, если суммарный ток имеет несколько компонент с характерными временами $\tau_1, \dots, \tau_n$, то описание (5.1) применимо на временах порядка τ_j , если характерные времена быстрых токов много меньше, чем τ_j . Описание (5.1) удастся использовать и в том случае, когда медленный ток имеет несколько компонент. В этом случае их постоянные времени должны быть либо близки к τ_j , либо много больше, чем τ_j («сверхмедленные компоненты»).

Вообще построение системы (5.1) можно рассматривать как сведение методом малого параметра полной (неизвестной нам) системы уравнений мембраны к системе второго порядка. При этом уравнения для быстрых токов исключаются. Ошибка такого асимптотического перехода определяется малыми параметрами: $\epsilon_k = \tau_k/\tau_j$ ($k = 1, \dots, j-1$).

Таблица 5

Точность построения фазового портрета по записям ионных токов Трабекулы предсердия лягушки

Характеристики	Диапазон изменения характеристик	Отличие от прямых измерений, %
Пороговый ток, мкА	0,1—0,4	15
Пороговый потенциал, мВ	10—20	3
Амплитуда ПД, мВ	80—100	6

Модель Ходжкина — Хаксли для гигантского аксона кальмара

Электрофизиологические характеристики	Оценка по ФП	Прямые измерения
Амплитуда ПД, мВ	111	113
Следовой потенциал, мВ	—11,5	—11,3
Ток повторных ответов, мкА/см ²	5,3	6,1
Аккомодация	Есть (2 тип)	Есть (2 тип)
Границы автоматии		
ΔE_m (сдвиг $\bar{m}(E)$), мВ	—2 + —9	—2 + —11
ΔE_n (сдвиг $\bar{n}(E)$), мВ	3 + 19	3 + 24

Таблица 5 (окончание)

Модель Франкенхойзера для перехвата Ранвье

Электрофизиологические характеристики	Оценка по ФП	Прямые измерения	Расхождение
Пороговый потенциал, мВ	17,5	18	0,5 мВ
Амплитуда ПД, мВ	115,8	115	0,8 мВ
Ток реобазы, мА/см ²	0,33	0,33	6%
Пороговый ток повторных ответов, мА/см ²	0,41	0,58	29%
Пороговый потенциал повторных ответов, мВ	13	18	5 мВ
Пороговый ток устойчивой деполяризации, мА/см ²	5,36	0,87	515%
Пороговый потенциал устойчивой деполяризации, мВ	40,8	22,8	18 мВ
Аккомодация	Есть	Есть	—

Точность метода для мембраны трабекулы предсердия лягушки оценивалась в работе [39]. Ионные токи и потенциалы действия регистрировали двойным сахарозным мостиком. В табл. 5 суммируются результаты сравнения непосредственного измерения характеристики с их оценками по фазовым портретам для 10 трабекул. Видно, что, хотя из-за различия трабекул пороги по току и напряжению различаются от препарата к препарату в несколько раз, среднее отклонение оценок по фазовому портрету от их истинных значений не превосходит 10—15%.

Детальное исследование точности метода на живых мембранах (большое число характеристик на одной мембране) не дает надежных результатов из-за того, что характеристики живых мембран, находящихся в установке по фиксации потенциала, меняются с течением времени (медленное повреждение). Более детально точность метода удастся исследовать, используя вместо живых мембран математические модели (их свойства не меняются со временем).

5.7. Оценка на математических моделях мембран точности построения фазового портрета по записям ионных токов

Модель Ходжкина—Хаксли. Для оценки точности с помощью модели Ходжкина—Хаксли получали [39] записи ионных токов (моделируя на ЦВМ фиксацию потенциала) и записи потенциалов действия (моделируя микроэлектродную регистрацию). Те же

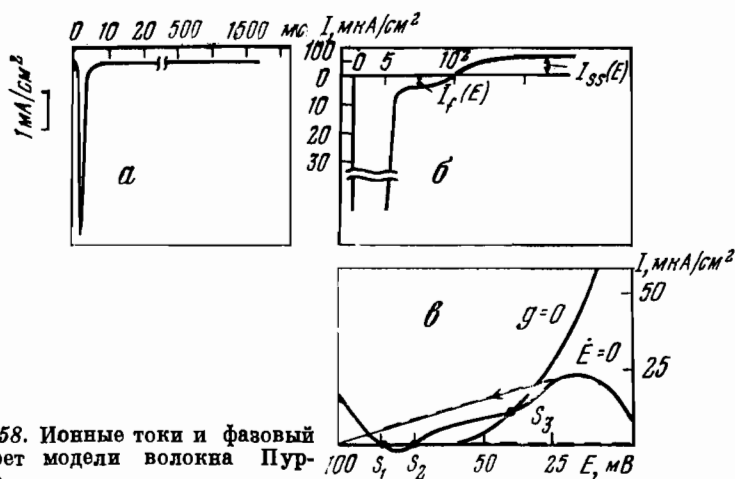


Рис. 58. Ионные токи и фазовый портрет модели волокна Пуркинье

a — запись суммарного ионного тока в модели N_4 при фиксации потенциала; *б* — участок той же кривой в увеличенном масштабе (шкала времени — логарифмическая); *в* — фазовый портрет, построенный по вольт-амперным кривым токов

записи повторяли при измененных параметрах мембраны (что моделировало действие веществ на мембрану).

По записям суммарного ионного тока строили фазовый портрет мембраны (см. рис. 48). Характеристики определяли непосредственно (по записям потенциалов действия) и оценивали по фазовым портретам. Результаты приведены в табл. 5. Видно, что точность оценок достаточна для большинства электрофизиологических задач.

Модель Франкенхойзера для перехвата Ранье. Результаты, полученные качественными методами для этой модели, приведены [47] в табл. 5. Видно, что оценки всех характеристик, кроме относящихся к устойчивой деполяризации под током, вполне приемлемы.

Модель Нобла. Записи суммарного тока при фиксации потенциала на модели Нобла приведены на рис. 58, *a, б*. Видно, что здесь быстрые процессы заканчиваются к моменту, отмеченному на записи стрелкой. Этот ток (на плато записи) и брали в качестве быстрого установившегося тока (в отличие от всех других исследованных случаев, где в качестве быстрого установившегося тока использовался пиковый ток I_p).

Нуль-изоклины модели Нобла, построенные по записям ее ионных токов, приведены на рис. 58, *в*. После того как эти нуль-изоклины были перестроены в координатах (n^4, E) , оказалось,

что они совпадают (в пределах долей мВ) с нуль-изоклинами системы N_1 . Это значительно сократило дальнейший анализ. Полученное совпадение нуль-изоклин означает, что о точности метода фазового портрета для модели Нобла можно судить (с точностью до долей мВ) по той же табл. 3, которая была получена при исследовании модели N_2 , иными словами, здесь все характеристики определяются с точностью не ниже 1—3% или единиц мВ.

Таким образом, приведенные примеры показывают, что качественные методы анализа, разработанные в теории колебаний, оказываются довольно эффективным инструментом исследований ионных токов мембран.

При этом они почти не увеличивают трудоемкость исследований и обеспечивают точность, достаточную для решения многих прикладных задач.

3 * ВОЗБУДИМЫЕ СРЕДЫ. ВОЛНЫ И АВТОВОЛНОВЫЕ ПРОЦЕССЫ

Глава шестая

РЕВЕРБЕРАТОР — ИСТОЧНИК СПИРАЛЬНЫХ ВОЛН В ВОЗБУДИМЫХ СРЕДАХ

6.1. Автоволновые процессы в возбудимых средах

Одним из основных механизмов, с помощью которого осуществляется передача сигналов в живом организме, является распространение волн возбуждения. Волны возбуждения могут распространяться не только по нервным клеткам, но и по клеткам скелетной мускулатуры, кишечника, мочевого пузыря, кровеносных сосудов, сердца. Распространяющаяся по мышечным клеткам волна возбуждения запускает биохимический сократительный аппарат. В мышце сердца и в гладкой мускулатуре кишечника волна возбуждения помимо электромеханического сопряжения обеспечивает и синхронизацию сокращений отдельных мышечных волокон. Нарушение распространения волн возбуждения может приводить к различным серьезным заболеваниям: параличам, паркинсонизму, эпилепсии, сердечным аритмиям.

Распространение волн в возбудимых тканях существенно отличается от распространения обычных электромагнитных и механических волн. Так, волны возбуждения могут распространяться без затухания за счет запасенной клеткой энергии. Основное свойство возбудимой ткани — рефрактерность делает невозможным интерференцию и отражение волн. В этом смысле распространение волны возбуждения напоминает распространение пламени по бикфордову шнуру или по сухой степи. За фронтом пламени остаются выжженные участки, так что ни отражение волны, ни прохождение одной волны сквозь другую, как при распространении обычных волн, не наблюдается. Аналогия волн возбуждения с распространением пламени только частичная — в биологических возбудимых тканях через некоторое время после прохождения волны (это время получило название периода рефрактерности) свойства клеток полностью восстанавливаются, и по ткани опять может распространяться волна возбуждения.

Эта способность возбудимых тканей восстанавливать свои свойства делает возможным возникновение так называемых авто-

волновых процессов — процессов, аналогичных автоколебательным процессам в сосредоточенных системах. Автоволновые процессы существенны для понимания активных сред самой различной природы: биологических, электрохимических, химических, физических.

Наибольший интерес при изучении возбудимых сред представляют источники волн, которые качественно отличаются от известных генераторов автоколебаний в сосредоточенных системах. Как будет показано ниже, источники волн могут возникать и в таких средах, где ни один из элементов не способен самопроизвольно возбуждаться (не является автоколебательным). Возникновение подобных источников связано с особыми пространственными режимами распространения волны возбуждения.

К настоящему времени изучены источники волн двух типов: ревербератор, представляющий собой вращающуюся спиральную волну, и эхо, или ведущий центр, посылающий концентрические волны. Возникновение источников спиральных волн было теоретически предсказано в работах Винера и Розенблюта [2], Балаховского [3], источников эха — в работе Кринского и Холопова [1]. Оба этих типа источников волн были экспериментально обнаружены в распределенной химической активной среде Жаботинским и Заикиным [5, 6].

Механизм возникновения и размножения источников волн исследован Кринским [4, 20]. Процесс размножения источников играет важную роль в механизме фибрилляции, одной из наиболее опасных сердечных аритмий. Исследованию свойств источников волн, механизмов их возникновения, исчезновения и анализу параметров, контролирующих эти процессы, посвящена третья часть книги.

Для описания распространения волн возбуждения обычно используются системы нелинейных дифференциальных уравнений с частными производными параболического типа, аналогичные той, которую применили Ходжкин и Хаксли для описания распространения импульса по нервному волокну:

$$\begin{aligned}
 -C \frac{\partial E}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 E}{\partial x^2} + g_{Na} m^3 h (E - E_{Na}) + g_K n^4 (E - E_K) + \\
 &\quad + g_l (E - E_l), \\
 \frac{\partial m}{\partial t} &= [\bar{m}(E) - m]/\tau_m; \quad \frac{\partial n}{\partial t} = [\bar{n}(E) - n]/\tau_n; \\
 \frac{\partial h}{\partial t} &= [\bar{h}(E) - h]/\tau_h.
 \end{aligned}$$

Системы уравнений такого типа встречаются не только при изучении распространения волн в возбудимых тканях (нервах, мышцах), но и в математической экологии, теории клеточной дифференцировки, при описании распределенных химических систем, в теории горения и т. д.

Методы анализа подобных уравнений разработаны слабо. Аналитически удается рассматривать только автомоделное решение — стационарное распространение волны. Первые успехи в анализе автоволновых процессов были получены не при исследовании уравнений с частными производными, а при анализе гораздо более простых моделей. Важную роль сыграла работа Винера и Розенблюта [2], в которой был предложен новый подход к анализу волн в возбудимых тканях, основанный на изучении формальной возбудимой среды. В этой модели среда представляет собой непрерывную совокупность элементов x , состояния которых дискретны, а для нее задано правило, определяющее взаимодействие элементов.

С помощью моделей возбудимых сред удастся получать в аналитическом виде ответы на вопросы, которые в более детальных моделях пока вообще не удастся исследовать: изучать типы и свойства источников волн в однородных и неоднородных средах, механизмы возникновения и взаимодействия источников.

Анализ автоволновых процессов в моделях с частными производными до последнего времени проводился только численными методами. В частности, воспроизведены оба типа источников волн, обнаруженные при изучении формальных возбудимых сред [5, 7]. И лишь недавно появились работы, где к изучению автоволновых процессов в моделях с частными производными применяются качественные методы анализа [8—10]. Начал также изучаться еще один класс моделей, промежуточных между моделями формальных возбудимых сред и уравнениями с частными производными. Такими моделями являются цепочки электрически связанных клеток. Эти модели, исследуемые качественными методами, позволяют связать возникновение автоволновых процессов с реально измеряемыми в эксперименте параметрами клеточной мембраны.

В настоящее время одно из основных приложений исследования источников спиральных волн в возбудимых средах связано с изучением различных патологий сердечной мышцы и прежде всего — сердечных аритмий, возникающих при аномальных режимах распространения волн возбуждения. Одной из наиболее опасных сердечных аритмий является фибрилляция желудочков сердца, при которой нарушается синхронизация сокращений отдельных мышечных элементов и сердце перестает нагнетать кровь, что приводит к мгновенным летальным исходам.

Попытки объяснения возникновения сердечных аритмий появлением источников возбуждения предпринимались уже давно. Еще в 1913—1914 гг. в работах Майнса и Гэрри [11, 12] круговое движение возбуждения вокруг отверстия (reentry) рассматривалось в качестве одного из возможных механизмов сердечных аритмий.

Математическое исследование спиральных волн впервые было проведено в работе Винера и Розенблюта [2]. Ими была исследована волна, вращающаяся вокруг отверстия. Полученные результаты позволили объяснить трепетание предсердий циркуляцией волн вокруг полых вен. Компьютерная модель фибрилляции впервые была построена Моу и др. [13]. Был выделен ряд параметров, которые могли затруднять возникновение фибрилляции в модельной среде. Однако оставались и серьезные проблемы.

1. Как модель Винера — Розенблюта, так и модель Моу не могли объяснить механизм аритмий, возникающих на участке, существенно меньшем винеровской длины волны λ , которые наблюдались экспериментально [14, 15].

2. Оставалось не ясно, как могут возникать источники спиральных волн в среде без отверстий.

3. Оставалась нерешенной и проблема параметров сердечной ткани, на которые должны действовать антиаритмические вещества. Как следовало из теории, противоаритмические вещества должны увеличивать длину волны λ и уменьшать неоднородности миокарда по рефрактерности [16]. «Классические» противоаритмические препараты (хинидин, прокаинамид) так и действовали. Но впоследствии был обнаружен ряд противоаритмических веществ (см. классификацию в работах [17—19]), не укладывавшихся в эту схему. Противоаритмические вещества уменьшали скорость распространения v (за счет увеличения порогов возбуждения и уменьшения максимальной крутизны переднего фронта потенциала действия), что приводило к уменьшению (вместо увеличения) длины волны λ . Математическая теория в то время ничего не могла дать для объяснения возможных механизмов действия таких веществ.

Эти первые неудачи продемонстрировали, что для решения возникших вопросов необходимы серьезные математические исследования возбудимых сред и автоволновых процессов в них.

6.2. *Распространение волн в однородной среде. Спиральная волна, вращающаяся вокруг отверстия, и ревербатор*

В этом разделе излагаются результаты, полученные в основном на моделях формальных возбудимых сред, которые внесли основной вклад в понимание качественных механизмов возникновения и типов автоволновых процессов.

Наиболее простой и удобной для анализа моделью возбудимой среды оказалось обобщение [4] модели Винера — Розенблюта для

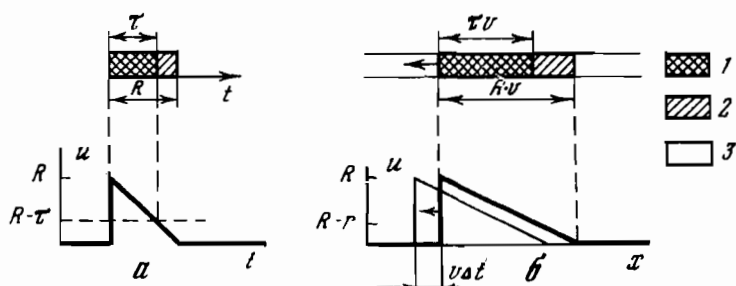


Рис. 59. Соответствие между состояниями и фазами в модели возбудимой среды

а — одиночный элемент (вверху — состояния, внизу — фаза); *б* — волна в волокне (тонкой линией показано положение волны через время Δt). Значения фазы $R - \tau \leq u \leq R$ соответствуют состоянию возбуждения (1), значения $0 < u < R - \tau$ — состоянию рефрактерности (2), $u = 0$ — состоянию покоя (3)

ненулевой длительности возбужденного состояния (τ). Хотя эта модель (τ -модель), как и модель Винера — Розенблута, не дает количественных оценок, она сравнительно просто позволяет понять механизм возникновения и основные свойства автоволновых процессов на качественном уровне.

Свойства среды (τ -модель). Среда представляет собой непрерывную совокупность элементов x . Каждый элемент может находиться в одном из трех состояний: покоя, возбуждения, рефрактерности. Если покоящийся элемент переведен в возбужденное состояние, то он находится в этом состоянии в течение времени τ , затем переходит в состояние рефрактерности, которое длится время $R - \tau$, после чего переходит в состояние покоя и остается в нем. Из состояния покоя в состояние возбуждения элемент может быть переведен либо внешним воздействием, либо воздействием соседних возбужденных элементов. Волна возбуждения от любого возбужденного элемента распространяется только по области покоящихся элементов с постоянной скоростью v .

Для удобства анализа в некоторых случаях используется понятие фазы $u(x, t)$; она определяется следующим образом (рис. 59). Состоянию покоя приписывается значение $u = 0$, для остальных состояний фаза определяется как время, оставшееся до перехода элемента в состояние покоя. При таком определении фаза в момент возбуждения элемента принимает значение $u = R$; значения $R \geq u \geq R - \tau$ соответствуют состоянию возбуждения, значения $R - \tau > u > 0$ — состоянию рефрактерности. Преобразование, переводящее за малый промежуток времени u в $u + du$ таково: $du = -dt$, если $u > 0$, а если $u = 0$ как в данной точке, так и в близких к ней точках, то $du = 0$. Если же в данной точке

$u = 0$, а в некоторой близкой к ней точке (отстоящей не далее, чем на vdt) выполнено условие $u \geq R - \tau$, то на всем отрезке между этими точками $du = R$.

Одиночная волна. Волна в одномерной среде — волокне показана на рис. 59, б. Ее длина равна произведению рефрактерности R на скорость v . Аналогично в двумерной среде за каждым свободно распространяющимся фронтом волны движется полоса фиксированной ширины, в которой элементы не находятся в состоянии покоя. Ее ширина называется длиной волны λ [2]. Волна, движущаяся со скоростью v , имеет длину $\lambda = Rv$. Передняя часть волны длиной τv состоит из возбужденных элементов, задняя длиной $(R - \tau)v$ — из рефрактерных.

Показанная на рис. 59, б волна возникла после однократного возбуждения правого конца волокна. Эту же волну можно получить и другим способом, не нанося возбуждение на исходно покоящуюся среду, а задав в качестве начальных условий распределение фаз $u(x)$, показанное внизу.

Волна в кольце. Простейшим одномерным аналогом спиральных волн являются волны, циркулирующие в кольце из возбудимой ткани. Условие осуществимости этого режима очевидно: кольцо не должно быть слишком коротким; его длина l должна быть не меньше длины волны λ . Все точки кольца возбуждаются с периодом $T = l/v$.

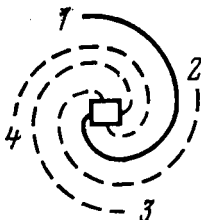
Однако не столь очевидно, как такой режим может возникать: если возбудить некоторую точку кольца, то возбуждение распространится в обе стороны, волны встретятся в противоположной части кольца и погаснут.

Уже на этом простейшем примере видно важное свойство режимов циркуляции: они не могут возникать «естественным образом» в изотропных, однородных возбудимых средах. Возникновение таких режимов будет рассмотрено в следующем параграфе.

Спиральная волна в двумерной среде с отверстием. Аналогично циркуляции в кольце волна может циркулировать и в двумерной среде вокруг отверстия. Этот режим был детально исследован Винером и Розенблютом [2]. Предложено два типа описаний — в терминах фронтов волн и в терминах траекторий распространения возбуждения. Показано, что длина замкнутой траектории, по которой циркулирует возбуждение, равна периметру l для выпуклого отверстия. При этом волна периодически возбуждает все точки среды с периодом $T = l/v$. Фронт волны определяется по принципу Гюйгенса и представляет собой спираль-эвольвенту отверстия (рис. 60).

Спиральная волна в среде без отверстий. Ревербератор. Является ли для спиральной волны обязательным наличие отверстия (невозбудимого участка)? Винер и Розенблют показали, что по крайней мере не является обязательным наличие большого отвер-

Рис. 60. Спиральная волна циркулирует вокруг отверстия. Цифрами обозначены последовательные положения волны [2]



ствия — волна может циркулировать по пути, охватывающему несколько маленьких отверстий. Периметр каждого отверстия меньше длины волны λ , но суммарная длина пути оказывается большей чем λ . С помощью анализа траекторий распространения они продемонстрировали, что режим циркуляции возможен в сети из возбудимых элементов при любом, даже как угодно малом по сравнению с λ , размере ячейки сети. На случай непрерывной среды этот результат обобщен Балаховским [3]. Такие источники спиральных волн впоследствии получили название ревербераторов и были детально исследованы в работах Кринского [20, 21].

Ревербераторы естественно возникают в неоднородных средах. Механизм их появления и размножения будет подробно рассмотрен ниже.

6.3. Возникновение ревербератора в простейшей неоднородной среде

Качественное представление о процессе рождения ревербератора дает рис. 61. Изображены две волны, следующие одна за другой со столь малым интервалом, что вторая волна не может возбудить область D , где рефрактерность повышена. В результате появляется разрыв волны (рис. 61, б). При его эволюции края разрыва скручиваются в спираль, и возникает ревербератор (рис. 61, в, г).

Чтобы за этой картиной проследить в деталях, а также исследовать свойства ревербератора как источника волн, сначала рассмотрим особенности распространения волн в неоднородной среде.

Трансформация ритма в волокне. Одним из интересных явлений, наблюдающихся в неоднородных возбудимых системах, является трансформация ритма: если на среду наносится возбуждение с достаточно высокой частотой, то возможно периодическое выпадение одного импульса из серии, так что из каждых N посланных импульсов проходит только $N - 1$. Анализ различных моделей трансформации ритма и обзор экспериментальных работ можно найти в [22]. Трансформация ритма играет важную роль при образовании источников волн, поэтому остановимся на ней более подробно. Пусть имеется волокно (рис. 62), состоящее из двух однородных отрезков

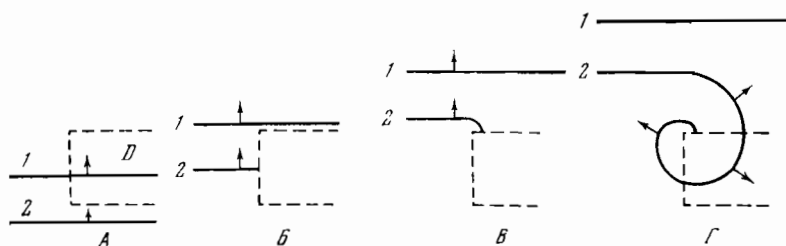


Рис. 61. Возникновение ревербератора (спиральной волны в среде без отверстий и препятствий)

Пунктирной линией отмечена область D с повышенной рефрактерностью (R_1). Сплошной линией изображен фронт волны.

a — исходное положение двух плоских волн; стрелками показано направление движения; 1—2 — номер волны; $б$ — вторая волна не входит в область D ; возник разрыв фронта; $в$ — правый край разрыва начинает скручиваться в спираль; $г$ — возникла спиральная волна — ревербератор. Ревербератор может возникать, только если интервал T между волнами достаточно мал: $T < R_1$. При $T > R_1$ разрыва волны не будет, и ревербератор не образуется

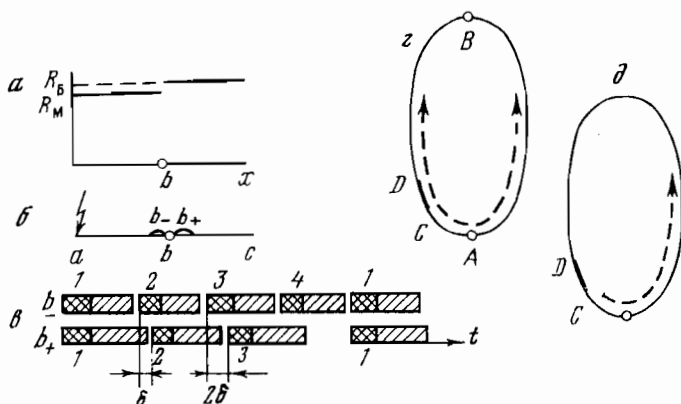


Рис. 62. Трансформация ритма в волокне

a — распределение рефрактерности в волокне, показанном на рис. 6;

$б$ — случай, когда при периодической стимуляции левого конца волокна из каждых четырех импульсов до правого конца доходят только три. 4-й импульс возбуждает элементы из $в$, но состояние возбуждения (двойная штриховка) оканчивается раньше, чем рефрактерность (одинарная штриховка) от 3-го импульса в элементах $в$.

$г, д$ — возникновение циркуляции импульса в кольце при трансформации ритма. CD — участок с повышенной рефрактерностью: $г$ — 1-й импульс распространяется налево и направо; в точке B эти импульсы сталкиваются и гаснут; $д$ — распространение 2-го импульса

с различной рефрактерностью: рефрактерность левого равна R_M , правого — R_B , причем $R_M < R_B$. Левый конец возбуждается внешними импульсами с периодом T , меньшим, чем рефрактерность правой половины волокна ($T < R_B$, но $T > R_M$). Тогда участок с рефрактерностью R_B не может пропустить все импульсы. Легко видеть, что уже вторая волна подойдет к участку с повышенной рефрактерностью ранее, чем он выйдет из состояния рефрактерности. Если бы τ равнялось нулю, то эта волна погасла бы на границе (в точке b). Однако согласно свойствам среды точка, возбудившись, находится в возбужденном состоянии в течение времени τ ; если за это время правый участок успеет выйти из рефрактерности (это возможно, если $R_B - R_M < \tau$), то волна двинется дальше. Разность фаз элементов b_- и b_+ (рис. 62, ϵ) к моменту подхода первого импульса равнялась нулю; к моменту подхода второго импульса она равна $\delta = R_B - T$, для третьего — 2δ и т. д. Действительно, пусть элементы b_- возбуждаются в моменты времени $0, T, 2T, 3T \dots$. Элементы b_+ не могут возбуждаться с периодом T , так как $T < R_B$; они возбуждаются, как только выходят из состояния рефрактерности, т. е. в моменты $0, R_B, 2R_B, 3R_B$ и т. д. Сравнивая эти моменты возбуждения, получаем выражение для разности фаз Δu , возникшей к k -му импульсу:

$$\Delta u_k = (k - 1)\delta, \quad \delta = R_B - T. \quad (6.1)$$

Как только разность фаз превысит τ , соответствующий импульс не сможет возбудить b_+ и выпадет. Номер выпадающего импульса N легко определяется из условий $\Delta u_N > \tau$, $\Delta u_{N-1} < \tau$; он равен

$$N = 2 + [\tau / (R_B - T)], \quad (6.2)$$

где квадратные скобки обозначают целую часть числа.

Из-за того что N -й импульс выпал, для следующего импульса разность фаз Δu уменьшится (см. рис. 62, ϵ). Если она станет равна нулю, как это было для первого импульса, то выпадения импульсов будут происходить периодически. Так будет, если $\tau < \frac{1}{2}R_B$. Как видно из равенства (6.2), период трансформации ритма N тем больше, чем ближе период импульсов T к рефрактерности R_B .

Кольцо. Возникновение циркуляции. В кольце, неоднородном по рефрактерности, трансформация ритма может приводить к возникновению циркуляции возбуждения. Рассмотрим кольцо (рис. 62, z, ∂), в котором рефрактерность всюду равна R_M , кроме участка CD , где она равна R_B (больше, чем в остальной части кольца). Если в точку A послать подряд два импульса с достаточно маленьким интервалом, то волна от второго импульса, идущая влево, погаснет из-за трансформации ритма, а идущая вправо будет двигаться по кольцу. Если длина кольца достаточно велика, то эта волна подойдет к участку CD , когда он уже выйдет

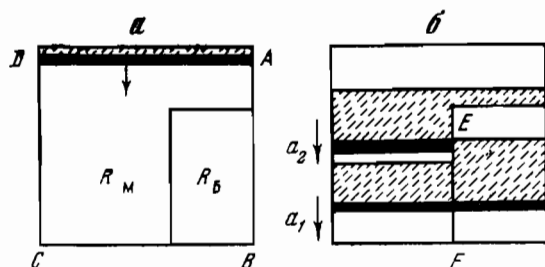


Рис. 63. Трансформация ритма в двумерной среде

а — распределение рефрактерности ($R_B > R_M$); *б* — возникновение разрыва фронта волны a_2 при трансформации ритма. Волны распространяются сверху вниз

из состояния рефрактерности — возникнет циркуляция импульса в кольце.

Мы уже упоминали, что в однородном кольце для возникновения циркуляции надо задавать специальные начальные условия или вводить сложные дополнительные постулаты, выходящие за рамки анализируемой модели. В неоднородной среде, как мы видели, режим циркуляции возникает просто и естественно.

Трансформация ритма в двумерной среде. В двумерной неоднородной среде трансформация ритма приводит к образованию разрывов фронта волны на границе неоднородности. Как будет показано ниже, при определенных условиях из разрыва может образоваться ревербератор.

Рассмотрим подробнее механизм формирования разрыва. На рис. 63 показана неоднородная среда, состоящая из двух областей с рефрактерностями R_B и R_M , где $R_B > R_M$. Волны распространяются сверху параллельно стороне AD . Интервал T между волнами a_1 и a_2 таков, что волна a_2 не может возбудить область с рефрактерностью R_B ($T < R_B - \tau$), но по области R_M волна a_2 распространяется. Возникает разрыв фронта волны a_2 . Этот разрыв будет двигаться вдоль границы EF , так как за волной a_1 движется рефрактерный хвост, длина которого в области R_B больше, чем в области R_M , в результате чего возбужденные участки волны a_2 справа (вдоль EF) граничат с рефрактерным хвостом волны a_1 и не могут распространяться вправо.

Заметим, что если интересоваться распространением возбуждения только вдоль линии AB , то мы увидим картину трансформации ритма, обычную для одномерной среды: первый импульс прошел, а второй выпал.

Возникновение ревербератора на неоднородности при трансформации ритма показано на рис. 64. Изображены две волны, движущиеся одна за другой с малым интервалом, таким, что волна 2 не может возбудить участок с повышенной рефрактерностью

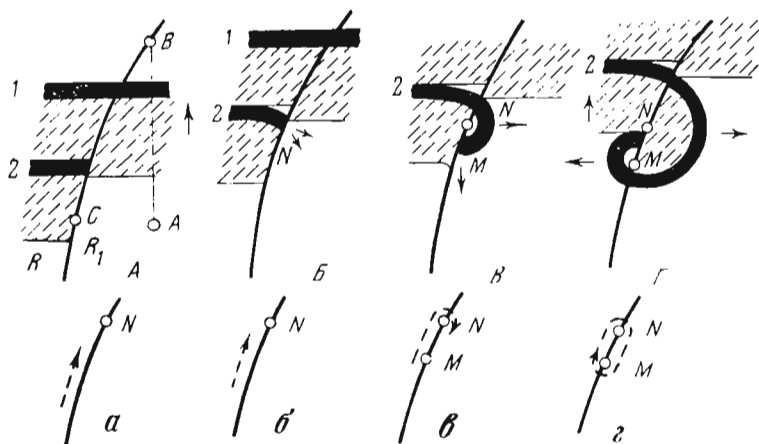


Рис. 64. Механизм возникновения ревербератора при огибании разрывом волны участка с повышенной рефрактерностью

Слева рефрактерность (R) меньше, чем справа (R_1). Возбужденные участки зачернены, рефрактерные — заштрихованы. Стрелки показывают направления движения волн. A — волна 2 движется только по левой области, справа фронт возбуждения волны 2 упирается в более длинный рефрактерный хвост волны 1; B — волна 2, двигаясь вдоль границы двух областей (BC), отстает от волны 1 (волна 1 приходит в точку B по кратчайшему пути AB , а волна 2 — по длинному CB), фронт возбуждения волны 2 благодаря этому начинает соприкасаться в точке N с полежащими участками правой области; B — возбуждение от волны 2 распространяется по правой области, в точке M оно сможет вновь перейти в левую область; Γ — волна перешла в левую область и образовала ревербератор. a — e — эволюция траектории движения разрыва волны 2 при образовании ревербератора

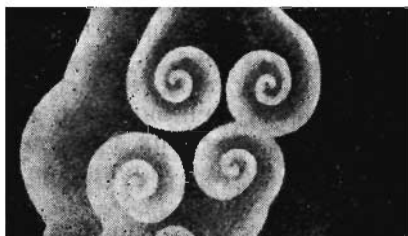


Рис. 65. Ревербератор в химической возбудимой среде [5]

расположенный справа от линии BC), и возникает разрыв волны 2. Он сохраняется до тех пор, пока возбужденные элементы волны 2 справа граничат с рефрактерными элементами, принадлежащими к «хвосту» волны 1 (рис. 64, A). По мере того как волна 2 отстает от волны 1, возбужденные элементы волны 2 получают возможность в некоторой точке N (рис. 64, B) вступить в контакт с элементами, которые перешли в состояние покоя.

Волна получает возможность распространяться и в правую полуплоскость. Через малое время dt в правой полуплоскости

она имеет вид полуокружности радиуса $vd\tau$ с центром в N (рис. 64, B). На участке, отмеченном на рис. 64, B стрелкой, волна может распространяться только справа от AB , так как слева от AB среда рефрактерна. Миновав рефрактерный «хвост», движущийся навстречу ей по левой полуплоскости, волна в точке M (рис. 64, Γ) входит в левую полуплоскость. Возбуждение совершило полный оборот вокруг MN и будет циркулировать так и дальше.

6.4. Ревербератор в более детальных моделях

Подобным же образом ревербератор может возникать и в непрерывных моделях возбудимых сред.

Визуально наблюдаемый ревербератор. В тонком (1–2 мм) слое раствора, в котором протекает реакция окисления броммалоновой кислоты броматом, катализируемая комплексными ионами железа переменной валентности, были получены визуально наблюдаемые концентрационные волны синего цвета на ярко-красном фоне [6]. Волны здесь аналогичны волнам в известной модели Лилли («железный нерв»), но в отличие от нее здесь просто наблюдать двух- и трехмерное распространение волн. В этой системе был получен ревербератор (рис. 65) [5, 23]. Ревербератор, возникающий в трехмерной (объемной) среде такого типа, был экспериментально исследован в работе [24].

Ревербератор в модели Нобла. В работе [25] было рассчитано возникновение ревербератора в неоднородной по рефрактерности полоске ткани сердца, каждый элемент которой описывался уравнением Нобла. Ревербератор был получен в ответ на два импульса внешнего тока (рис. 66). Волна совершила два оборота, после чего полоска ткани перешла в состояние покоя. Рисунок 66, b позволяет сравнить потенциалы с потенциалами, регистрируемыми микроэлектродом при возникновении уязвимости. Особенно интересно поведение потенциала в центральной области ревербератора (точка c).

Другие модели. В работе [26] с помощью гибридной аналого-цифровой машины промоделировано возникновение ревербератора в однородной плоской среде (30×30 элементов), каждый из которых описывается системой дифференциальных уравнений третьего порядка, близкой к уравнениям Нобла. Ревербератор в среде, образованной из перемешанных волокон двух типов, анализировался в работе [27]. В работе [28] на ЦВМ моделировалось возникновение ревербератора в среде с большим числом элементов (75×75), причем особое внимание уделено структуре внутренней зоны ревербератора.

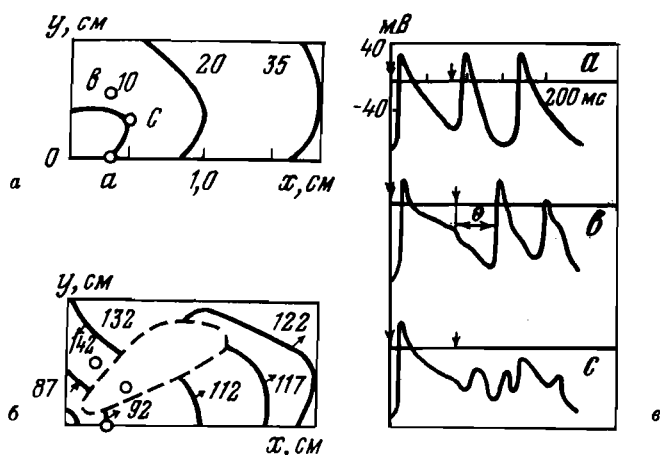


Рис. 66. Возникновение ревербератора при компьютерном моделировании уязвимости в сердечной ткани, неоднородной по рефрактерности. На полоску ткани, описываемую уравнениями Нобла, подано два раздражающих импульса с интервалом 82 мс

a — последовательные положения первой волны; цифры указывают время (в мс); *б* — распространение второй волны; виден разрыв волны ($t = 92$ мс), вращающийся вокруг центральной части полоски; *в* — записи потенциала в точках *a*, *б*, *с*, отмеченных на рис. *a*. Стрелками показаны моменты нанесения раздражающих импульсов

6.5. Свойства ревербератора как источника волн. Размножение ревербераторов в неоднородной среде. Время жизни

На t -модели были обнаружены следующие свойства ревербератора [4]:

В однородных средах: 1. Время жизни ревербератора бесконечно. 2. Характерный размер ревербератора равен винеровской длине волны λ . 3. Период волн, посылаемых ревербератором, равен рефрактерности R . 4. Ревербератор может возникать лишь при специально подобранных начальных условиях. Эти условия соответствуют разрыву волны и в однородных средах «естественным» образом не реализуются.

В неоднородных средах: 1. Время жизни ревербератора конечно. 2. Размер ревербератора уменьшается с течением времени и может быть меньше, чем λ . 3. Частота волн, посылаемых ревербератором, есть максимально возможная частота возбуждения данной среды. Поэтому ревербераторы, посылающие волны с различающимися частотами, в принципе не синхронизируются. Ревербератор (см. рис. 64) посылает волны в левую половину среды

с периодом R и в правую с периодом R_1 (периоды $T_1 = R_1$). 4. Ревербератор может возникать на неоднородности из разрыва волны. 5. Возможен процесс «размножения» ревербераторов: волны, посылаемые ревербераторами, разрываясь на неоднородностях, приводят к формированию новых ревербераторов, как на рис. 67.

Рассмотрим некоторые свойства ревербератора подробнее. Для определения параметров ревербератора удобно проследить, что будет со спиральной волной, циркулирующей вокруг отверстия, если это отверстие убрать (использовав стандартный прием, принятый в топологии, «сшивания» краев отверстия) (рис. 68). Легко видеть, что спиральная волна не исчезнет. В самом деле, некоторое время волна будет двигаться, как и раньше (рис. 68, б), т. е. только справа от линии AN , так как слева от AN точки находятся в состоянии рефрактерности. Так будет продолжаться до тех пор

Рис. 67. Пример неоднородной среды, в которой возможно размножение ревербераторов

Волны, посылаемые ревербератором, возникшим на границе областей с рефрактерностями R_1 и R_2 , разрываючись на границах соседних областей (если их рефрактерности $R_1, R_2, R_4 > R_3$). Из этих разрывов могут возникать новые ревербераторы (отмечены крестиками). Пунктирные линии показывают границы областей с различной рефрактерностью

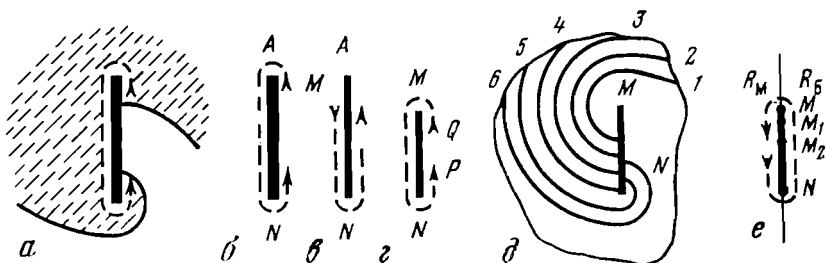
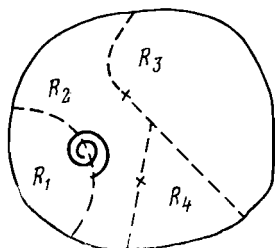


Рис. 68. К анализу свойств ревербератора. Возникновение ревербератора из волны, циркулирующей вокруг разреза в среде

а — циркуляция волны вокруг разреза, разрез показан толстой черной линией. Изображены передний и задний фронты волны, пунктирная стрелка длины волны λ — отрезок траектории распространения возбуждения. Область рефрактерности заштрихована. На рис. б — г, е показана только траектория распространения возбуждения; б — г — после «сшивания» краев разреза возникает ревербератор; д — последовательные положения (1—6) переднего фронта волны; е — схема ревербератора в неоднородной среде: точка перехода волны из области R_B в область R_M смещается с каждым оборотом волны (M, M_1, M_2 и т. д.)

пока передний и задний фронт волны не окажутся в положении, показанном на рис. 68, в. Поскольку разрез теперь отсутствует, волна сможет в точке M перейти через линию AN (справа рефрактерность уже окончилась). Зазор PQ между передним и задним фронтами волны сократится до нуля. Далее волна возбуждения будет двигаться вокруг линии MN точно так же, как если бы вдоль линии MN был проведен разрез — возник ревербератор.

Период ревербератора. Поскольку при образовании ревербератора зазор PQ между передним и задним фронтом волны сокращается до нуля (рис. 68, в, г), то элементы, расположенные вдоль линии разрыва фаз MN , возбуждаются сразу же, как только выходят из состояния рефрактерности. Это означает, что в однородной среде ревербератор посылает волны с периодом $T = R$.

В неоднородной среде период волн, посылаемых ревербератором, зависит от направления. Рассмотрим случай, когда ревербератор возникает на границе двух полуплоскостей с рефрактерностями R_B и R_M (рис. 68, е). Пусть MN — линия разрыва фаз. Покажем, что в области с рефрактерностью R_B все точки возбуждаются с периодом $T = R_B$; в области с рефрактерностью R_M есть точки, возбуждающиеся с периодом R_M .

Первая часть утверждения следует из рис. 68, в. При определении периода волн в области с рефрактерностью R_M возникает осложнение. Оно заключается в том, что для ревербератора в неоднородной среде с каждым оборотом волны линия разрыва фаз укорачивается, и волна переходит в левую полуплоскость (рис. 68, е) каждый раз в новой точке (точки $M_1, M_2, \dots$). В результате возникает эффект Доплера, и частота волн, распространяющихся в левой полуплоскости в разных направлениях, оказывается различной; поэтому кроме точек, возбуждающихся с периодом R_M , в области R_M есть точки, возбуждающиеся с периодом R_B .

Чтобы найти частоту волн в левой полуплоскости, испускаемых этим движущимся источником (точки $M, M_1, M_2, \dots$), можно использовать формулы эффекта Доплера, как это сделано в [27]. Но здесь проще определить эти частоты непосредственно. Для волн, распространяющихся вверх от точки M по области R_M , период равен R_B , так как вместо подвижного источника M_1 можно рассмотреть неподвижный источник N . Для волн, распространяющихся вниз от точки M (в направлении MN), период равен R_M , что следует из рис. 68, в.

Время жизни. В однородной среде ревербератор может существовать неограниченно долго. В неоднородной среде время жизни ревербератора конечно; он исчезает после того, как волна совершит несколько оборотов (рис. 69). Причина гибели ревербератора — трансформация ритма: волна не может в очередной раз

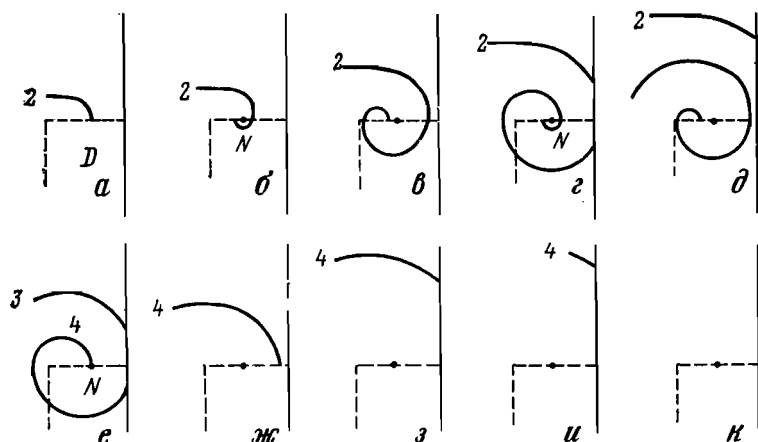


Рис. 69. Конечное время жизни ревербератора в неоднородной среде

Пунктиром отмечена область D с повышенной рефрактерностью (R_1); тонкая линия справа — граница среды; толстой линией изображен фронт волны. a — k — последовательные положения волн; 2, 3, 4 — номер волны.

a — разрыв волны 2; $б$ — в точке N волна вошла в область D ; $в$ — волна вышла из области D (теперь эта третья волна в среде); $г$ — волна вторично вошла в область D (в точке N); $д$ — волна вышла из области D (это — волна 4); $е$ — волна не смогла в третий раз войти в область D (из-за трансформации ритма в окрестности точки N); $ж$ — $и$ — последовательные положения волны 4, которая доходит до границы среды и исчезает (k)

перейти из области с малой рефрактерностью в область с большой рефрактерностью.

Время жизни ревербератора, измеряемое числом оборотов $n_{ж}$ волны возбуждения вокруг линии разрыва фаз, равно числу импульсов, проходящих при трансформации ритма:

$$n_{ж} = 1 + [\tau / (R_B - R_M)]. \quad (6.3)$$

Эта формула следует из равенства (6.2), так как левая полуокрестность точки N (см. рис. 65) возбуждается с периодом R_M , а правая — с периодом R_B .

Видно, что время жизни ревербератора $n_{ж}$ тем меньше, чем больше неоднородность (больше разность $R_B - R_M$).

Замечание. В модели Винера ($\tau = 0$) время жизни ревербератора в неоднородной среде равно единице (послав одну волну, он исчезает при любой, даже сколь угодно малой, неоднородности ΔR).

Размер ревербератора. Будем характеризовать размер ревербератора длиной замкнутой траектории, по которой циркулирует волна, т. е. удвоенной длиной линии разрыва фаз.

В однородной среде размер l ревербератора равен длине волны λ (рис. 68). В неоднородной среде происходит трансформация ритма, и с каждым оборотом волны нарастает разность фаз. Соответственно этому укорачивается длина пути, проходимого волной при каждом обороте. Длина этого пути равна

$$l = (R_B - \Delta u)v, \quad (6.4)$$

где Δu — разность фаз. Используя формулу (6.1) для разности фаз Δu_k при трансформации ритма, получим, что с каждым оборотом волны длина пути укорачивается на $\Delta l = \Delta R \cdot v$, где $\Delta R = R_B - R_M$, т. е. если первый раз волна перешла из области R_B в область R_M в точке M , то следующий раз она перейдет в другой точке — M_1 (рис. 68, *e*), расположенной ближе к N на $\frac{1}{2}\Delta R \cdot v$, следующий раз — в точке M_2 и т. д. Прежде чем ревербератор исчезнет из-за конечного времени жизни, длина его успеет сократиться (как следует из (6.4) и условия $\Delta u < \tau$) вплоть до

$$l_{\min} = (R_B - \tau)v, \quad (6.5)$$

где $\lambda = R_B v$ — длина волны. В случае среды со сложным распределением рефрактерности, таким, что трансформация ритма одновременно происходит в нескольких (k) точках, минимальный размер ревербератора есть

$$l_{k\min} = (R_B - k\tau)v = \lambda (1 - k \cdot \tau / R_B). \quad (6.6)$$

Видно, что этот размер зависит не только от длины волны λ , но и от длительности возбужденного состояния τ , и при $\tau \geq (1/k)R$ может оказаться много меньше длины волны λ .

6.6. Ревербератор и сердечные аритмии. Уязвимость сердечной ткани

Уязвимость. Одной из основных экспериментальных моделей сердечных аритмий является феномен уязвимости. Он наблюдается в нормальной сердечной мышце и состоит в следующем: при стимуляции двумя электрическими импульсами со специально подобранным временным интервалом возникает не два, а несколько сокращений. Возникшие дополнительные сокращения называются экстрасистолами.

Феномен уязвимости на полоске правого желудочка кошки [29] показан на рис. 70. При большом интервале между раздражающими импульсами ($T = 148$ мс) в полоске возникает одиночное сокращение в ответ на каждый импульс. При уменьшении интервала от $T = 143$ мс до $T = 135$ мс в ответ на второй раздражающий импульс в полоске ткани развивается множественная экстрасистолия.

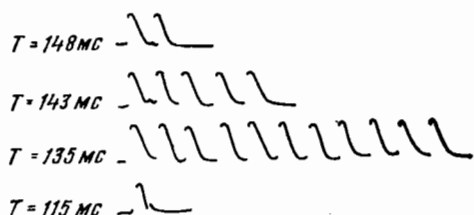


Рис. 70. Уязвимость в полоске ткани из желудочка сердца кошки, на которую подаются два раздражающих стимула

Цифрами слева указан интервал T , между стимулами. Показаны экстрасистолы, возникающие при $T = 143$ и 135 мс. При $T = 115$ мс второй стимул не вызывает возбуждения, ткань рефрактерна [29]

При еще меньших T (115 мс) в ответ на второе раздражение в полоске ткани не возникает сокращения.

Интервал $\Delta T = T_{\max} - T_{\min}$, где $T_{\max}$ и $T_{\min}$ — соответственно минимальное и максимальное значения T , при которых еще возникают экстрасистолы, называется шириной уязвимой зоны. Ширина уязвимой зоны является одной из характеристик, указывающих на предрасположенность ткани к аритмиям [30]. Как показывает анализ моделей возбудимых сред, уязвимость может быть связана с возникновением источников волн обоих типов — ревербератора и эха.

Уязвимость, обусловленная возникновением ревербератора. Возникновение ревербератора в ответ на два внешних импульса воспроизводит основные черты уязвимости в миокарде. Если регистрировать состояние одного какого-либо элемента среды (аналог микроэлектродной регистрации), то будет зарегистрировано кроме двух импульсов, поданных извне, еще один или несколько импульсов, посланных возникшим ревербератором (так как ревербератор в неоднородной среде имеет конечное время жизни).

Оценим, как параметры среды влияют на область уязвимости. Рассмотрим непрерывную двумерную возбудимую среду, рефрактерность которой всюду равна R_M , кроме некоторого прямоугольника размером $l_1 \times l_2$, где она равна R_B ($R_B > R_M$), а раздражающие импульсы подаются на нижний край среды так, что распространяются плоские волны (рис. 71). Для такой среды показано, что область уязвимости задается неравенствами:

$$R_M < T < R_B - \tau, \quad (6.7)$$

$$\tau > R_B - T - l_2/v, \quad (6.8)$$

$$\tau > T - \Delta - l_1/v - L/v, \quad (6.9)$$

где $\Delta = R_B - R_M$, $L = \sqrt{l_1^2 + l_2^2}$.

Область уязвимости показана на рис. 72 в безразмерных переменных $\tau' = \tau/R_M$, $T' = T/R_M$. Безразмерные параметры: $\epsilon = (R_B - R_M)/R_M$ — относительная неоднородность по рефрактерности, $l'_i = l_i/\lambda$, где $\lambda = R_M l$. Видно, что: а) ширина

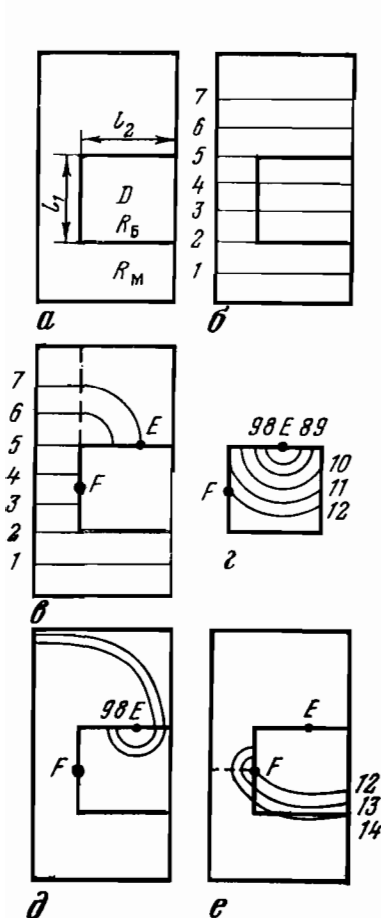


Рис. 71

Рис. 71. Распространение волн при возникновении уязвимости

a — распределение рефрактерности в среде с неоднородностью с размерами $l_1 \times l_2$; b — последовательные положения первой волны (1—7); c — e — последовательные положения второй волны (1—14); z, θ — в точке E волна вошла внутрь прямоугольника D после окончания в нем рефрактерного периода (z — вид волны внутри прямоугольника D ; θ — вид волны во всей среде); e — в точке F волна вышла из прямоугольника D , совершив полный оборот, — возник ревербератор

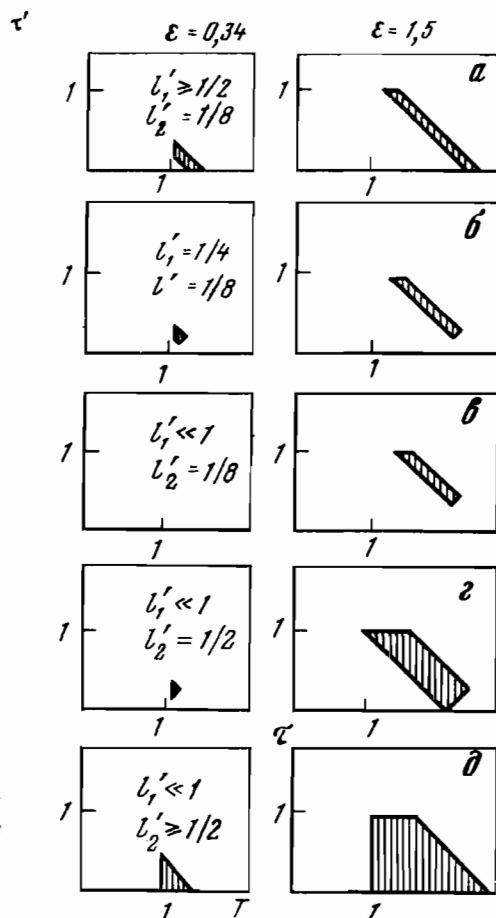


Рис. 72

Рис. 72. Область уязвимости при возникновении ревербератора на неоднородности с размерами $l_1 \times l_2$ в зависимости от параметров среды (a — d)

Безразмерные переменные: $l' = l/\lambda$, где $\lambda = R_M \cdot v$; $T' = T/R_M$ — интервал между двумя импульсами; $\tau' = \tau/R_M$ — длительность возбужденного состояния; $\varepsilon = (R_B - R_M)/R_M$ — относительная неоднородность по рефрактерности

уязвимой зоны уменьшается при уменьшении относительной неоднородности ϵ и при уменьшении размеров неоднородности; б) для неоднородности с размерами, меньшими длины волны λ , ширина уязвимой зоны не равна нулю; это возможно, если τ и ϵ достаточно велики; в) на неоднородности большого размера ревербератор может возникнуть при любых значениях τ' , вплоть до $\tau' = 0$. Для неоднородности с размерами, малыми по сравнению с λ , существует критическое значение $\tau'_{кр}$, такое, что при $\tau < \tau'_{кр}$ уязвимости нет.

Глава седьмая

ЭХО — ИСТОЧНИК КОНЦЕНТРИЧЕСКИХ ВОЛН В ВОЗБУДИМЫХ СРЕДАХ

На сердечных препаратах Розенблют [31] обнаружил интересное явление: при высокой частоте стимуляции посланная в определенном направлении волна возбуждения отражается и возвращается к месту старта. Аритмия такого типа была названа «эхо», а место отражения рассматривалось как активный центр (эктопический фокус).

Такое явление казалось невозможным в простых возбудимых средах, поскольку одиночная волна, как упоминалось во введении, не испытывает отражений. Существование эха первоначально рассматривалось как свидетельство специальной сложной структуры сердечной ткани (наличие двух типов проводящих путей, по одному из которых импульс распространяется вперед, а по другому — в противоположном направлении [31]).

Математические модели показали [1], что источник волн такого типа (эхо) не требует специальной структуры и возможен даже в изотропной возбудимой среде (рис. 73). Было выяснено, почему важна высокая частота стимуляции для возникновения эха. Оказалось, что источник волн этого типа в отличие от ревербератора может возникать не только в двумерной, но и в одномерной среде. Были обнаружены далеко идущие аналогии с ревербератором и ряд отличий.

Эхо как источник волн по сравнению с ревербератором обладает еще одним прагматически ценным свойством: его оказалось намного проще исследовать и рассчитывать. В результате появилась возможность аналитически исследовать сложные задачи, особенно задачи, связанные с взаимодействием источников волн.

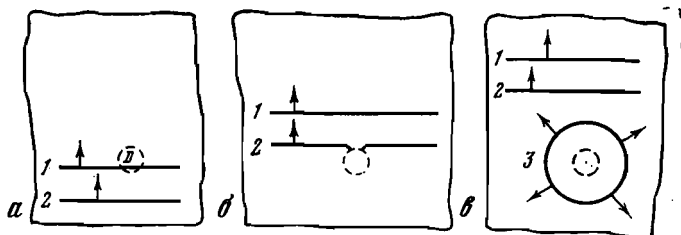


Рис. 73. Возникновение эха (ведущего центра) в двумерной неоднородной среде после прохождения двух волн через область D с повышенной рефрактерностью

a — исходное положение: две плоских волны распространяются по среде; $б$ — вторая волна проходит область D ; возник разрыв волны; $в$ — те же волны после прохождения области D — возникла дополнительная волна 3, концентрически распространяющаяся от D

7.1. Эхо в простейших моделях. Источник эха и ревербератор

Примеры источников эха. В простейшем случае эхо может быть получено в среде из двух одинаковых элементов. Если, например, в τ -модели (раздел 6.2) задать начальные условия так, чтобы один элемент находился в состоянии возбуждения к моменту окончания состояния рефрактерности другого элемента, то элементы могут поочередно возбуждать (перезапускать) друг друга (рис. 74). При иных начальных условиях, как следует из аксиом среды (см. раздел 6.2), подобный генератор автоколебаний не возникает.

Аналогичные источники волн можно получить в одномерной и двумерной средах, состоящих из описанных элементов. Для этого необходимо создать начальный «разрыв» в распределении фаз (рис. 75, 76). При этом источником волн будут элементы среды, находящиеся в окрестности «разрыва» начальных условий. В двумерной среде источник эха в отличие от ревербератора посылает концентрические волны.

Начальные условия для возникновения эха. Необходимые параметры среды. Найдем ограничения на начальную разность фаз для случая источника эха из двух элементов. Пусть элемент A имеет рефрактерность R_M (малую), а элемент B — рефрактерность R_B (большую). Чтобы элемент A мог возбудиться от элемента B (см. рис. 74, в), необходимо, чтобы $R_M - \Delta u < \tau$. Чтобы элемент B мог возбудиться от элемента A , должно выполняться условие $\Delta u < \tau$. Следовательно, начальные условия $u(A, 0)$, $u(B, 0)$ для возникновения эха должны удовлетворять неравенству

$$R_M - \tau < \Delta u(0) < \tau. \quad (7.1)$$

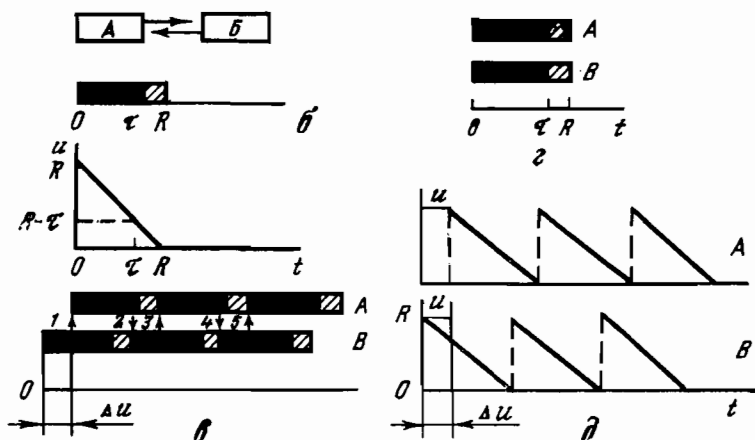


Рис. 74. Источник эха в простейшей модели, состоящей из двух одинаковых точечных возбудимых элементов

a — схема взаимодействия элементов *A* и *B*; *б* — схема состояний (вверху) и фазы $u(t)$ (внизу) одиночного элемента; τ — длительность возбуждения (изображено черным); R — рефрактерность (штриховка); ε — изменение состояний элементов в режиме эха; элемент *B* возбуждает элемент *A* (стрелка 1), затем *A* возбуждает *B* (стрелка 2) и т. д. Существенно различие фаз Δu при $t = 0$; *в* — при $t = 0$ заданы одинаковые начальные условия — эхо отсутствует; *д* — изменения фаз $u(t)$ в режиме эха (см. рис. *е*)

Отсюда ясно, что эхо может возникать только тогда, когда параметры среды удовлетворяют условию

$$\tau/R_M > 1/2. \quad (7.2)$$

В противном случае область, задаваемая неравенством (7.1), пуста.

Случаи непрерывной одномерной и двумерной сред анализируются аналогично. Вместо элементов *A* и *B* рассматривается взаимодействие полукрестностей областей, на которых задан начальный «разрыв» распределения фаз (рис. 75 и 76). Все характеристики источника эха остаются теми же, как и для источника на двух возбудимых элементах.

Возникновение эха при трансформации ритма. Распределение фаз, необходимое для возникновения источника эха, может «естественно» создаваться в среде, неоднородной по рефрактерности, при периодической стимуляции среды внешним источником.

Рассмотрим волокно, состоящее из двух однородных отрезков с различной рефрактерностью — R_B и R_M (рис. 77). Если отрезок с меньшей рефрактерностью стимулируется с периодом T , таким что $R_B > T \geq R_M$ и $R_B - R_M < \tau$, то разность фаз на неоднородности будет расти по закону $\Delta u_n = n(R_B - T)$, где n — число прошедших волн. Как только накопленная разность

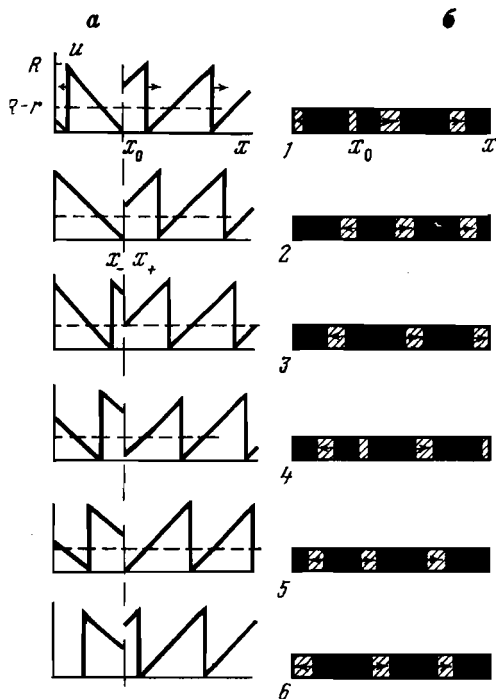


Рис. 75

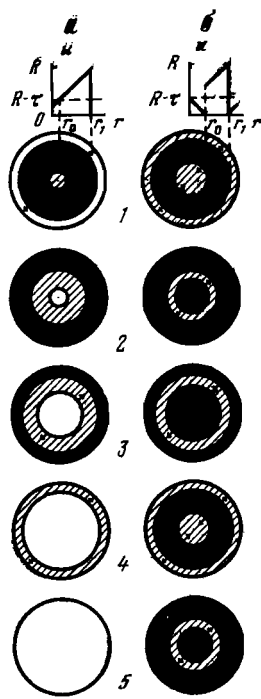


Рис. 76

Рис. 75. Эхо в волокне

a — распределение фаз; b — распределение состояний через промежутки времени, равные $R/8$. Полуокрестности x_- и x_+ точки x_0 (см. 2) играют роль элементов A и B (см. рис. 74, e). Направление распространения волн обозначено стрелками. Возникновение в окрестности точки x_0 новой волны, идущей влево — см. 3, идущей вправо — см. 6. Состояние возбуждения показано черным; рефрактерности — штриховкой

Рис. 76. Эхо в двумерной среде

a — нормальное распространение волны; в среде устанавливается состояние покоя (5); b — источник эха; состояние покоя в среде не устанавливается никогда; по среде пробегают волны с периодом R , 4 повторяет 1 и т. д. Рис. 6 — обобщение рис. 75 для двумерной среды. Голь элементов A и B (см. рис. 74, e) здесь играют области, прилегающие к линии разрыва фаз — окружности радиуса r_0 . Состояние возбуждения показано черным; рефрактерности — штриховкой; состояние покоя — не заштриховано. $\mu(r)$ — начальное распределение фаз; 1–5 — изменение состояний в среде через промежутки времени, равные $1/8 R$. Стрелками показано направление распространения волн

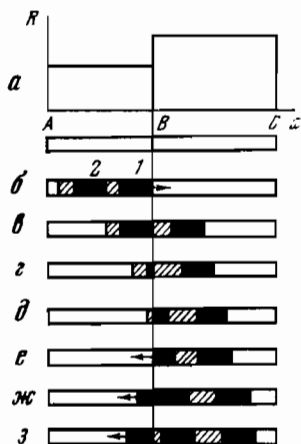


Рис. 77. Распространение волн при возникновении эха в неоднородном волокне

a — волокно и распределение рефрактерности (R) в нем; два импульса поданы на левый конец волокна;
б — *з* — последовательные положения волн, стрелки указывают направление их распространения;
в, *г* — длина возбужденного участка волны 2 уменьшается;
д — волна 2 вошла в участок *BC*;
е, *ж* — длина рефрактерного участка волны 2 уменьшается;
ж — возникла отраженная волна.
 Состояние возбуждения отмечено черным; рефрактерности — штриховкой; состояние покоя — не заштриховано

фаз Δu_n будет соответствовать условию (7.1), возникнет источник эха. Необходимое для этого число внешних импульсов определяется выражением

$$n_3 = 2 + [(R_M - \tau)/(R_B - T)], \quad n_3 < N, \quad (7.3)$$

где квадратные скобки означают целую часть, а N — период трансформации ритма [20]. Эхо возникает тем легче (требуется меньше импульсов), чем короче интервал T между импульсами (из диапазона $R_M \leq T < R_B$). Если $\tau/R_M < 1/2$, то определенное из уравнения (7.3) число импульсов окажется больше, чем период трансформации ритма N . При этом источник эха не успевает возникнуть: прежде чем разность фаз увеличится до необходимой величины, один из предыдущих импульсов выпадает из-за трансформации ритма, и разность фаз снова уменьшится.

Распространение волн в волокне при возникновении источника эха показано на рис. 77.

Время жизни источника эха. Возникнув при трансформации ритма на неоднородном участке, источник эха посылает несколько волн и потом исчезает. Причиной гибели источника эха оказывается та же трансформация ритма, которая привела к его возникновению. Покажем это.

Волны, посылаемые источником эха, имеют неодинаковый период в различных участках неоднородной среды: слева от точки b период равен R_M , справа — R_B . Это приводит к тому, что разность фаз Δu между элементами b_- и b_+ более не сохраняется и выходит за пределы области (7.1). С каждым новым импульсом, посланным источником эха, разность фаз Δu увеличивается на величину $\Delta R = R_B - R_M$. Поэтому общее число $n_{ж}$ волн, посланных источником эха, определяется числом точек, отстоящих на

ΔR в интервале (7.1). Отсюда возникает оценка

$$n_{\text{ж}} \approx (2\tau - R_{\text{м}})/\Delta R, \quad (7.4)$$

где $\Delta R = R_{\text{Б}} - R_{\text{м}}$. При $\Delta R \rightarrow 0$ время жизни источника эха неограниченно возрастает.

В отличие от неоднородной среды время жизни источника эха, созданного в однородной среде, бесконечно, так как элементы возбуждаются с одинаковым периодом $T = R$, и источник работает в стационарном режиме, сохраняя заданную разность фаз.

Связь между источником эха и ревербератором. В предыдущей главе мы рассматривали ревербератор — источник импульсации, возможный в среде и при малых τ/R . У ревербератора пути, по которым возбуждение переходит из области с большей рефрактерностью в область с меньшей рефрактерностью (переход в точке M , рис. 69, e) и обратно (переход в точке N), были пространственно разделены. При увеличении отношения τ/R эти пути сближаются, и при $\tau/R \geq 1/2$ расстояние между ними становится равным нулю. Таким образом, эхо можно рассматривать как предельный случай ревербератора — ревербератор нулевой длины, возможный при $\tau/R > 1/2$. Поэтому эхо и ревербератор как источники импульсации обладают близкими свойствами: возникают в результате трансформации ритма при высокой частоте стимуляции на неоднородной по рефрактерности среде; через некоторое время погибают из-за той же трансформации ритма.

«Простота» источника эха значительно облегчила исследование структуры одиночного источника волн (см. раздел 7.2) и анализ взаимодействия источников.

После того как ревербераторы были получены в формальных моделях возбудимых сред (винеровской модели [2], τ -модели [4]), оставалось не ясным, сохраняются ли эти результаты и на более близких к реальности моделях, описываемых дифференциальными уравнениями с частными производными. Не окажется ли, что диффузия размоет разрывы в распределении переменных, которые необходимы для образования источников волн, и сами источники волн (ревербератор, источник эха) окажутся артефактом, свойственным лишь дискретным моделям?

Поскольку в соответствующих дифференциальных уравнениях нелинейность не является малой, этот вопрос пришлось решать численными расчетами на ЦВМ. И здесь источник эха позволил намного упростить расчеты, проводя их для одномерной среды вместо двумерной (одно это ускорило расчеты на два порядка).

Взаимодействие источников эха может быть исследовано аналитически. Результаты таких исследований формируют эвристическую точку зрения и на процессы взаимодействия ревербераторов, позволяя для них интуитивно уже понятые закономерности проверять моделированием на ЦВМ.

7.2. Источники эха в моделях, описываемых обыкновенными дифференциальными уравнениями

Для τ -модели условием эха оказалось $\tau/R > 0,5$. Каковы условия эха для моделей, описываемых обыкновенными дифференциальными уравнениями? Этот вопрос может представлять интерес для исследований эха в возбудимых мембранах, химических и других системах. Он рассматривался в работе [81] для простейшей модели источника эха — двух взаимодействующих мембран (клеток). Каждая из клеток описывалась уравнением второго порядка типа Бонгоффера — Ван дер Поля (BVP). Анализ проводился методом нуль-изоклин. Было показано, что для возникновения эха необходимы следующие условия: 1. Особая точка дифференциального уравнения, описывающего сосредоточенную (точечную) мембрану, должна терять устойчивость при изменении одного из параметров (внешнего тока, (рис. 78)). 2. Возникающие из-за потери устойчивости автоколебания должны обладать не слишком высокой скважностью: отношение длительности импульса к периоду колебаний должно быть не менее 0,5. Такое ограничение является достаточно очевидным аналогом условия $\tau/R > 0,5$.

Эти условия были использованы в дальнейшем (см. разделы 7.3, 7.4), чтобы подобрать характеристики возбудимой мембраны и ионные токи, при которых удается получать эхо в модели сердечных клеток — модели Нобла (система четвертого порядка), а также чтобы получить эхо в модели, описываемой уравнениями с частными производными.

Модель. Рассматривалась система

$$\begin{aligned} \mu \dot{u}_1 &= f(u_1) + v_1 - z(u_1, u_2), \\ \frac{1}{\mu} \dot{v}_1 &= \varphi(u_1, v_1), \end{aligned} \quad (7.5a)$$

$$\begin{aligned} \mu \dot{u}_2 &= f(u_2) + v_2 - z(u_2, u_1), \\ \frac{1}{\mu} \dot{v}_2 &= \varphi(u_2, v_2). \end{aligned} \quad (7.5b)$$

Подсистема (7.5a) описывает мембрану 1, подсистема (7.5b) — мембрану 2. Связь между ними задается в виде $z(u_1, u_2) = -z(u_2, u_1) = D(u_1 - u_2)$, где D — коэффициент связи. При $D = 0$ подсистемы (7.5a) и (7.5b) совпадают и каждая из них представляет собой систему типа BVP.

В системе BVP, описанной в работе [63], функции были таковы: $f(u) = u - \frac{1}{3}u^3$, $\varphi(u, v) = -u - bv + a$. Так как режим эха исследуется качественными методами, то конкретный вид функции не имеет значения, лишь бы нуль-изоклины подсистем (7.5a) и (7.5b) были качественно сходны с нуль-изоклинами BVP.

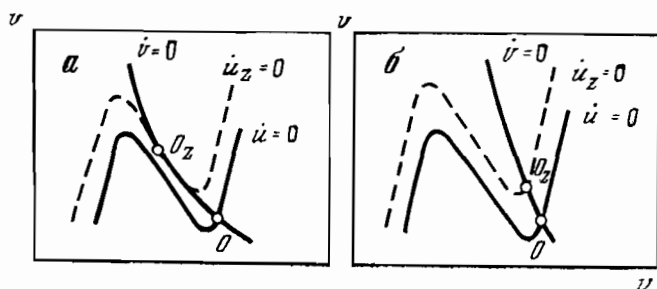


Рис. 78. Нуль-изоклины моделей, в которых возможно (а) и невозможно (б) эхо

Пунктиром показано положение изоклины $\dot{u} = 0$ при действии внешнего тока; а — особая точка теряет устойчивость при внешнем токе. Точка O устойчива; точка O_z неустойчива; б — особая точка сохраняет устойчивость; точки O и O_z устойчивы

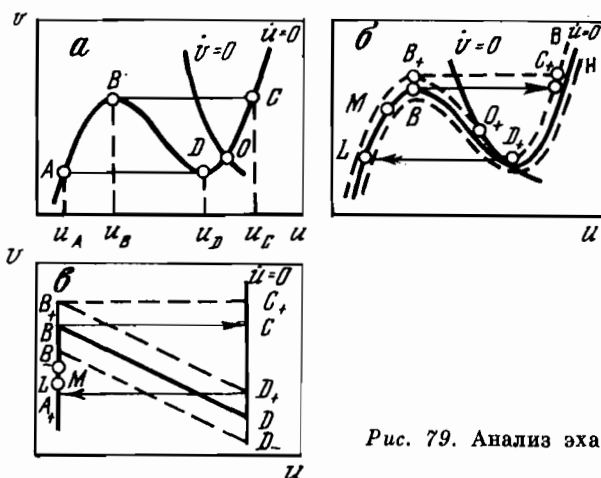


Рис. 79. Анализ эха

а — нуль-изоклины системы (7.5а) при $z=0$. Стрелками указаны направления скачков по переменной u ; б — сдвиги нуль-изоклины при различных значениях z ; сплошная линия соответствует $z=0$; в — идеализированный вид изоклины $\dot{u}=0$ при выполнении условия $u_A = u_B$, $u_C = u_D$

системы (рис. 78). Авторы анализировали случай, когда при $z=0$ состояние равновесия абсолютно устойчиво (невозможны автоколебания в изолированной мембране).

Анализ проводился для случая релаксационной системы ($\mu \ll \ll 1$). Использовалось следующее упрощающее обстоятельство. Когда представляющие точки подсистем (7.5а) и (7.5б) находятся на одной и той же ветви нуль-изоклины (обе на левой, AB , или обе на правой, CD), то член связи мал (рассматривался случай «кру-

тых» ветвей AB и CD (рис. 79): $|u_A - u_B|, |u_C - u_D| \ll |u_A - u_D|$). Когда точки находятся на разных ветвях, член связи велик, но медленно меняется. Это позволяет разбить движение на участки, на каждом из которых удастся проводить анализ для системы второго порядка вместо системы четвертого порядка.

Техника такого анализа аналогична той, которая описана в разделе 8.5. Примеры фазовых портретов, возникающих здесь, показаны на рис. 79. При режиме эха мембраны возбуждаются поочередно. Синхронные колебания невозможны, так как при этом член связи $z(u_1, u_2) = D(u_1 - u_2) = 0$, подсистемы (7.5а) и (7.5б) независимы и в силу абсолютной устойчивости приходят в состояние равновесия. Опишем движения на фазовой плоскости в режиме эха.

Фазовые плоскости обеих мембран (u_1, v_1) и (u_2, v_2) будем изображать на одном рисунке (рис. 79). Пусть при $t = 0$ представляющая точка первой мембраны (будем называть ее точкой 1) находится в положении M , а вторая (точка 2) — в положении L . Тогда $z = 0$ (так как $L \in AB, M \in AB$), и обе точки движутся вверх по участку AB изоклины, определяемой уравнением $f(u) + v = 0$. Мембраны можно рассматривать независимо, пока точка 1, достигнув положения B , не сорвется на правую ветвь. Член связи при этом «скачком» изменится и примет значение $z \approx kD$ для первой клетки и $z \approx -kD$ для второй, где $k = u_B - u_C$, после чего мембраны снова можно рассматривать независимо. Однако линии $\dot{u}_1 = 0$ и $\dot{u}_2 = 0$ уже не совпадают. Если раньше их уравнением было $\dot{u} = f(u) + v = 0$, то теперь $\dot{u}_1 = f(u_1) + v_1 - kD = 0$, $\dot{u}_2 = f(u_2) + v_2 + kD = 0$.

Линии $\dot{u}_1 = 0$ и $\dot{u}_2 = 0$ сместятся в разные стороны относительно линии $f(u) + v = 0$, а именно линия $\dot{u}_1 = 0$ окажется выше [пунктир e (верх), рис. 79], $\dot{u}_2 = 0$ — ниже [пунктир n (низ)]. Точка 1 теперь движется по пунктиру e вниз, а точка 2 — по пунктиру n вверх. Если подобрать функции f и φ и начальные условия так, что к моменту, когда точка 2 достигает положения M , точка 1, пройдя участок C_+D_+ , окажется в положении L , создается исходная ситуация, и цикл повторится. Таким образом, режим эха выглядит так: сначала возбуждается мембрана 1, затем мембрана 2, снова мембрана 1 и т. д. Рассчитанный на ЦВМ пример режима эха в системе (7.5) показан на рис. 80.

Эхо на автоколебательных элементах. Что будет происходить, если в модели (7.5) рассмотреть автоколебательные элементы (7.5а) и (7.5б) и попробовать получить режим эха?

Мы видели, что в режиме эха период колебаний T имеет порядок длительности импульса (не превосходит его более чем в два раза). Естественно ожидать, что если элементы автоколебательные и их собственный период автоколебаний T_0 значительно превосходит длительность импульса (как это обычно имеет место в

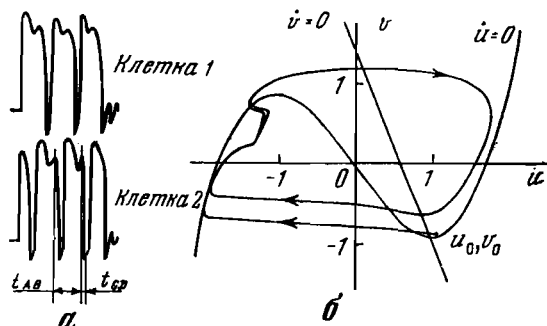


Рис. 80. Эхо в системе (7.5) (по [81])

а — форма импульсов для клеток 1 и 2; б — фазовые траектории клетки 1

клетках сердца и нервных клетках), то режим эха осуществляется по механизму, описанному выше (способность к автоколебаниям элемента «не успевает» проявляться). Приведенный в работе [81] численный пример подтверждает это. Особенность рассматриваемого случая состоит только в том, что при близких начальных условиях мембраны 1 и 2 не переходят в состояние покоя, а синхронизируются и возбуждаются с периодом T_0 .

7.3. Эхо в непрерывных возбудимых средах

Эхо в волокне (уравнения с частными производными). Основная проблема, решавшаяся при моделировании эха в системе уравнений с частными производными, состояла в следующем. Возможен ли перезапуск в распределенной системе (например, в волокне) или же диффузия «размоет» разрывы в распределении состояний соседних элементов и сделает перезапуск невозможным? Это та же проблема, которая важна и для ревербератора; ее формулировка для эха имеет то преимущество, что позволяет решать одномерную задачу вместо двумерной.

Исследовалась система, описывающая распространение возбуждения в волокне:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = F(u, v) + D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}, \quad \frac{\partial v}{\partial t} = \Phi(u, v). \quad (7.6)$$

Граничные условия:

$$\frac{\partial u}{\partial x}(x=0) = 0 \quad \frac{\partial u}{\partial x}(x=l) = 0. \quad (7.7)$$

Здесь $D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}$ — ток, идущий через данный элемент от соседних.

Предполагалось, что: 1. Вырожденная система ($D = 0$) абсолют-

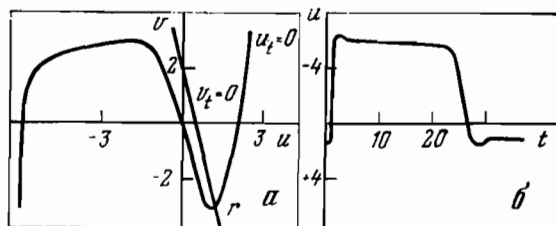


Рис. 81. Свойства одиночного возбудимого элемента волокна

a — нуль-изоклины $\dot{u}_t = 0$ и $\dot{v}_t = 0$ системы (7.6) при $D = 0$; δ — импульс, генерируемый одиночным возбудимым элементом

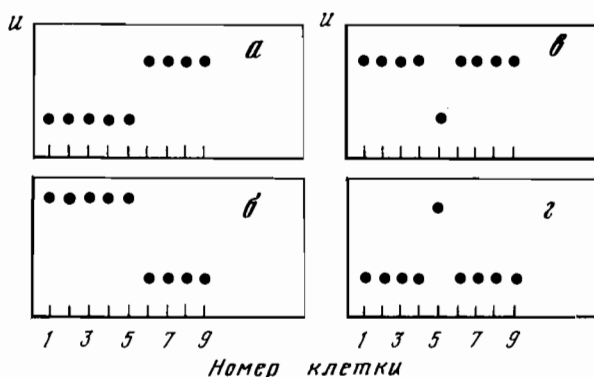


Рис. 82. Распространение волн в цепочке клеток в режиме эха

a, b — антисимметричное; c, d — симметричное. a, c — состояние цепочки в начальный момент; b, d — состояние цепочки после того, как пробежала одна волна

но устойчива (в физиологических терминах: каждый элемент не является спонтанно активным). 2. Тривиальное решение $u(x) = \text{const}$, $v(x) = \text{const}$ устойчиво (волокно, составленное из таких элементов не является спонтанно активным, т. е. нет неустойчивости, вызванной диффузией).

В такой системе для всех начальных условий, кроме некоторых специальных, решение стремится к константе $u(t; x) \rightarrow u_r = \text{const}$, $v(t, x) \rightarrow v_r = \text{const}$, где u_r и v_r — координаты точки покоя вырожденной системы (рис. 81). Возникающие здесь при специальных начальных условиях автоколебания можно было бы назвать жесткими автоколебаниями в волокне, по аналогии с жесткими автоколебаниями в точечных системах.

Вообще говоря, если эхо в подобной системе существует, возможны два типа возбуждения волокна — антисимметричное и симметричное (рис. 82).

Антисимметричный тип эха в волокне, полученный расчетами на ЦВМ [79], приведен на рис. 83. Для получения эха в системе (7.7) функции F и Φ и начальные условия (рис. 83, а, $t = 0$) выбирались так, чтобы по крайней мере для одной точки [в нашем случае точки A (с координатой $x = 1,5$)] за счет члена диффузии $I_0 = D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}$ особая точка становилась неустойчивой (условие 1, раздел 7.2) и в системе обыкновенных дифференциальных уравнений ($D = 0$) период автоколебаний при внешнем токе I_0 был короче, чем удвоенная длительность импульса (условие 2, раздел 7.2).

Эхо в химической системе. Фото источников эха, полученных в химической возбудимой среде, приведены на рис. 84 [7]. Среда та же самая, в которой был получен и режим ревербератора (глава 6).

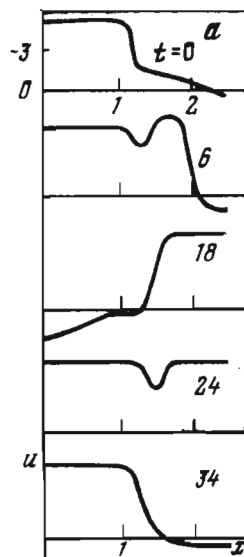


Рис. 83. Эхо в волокне (расчет на ЦВМ)

а — распределение потенциалов вдоль волокна для различных моментов времени. Начальные условия отмечены индексом 0 (вверху); правая и левая половины волокна запускают одна другую (цифры указывают время в отн. ед.), сначала правая половина возбуждается от левой ($t = 6$), затем прекращается возбуждение в левой половине волокна ($t = 18$), после чего левая половина возбуждается от правой ($t = 24$), и т. д. (распределение потенциалов при $t = 34$ почти повторяет начальные условия); б — возникновение новой волны (детальное изображение) в правой половине волокна ($t = 157$)

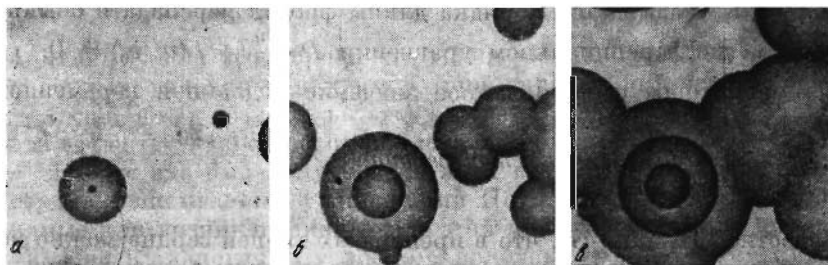
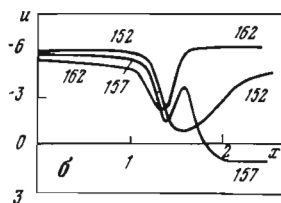


Рис. 84. Ведущий центр в химической возбудимой среде
Кадры сняты с интервалом 30 с; длина волны равна $\approx 6,5$ мм [5]

Если ревербератор в такой среде получали механическим разрывом фронта волны [5] (лопаточкой или за счет резкого поворота чашки Петри, в которой происходит реакция), то для получения источника эха использовали так называемую процедуру переноса для создания начальной разности фаз. Пипеткой переносили каплю жидкости из района фронта возбуждения в область покоя, и эта область становилась периодически работающим источником волн.

Источниками концентрических волн в такой реакции могут быть кроме источника эха также и элементы объема, находящиеся в состоянии автоколебаний (например, из-за наличия микрозагрязнений [38]). Возникающий при процедуре переноса источник концентрических волн (описанный под названием ведущий центр) был идентифицирован как источник эха: при переносе капли жидкости из одной области покоя в другую или из одной области возбуждения в другую эти источники не возникали.

Оценка размера источника эха в модели уравнений с частными производными. В τ -модели размер источника эха оказывается нулевым в отличие от ревербератора, размер которого равен длине волны λ . Поэтому размер источника эха необходимо оценивать на других, более детальных моделях.

Численные расчеты источника эха в волокне, описываемом дифференциальными уравнениями с частными производными [25, 39], показывают, что линейный размер источника эха оказывается порядка длины переднего фронта потенциала действия, распространяющегося в этом волокне. Всегда ли это так?

Этот вопрос был исследован в работе [40]. Рассматривалось волокно, задаваемое релаксационной системой

$$\mu \frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + f(u, v), \quad \frac{\partial v}{\partial t} = \varphi(u, v). \quad (7.8)$$

Используя релаксационность системы ($\mu \ll 1$), с помощью качественных методов анализа удалось показать, что размер источника эха оказывается порядка длины фронта перепада в обыкновенном дифференциальном уравнении $D \frac{d^2 u}{dx^2} + f(u, v_0) = 0$, где v_0 — некоторое фиксированное значение медленной переменной.

7.4. Эхо в модели клеток сердца. Уязвимость

Известно [31, 35, 47], что в препаратах тканей сердца можно вызвать аритмию, подавая раздражающие стимулы с высокой частотой. В работе [31] высказано предположение о том, что причиной аритмии в таких случаях может являться активность эктопического фокуса типа эха. При этом отмечается, что для возникновения

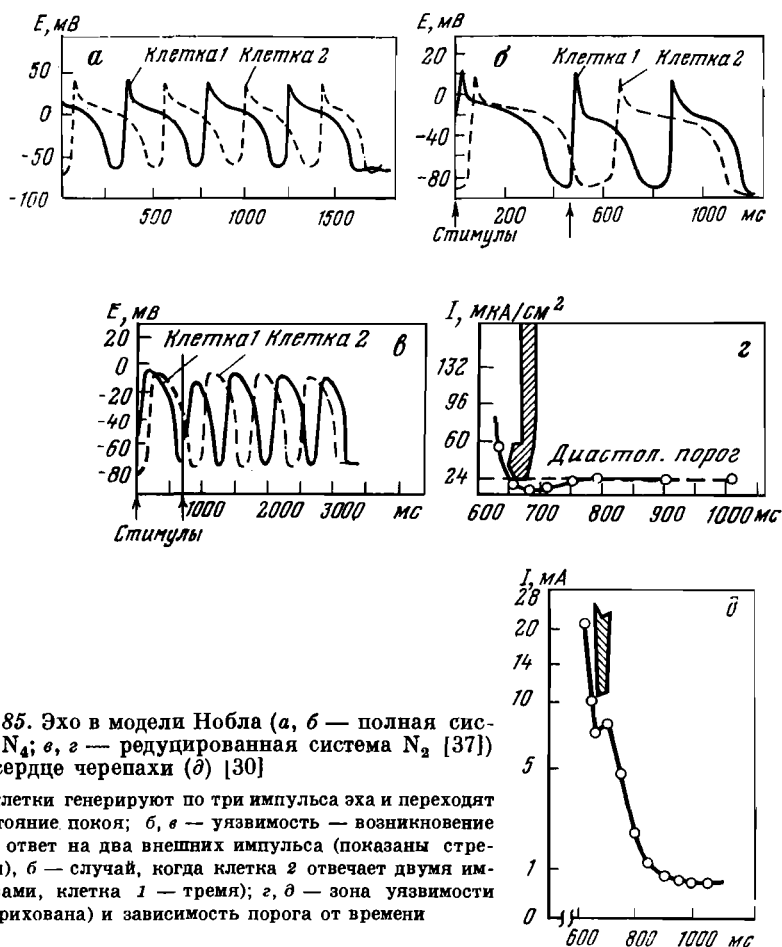


Рис. 85. Эхо в модели Нобла (а, б — полная система N_4 ; в, г — редуцированная система N_2 [37]) и в сердце черепахи (д) [30]

а — клетки генерируют по три импульса эха и переходят в состояние покоя; б, в — уязвимость — возникновение эха в ответ на два внешних импульса (показаны стрелками), б — случай, когда клетка 2 отвечает двумя импульсами, клетка 1 — тремя; г, д — зона уязвимости (заштрихована) и зависимость порога от времени

аритмии важна неоднородность ткани сердца. Более того, в определенных условиях (например, при гипотермии) несколько импульсов могут возникать даже в ответ на один стимул [36]. Оба эти эффекта удалось воспроизвести на модели Нобла.

Режим эха был получен для двух взаимодействующих клеток сердца, описываемых уравнениями Нобла [37]. Условия, необходимые для возникновения эха в этой модели четвертого порядка, оказались аналогичны условиям, полученным для системы второго порядка (см. раздел 7.2).

1. Особая точка в области потенциала покоя должна терять устойчивость при действии внешнего тока, иначе — должны воз-

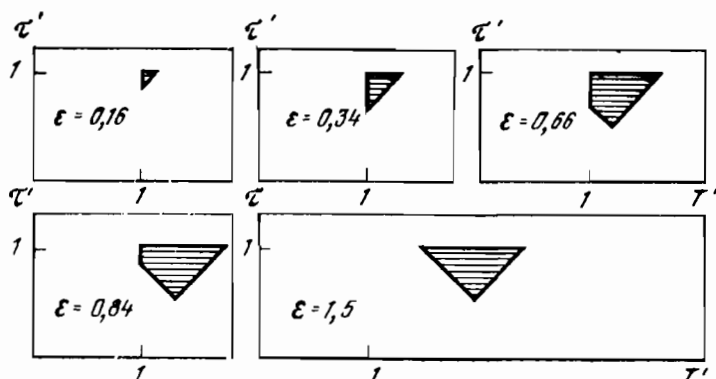


Рис. 86. Область уязвимости при возникновении эха
Безразмерные переменные те же, что на рис. 72.

никать повторные ответы при малых токах: $I \sim Du_A$, где D — коэффициент связи, u_A — амплитуда ПД.

2. Отношение длительности потенциала действия к периоду повторных ответов должно быть больше 0,5.

Первое из этих условий для уравнений Нобла выполняется всегда. Выполнение второго условия зависит, например, от значений постоянного времени калиевого тока $\tau_n(E)$ в окрестности потенциала покоя. Подбор значений параметров, при которых в модели Нобла (N_4) возникает режим эха, был осуществлен с помощью укороченной модели Нобла (системы второго порядка N_2 , см. раздел 4.1). Полученные примеры режимов эха приведены на рис. 85.

В такой системе оказалось возможным воспроизвести еще один феномен, наблюдаемый в тканях сердца. В экспериментах [30] показана связь уязвимости с так называемой супернормальностью: зона уязвимости, как правило, располагается над областью уменьшения порога (рис. 85). Зона уязвимости, вызванной возникновением эха в модели Нобла, обладает тем же свойством (рис. 85, г).

Оценка зоны уязвимости, вызванной возникновением источника эха, для τ -модели. Для этого случая ширину уязвимой зоны легко получить из оценки числа импульсов, которые необходимо послать на неоднородное волокно для возникновения эха. Формула (7.3) при $n_3 = 2$ задает область уязвимости в виде

$$R_M > \tau > \max [R_B - T, T - (R_B - R_M)], \quad T \geq R_M, \quad (7.9)$$

или в безразмерных переменных $\epsilon = (R_B - R_M)/R_M$, $T' = T/R_M$, $\tau' = \tau/R_M$

$$1 > \tau' > \max [T' - \epsilon, 1 - (T' - \epsilon)]T' \geq 1. \quad (7.10)$$

Область уязвимости, рассчитанная по этому неравенству для разных ε , показана на рис. 86. Видно, что ширина уязвимой зоны определяется не только неоднородностью среды по рефрактерности, но и величиной параметра $\tau' = \tau/R$ при любой неоднородности среды ε . Более того, существует критическое значение $\tau_{кр} = 1/2$, такое, что при $\tau' < \tau_{кр}$ ширина уязвимой зоны равна нулю независимо от остальных параметров среды.

Интересно, что неоднородность по рефрактерности по-разному влияет на ширину уязвимой зоны и на число экстрасистол. При уменьшении неоднородности область уязвимости уменьшается, но число экстрасистол растет. При уменьшении длительности возбужденного состояния τ происходит как сужение зоны уязвимости, так и уменьшение количества экстрасистол.

Глава восьмая

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИСТОЧНИКОВ ВОЛН. АВТОВОЛНОВЫЕ ПРОЦЕССЫ И СЕРДЕЧНЫЕ АРИТМИИ

В главе рассматривается взаимодействие источников волн — ревербераторов и источников эха. В отличие от автоколебательных элементов эти источники волн обладают рядом любопытных свойств, например они могут размножаться в неоднородных средах. Рассмотрим одну из прикладных проблем, где взаимодействие источников волн является существенным. При одной из опасных для жизни сердечных аритмий — фибрилляции желудочков сердца — возникает много независимых источников сокращений, дезорганизующих работу сердечной мышцы. Изучение механизмов размножения источников волн и параметров ткани, которые управляют этими процессами, может составить рациональную базу для поиска современных эффективных сердечных противоаритмических лекарственных средств и для понимания существенных черт автоволновых процессов в различных возбудимых средах.

8.1. Фибрилляция сердечной мышцы

В нормальных условиях сердце сокращается ритмично, возбуждаемое импульсами от синусного узла — сердечного водителя ритма. Синхронизация сокращения мышечных клеток сердца обеспечивается за счет распространения волн электрического возбуждения по возбудимым мембранам. Однако возможны такие режимы, когда отдельные элементы сердечной мышцы перестают подчиняться синусовому узлу и начинают возбуждаться без видимой

связи друг с другом. Такие режимы получили название фибрилляции. Фибрилляция приводит к исчезновению макросокращений и прекращению циркуляции крови. Фибрилляция желудочков сердца часто наблюдается при инфаркте миокарда и является одной из основных причин мгновенных летальных исходов. При определенных условиях (например, при попадании раздражающего импульса в уязвимую фазу) фибрилляцию можно воспроизвести и в здоровом миокарде животного.

Многочисленные экспериментальные исследования ([35, 42—45, 29], обзор [47]) привели к предположению, что одной из причин фибрилляции является возникновение замкнутых траекторий циркуляции возбуждения (reentry) и «случайных блужданий волны» в неоднородной по рефрактерности среде. Было показано, что возникновение фибрилляции облегчается при увеличении неоднородности тканей миокарда (по рефрактерности, по величине порога) и при уменьшении рефрактерности R и скорости распространения [16]. Первая проверка того, что этот механизм действительно в состоянии обеспечить самоподдерживающуюся аритмию, была предпринята Моу и др. [13]. На ЦВМ запрограммировали модель сердечной ткани, учитывающую такие свойства реального миокарда, как неоднородность по рефрактерности, зависимость рефрактерности от частоты, относительную рефрактерность. В модели фибрилляцию удавалось вызвать тем же способом, как ее воспроизводят экспериментально, нанося серию раздражающих импульсов с высокой частотой. Обнаружено, что в модели среды возникновение фибрилляции затрудняется при увеличении рефрактерности R , уменьшении степени неоднородности по рефрактерности ΔR и уменьшении характерного размера среды L . Эти данные подтверждали представления, которые сложились из экспериментальных работ.

Модель, запрограммированная в работе [13], слишком сложна, чтобы ее можно было исследовать аналитическими методами и быть уверенным, что выделены основные параметры, контролирующие процесс. Однако эта первая модель сыграла важную роль. Воспроизведение фибрилляции на ЦВМ-модели показало, что возникающие на неоднородной среде нерегулярные блуждания волны, в принципе, воспроизводят основные черты фибрилляции, в том числе и то, что она является самоподдерживающейся аритмией.

Исследование механизмов фибрилляции стало возможно после того, как были выделены источники волн и начато изучение их взаимодействия.

8.2. Синхронизация при взаимодействии источников волн

Взаимодействие пейсмейкеров. В главах 6 и 7 рассматривались источники волн в средах, где ни один из элементов не может самопроизвольно возбуждаться. Однако во многих биологических системах, и в частности в сердце, имеются клетки (клетки синусного и атриовентрикулярного узлов, волокна Пуркинью), которые могут периодически самопроизвольно возбуждаться. Такие клетки получили название пейсмейкеров. В возбудимой среде от пейсмейкера во все стороны распространяются волны в виде концентрических окружностей. Частота следования волн определяется периодом работы пейсмейкера.

Если в среде имеется несколько пейсмейкеров, работающих с разными периодами, то через некоторое время останется только один, период работы которого наименьший. Этот результат был получен Гельфандом и Цетлиным [48]. Ниже он иллюстрируется простейшим случаем взаимодействия двух пейсмейкеров. Рассмотрим длинный отрезок линейной возбудимой ткани, на концах которого расположены пейсмейкеры с периодами T_1 и T_2 ($T_1 < T_2$). Пусть первый импульс они выдали одновременно, тогда волны возбуждения встретятся и погаснут посередине между пейсмейкерами. Следующий импульс первый пейсмейкер выдает на $T_2 - T_1$ раньше второго, и место встречи сдвигается в сторону медленного пейсмейкера на величину $\delta = \frac{1}{2}v(T_2 - T_1)$. Далее место встречи будет сдвигаться шагами одинаковой величины δ в том же направлении, пока, наконец, некоторый импульс от первого пейсмейкера пройдет все расстояние между ними, так и не встретив волну второго. После этого медленный пейсмейкер попадает под влияние быстрого и начинает работать с его частотой (синхронизируется).

Приведенные результаты относятся к взаимодействию источников волн в формальных возбудимых средах (винеровской среде, т-модели). Для моделей в виде дифференциальных уравнений задача о взаимодействии спонтанно активных клеток — частный случай задачи о синхронизации генераторов; эта задача детально и в разных модификациях исследована в теории колебаний [49]. Здесь уже генераторы синхронизируются не на максимальной частоте, причем возможны различные варианты, в зависимости от других параметров генераторов (установившаяся частота может быть даже ниже собственной частоты каждого из двух генераторов [50]). Однако это касается лишь генераторов с непосредственной связью. Для генераторов, связанных через возбудимую среду (модель пейсмейкеров, расположенных в ткани сердца достаточно далеко один от другого), по-видимому, должен сохраняться тот же результат, что и для винеровской модели, так как место встречи волн от двух генераторов будет перемещаться в сторону более

медленного генератора. В результате этого медленный генератор не сможет влиять на быстрый.

Отсутствие синхронизации при взаимодействии ревербераторов. В отличие от пейсмекеров ревербераторы не синхронизируются. Это связано с тем, что период волн, посылаемых ревербератором, является минимально возможным для данного участка среды.

8.3. Размножение ревербераторов и фибрилляция

В среде, где есть несколько неоднородностей, возможно размножение ревербераторов. Волны, посылаемые ревербератором, возникшим на одной неоднородности, будут разрываться на других неоднородностях, если период волн достаточно мал (как было показано в главе 6, ревербератор посылает волны с минимально возможным периодом: $T_i = R_i$). Из разрывов аналогично тому, как описано в главе 6, могут образовываться новые ревербераторы.

Возникающий при этом на среде процесс по многим характеристикам аналогичен фибрилляции сердечной мышцы. Источники спиральных волн посылают волны с разными частотами ($T_i = R_i$) и не синхронизируются, что хорошо соответствует наблюдаемой в сердце дезорганизации сокращений. Конечное время жизни и размножение источников волн (глава 6), в результате чего они исчезают в одних местах и появляются в других, еще более «хаотизируют» процесс. Взаимодействие ревербераторов в неоднородной среде обнаруживает и другие свойства, характерные для фибрилляции: 1) малые по сравнению с длиной волны λ размеры фибриллирующего участка; 2) феномен уязвимости; 3) феномен критической массы; 4) конечное (при некоторых условиях) время фибрилляции; 5) феномен дефибрилляции.

Для перехода множественной экстрасистолы в фибрилляцию в модельной среде оказывается важным, выполнены ли условия для размножения ревербераторов. Точнее, тип режима, который установится в среде, определяется соотношением скоростей двух процессов — исчезновения и размножения источников волн:

$v_p \geq v_n$ — фибрилляция возможна,

$v_p < v_n$ — фибрилляция невозможна.

Если скорость размножения v_p больше, чем скорость исчезновения v_n , то в среде оказывается возможной длительная нерегулярная активность, аналогичная фибрилляции. При обратном соотношении скоростей фибрилляция невозможна. Здесь возникает ситуация, аналогичная цепным реакциям, и появляются критические значения характеристик, при превышении которых возможна фибрилляция. Одна из них — критическая масса $M_{кр}$, аналогичная известной для миокардиальной ткани [14].

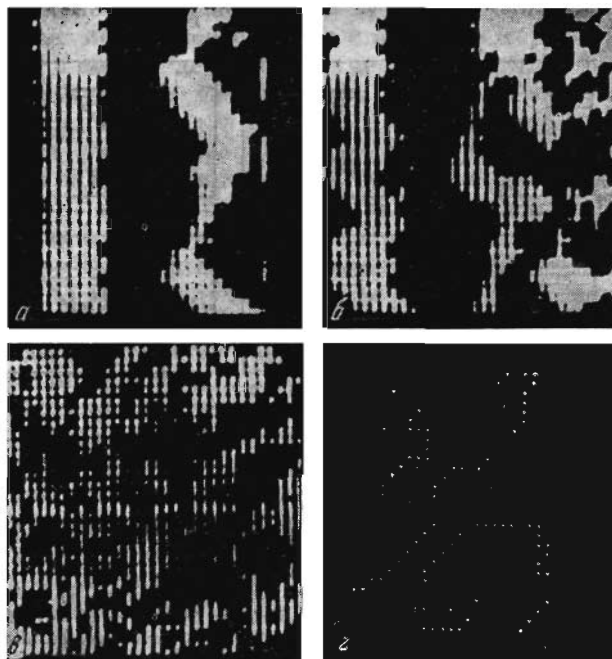


Рис. 87. Возникновение фибрилляции в модели возбудимой среды (фото с дисплея ЦВМ)

а — две волны, распространяющиеся справа налево; видно искривление фронта второй волны и появление разрыва; б — начало фибрилляции; в — развитая фибрилляция (подсвечены элементы среды, находящиеся в возбужденном состоянии; $\tau = 7$, $\bar{R} = 17$, $l_1 \times l_2 \approx 2\lambda \times 2\lambda$); г — при уменьшении отношения τ/R хорошо видны отдельные ревербераторы (подсвечен только передний фронт волны; $\tau = 2$, $R = 6$)

Параметры, контролирующие уязвимость и фибрилляцию, исследовались на ЦВМ в работе [51]. ЦВМ-программа моделировала среду винеровского типа со случайным (гауссовым) распределением параметров. На дисплее ЦВМ можно было визуально наблюдать возникновение разрывов волн на неоднородной по рефрактерности среде, развитие из них ревербераторов, возникновение и развитие фибрилляции. Меняя параметры среды, можно было менять число и размеры разрывов волн, время жизни и скорость размножения ревербераторов. С дисплея ЦВМ был снят фильм, демонстрирующий эти процессы. На рис. 87 показано возникновение фибрилляции в среде с размерами $\sim 2\lambda \times 2\lambda$ при $\tau/R \sim 0,1$. Здесь картина сразу становится хаотичной, так как одновременно возникает много источников волн, и волны от отдельных ис-

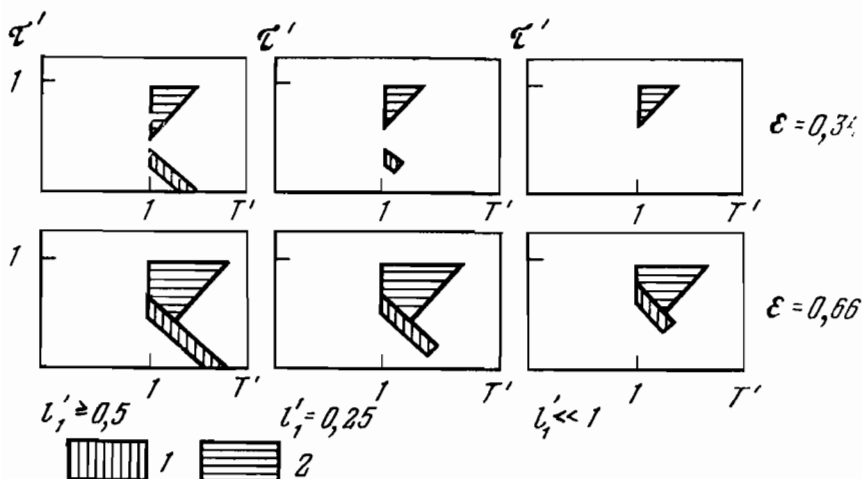


Рис. 88. Область уязвимости для неоднородности с размерами $l_1 \times l_2$ при различных l_1' и ϵ ($l_2 = 0,125$)

Безразмерные переменные: $l_i = l_i/\lambda$, где λ — длина волны; $\epsilon = (R_1 - R)/R$ — степень неоднородности по рефрактерности; $\tau' = \tau/R$; $T' = T/R$. 1 — область возникновения ревербератора; 2 — область возникновения эха. Видно, что уменьшение параметра τ' блокирует уязвимость только в случае неоднородности малых размеров

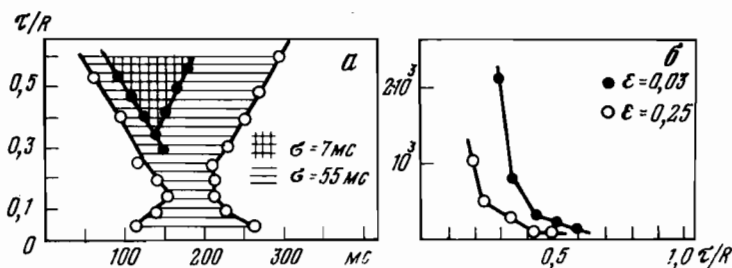


Рис. 89. Область уязвимости (а) и «критическая масса» фибрилляции (б) для случайной среды с гауссовым распределением рефрактерности (расчет на ЦВМ)

σ — среднеквадратичное отклонение рефрактерности, $\epsilon = \sigma/R$. Здесь, как и на рис. 88, уязвимость блокируется при уменьшении τ/R только при неоднородностях малых размеров (возникающих при малых σ) и не блокируется при больших σ , когда возникали неоднородности с размерами $\sim \lambda$. Рассчитывалась среда с размерами $2\lambda \times 2\lambda$. Для б ордината — минимальное число элементов в матрице, при котором возможна фибрилляция

точников увидеть не удастся. Если число источников волн уменьшается, отдельные ревербераторы становятся хорошо видны (рис. 87, з). Этого можно достигнуть уменьшением τ/R ; при дальнейшем уменьшении τ/R фибрилляция прекращается.

Уязвимость на случайной среде. Возникновение ревербератора, как уже говорилось, воспроизводит основные черты уязвимости и позволяет анализировать ее зависимость от параметров. Для среды с неоднородностью по рефрактерности правильной формы область уязвимости была рассчитана аналитически (см. главу 6); для среды со случайным распределением рефрактерности (модель ткани сердца) были получены оценки на ЦВМ [51] (рис. 88, 89, а). Качественная зависимость области уязвимости от параметров для такой среды сохраняется такой же, как и в среде с детерминированной неоднородностью. Было обнаружено, что в случае неоднородности больших геометрических размеров ($l \geq 0,5\lambda$) определяющими являются параметры, найденные Моу [13]: R и ΔR . В случае неоднородностей малых размеров ($l < 0,5\lambda$), что представляет наибольший физиологический интерес, существенную роль играет уже упоминавшийся важный параметр τ/R . Здесь уменьшение τ/R блокирует уязвимость.

Фибрилляция на случайной среде. При попадании раздражающего импульса в уязвимую фазу в среде со случайным распределением рефрактерности могут оказаться выполненными условия для размножения источников, и возникает самоподдерживающаяся активность (фибрилляция).

Зависимость критической массы фибрилляции от параметров τ -модели изучалась теоретически [32] и на ЦВМ [51]. Так как скорости умирания и размножения ревербераторов зависят от τ/R , то и критическая масса оказалась сильно зависящей от τ/R (рис. 89, б). При уменьшении τ/R всего в два раза (от 0,5 до 0,25) она увеличивалась более чем в 17 раз ($\epsilon = 0,03$). Изменение ϵ -степени неоднородности среды по рефрактерности влияет на критическую массу, но значительно слабее, чем τ/R .

Таким образом, полученные оценки как для характеристик отдельных ревербераторов, так и для фибрилляции, вызванной их взаимодействием, показывают, что кроме традиционно исследуемых параметров важную роль, особенно в случае неоднородностей малых размеров, играет еще один параметр — τ/R .

8.4. Взаимодействие источников эха

Как уже упоминалось, взаимодействие источников волн оказывается гораздо проще исследовать для случая взаимодействия источников эха, где все основные вопросы удается решить аналитически. Анализ можно значительно упростить, используя понятия времени запуска и времени жизни источников волн. Время запус-

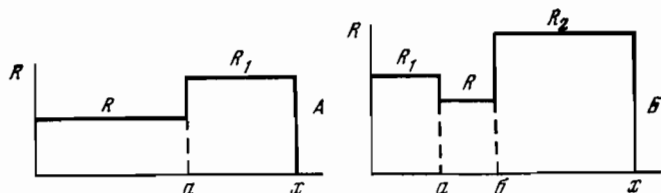


Рис. 90. Распределение рефрактерности в волокне, при котором может возникнуть один (А) или два (Б) источника эха

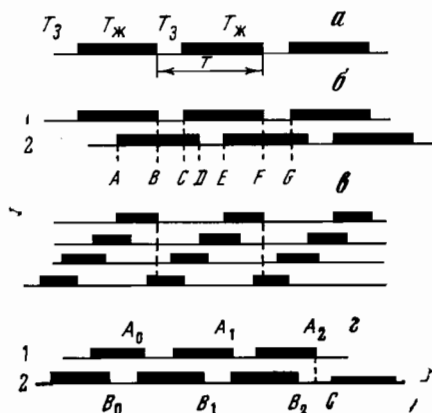


Рис. 91. Источники эха в возбудимой среде

а — запись состояния одного источника;
б — источники 1 и 2 запускают друг друга;
в — взаимодействие четырех источников;
г — окончание фибрилляции

ка T_3 — время, в течение которого на неоднородность необходимо посылать импульсы извне, чтобы возник первый импульс эха; время жизни $T_{ж}$ — время, в течение которого источник сам генерирует импульсы.

Для среды, показанной на рис. 90, А, источник эха может возникнуть в точке а. Для этой среды время жизни источника эха в τ -модели возбудимой среды описывается выражением

$$T_{ж} = R \left(\left[\frac{\tau}{R_1 - R} \right] - \left[\frac{R - \tau}{R_1 - R} \right] \right), \quad (8.1)$$

следующим из $T_{ж} = Rn_{ж}$, аналогично формуле (7.4). Если на эту среду подавать извне импульсы с периодом $T = R$, то, как следует из формулы (7.3),

$$T_3 = R \left[2 + \frac{R - \tau}{R_1 - R} \right], \quad (8.2)$$

где [...] означает целую часть числа.

Если на среду импульсы извне поступают непрерывно, то на неоднородности в точке а будет наблюдаться следующая картина: по истечении времени T_3 на ней возникает источник импульсов, который затем в течение $T_{ж}$ сам генерирует импульсы, после чего он исчезает и появляется вновь через время T_3 и т. д. (рис. 91, а).

Картина периодически повторяется с периодом $T_B = T_3 + T_{ж}$, который будем называть периодом восстановления источника.

Незатухающая активность при взаимодействии двух источников эха. Пусть рефрактерность на среде распределена, как это показано на рис. 90, Б. Тогда источники импульсов могут возникнуть в точках a и b , а при подходящих параметрах они могут бесконечно долго запускать друг друга. Понятия времени жизни и времени запуска позволяют для анализа взаимодействия источников эха использовать ту же технику, что и для анализа одиночного источника эха (рис. 91). Рассматривая взаимодействие источников импульсов, будем считать, что они расположены так близко один от другого, что временем распространения импульса можно пренебречь по сравнению со всеми временами рефрактерностей, с которыми мы будем далее оперировать.

«Историю» источников можно изобразить схемой, показанной на рис. 91, б. В течение времени AB работают оба источника, в течение времени BC второй источник запускает первый, в течение времени CD опять работают оба источника, в течение времени DE первый источник запускает второй и т. д.

Чтобы процесс взаимного запуска был возможен, необходимо, чтобы выключившийся источник получал импульсацию по крайней мере в течение времени запуска T_3 , т. е. надо, чтобы

$$T_{31} < T_{ж2}, \quad T_{32} < T_{ж1}. \quad (8.3)$$

Процесс может длиться неограниченно долго, если периоды восстановления источников равны: $T_{B1} = T_{B2}$. Если же периоды восстановления T_{B1} и T_{B2} не равны, то фаза источников будет «ползти» и наступит момент, когда они выключаются одновременно. Из формул (8.1)—(8.3) следует, что для возникновения незатухающей активности необходимо, чтобы: 1) длительность возбужденного состояния τ удовлетворяла условию $\tau/R > 2/3$ (мы здесь приняли, что неоднородность среды по рефрактерности мала: $R_1 - R \ll \min \tau, R - \tau$); 2) начальная расфазировка источников удовлетворяла условию $\varphi_0 > T_{31}$.

Начальная расфазировка источников может возникнуть, например, следующим образом. Пусть рефрактерность в волокне распределена, как на рис. 90, Б. Если в любую точку волокна между a и b подавать импульсы с периодом T ($R_1 < T < R_2$), то эта импульсация вызовет возникновение источника эха на неоднородности b , но не в a (так как $T > R_1$). От возникшего на неоднородности b источника импульсы будут следовать с периодом $R < R_1$, и эти импульсы спустя время T_3 вызовут возникновение источника в точке a .

Минимальное число источников, обеспечивающих незатухающую активность. Как следует из соотношения (8.3), два источника, у которых время жизни короче времени запуска (при $\tau/R <$

$< 2/3$), не могут запускать друг друга. В этом случае для фибрилляции необходимо большое число источников. Оценим минимальное число источников $K_{\min}$, обеспечивающих незатухающую активность (при $\tau/R < 2/3$). Взаимный запуск источников при этом может происходить, например, по схеме, показанной на рис. 91, в. Здесь источники сфазированы так, что, хотя времена запуска больше, чем время жизни любого из источников, всякий погибший источник непрерывно получает импульсы в течение времени T_{3i} (хотя и от разных источников).

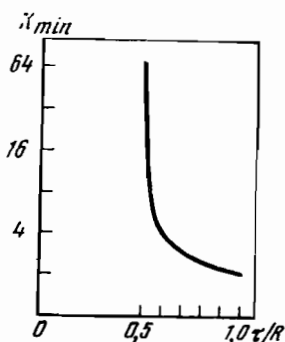


Рис. 92. Минимальное число источников эха ($K_{\min}$), обеспечивающих незатухающую активность

Чтобы упростить рассмотрение, будем считать далее, что все источники работают с одинаковым периодом (т. е. рефрактерность всюду на среде равна R , кроме небольших изолированных участков, рефрактерности R_i которых превышают R и близки ($R_i \approx R_1$); на них и возникают источники импульсов.

Предположим также, что между двумя любыми неоднородными участками существует путь по среде с рефрактерностью R . Как видно из рис. 91, в, минимальное число источников $K_{\min}$,

которые могут обеспечить незатухающую активность, равно

$$K_{\min} = 1 + [T_B/T_{\text{ж}}]. \quad (8.4)$$

Подставив сюда выражения (8.1), (8.2), получим

$$K_{\min} = \frac{2 + [\tau/(R_1 - R)]}{[\tau/(R_1 - R)] - [(R - \tau)/(R_1 - R)]} + 1. \quad (8.5)$$

В случае малой разницы рефрактерностей ($R_1 - R \ll \tau$, $R - \tau$) формула для $K_{\min}$ принимает простой вид:

$$K_{\min} \approx \tau/(2\tau - R) \quad (\tau/R > 1/2). \quad (8.6)$$

Видно, что $K_{\min}$ велико при значениях τ/R , близких к $1/2$, и быстро уменьшается при увеличении τ/R (рис. 92).

Среднее время фибрилляции. Окончание фибрилляции при взаимодействии двух источников эха показано на рис. 91, г. Аналогично может прекращаться фибрилляция и при взаимодействии нескольких источников. Для случая, когда процесс взаимодейст-

¹ $K_{\min}$ является аналогом электрофизиологической характеристики критической массы фибрилляции.

вия источников является эргодическим, получена оценка среднего времени фибрилляции [32].

$$\bar{T}_\Phi \approx \left(\frac{\tau/R}{1 - \tau/R} \right)^K \cdot \bar{T}_3; \quad \left(\tau/R > \frac{1}{2} \right).$$

Время фибрилляции оказывается тем больше, чем больше число K источников волн на среде; при больших K время фибрилляции очень быстро возрастает при увеличении τ/R .

Любопытно сопоставить это с тем, что в предсердии собаки вызванная в эксперименте фибрилляция (мерцание) прекращается через 1—2 мин, а фибрилляция желудочков самопроизвольно не кончается и через несколько минут приводит к гибели животного.

8.5. *Связь параметров возбудимых сред с характеристиками дифференциального уравнения мембраны*

В моделях возбудимых сред одним из основных параметров, от которых зависит возникновение автоволновых процессов, является безразмерная характеристика τ/R , где τ и R — длительности возбужденного и рефрактерного состояний. Характеристики возбудимых мембран и их ионные токи, определяющие длительность рефрактерного состояния R , изучены достаточно детально.

Чтобы управлять автоволновыми процессами на практике, нужно знать, чему соответствует параметр τ в реальных биологических возбудимых системах, нервных волокнах, электрических синцитиях, важно выяснить, как связаны эти параметры с характеристиками мембраны, со свойствами клеточных контактов.

Для ответа на эти вопросы требуются более детальные модели. Первым шагом к моделям такого типа являются цепочки электрически связанных релаксационных генераторов — клеток. Каждая клетка в такой модели описывается дифференциальным уравнением второго порядка типа Бонгоффера — Ван дер Поля (BVP). К системе типа BVP, как показано в главе 4, приводятся уравнения Ходжкина — Хаксли для мембран, а как она кальмара, уравнения Нобла для мембраны клетки сердца. Достоинством таких уравнений является возможность применения качественных методов теории дифференциальных уравнений, метода нуль-изоклин.

Как показано в работе [53], параметр τ может быть интерпретирован как максимальная латентность ($\theta_{\max}$), возникающая при передаче возбуждения (см. также раздел 8.8).

Один из важных результатов, полученных при анализе цепочек электрически связанных клеток, состоит в следующем. Показано [54], что максимальная латентность $\theta_{\max}$ определяется устойчивостью особой точки дифференциального уравнения мембраны при изменении одного из параметров (внешнего тока, рис. 93).

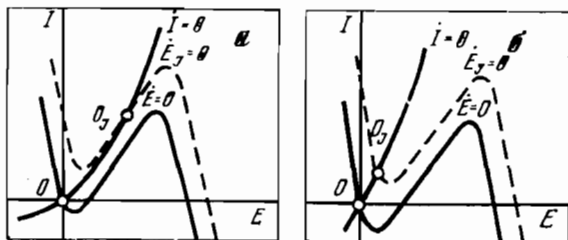


Рис. 93. Нуль-изоклины мембран двух типов с большой (а) и малой (б) латентностью

Пунктиром показано положение изоклины $E = 0$ при внешнем токе $I_0 = D \cdot E_A$. а — особая точка теряет устойчивость (точка O устойчива, O_I неустойчива); б — особая точка сохраняет устойчивость (точки O и O_I устойчивы)

Если особая точка теряет устойчивость при некотором определенном далее значении внешнего тока I_0 , то латентность $\theta_{\max}$ велика (порядка длительности потенциала действия). Если устойчивость не теряется, то $\theta_{\max}$ мала (порядка длительности переднего фронта ПД). Это означает, что для сердечных клеток диапазон изменения $\theta_{\max} \sim 10^2$.

Как будет показано ниже, этот результат имеет два практически важных следствия. Во-первых, он позволяет интерпретировать $\theta_{\max}$ в терминах ионных токов мембран (так как ионные токи определяют форму нуль-изоклин, см. главу 5). Во-вторых, он позволяет связать $\theta_{\max}$ с просто измеряемыми в эксперименте электрофизиологическими характеристиками мембраны — током возникновения повторных ответов и аккомодацией. Это означает, что для оценки эффективности антиаритмических препаратов вместо $\theta_{\max}$, в принципе, можно использовать ток повторных ответов и аккомодацию.

Покажем коротко, как анализируется механизм возникновения латентности в простейшей цепочке, состоящей всего из двух одинаковых клеток. Уравнения такой цепочки имеют вид:

$$\mu \dot{E}_1 = f(E_1) + I_1 + z(E_1, E_2), \quad I_1 = \varphi(E_1, I_1), \quad (8.7a)$$

$$\mu \dot{E}_2 = f(E_2) + I_2 + z(E_2, E_1), \quad I_2 = \varphi(E_2, I_2), \quad (8.7b)$$

где

$$\mu \ll 1.$$

Подсистема (8.7a) описывает клетку 1, а подсистема (8.7b) — клетку 2. Связь между клетками задается членом связи

$$z(E_1, E_2) = -z(E_2, E_1) = D(E_2 - E_1). \quad (8.8)$$

Член $D(E_2 - E_1)$ описывает ток, текущий через клетку 2 от клетки 1. При $D = 0$ подсистемы (8.7a) и (8.7b) совпадают.

Как будет видно из дальнейшего анализа, результаты справедливы не только для цепочек, состоящих из клеток, описывающихся уравнениями ВВР, но и для более широкого класса систем с похожим фазовым портретом. Так, с некоторыми поправками все это относится и к клеткам, описывающимся редуцированными уравнениями Ходжкина — Хаксли и Нобла. Поэтому здесь не конкретизируется вид функций $f(E)$ и $g(E)$. Обратим внимание, что в подсистемах (8.7а) и (8.7б), как и в модели ВВР, при изменении z (внешнего тока) происходит сдвиг изоклины $\dot{E} = 0$ по оси I на величину z . Это свойство будет использоваться ниже при анализе.

Анализ латентности проводится методом фазового портрета. Предполагается, что первой возбуждается клетка 1 (при $t = 0$ клетка 2 находится в состоянии, соответствующем вершине потенциала действия), и изучается зависимость латентности ответа клетки 2 от начальных условий.

Для частного случая, когда форма потенциала действия близка к прямоугольной, анализ существенно упрощается, и вместо полной системы (8.7) можно рассматривать только подсистему (8.7б). При этом действие клетки 1 на клетку 2 описывается с помощью эквивалентного генератора тока

$$I(t) = DE_1(t) = \begin{cases} DE_A & \text{при } t \leq \tau, \\ 0 & \text{при } t > \tau, \end{cases} \quad (8.9)$$

где τ — длительность, E_A — амплитуда потенциала действия. Таким образом, задача сводится к изучению зависимости латентности ответа в подсистеме (8.7б) (уже системе второго порядка вместо четвертого!) от начальных условий в момент включения внешнего тока $I_{\text{вн}}(t)$.

Для рассматриваемого частного случая

$$\theta_{\text{max}} \begin{cases} \sim \tau & \text{при } I_{\text{кр}}/D < E_A, \\ \sim 0 & \text{при } I_{\text{кр}}/D > E_A, \end{cases} \quad (8.10)$$

где $I_{\text{кр}}$ — значение тока $I_{\text{вн}}$, при котором особая точка подсистемы (8.7б) теряет устойчивость. Для потенциала действия прямоугольной («реальной») формы θ_{max} оказывается равной длительности этого ПД, отсчитываемой на уровне $E_0 = I_{\text{кр}}/D$.

Эти результаты были получены следующим образом. На фазовом портрете подсистемы (8.7б) были рассмотрены типы траекторий, возникающие при включении тока в различные фазы возбуждения. На рис. 94, а показана траектория, возникающая в случае, когда клетка находится в состоянии покоя. Движение из начальной точки P в точку A быстрое, задержка отсутствует (точка A соответствует вершине потенциала действия). На рис. 94, б — г показаны траектории, возникающие, когда при $t = 0$ клетка находится в состоянии рефрактерности. Траектория, при

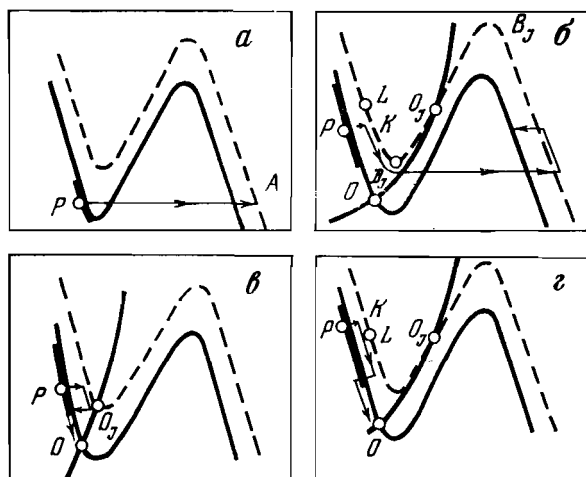
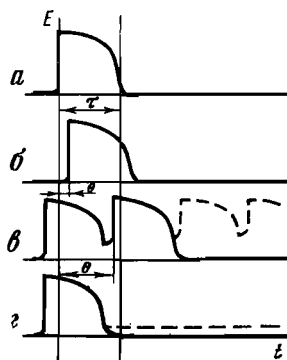


Рис. 94. Движения на фазовой плоскости, соответствующие большой и малой латентности

a — траектория в норме; начальные условия («покой») выделены толстой линией; ответ (быстрое движение из *P* в *A*) возникает без задержки; *б — г* — ответы, когда начальные условия (толстая линия) соответствуют состоянию рефрактерности; *б* — точка O_I неустойчива, возникает большая задержка, вызванная медленным движением на участке KD_I ; *в* — точка O_I устойчива, ответ отсутствует; *г* — точка O_I неустойчива, но за время действия стимула представляющая точка не успевает дойти до точки срыва D_I , и ответ отсутствует. Пунктиром показано положение изоклины $\dot{E} = 0$ при внешнем токе

Рис. 95. Задержки при передаче возбуждения от клетки к клетке

a — потенциал действия клетки 1, его передний фронт соответствует $t = 0$; *б — г* — потенциалы действия клетки 2 при различных условиях; *б* — норма (при $t = 0$ клетка 2 в покое, задержка мала ($\theta \ll \tau$)). *в* — большая задержка ($\theta \sim \tau$) (при $t = 0$ клетка рефрактерна); *г* — ответ отсутствует, начальные условия те же. Различие рис. *в* и *г* обусловлено различным поведением под внешним током (показано пунктиром): *в* — есть повторные ответы, *г* — повторные ответы отсутствуют



которой возникает большая задержка, приведена на рис. 94, б. На ней имеется участок KD_I , где движение медленное. Латентность примерно равна времени движения по этому участку $\theta \approx \approx t_{KD_I}$. Легко видеть, что траектории типа изображенных на рис. 94, б могут наблюдаться только в случае, когда особая точка подсистемы (8.76) при $z = DE_A$ (на рисунке она отмечена, как O_I) неустойчива, т. е. когда ток потери устойчивости $I_{кр} < DE_A$. Если подсистема (8.76) этому условию не удовлетворяет, возникают траектории типа изображенных на рис. 94, в, когда клетка вообще не возбуждается в ответ на включение тока. Достигнув устойчивой особой точки, представляющая точка системы будет находиться там вплоть до выключения тока, после чего переходит в состояние покоя O . На рис. 94, г иллюстрируется невозможность задержек, превышающих длительность плато потенциала действия τ . Точка L соответствует $\theta_{\max} = t_{LD_I} = \tau$. Если начальные условия таковы, что начальная точка P расположена выше L , то возбуждение не возникает (траектория такого же типа, что и на рис. 94, в). Это связано с тем, что $t_{KD_I} > \tau$, и ток выключается прежде, чем представляющая точка системы достигнет D_I .

Опишем некоторые следствия из этих результатов.

$\theta_{\max}$ и повторные ответы. Рассмотренный механизм возникновения латентности тесно связан с возникновением в мембране повторных ответов — автоколебаний под внешним током. Потеря устойчивости особой точки под током означает возможность возникновения повторных ответов. Это позволяет по наличию или отсутствию повторных ответов оценивать величину $\theta_{\max}$.

Механизм возникновения в мембранах с повторными ответами большой латентности, сравнимой с длительностью потенциала действия, легко понять на качественном уровне. Обратимся к рис. 95.

Пусть в момент возбуждения клетки 1 клетка 2 находится в состоянии рефрактерности. Пока клетка 1 возбуждена, она является источником тока через клетку 2. Если величина тока достаточна для возникновения автоколебаний, то через некоторое время, определяемое периодом автоколебаний, появится импульс, который и будет зарегистрирован как ответ клетки 2, появившийся с большой задержкой. Импульсы, показанные пунктиром, не появятся, так как с окончанием потенциала действия клетки 1 исчезает внешний ток. В мембранах, где постоянный ток не может вызывать автоколебаний, больших задержек не возникает, так как при тех же начальных условиях передача возбуждения блокируется. На первый взгляд кажется, что больших задержек не появится и в случае, когда период автоколебаний велик (межимпульсные интервалы больше длительности потенциала действия). Детальный анализ, проведенный выше, показывает, что и в этом случае $\theta_{\max} \simeq \tau$ — длительность потенциала действия.

Зависимость $\theta_{\max}$ от наклона медленной нуль-изоклины. Для прикладной задачи поиска антиаритмических препаратов особый интерес представляют воздействия, которые влияют на латентность. Легко видеть, что таким свойством обладают воздействия, меняющие наклон изоклины $I = 0$. При этом мембрану можно перевести из одного класса ($\theta_{\max} \sim \tau$) в другой ($\theta_{\max} \sim 0$), не меняя порога возбуждения и амплитуды потенциала действия (см. рис. 93).

Латентность и аккомодация. В рассматриваемой модели величина $\theta_{\max}$ оказывается тесно связанной с аккомодационными свойствами мембраны, а именно для клеток с хорошей аккомодацией $\theta_{\max}$ мало ($\theta_{\max} \ll \tau$).

Действительно, клетки, в которых наблюдается феномен минимального градиента — отсутствие возбуждения при медленно нарастающем токе стимуляции, заведомо таковы, как на рис. 93, б: это объясняется тем, что в рассматриваемой модели минимальный градиент возможен лишь в том случае, если изоклина $I = 0$ вертикальна. При этом точка O_I устойчива при любом внешнем токе. Если наклон изоклины уменьшается (см. рис. 93, а), аккомодационные свойства ухудшаются. Клетка возбуждается при каком угодно медленном нарастании тока, лишь только он достигает некоторого порогового значения $I_{кр}$, при котором точка O_I становится неустойчивой.

8.6. Стационарные и нестационарные режимы распространения

В τ -модели возбудимой среды предполагается, что скорость распространения импульсов при стационарном режиме распространения не зависит от частоты следования импульсов. Однако в реальных возбудимых тканях такая зависимость есть. На рис. 96 показана зависимость скорости от фазы в миэлинизированном волокне жабы. Видно, что с уменьшением интервала T между импульсами скорость распространения уменьшается, и существует некоторое минимальное значение скорости, соответствующее границе стационарного режима. Возможно ли распространение с еще меньшими скоростями? При каких условиях? Эти вопросы оказываются важны как для исследования механизмов возникновения сердечных аритмий (напомним, что размеры сердца невелики по сравнению с длиной волны λ), так и для «конструирования» новых антиаритмических препаратов.

Одной из простейших моделей возбудимых сред, позволяющих изучать эти вопросы, является θ -модель. τ -модель представляет собой частный случай этой более общей модели. θ -модель исследуется с помощью метода лестничных диаграмм. В качестве примеров

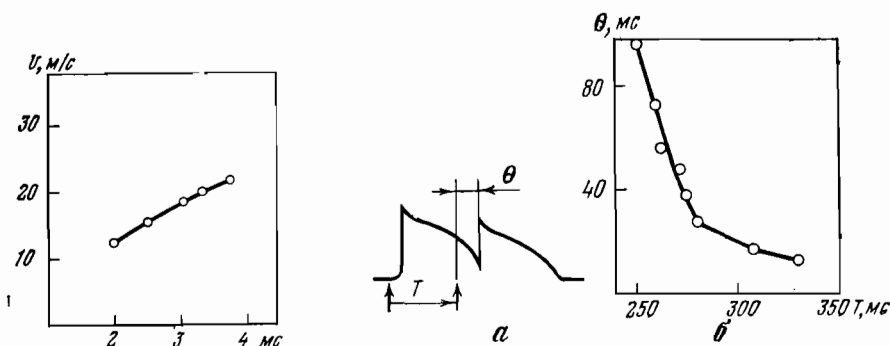


Рис. 96. Зависимость скорости распространения импульса (V) от фазы рефрактерности в миэлинизированном волокне жабы [78]

Рис. 97. Латентность в сердечной ткани

a — осциллограмма при тестировании двумя стимулами (показаны стрелками); T — интервал между двумя стимулами, θ — латентность; b — зависимость латентности от интервала T для сердца кошки (препарат волокно Пуркинье — папиллярная мышца [80])

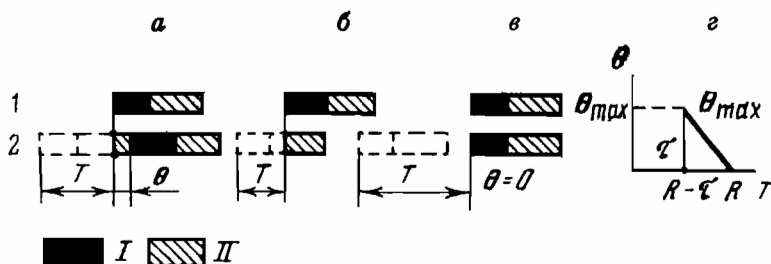


Рис. 98. Возникновение латентности в цепочке из двух элементов при различных начальных состояниях элемента 2 (τ -модель)

a — элемент 2 возбуждается через время θ после элемента 1 (большая латентность); b — передача блокируется; c — передача возбуждения происходит мгновенно ($\theta = 0$); d — зависимость латентности от начального состояния элемента 2. I — возбужденное состояние; II — рефрактерное состояние

будет проанализирован процесс установления стационарного режима при периодической стимуляции и пример нестационарного режима — трансформация ритма. Далее θ -модель будет использоваться, чтобы установить связь между τ/R и параметрами, измеряемыми в ткани сердца.

Свойства элемента в θ -модели. Функция $\theta(T)$. Введем фазу как время T , прошедшее с момента возбуждения элемента. Фазы от 0 до T_{abs} соответствуют состоянию абсолютной рефрактерности (R_{abs}), т. е. состоянию, когда элемент невозможно возбудить. При

нанесении раздражения в более позднюю фазу элемент возбуждается после некоторого латентного периода θ , являющегося монотонно убывающей функцией фазы T в момент нанесения раздражения. На рис. 97 показана зависимость $\theta(T)$, которая наблюдается в миокарде при последовательном нанесении двух раздражающих импульсов, разделенных интервалом времени T .

$\theta(T)$ в τ -модели. Нетрудно построить зависимость $\theta(T)$ для τ -модели. Пусть имеется цепочка из двух элементов. Легко видеть, что если элемент 1 возбудится в момент, когда элемент 2 еще не перешел в состояние покоя, то возникнет задержка θ (рис. 98) в передаче возбуждения с элемента 1 на элемент 2. Для этого элемент 1 должен возбудиться через время $T < R$ после возбуждения элемента 2. Зависимость $\theta(T)$ для τ -модели приведена на рис. 98, δ и представляет собой отрезок прямой, наклоненной под углом 45° . Фазы от 0 до R — τ соответствуют абсолютной рефрактерности (рис. 98, δ , ε), фазы $T > R$ — покою ($\theta = 0$). Максимальная задержка в τ -модели $\theta_{\max}$ равна τ . Последний факт был использован для оценки величины τ в миокарде по виду экспериментальной зависимости $\theta(T)$.

Скорость распространения в θ -модели не постулируется, как в τ -модели, а определяется по виду $\theta(T)$. Рассмотрим длинную цепочку одинаковых элементов, на край которой подаются раздражающие импульсы с периодом T_s . Как будет показано ниже, в установившемся режиме элемент 1 (на который подаются импульсы от стимулятора) будет возбуждаться с некоторой постоянной задержкой θ по отношению к стимулятору [см. формулу (8.12)]. Задержка элемента 2 составит уже 2θ , (для нее стимулятором является элемент 1), n -го элемента — $n\theta$, и т. д. Если положить линейный размер элемента равным l , скорость распространения в такой цепочке будет определяться, как отношение l/θ_{st} .

Найдем θ_{st} . Рассмотрим клетку, на которую от соседней клетки или от стимулятора поступают импульсы с периодом T_s (рис. 99). Из рис. 99, a видно, что время от $(n-1)$ -го срабатывания клетки до поступления n -го стимула равно $T_n = T_s - \theta_{n-1}$. Латентный период θ_n является функцией от этого времени: $\theta_n = \theta(T_n)$. Отсюда следует рекуррентное соотношение

$$\theta_n = \theta(T_s - \theta_{n-1}). \quad (8.11)$$

Если в уравнении (8.11) положить $\theta_n = \theta_{n-1} = \theta_{st}$, получим уравнение для установившегося значения латентного периода

$$\theta_{st} = \theta(T - \theta_{st}). \quad (8.12)$$

Это уравнение может быть решено методом лестничных диаграмм.

Решение уравнения (8.12) находится, как точка пересечения прямой, проведенной с наклоном 1 из точки T_s (график функции $T = T_s = \theta$) и графика $\theta(T)$ (рис. 99).

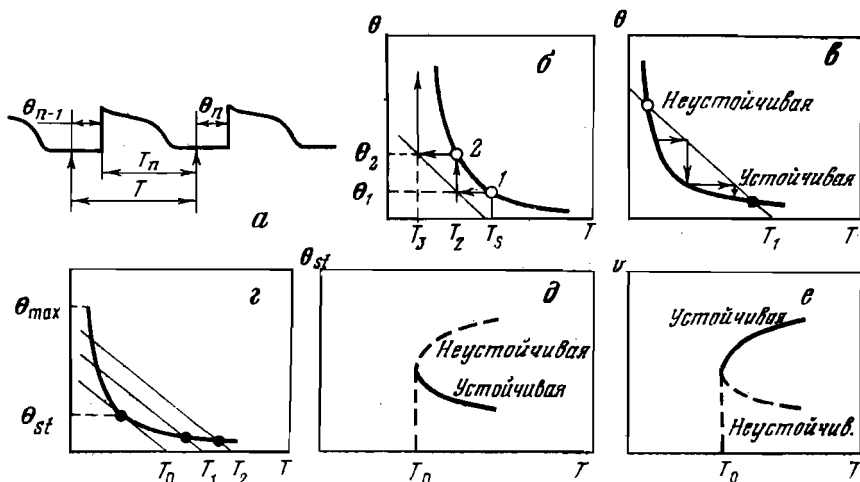


Рис. 99. Возникновение большой латентности при нестационарных режимах (θ -модель)

a — стимулы и ответы; *б* — изменение латентности в одном из нестационарных режимов — трансформации ритма (два импульса проходят, третий выпадает); θ_1 и θ_2 — латентности первого и второго импульсов; T_s — период стимуляции; кривая — зависимость $\theta(T)$; прямая проведена из точки T_s с наклоном 1 для решения методом лестничных диаграмм уравнения $\theta_n = f(T - \theta_{n-1})$; *г* — два установившихся значения латентности при стационарном распространении ($T_1 > T_0$, см. рис. *г*). Большее значение θ неустойчиво, меньшее — устойчиво. Стрелки показывают установление стационарного режима; *г* — влияние изменения периода стимуляции. Видно, что максимальная латентность в нестационарном режиме ($\theta_{\max}$) больше, чем в стационарном режиме (θ_{st}); *д* — зависимость стационарного значения латентности θ_{st} от периода стимулов T , построенная по рис. *г*; *е* — та же зависимость для скорости ($V \sim 1/\theta$)

Две скорости. Уравнение (8.12) может иметь два решения (рис. 99, *е*), каждому из которых соответствует своя скорость распространения. Можно показать, что большая скорость устойчива, это так называемая скорость горения. Меньшая скорость неустойчива («тление») и в эксперименте в стационарном режиме наблюдаться не может.

Зависимость $v(T)$. Также графически в θ -модели определяется и зависимость $v(T)$. При увеличении частоты следования импульсов (переход от T_2 к T_1 на рис. 99, *г*) скорость распространения (устойчивая) уменьшается ($\theta_1 > \theta_2$). $v(T)$ — монотонно убывающая функция. Неустойчивая скорость при этом возрастает. Обе скорости при уменьшении T_s сближаются. Минимальное значение стационарной скорости $v_{\min}$ соответствует точке, в которой $d\theta/dt = -1$; там прямая $T = T_s - \theta$ касается графика $\theta(T)$. В этой точке устойчивая и неустойчивая скорости совпадают (T_0 на рис. 99, *г* — *е*).

Трансформация ритма. Когда $T_s < T_0$, прямая и кривая не пересекаются и стационарного значения скорости не существует — импульсы периодически выпадают (рис. 99, б). Номер выпавшего импульса определяется из уравнения (8.11). Его графическое решение в этом случае показано на рис. 99, б. По θ_1 находится T_2 (горизонтальная стрелка), по T_2 находится θ_2 (вертикальная стрелка), по θ_2 находится T_3 (горизонтальная стрелка) и т. д. Видно, что фаза T_n уменьшается с номером импульса, и когда становится меньше $T_{\min}$, импульс выпадает.

Об измерении латентности в эксперименте. На рис. 99 через θ_{st} обозначено максимальное значение латентности, которое можно измерить при периодической стимуляции (стационарный режим); θ_{st} соответствует точке, где $\partial\theta/\partial t = -1$. Видно, что $\theta_{st} < \theta_{\max}$. Отсюда следует, что в электрофизиологическом эксперименте нельзя оценить максимальное значение латентности при периодической стимуляции. $\theta_{\max}$ может быть оценено в нестационарном режиме, например при стимуляции парами импульсов с уменьшающимся интервалом T между ними.

8.7. Результаты микроэлектродного исследования уязвимости

Связь между уязвимостью и параметрами сердечной мышцы исследовалась в работах [55—58]. Уязвимость вызывалась и подавлялась с помощью различных воздействий и одновременно микроэлектродами измерялись R — как минимальная эффективная рефрактерность и θ — как максимальная разность времен проведения тестирующего и кондиционирующего импульсов. Было исследовано более 200 препаратов сердца холоднокровных (лягушки) и теплокровных (кошки, собаки) — полосок ткани размером $\sim 1 \times 1$ см из предсердий и желудочков. Эксперименты показали, что в соответствии с математическими моделями уязвимость возникала при увеличении значений θ/R и подавлялась при уменьшении θ/R . Граничным значением оказалось $\theta/R = 0,5$.

В большинстве (85—90% из общего числа более 200) неуязвимых препаратов $\theta/R < 0,5$, в уязвимых препаратах $\theta/R > 0,5$ (см. табл. 6).

То, что значение $\theta/R = 0,5$ оказалось граничным, по-видимому, означает, что уязвимость была связана с циркуляцией волны возбуждения по участку малых (по сравнению с λ) размеров, причем в большинстве случаев (как следует из формулы (8.16), см. далее) число «задержек» на этом пути равнялось двум.

Действие химических веществ также согласуется с теорией: аритмогенные вещества увеличивали θ/R , антиаритмические — уменьшали θ/R .

Таблица 6

Аритмогенные и антиаритмические воздействия на мышечные полоски миокарда

Препарат	Условия опыта	Число препаратов	Из них уязвимых	θ , мс	θ/R
Желудочек кошки	Контроль $T = 22-23^\circ$ охлаждение	5	0 5	37 ± 4 137 ± 22	$0,33 \pm 0,05$ $0,68 \pm 0,07$
Предсердие кошки	Контроль $K^+ = 3,4$ мМ	3	0 3	50 ± 6 78 ± 14	$0,37 \pm 0,04$ $0,69 \pm 0,13$
Желудочек лягушки	Контроль Адреналин $0,1-0,3$ мг/л	7	0 5	159 ± 12 236 ± 16	$0,34 \pm 0,04$ $0,63 \pm 0,06$
Предсердие лягушки	Контроль Ацетилхолин $0,1-0,3$ мг/л	7	0 3	81 ± 16 104 ± 12	$0,24 \pm 0,04$ $0,47 \pm 0,03$
Желудочек лягушки	Контроль Этмозин $0,12-0,5$ мг/л	5	5 0	230 ± 23 111 ± 22	$0,61 \pm 0,07$ $0,2 \pm 0,04$

Аритмогенные воздействия. Исследованы примеры аритмогенных воздействий трех групп: 1. Понижение температуры (для тепловых). 2. Изменение электролитного состава наружного раствора (понижение концентрации ионов K). 3. Действие медиаторов — ацетилхолина и адреналина. Обнаружено, что все исследованные аритмогенные воздействия сопровождаются увеличением θ/R (табл. 6). Этот результат позволяет проследить, как достигается аритмогенный эффект для различных веществ: адреналин в основном растит латентность θ , ацетилхолин уменьшает рефрактерность R , а при гипотермии рефрактерность R растет (почти в два раза), причем латентность увеличивается еще больше (табл. 6).

Антиаритмические воздействия. Исследованы антиаритмические вещества трех групп: 1. «Классические» антиаритмики — хинидин и новокаионамид. 2. Блокатор β -адренорецепторов — индерал. 3. Производное фенотиазина с антиаритмическими свойствами — этмозин, а также ряд производных фталазона. Обнаружено, что в тех случаях, когда исследованные вещества проявляли антиаритмический эффект (блокировали уязвимость), θ/R уменьшалось.

В табл. 6 приведены данные только для этмозина. В некотором диапазоне концентраций (например, для новокаионамида — ~ 3 мг/л) эти вещества не проявляли антиаритмического эффекта, а, напротив, приводили к уязвимости, при этом θ/R , как и следовало ожидать, возрастало.

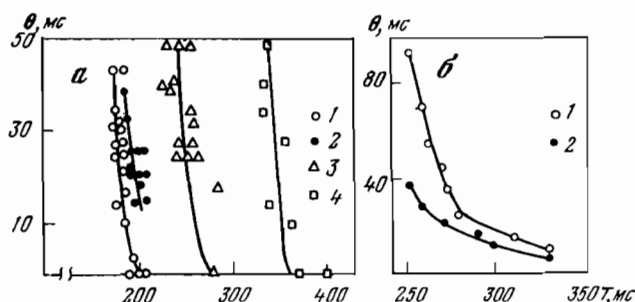


Рис. 100. Влияние на латентность антиаритмических препаратов прокаинамида (а) и индерала (б) в желудочке сердца кошки

а: 1 — контроль, 2 — 2 мг/л, 3 — 10 мг/л, 4 — 50 мг/л; б: 1 — контроль, 2 — 1 мг/л

При больших концентрациях θ/R уменьшалась даже на не-уязвимых препаратах. Антиаритмический эффект хинидина и новокаинамида достигался за счет увеличения эффективной рефрактерности R (рис. 100, а). Такой способ действия антиаритмических веществ хорошо известен. Для этмозина и индерала обнаружен другой механизм действия — значительное уменьшение максимальной латентности θ (рис. 100, б).

8.8. О параметрах, контролирующих уязвимость в математических моделях и в миокарде

Результаты, приведенные в предыдущем разделе, показывают, что уязвимость в полосках, вырезанных из миокарда, эффективно контролируется безразмерной характеристикой θ/R . Что это означает? Ведь еще со времен работ Гарри [12] считается, что аритмии, связанные с круговым движением волны возбуждения (reentry), должны контролироваться длиной волны λ . Свидетельствуют ли полученные результаты против циркуляции волны возбуждения как механизма уязвимости?

Нет! Рассмотренные в главах 6—8 математические модели показывают, что уязвимость, связанная с образованием ревербератора, действительно контролируется стационарной длиной волны λ , но только если размеры l участка, на котором образуется ревербератор, достаточно велики: $l \sim \lambda$. Если же l существенно меньше длины волны λ , то возможность возникновения ревербератора зависит от θ/R : чем больше θ/R , тем легче образуется ревербератор. Это происходит потому, что при $l < \lambda$ для распространяющейся волны становятся существенны неоднородности миокарда по параметрам (в первую очередь по рефрактерности), и распространение становится существенно нестационарным. Все это суммировано ниже:

Размер участка среды	$l \geq \lambda$	$l \leq \lambda$
Наличие неоднородностей по рефрактерности	Не сказывается	Существенно сказывается
Движение волны	Стационарное	Нестационарное
Основной вклад во время распространения вносит	Скорость v	Латентность θ
Параметр, контролирующий возникновение ревербератора	λ	θ/R

Для уязвимости миокарда, как правило, реализуется случай $l < \lambda$, так как в сердце обычно $\lambda \approx 5 \div 20$ см. При этом традиционное условие циркуляции волны

$$l > \lambda, \quad \lambda = Rv, \quad (8.13)$$

уже не является адекватным, так как равенство $\lambda = Rv$ подразумевает стационарность распространения.

Для нестационарного распространения необходимое условие циркуляции волны должно формулироваться не в терминах скоростей (скорость не постоянна!), а в терминах времен распространения: время обхода волны по замкнутому пути (длиной l) не меньше рефрактерности, т. е.

$$t \geq R, \quad \text{где } t = \oint \frac{dx}{v(x)} = \int_0^l \frac{dx}{v(x)}. \quad (8.14a, б)$$

Формула (8.14) представляет собой общее условие циркуляции волны возбуждения, пригодное и для неоднородной среды.

Здесь естественно выделяются два крайних случая, отмеченных выше. Первый — стационарное распространение — при $v(x) = v = \text{const}$, из формулы (8.14) получается «традиционное» условие (8.13). Второй крайний случай, когда нестационарность доминирует и вносит основной вклад во время распространения волны. Проиллюстрируем его следующим простым примером.

Условия микрореентри (microreentry) на языке латентностей. Напомним, что термином микрореентри называют циркуляцию волны на участке очень малого (по сравнению с длиной волны λ) размера. Гипотезы о микрореентри были введены [35], чтобы объяснить факт, что в фибриллирующем сердце участки, отстоящие на 1–3 мм один от другого, сокращаются практически независимо. О возникновении микрореентри известно очень мало.

Найдем условия возникновения микрореентри. Рассмотрим замкнутый путь длиной l , на котором имеется n участков (например, типа контакта волокна Пуркинье с мышцей) с одинаковыми для простоты задержками θ . Время распространения по такому пути $t = l/v + n\theta$. Условие циркуляции волны (8.14) запишется тогда в виде

$$l/v + n\theta \geq R. \quad (8.15)$$

Для длин l порядка нескольких миллиметров (микрореентри) и скоростей $v \sim 1$ м/с (неповрежденная ткань) слагаемым l/v можно пренебречь по сравнению с рефрактерностью R ($R \sim 0,2$ с), и условие микрореентри запишется в виде $n\theta \geq R$, или

$$\theta/R \geq 1/n. \quad (8.16)$$

Экспериментальные результаты по уязвимости, как отмечалось в разделе 8.7, описываются этой формулой при $n = 2$.

8.9. Следствия из моделей для антиаритмических веществ

Результаты исследования математических моделей позволяют понять, как достигается антиаритмический эффект для ряда веществ и указать новые направления их поиска. Основной результат, лежащий в основе этих следствий, — важная роль нестационарных режимов и задержек (θ) для возникновения источников спиральных волн. На рис. 101, а показано распространение импульса через неоднородность. Вдали от неоднородности скорость (v_0) велика; на неоднородности скорость уменьшается (до значений $v_{\min}$), после чего импульс либо выпадает, либо, миновав неоднородность, увеличивает свою скорость до v_0 .

Возможность возникновения циркуляции волны определяется суммарным временем проведения (см. (8.14)), но время распространения (интеграл в (8.14)) зависит от $v_{\min}$ гораздо сильнее, чем от v_0 . Отсюда следует, что антиаритмические вещества, влияющие на скорость, должны увеличить $v_{\min}$ (рис. 101, а, б), а их влияние на стационарную скорость v_0 гораздо менее существенно — ее они могут как увеличивать, так и уменьшать. Последний эффект был обнаружен экспериментально и долгое время оставался непонятным.

Антиаритмический эффект веществ первого класса. Механизм действия многих противоаритмических веществ не ясен. Например, большая группа веществ уменьшает максимальную скорость деполяризации $\dot{E}$ (первый класс, по Вильямсу [18]). Сейчас в литературе нет однозначных объяснений, почему уменьшение $\dot{E}$ должно приводить к антиаритмическому эффекту: уменьшение $\dot{E}$ ведет к уменьшению скорости распространения ($v_0 \sim \sqrt{\dot{E}}$) и уменьшению длины волны λ (так как $\lambda = Rv$), что должно бы приводить к аритмогенному эффекту вместо антиаритмического.

Математические модели подсказывают следующую гипотезу. Как мы только что упоминали, важно увеличить $v_{\min}$, а не v_0 . На рис. 102, а показана следующая из моделей типичная зависимость скоростей от параметра $\dot{E}$. При уменьшении $\dot{E}$ происходит уменьшение скорости v_0 , но одновременно $v_{\min}$ увеличивается

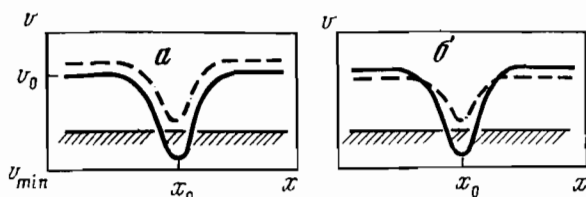


Рис. 101. Антиаритмическое вещество может как увеличивать (а), так и уменьшать (б) стационарную скорость v_0

Показана зависимость скорости v от расстояния x при распространении через участок с повышенным порогом (в окрестности точки x_0). Сплошная кривая — контроль, пунктир — под действием антиаритмического вещества. В обоих случаях (а, б) антиаритмик увеличивает скорость $v_{\min}$, время распространения импульса зависит от $v_{\min}$ гораздо сильнее, чем от v_0

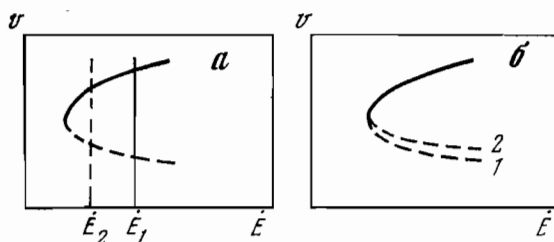


Рис. 102. Различные способы достижения антиаритмического эффекта

Сплошная кривая — устойчивая стационарная скорость (v_0), пунктирная — неустойчивая скорость. Антиаритмический эффект (увеличение $v_{\min}$) достигается: а — за счет уменьшения максимальной скорости деполяризации $\dot{E}$ (переход от $\dot{E}_1$ к $\dot{E}_2$); б — при переходе от кривой 1 к кривой 2. Здесь не требуется опасного подавления возбудимости мембраны (уменьшения $\dot{E}$)

(рис. 102, а); это и может объяснять антиаритмический эффект веществ первого класса.

Приведенный вывод пока не проверен экспериментально. Он основан на соображении о том, что, хотя неустойчивая скорость v_u не реализуется в стационарном режиме, она является приближенной оценкой нижней границы для $v_{\min}$ (если скорость импульса окажется меньше, чем v_u , импульс выпадет).

Антиаритмические воздействия, не уменьшающие возбудимость. Качественно так же, как и от $\dot{E}$, скорость в моделях зависит и от других параметров, характеризующих возбудимость: при уменьшении возбудимости падает v_0 , но $v_{\min}$ растет. Это может объяснять, почему для многих антиаритмических веществ обнаружено понижение возбудимости (рост порогов). Однако понижение возбудимости — опасное воздействие. Нельзя ли увеличивать $v_{\min}$, не понижая возбудимости?

Такой эффект иллюстрируется на рис. 102, б. Выяснить, изменение каких параметров может приводить к такому эффекту, — интересная задача для исследования на модели уравнений в частных производных.

Параметр θ/R . Как уже отмечалось, вместо $v_{\min}$, которое экспериментально измерять не удастся, удобной оказалась другая величина — латентность θ (точнее, ее соотношение с рефрактерностью R , характеризующее параметром θ/R). В моделях уменьшение θ/R оказалось эффективным антиаритмическим воздействием; в эксперименте θ/R хорошо описывало как уязвимость в норме, так и эффекты веществ.

Любопытно, что исследованные вещества обладают разными механизмами действия и принадлежат к различным классам по классификации [18]. То, что они уменьшают один и тот же параметр θ/R , означает, по-видимому, что уменьшение θ/R характеризует конечный результат их действия — блокирование уязвимости.

Параметр θ/R показывает, что для поиска противоаритмических веществ кроме хорошо известного пути, связанного с увеличением рефрактерности R [16], имеется еще один путь — уменьшение максимальной латентности θ .

В заключение отметим, что направление, начатое Винером — анализ моделей возбудимых сред, позволило развить представления о фундаментальных механизмах распространения волн возбуждения и о механизмах сердечных аритмий. Спиральные волны — ревербераторы — их возникновение, размножение и гибель позволили объяснить многие важные явления в сердечной ткани: уязвимость, одиночную или кратную экстрасистолию, фибрилляцию, феномены «критической массы» фибрилляции и спонтанного прекращения фибрилляции. Стало возможным выяснить условия возникновения микрореентри и устранить парадоксы, связанные с возникновением и развитием фибрилляции на участках малого по сравнению с длиной волны λ размера; проанализировать параметры, контролирующие уязвимость и фибрилляцию. На основе анализа выделены параметры, которые хорошо коррелируют с аритмогенными и антиаритмическими эффектами исследуемых веществ. Полученные результаты дают ключ для понимания механизмов конечных эффектов действия сердечных антиаритмических препаратов и могут послужить основой для их направленного поиска.

В части III книги описаны результаты, полученные при исследовании достаточно простых моделей возбудимых сред. Дальнейший прогресс ожидается от углубления анализа и перехода на уровень изучения ионных токов. Отметим, что анализ, основанный только

на использовании вычислительных машин, представляется мало-перспективным; интересных результатов можно ожидать от качественных методов анализа, развитых, например, в теории колебаний [8, 69—77]; их первые применения к исследованию механизмов сердечных аритмий описаны в работах [9, 54]. Из задач, вполне созревших для использования этих методов, можно отметить качественный анализ источников спиральных волн и их характеристик или анализ параметров, контролирующих минимальную скорость $v_{\min}$ для стационарных [10, 77] и нестационарных режимов. Исследование распространения волн возбуждения в средах типа сердечной ткани представляется многообещающим для специалистов в области нелинейных дифференциальных уравнений с частными производными. Полученные на простых моделях результаты — скорее всего лишь прототипы будущих интересных теорем.

4 * ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР

Глава девятая

МОДЕЛИРОВАНИЕ ОБЪЕМНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР. ВИРУСЫ, ФЕРМЕНТЫ

9.1. Процесс формирования изображений

Происходящие в клетке процессы на молекулярном уровне (связанные, например, с движением, дыханием) сопровождаются изменением пространственной организации структуры. Уникальную возможность увидеть молекулы дает электронный микроскоп.

Разрешение микроскопов достигает $2-3 \text{ \AA}$, однако биологические объекты не могут исследоваться с таким разрешением. Связано это с необходимостью контрастирования биологических объектов, которые сами слабо рассеивают и поглощают электроны. Из-за неоднородного проникновения контрастирующего вещества внутрь структуры и его деформирующего действия разрешение, достижимое при исследовании биологических образцов в электронном микроскопе, составляет величину около $10-20 \text{ \AA}$.

Помимо ограничений, связанных с методикой приготовления препаратов, имеются приборные ограничения. Из-за неустраняемых сферических aberrаций величина апертуры электронного микроскопа мала — примерно $0,01$ рад, глубина фокуса при этом составляет величину около $2000 \text{ \AA}$, что часто превышает толщину исследуемых объектов. Поэтому электронно-микроскопическое изображение представляет собой проекцию на плоскость трехмерной структуры заметной толщины. В этом одна из сложностей исследования пространственной организации молекулярных структур с помощью электронного микроскопа. Трехмерная интерпретация изображений — уязвимое место электронно-микроскопического анализа, так как базируется исключительно на интуиции и опыте исследователя. Часто прибегают к получению снимков структуры в различных ориентациях. Такой прием облегчает получение представления о пространственной организации объекта.

В последние годы появились описания методов количественного восстановления трехмерной структуры по ее электронно-микроскопическим снимкам [1]. Восстановление третьего измерения производится по набору проекций, полученных под разными углами.

Распределения амплитуд на зрачке оптической системы и в плоскости изображения связаны между собой преобразованием Фурье. Для изображений преобразование Фурье дает набор пространственных гармонических колебаний, отличающихся периодом, амплитудой и ориентацией.

Заманчиво применить для описания поведения оптических систем хорошо разработанные в теории передачи одномерных сообщений экономные методы, в частности методы, использующие системы линейных дифференциальных уравнений. Решение этих уравнений — интегральные выражения, связывающие вход и выход устройства, достаточно полно характеризовали бы работу системы. Однако это требует рассмотрения условий, при которых оптическая система будет работать как линейная система [2]. Необходимо, чтобы преобразования, выполняемые оптической системой, отличались только масштабными коэффициентами и не зависели от аргументов функции, описывающей изображение.

Главное условие — это сохранение пропорциональности между входом и выходом системы. При изменении входного воздействия в некоторое количество раз выходной отклик системы должен измениться в такое же количество раз. Если функция $f_{вх}(x, y)$ воспроизводится на выходе функцией $f_{вых}(x, y)$, то $af_{вх}(x, y)$ должна воспроизводиться функцией $af_{вых}(x, y)$. Таким образом, первое условие требует, чтобы график, иллюстрирующий зависимость выхода оптической системы от ее входа, был прямой линией. Соблюдение этого условия является следствием выполнения принципа суперпозиции в линейной системе. Следует учесть, что регистрирующая система может быть линейной лишь относительно интенсивностей (квадратов амплитуд) светового потока (так как любой фотодетектор является квадратичным), в то время как оптическая система может быть линейной как относительно амплитуд (при когерентном освещении), так и относительно интенсивностей (при некогерентном освещении).

Второе условие линейности, именуемое условием инвариантности, сводится к тому, что выходная функция не должна менять своей формы при изменении начала отсчета. Для оптической системы это условие предполагает постоянство изображения объекта при его перемещении в поле зрения, т. е. если $f_{вх}(x, y)$ воспроизводится на выходе $f_{вых}(x, y)$, то $f_{вх}(x + r, y + s)$ дает на выходе $f_{вых}(x + r, y + s)$. Это условие выполнимо не для всех оптических систем вследствие зависимости величины аберраций от угловых координат. Инвариантность соблюдается в системах, где аберрации достаточно мало изменяются по полю, т. е. в изопланатических системах, или внутри некоторых зон оптических систем (такие зоны называются изопланарными).

Распределение интенсивности в изображении микрообъекта, которое может рассматриваться как выходная функция линейной

оптической системы, представляется интегралом свертки

$$I_{из}(x, y) = \iint_{-\infty}^{+\infty} I_{об}(x_1, y_1) h_u(x - x_1, y - y_1) dx_1 dy_1, \quad (9.1)$$

где $I_{об}(x_1, y_1)$ — распределение интенсивности в плоскости объекта; $h_u(x - x_1, y - y_1)$ — аппаратная функция рассеяния. (В радиотехнике аналогичная функция носит название импульсной реакции.) Аппаратная функция описывает распределение света в плоскости изображения (x, y) при наличии в плоскости объекта (x_1, y_1) точечного источника. Под точечным источником подразумевается входное воздействие, интенсивность которого описывается дельта-функцией:

$$\delta(x_1, y_1) = \begin{cases} 0 & \text{для } x_1, y_1 \neq 0, \\ \infty & \text{для } x_1 = y_1 = 0, \end{cases} \quad \iint_{-\infty}^{+\infty} \delta(x_1 y_1) dx_1 dy_1 = 1.$$

Аппаратная функция, или отклик системы на точечный источник, полностью характеризует поведение системы.

Интегральная форма зависимости (9.1) получена на основе принципа суперпозиции путем суммирования элементарных откликов. Условие инвариантности требует, чтобы характер функции рассеяния не изменялся при перемещении точечного источника в плоскости объекта.

Однако кроме aberrаций на аппаратную функцию влияет также положение сигнала во входной плоскости вследствие появления эффекта виньетирования (ограничения пучков), связанного с конечной апертурой используемых линз. Это ограничивает не только положение, но и размеры анализируемых объектов на входе.

Таким образом, процесс формирования изображения объекта в микроскопической системе может быть описан в виде двух последовательных процессов дифракции (вначале на входном зрачке, затем на выходном). Каждый из этих этапов формирования изображения формально описывается преобразованием Фурье (соответственно прямым и обратным). Степень приближения зависит от того, насколько точно система, формирующая изображение, удовлетворяет условиям линейности. Такое описание, естественно, никак не связывается с характером излучения и справедливо как для оптического, так и для любого другого (электронного или рентгеновского) диапазона.

Согласно прямому преобразованию Фурье двумерный спектр изображения объекта определяется так:

$$S_{из}(\omega_x = \omega_y) = \iint_{-\infty}^{+\infty} I_{из}(x, y) \exp[-j(\omega_x x + \omega_y y)] dx dy. \quad (9.2)$$

Обратное преобразование:

$$I_{из}(x, y) = (1/4\pi^2) \iint_{-\infty}^{+\infty} S_{из}(\omega_x, \omega_y) \exp[j(\omega_x x + \omega_y y)] d\omega_x d\omega_y. \quad (9.3)$$

Если учитывать влияние системы формирования изображения, то спектр изображения можно представить в виде произведения спектра объекта и частотной характеристики оптической системы:

$$S_{из}(\omega_x, \omega_y) = S_{об}(\omega_x, \omega_y) H(\omega_x, \omega_y).$$

$H(\omega_x, \omega_y)$, в свою очередь, представляет собой преобразование Фурье от аппаратной функции системы.

Выражение (9.3) можно переписать в виде

$$I_{из}(x, y) = (1/4\pi^2) \iint_{-\infty}^{+\infty} S_{об}(\omega_x, \omega_y) H(\omega_x, \omega_y) \times \\ \times \exp[j(\omega_x x + \omega_y y)] d\omega_x d\omega_y. \quad (9.4)$$

Таким образом, распределение интенсивностей в выходном изображении является функцией двумерного спектра исследуемого объекта и двумерной частотной характеристики используемой системы.

Другими словами, изображение структуры клетки представляется в виде предела суммы элементарных пространственных гармонических составляющих, частоты которых одинаковы для любых изображений (интегрирование ведется в бесконечных пределах), но амплитуды и фазы выбраны так, что их сумма есть анализируемое распределение яркости. Спектр показывает вклад в эту сумму каждой гармонической составляющей. Используемая для анализа структуры клетки система переносит каждую гармоническую составляющую из плоскости объектов в плоскость изображений с множителем $H(\omega_x, \omega_y)$.

Так как $H(\omega_x, \omega_y)$ определяется аппаратной функцией системы, детальный анализ ее двумерной частотной характеристики может быть проведен при решении задачи о дифракции света от точечного источника. В случае, когда такой путь осложнен, имеется возможность определить двумерную частотную характеристику системы по степени деформации выходного волнового фронта.

При образовании изображения в микроскопе за счет явлений дифракции происходит естественное разделение волн, дифрагированных на различных пространственных структурах. Угол, под которым свет дифрагирует на объекте, пропорционален отношению λ/p , где λ — длина волны используемого излучения, а p — период пространственной структуры. При освещении препарата параллельным монохроматичным пучком света (когерентное освеще-

щение) происходит разделение плоской падающей волны на ряд отклоненных под различными углами, являющимися функцией пространственной частоты, плоских волн. Дифрагированные препаратом пучки света концентрируются объективом в его задней фокальной плоскости. Апертура объектива, ограничивающая попадание в микроскоп лучей, дифрагированных под углами, большими определенной величины, по существу и определяет характер двумерной частотной характеристики $H(\omega_x, \omega_y)$ микроскопической системы при когерентном освещении. Каждая точка задней фокальной плоскости объектива связана с определенным направлением дифрагированной волны, а интенсивность световой энергии в этой точке отражает удельный вес соответствующей пространственной частоты в формировании изображения. Пространственные частоты ω_x и ω_y , имеющие размерность рад/ед. длины, связаны с переменными η и ξ плоскости спектра, имеющими размерность единиц длины, соотношением

$$\xi = (\lambda F/2\pi) \omega_x, \quad \eta = (\lambda F/2\pi) \omega_y, \quad (9.5)$$

где ξ отсчитывается в направлении, параллельном x , а η — в направлении, параллельном y , F — фокусное расстояние объектива, λ — длина волны используемого света.

Таким образом, оптическая система при освещении объекта, находящегося в передней фокальной плоскости объектива, параллельным пучком света осуществляет в задней фокальной плоскости операцию, описываемую двумерным преобразованием Фурье. Эта плоскость, названная Аббе плоскостью «первичного изображения», является плоскостью двумерного спектра изображения объекта [3].

При исследовании трехмерных биологических объектов лучи, дифрагировавшие на внутренней структуре объекта, создают в дальней дифракционной зоне поле, в котором распределение амплитуд и фаз связано преобразованием Фурье с функцией плотности структуры $\rho(x, y, z)$. Эти соотношения между структурой объекта и рассеянным им излучением навели на мысль о возможности математического моделирования структуры на основе данных о распределении амплитуд и фаз в обратном пространстве.

Задачи такого плана довольно распространены в структурных исследованиях и получили название обратных дифракционных задач. Возникают они в тех случаях, например, когда по условиям эксперимента невозможно сформировать увеличенное изображение объекта. Так, с помощью рентгеновых лучей можно наблюдать лишь теневое изображение структуры, отличающееся невысокой четкостью. Объясняется это тем, что нельзя изготовить отклоняющие системы, которые могли бы обеспечить формирование в этом диапазоне четкого изображения. Однако зарегистрировать распределение поля в дальней дифракционной зоне можно, так как

для этого не требуется никакой «оптики». Выполнив обратное преобразование Фурье от распределения амплитуд и фаз в обратном пространстве, можно расчетным путем восстановить облученную структуру.

На этой идее основывается рентгеноструктурный анализ [4, 5]. Одна из сложностей рентгеноструктурного анализа состоит в том, что детекторы, используемые для регистрации рассеянного излучения, квадратичны и не регистрируют фаз. Это, как правило, — фотоматериалы или детекторы, использующие фотоэлектрический эффект. Для математического моделирования структуры необходимо знать распределения не только амплитуд, но и фаз в обратном пространстве. Поэтому фазовая проблема является одной из главных. Решить ее удастся пока далеко не для всех объектов, а методы ее решения весьма трудоемки. В области рентгеноструктурного анализа в последнее время активно интересуются возможностью создания когерентных излучателей (лазеров) в рентгеновском диапазоне, которые позволили бы кардинально решить фазовую проблему.

Таким образом, для восстановления трехмерной структуры объектов необходимо знать распределение амплитуд и фаз в трехмерном обратном пространстве. Этому распределению соответствует физическая реальность в виде амплитуд и фаз излучения, дифрагированного объектом. Параметры излучения можно либо измерить в дальней дифракционной зоне — амплитуды непосредственно, а фазы косвенно, как в рентгеноструктурном анализе, либо зафиксировать, как в голографии оптического диапазона. Реконструкция структуры ведется либо расчетным путем, либо восстановлением волнового фронта методами голографии (расчетное восстановление изображения возможно и в голографии: в этом случае информация о распределении амплитуд и фаз должна быть предварительно извлечена из голограммы, а затем введена в вычислительную машину для расчета).

9.2. Математические основы объемной реконструкции

Клуг и Де Розье [6] предложили использовать обратное фурье пространство для математического восстановления структуры, исследуемой в электронном микроскопе. В электронном микроскопе формируется изображение, которое при определенных условиях может рассматриваться как проекция трехмерной структуры на плоскость, т. е. как интеграл от функции, описывающей распределение плотности в объеме по одной из переменных, совпадающей с направлением просвечивания. Если распределение плотности в трехмерном объекте описывается функцией $\rho(x, y, z)$, то изображения, формируемые при разных направлениях просвечи-

вания, представляют собой двумерные проекции трехмерной структуры на плоскость. При этом распределение плотности в проекциях всякий раз пропорционально интегралу от трехмерной функции. Так, проекция $\sigma(x, y)$ вдоль направления z пропорцио-

нальна выражению $\int_{-\infty}^{+\infty} \rho(x, y, z) dz$. Преобразование Фурье от та-

кой проекции представляет собой центральное сечение трехмерного обратного пространства $\Phi(X, Y, O)$. Поскольку распределение плотности в проекции известно, а преобразование Фурье выполняется численным методом, то в центральном сечении обратного пространства будут известны и амплитуды, и фазы. Если теперь объект в электронном микроскопе повернуть на некоторый угол, то электронно-микроскопическое изображение будет представлять собой другую проекцию той же структуры. Преобразование Фурье такой проекции опять будет центральным сечением обратного пространства, но с другим угловым положением. Некоторый набор проекций объекта, снятых в разных ракурсах, при переходе в обратное пространство даст набор центральных сечений. На рис. 103 дана условная схема трехмерной реконструкции объекта по проекциям. Таким образом, имея достаточное количество проекций, можно заполнить обратное пространство пересекающимися по одной прямой плоскостями. Произведя интерполяцию между ними и выполнив обратное преобразование Фурье, можно восстановить распределение плотности в сечениях объекта, плоскость которых совпадает с направлениями просвечивания. Другими словами, можно смоделировать внутреннюю часть структуры, которую не удастся увидеть на отдельных электронно-микроскопических снимках, но информация о которой содержится в их наборе.

Если съемка проекции производится относительно фиксированной оси так, что все направления проектирования перпендикулярны к ней, или если сам объект имеет поворотную или винтовую ось симметрии, трехмерная задача сводится к двумерной. В этом случае для каждого из углов проектирования ψ вдоль направления y_ψ двумерные сечения функции $\rho(x, y, z)$ представляются в виде одномерных проекций $\sigma(\psi, x_\psi)$ на прямую x_ψ , перпендикулярную y_ψ (рис. 104).

Очевидно, что для несимметричного объекта проекции, отличающиеся на угол π , равны и обладают зеркальной симметрией:

$$\sigma(\psi, x_\psi) = \sigma(\psi + \pi, -x_\psi).$$

Для объектов с четными осями симметрии информативна лишь половина проекций, вторая половина повторяет первую, т. е.

$$\sigma(\psi, x_\psi) = \sigma(\psi, -x_\psi).$$

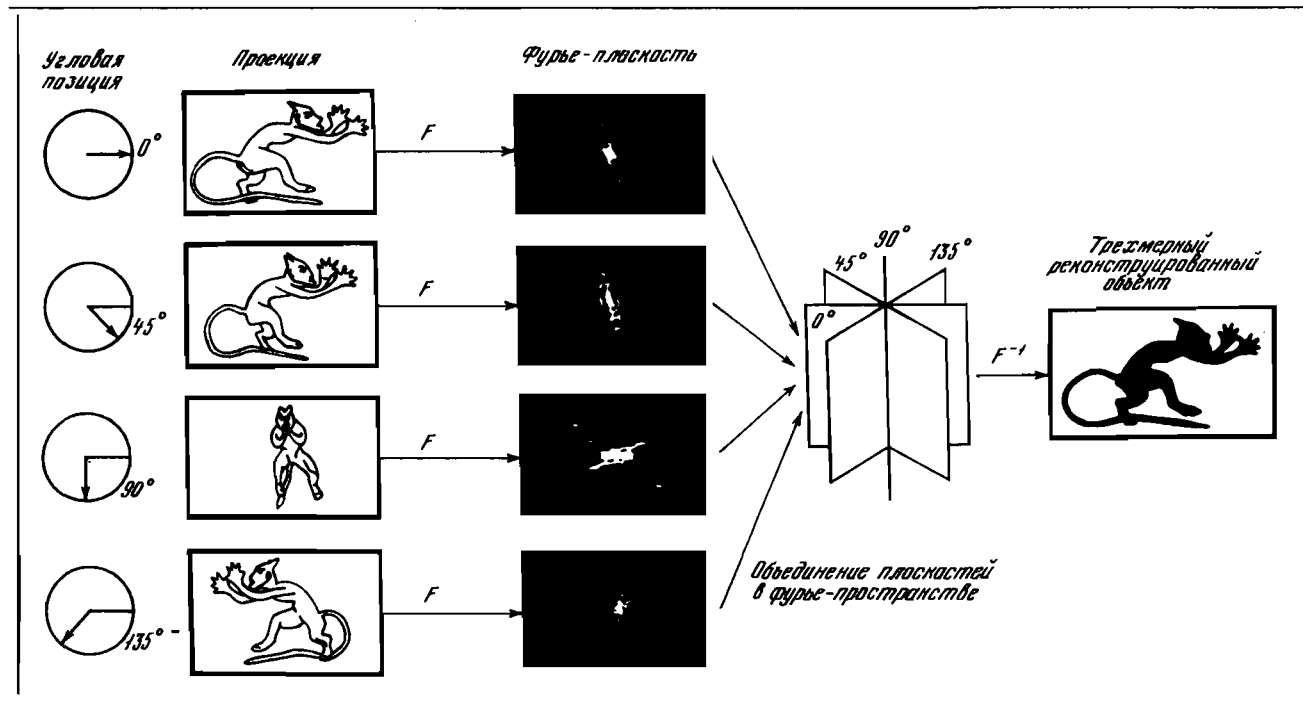


Рис. 103. Процесс трёхмерной реконструкции объекта по его проекциям

В качестве модельного объекта использована металлическая фигурка «чёрт». Удлиненный и асимметричный вид этой фигурки позволяет наблюдать изменения в спектре при различных ориентациях. Оператор F означает прямое преобразование Фурье, а F^{-1} — обратное

В общем случае для объекта с поворотной осью симметрия k -го порядка

$$\sigma(\psi, x_\psi) = \sigma[\psi + k(2\pi/N), x_{\psi+k(2\pi/N)}], \quad (9.6)$$

где $k = 1, 2, \dots, N$.

Для объекта с винтовой осью симметрии $S_{p,q}$ различные проекции получаются на различных уровнях по вертикальной оси:

$$\sigma(\psi, x_\psi, z) = \sigma[\psi + k(2\pi/p), x_{\psi+k(2\pi/p)}, z + k(c/p)], \quad (9.7)$$

где $k = 1, 2, \dots, p$.

Таким образом, одна проекция симметричного объекта уже содержит информацию, необходимую для восстановления. Такая проекция в случае поворотной симметрии эквивалентна $p = N$ (для нечетных N), $p = N/2$ (для четных N) проекциям элементарной несимметричной группировки, размножением которой формируется изображение структуры. При

наличии винтовой симметрии одна проекция эквивалентна pN (для нечетных N) и $pN/2$ (для четных N) проекциям, т. е. в ряде случаев можно избежать трудоемкой операции съемки объекта в разных ориентациях в электронном микроскопе.

Для структур со спиральной симметрией прямое и обратное преобразования в цилиндрических координатах будут иметь вид:

$$\Phi(R, \Psi, Z) = \sum_n G_n(RZ) \exp[in(\Psi + \pi/2)],$$

$$\rho(r, \psi, z) = \sum_n \int g_n(r, Z) \exp(in\Psi) \exp(2\pi izZ) dZ,$$

где g_n и G_n — взаимные трансформанты Бесселя.

Поскольку исходной информацией является изменение почернения фотографической пластинки, эта непрерывная величина (степень приближения не учитывает зернистой структуры фотослоя) для расчетов должна быть представлена в цифровой форме. Таким образом, каждая из проекций в результате измерений представляется в виде дискретного набора величин $\sigma(\psi_i, x_{\psi_i}) = \sigma_k^i(na/m)$, где a — сторона квадрата, на котором ведется восстановление, большая или равная размеру восстанавливаемой структуры. Шаг дискретизации a/m выбирается согласно теореме

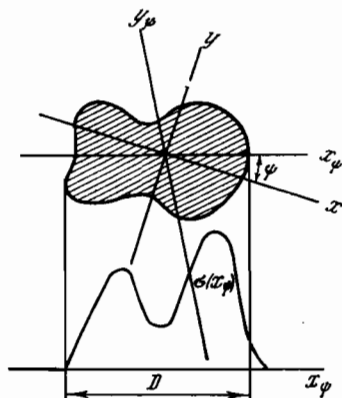


Рис. 104. Проекция двумерного сечения трехмерного объекта

Котельникова, распространяемой на случай двумерного изображения с ограниченным спектром. Такое изображение полностью определяется m независимыми значениями интенсивности в точках дискретных отсчетов, лежащих в узлах прямоугольной решетки с шагом $1/2 \omega_{x \max}$ по оси x и $1/2 \omega_{y \max}$ по оси y , при условии, что спектр пространственных частот изображения равен нулю вне прямоугольника, описываемого в частотной плоскости неравенствами

$$|\omega_x| \leq \omega_{x \max}, \quad |\omega_y| \leq \omega_{y \max}.$$

Число отсчетов, приходящихся на отрезок длиной x (или y), равно $2x\omega_{x \max}$. Общее число отсчетов в изображении (число степеней свободы) равно произведению площади изображения на «площадь», занимаемую спектром в частотной плоскости:

$$m = 4S\omega_{x \max}\omega_{y \max}. \quad (9.9)$$

В принципе, возможна реконструкция трехмерной структуры по проекциям и без перехода в обратное пространство. Одно из решений состоит в том, что каждая из проекций в дискретном представлении может рассматриваться как сумма значений плотности в одном из узлов решетки, на которой ведется восстановление.

Таким образом, могут быть составлены линейные уравнения вида

$$\sigma_k^i (na/m) = \Sigma \rho_{jl} \quad (9.10)$$

с числом неизвестных в каждом уравнении m . В общем случае, если имеется p проекций ($i = p$), то число известных pm , а неизвестных значений ρ_{jl} есть m^2 . Условие однозначного определения каждого из значений ρ_{jl} (т. е. реконструкция одного из сечений структуры): $pm \geq m^2$ или $p \geq m$. Решение уравнений вида (9.10) ведется обращением матриц. Для случая, когда величины ρ могут приобретать лишь два значения — 0 или 1, разработаны алгоритмы восстановления, действующие по принципу перебора.

В реальном пространстве справедлив и другой метод трехмерной реконструкции, получивший название метода восстановления обратным проектированием или синтезом проектирующих функций [8]. Идея метода иллюстрируется на рис. 105, где показано двумерное восстановление функции $\rho(x, y)$ (в полярных координатах $\rho(r, \Phi)$) из последовательности N проекций $\sigma_\psi(x')$, расположенных через равные углы $2\pi/N$. Для каждой точки (r, Φ) в структуре все проектируемые плотности $\sigma_\psi[x' = r \cos(\Phi - \Psi)]$ суммируются. Постоянный фон, возникающий при суммировании, может вычитаться. Однако в таком варианте методу присущи некоторые ошибки.

Поскольку фурье-преобразование представляет собой линейную операцию, то

$$\sum \sigma_{\psi} [r \cos (\Phi - \Psi)] = F^{-1} \left[\sum_{\psi} F(XY) \delta(Y'_{\psi}) \right], \quad (9.11)$$

где $\psi = 2\pi n/N$, $n = 1, 2, \dots, N$.

Левая часть уравнения (9.11) соответствует операции «обратного проектирования» плотностей проекции, как показано на

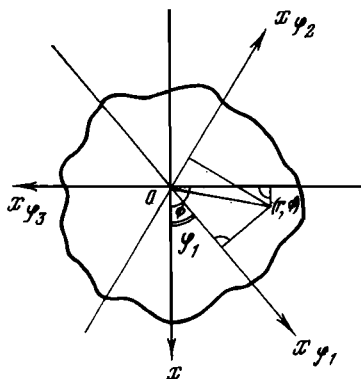


Рис. 105. Восстановление «обратным проектированием»

рис. 105. Такая операция эквивалентна фурье-синтезу с использованием центральных сечений, причем каждое из сечений соответствует фурье-преобразованию одной из проекций [правая часть уравнения (9.11)]. Оператор F^{-1} представляет обратное фурье-преобразование. $\sigma_{\psi}(x')$ рассматривается как двумерная функция; предполагается, что изменения в направлении y'_{ψ} отсутствуют. $F(X, Y) \delta(Y'_{\psi})$ представляет собой линейное сечение двумерного преобразования $F(X, Y)$ по линии, проходящей через начало координат под углом ψ к оси X .

Будем полагать, что спектр функции ограничен, т. е. выше некоторой пространственной частоты, обусловленной в обратном пространстве радиусом R_m , фурье-компоненты всех проекций равны нулю, т. е.

$$F(X, Y) \delta(Y'_{\psi}) = 0 \text{ при } |X'_{\psi}| > R_m.$$

Несложно показать, что результат синтеза представляется в виде

$$F^{-1} \left[\sum_{\psi} F(X, Y) \delta(Y'_{\psi}) \right] = \rho(x, y) * F^{-1} \times \\ \times [S(R, \Phi)] + (N - 1) F^{-1} [F(0, 0)], \quad (9.12)$$

причем $S(R, \Phi)$ — δ -функция единичного веса при углах $\Phi = 2\pi n/N$, $n = 1, 2, \dots, N$, R, Φ — обратные полярные координаты,

$$S(R, \Phi) = \begin{cases} \delta(X \cos \Phi + Y \sin \Phi) & \text{при } (R \leq R_m; \\ & \Phi = 2\pi n/N; n = 1, \dots, N). \\ 0 & \text{при } (R > R_m) \end{cases}$$

Символ * означает операцию свертки

$$F^{-1}[F(0, 0)] = \int_{-\infty}^{+\infty} \rho(x, y) dx dy = \Omega. \quad (9.13)$$

Величина Ω определяет объем объекта в трехмерном случае, или площадь — в двумерном. Ω может быть найдена из проекций

$$\Omega = \int_{-\infty}^{+\infty} \sigma_{\psi}(x') dx'.$$

Этот член появляется из-за того, что фурье-преобразования всех N проекций дают вклад в начале координат $X = 0, Y = 0$. Подставляя уравнения (9.11) и (9.13) в уравнение (9.12), получим, что реконструируемая плотность ρ_v , определенная методом обратного проектирования, будет:

$$\rho_v(x, y) = \rho(x, y) * F^{-1}[S(R, \Phi)] = \sum \sigma_{\psi}[r \cos(\Phi - \Psi)] - (N - 1) \Omega, \quad (9.14)$$

где $\Phi = 2\pi n/N, n = 1, 2, \dots, N$.

В этом и состоит ошибка, присущая этому методу. Чтобы увидеть, чем реконструируемая плотность ρ_v отличается от истинной плотности ρ , нужно рассмотреть функцию $F^{-1}[S(R, \Phi)]$. Функция $S(R, \Phi)$ является функцией с единичным значением на линиях $\Phi = 2\pi n/N, n = 1, 2, \dots, N$, для $R \leq R_m$ и поэтому имеет форму $2N$ одинаково расположенных спиц в колесе с длиной каждой спицы, равной R_m . Фурье-преобразование такой функции определяется интегралом от некоторой совокупности бесселевых функций

$$F^{-1}[S(R, \Phi)] = \int_0^{R_m} [J_n(2\pi Rr) + \sum f^n J_n(2\pi Rr) \exp jn\Phi] dR, \quad (9.15)$$

где $n = \pm 2N, \pm 4N, \dots$

Так как все бесселевы функции $J_0(2\pi Rr)$ имеют максимум при $r = 0$ для различных R , нулевой порядок бесселевой функции в выражении (9.15) для $F^{-1}[S(R, \Phi)]$ будет также иметь максимальную величину при $r = 0$, и поэтому свертка этого члена с истинной плотностью $\rho(x, y)$ в уравнении (9.14) довольно близка к $\rho(x, y)$. При бесконечном числе проекций в функции выборки $S(R, \Phi)$ отсутствуют азимутальные вариации, и вместо уравнения (9.15) получаем

$$S'_R(r) = J_0(2\pi Rr),$$

где $S'_R(r)$ — фурье-преобразование кольца радиуса R в обратном

пространстве. Таким образом, плотность свертывается с $F^{-1}[S'(R)]$, где

$$F^{-1}[S'(R)] = \int_0^{R_m} S'_R(r) dr.$$

В пределе при бесконечном разрешении

$$F^{-1}[S'(R)] = \int_0^{\infty} J_0(2\pi Rr) dR = 1/2\pi r. \quad (9.16)$$

Таким образом, даже при бесконечном числе проекций метод реконструкции обратным проектированием не будет восстанавливать истинной плотности $\rho(r, \Phi)$, а будет реконструировать $\rho(r, \Phi)$, свернутую с $1/r$. Если исследуемая структура имеет остроконечное распределение плотности, то пики будут восстановлены, так что метод все же даст примерную реконструкцию.

Причина, по которой метод обратного проектирования не может дать действительной реконструкции, состоит в том, что функция $S(R, \Phi)$ производит выборку преобразования объекта в неправильной пропорции для различных радиусов в обратном пространстве. Реконструкция обратным проектированием поэтому эквивалентна фурье-синтезу объекта из его фурье-преобразований со всеми членами, взвешенными пропорционально величине, обратной радиусу в фурье-пространстве.

Модификацию описанного выше способа с целью устранения присущих ему ошибок предложили Б. К. Вайнштейн (модифицированный синтез проектирующих функций [10]) и Рамачандран (метод свертки [11]). Суть модификации сводится к следующему. Если выборочную функцию изменить так, чтобы она меняла свое значение в соответствии с радиусом обратного пространства, то можно осуществить верную реконструкцию, точность которой ограничена лишь тем, что используется конечное число проекций. Другими словами, все компоненты фурье-преобразования будут включены в реконструкцию с правильным весом, если используемая функция выборки будет иметь вид $RS(R, \Phi)$. Фурье-синтез, использующий эту взвешенную выборочную функцию, будет реконструировать истинную структуру. Метод обратного проектирования эквивалентен фурье-синтезу, использующему преобразование с функцией выборки $S(R, \Phi)$. Можно показать, что в реальном пространстве возможен другой процесс, который эквивалентен фурье-синтезу, использующему преобразование с функцией выборки $RS(R, \Phi)$.

Согласно теореме о спектре свертки перемножение в обратном пространстве эквивалентно свертке в реальном пространстве. Поэтому реконструируемая плотность может быть восстановлена

точно, если каждая из проекций предварительно свернута со стандартной функцией, а затем суммирование таких модифицированных проекций осуществляется так, как указывалось выше.

Оценка точности восстановления будет зависеть от числа проекций, характера вычислительных операций (степени усреднения, вида интерполяции) и достоверности данных при экспериментальном определении проекций. Восстановление ведется на дискретной сетке, состоящей из $m \times m$ узлов с шагом $a \geq D/m$. Условие однозначного определения значения плотности ρ в каждом из m узлов: $p \geq m$. Таким образом, $a \geq D/p$. Кроме того, согласно теореме Котельникова шаг дискретизации определяется наивысшей пространственной частотой объекта ($^{1/2} \omega_x, ^{1/2} \omega_y$ — в декартовых или $^{1/2} R_m$ — в полярных координатах). Наивысшая пространственная частота примерно определяется размером d минимальной неоднородности объекта. Поэтому разрешение в восстановленной структуре в этом случае будет

$$d \geq 2D/p. \quad (9.17)$$

Оценить предельное разрешение можно и при переходе в обратное пространство. $F[\rho(x, y)]$ приобретает нулевые значения выше граничной пространственной частоты $R_m \approx 1/d$. Кроме того, шаг выборки в обратном пространстве при восстановлении структуры ρ размером D должен быть $1/D$. При заполнении обратного пространства центральными сечениями образуется фигура с радиально расходящимися лучами (типа спиц колеса). При удалении от центра наступает момент, когда расстояние между соседними спицами становится больше шага разбиения $1/D$. Граничный случай при $1/D \approx \pi R_m/p \approx \pi/dp$ и определяет разрешение

$$d \approx \pi D/p. \quad (9.18)$$

Поскольку амплитуды пространственных частот, близких к граничной частоте, малы, то вклад их незначителен, поэтому предел разрешения, определяемый выражением (9.18), выглядит несколько заниженным. Вообще же оценки уравнений (9.17) и (9.18) достаточно близки. Естественно, что более точную оценку разрешения можно дать при известном характере спектра структуры.

Следует сказать, что метод точного восстановления обратным проектированием (модифицированный синтез проектирующих функций) и метод свертки эквивалентны методу Круга и Де Розье, который состоит в подсчете фурье-преобразования проекций и затем выполнении обратного преобразования Фурье — Бесселя для восстановления структуры.

Если в первом методе модификация проекций осуществляется в реальном пространстве путем их свертки с преобразованием Фурье от функции выборки с весом, определяемым радиусом обратного пространства, то во втором случае это взвешивание произ-

водится автоматически в обратном пространстве. Оба метода имеют примерно те же ограничения и по разрешению. Однако метод Клуга и Де Розье требует большего времени для вычислений, так как необходимо выполнять два фурье-преобразования.

Итак, мы установили, что для восстановления внутренней структуры объекта, просвечиваемого электронными или оптическими пучками, необходимо иметь набор проекций его структуры, снятой под разными углами (т. е. при съёмке объект необходимо поворачивать). Исключение составляют объекты, обладающие симметрией. При восстановлении их структуры иногда достаточно одной проекции.

Следует отметить, что закрепление и поворот объекта размером в доли микрона являются сложной технической задачей. Существующие методы установки препарата в электронном микроскопе принципиально не позволяют достичь больших углов поворота (свыше $\pm 60^\circ$). При увеличении углов происходит перекрытие пучка электронов подложкой, на которой располагается наблюдаемый образец. Изготовление микроманипуляторов, которые позволили бы растянуть образец между двумя остриями игл, обеспечивая тем самым круговой обзор при вращении, — дело будущего.

Для иллюстрации описанных выше методов рассмотрим реконструкцию биологической структуры, обладающей спиральной симметрией.

9.3. Модель трехмерной структуры отростка бактериофага

Система «вирус — клетка»

Существуют несколько сотен бактериофагов или вирусов, поражающих бактерии [12, 13]. До недавнего времени основные усилия были сосредоточены на исследовании фагов с отростками, способных размножаться на клетках *Escherichia coli*, относящихся к штамму В. В настоящее время из них лучше других изучены семь фагов: от Т1 до Т7.

Все четные фаги имеют сходное строение (рис. 106). Их различие состоит в величине и толщине отростка, состоящего из стержня и чехла. В очень кратком изложении взаимодействие фага с бактериальной клеткой выглядит так: фаг встречает клетку, затем с помощью своих хвостовых нитей «проверяет» по химическому составу внешней мембраны вид клетки. Если клетка соответствует виду фага, то он прикрепляется к ней снаружи своей базальной пластинкой. Затем базальная пластинка с помощью литического фермента в месте своего крепления к клетке растворяет

небольшую зону внешней клеточной мембраны. Чехол хвоста сокращается, выталкивая ДНК (или РНК для некоторых видов фагов) из головы фага внутрь клетки.

С этого момента биохимический аппарат клетки в течение двух десятков минут работает под контролем фаговой ДНК. Сначала синтезируются особые ферменты, которые блокируют синтез собственных белков и собственной ДНК клетки и стимулируют синтез фаговой ДНК и фаговых белков. Затем внутри клетки из фаговых белков начинается сборка компонентов новых фагов (хвостов, голов) и целых фагов. Приблизительно через 20 мин весь имевшийся в распоряжении клетки-хозяина биохимический материал будет использован для построения фагов. Оболочка клетки разрывается, лизируется и 100—200 потомков фага готовы к встрече с новыми бактериальными клетками.

Как мы видим, вся проблема взаимодействия вируса и клетки распадается на большое количество отдельных проблем: проблема исследования рецепторных участков мембран (иммунохимическая проблема узнавания), молекулярных механизмов передачи информации ДНК — РНК — белок, морфогенеза (самосборки фагов) и, наконец, биологической подвижности. Сведения о пространственной молекулярной реорганизации отростка бактериофага при сокращении чрезвычайно важны, так как это сократительная структура однократного действия, она не обладает сопутствующими любому двигателю акту системами расслабления и регулирования и потому в наиболее элементарном виде моделирует поведение более сложных двигательных систем. Точные количественные результаты восстановления пространственной организации такой структуры по электронно-микроскопическим изображениям представляют большой интерес.

Для того чтобы увидеть, какова внутренняя структура растянутого хвоста бактериофага и как она изменяется при сокращении чехла, нам пришлось отказаться от фагов группы Т, так как они имеют короткий хвост и при сокращении чехла дифракционное изображение не позволяет определить параметры симметрии отростка и перейти на фаг группы Н. Он паразитирует на бакте-

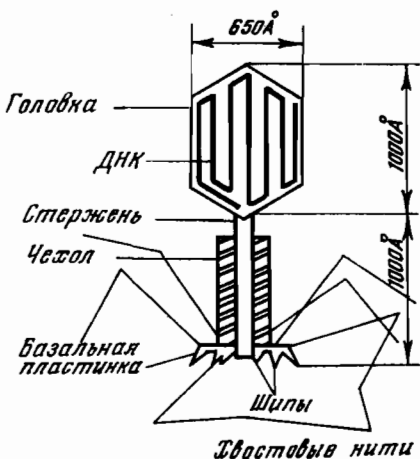


Рис. 106. Схема строения бактериофага

риях *Bacillus mycoides* и имеет отросток почти в два раза длиннее, чем фаг группы Т. Что касается сокращенной структуры чехлов фагов группы Т, то в этом отношении значительный интерес представляет работа [14], посвященная трехмерной реконструкции сокращенного отростка бактериофага Т4. Пространственная модель сокращенного отростка получена путем комбинации результатов трехмерного восстановления поличехлов и изображения сокращенной формы базальной пластинки. И хотя близость структуры сокращенных чехлов и поличехлов выглядела достаточно убедительно, существующее функциональное различие в способах формирования этих структур оставляло открытым вопрос об их полной структурной идентичности. Кроме того, не совсем ясна структурная организация центральной зоны сечений сокращенного отростка. Поэтому чрезвычайно полезной была трехмерная реконструкция растянутого и сокращенного отростков бактериофага Н-17 *Bacillus mycoides* [15, 16]. Сначала рассмотрим пространственную организацию растянутого отростка бактериофага Н-17 [15].

Модель структуры растянутого отростка бактериофага

Структура растянутого отростка бактериофага Н-17 в какой-то степени напоминает форму растянутых отростков Т-четных фагов [17—18]. Контрастирование препаратов фага проводилось 0,5%-ным раствором уранилацетата. Съемка осуществлялась на микроскопе JEM-7 с увеличением 50 000 (рис. 107, а).

Для отбора качественных электронно-микроскопических изображений и точной оценки параметров спирали отростка фага Н-17 было проведено исследование оптических дифракционных картин с нескольких десятков снимков на оптическом дифрактометре. Характерные особенности дифракционных картин растянутого отростка — наличие четкого меридианального рефлекса, зеркальной симметрии относительно меридиана и двух наиболее сильных слоевых линий, расположенных примерно на $1/3$ и $2/3$ расстояния от меридианального рефлекса до экватора.

По положению характерных рефлексов были определены основные параметры растянутой структуры отростка: радиус чехла $r = 105 \text{ \AA}$, величина заходности $N = 6$, период прерывной спирали $c = 664 \text{ \AA}$, толщина дисков $39 \text{ \AA}$. Нанесение на дифракционную картину обратной решетки (рис. 107, б) и системы слоевых линий позволило определить число субъединиц на период прерывной спирали ($p = 17$) и число оборотов непрерывной спирали на период прерывной ($q = 6$). Для проверки рассчитывалось распределение функций Бесселя по слоевым линиям для спирали с параметрами $N = 6$, $p = 17$, $q = 6$ (см. выражение 9.7),

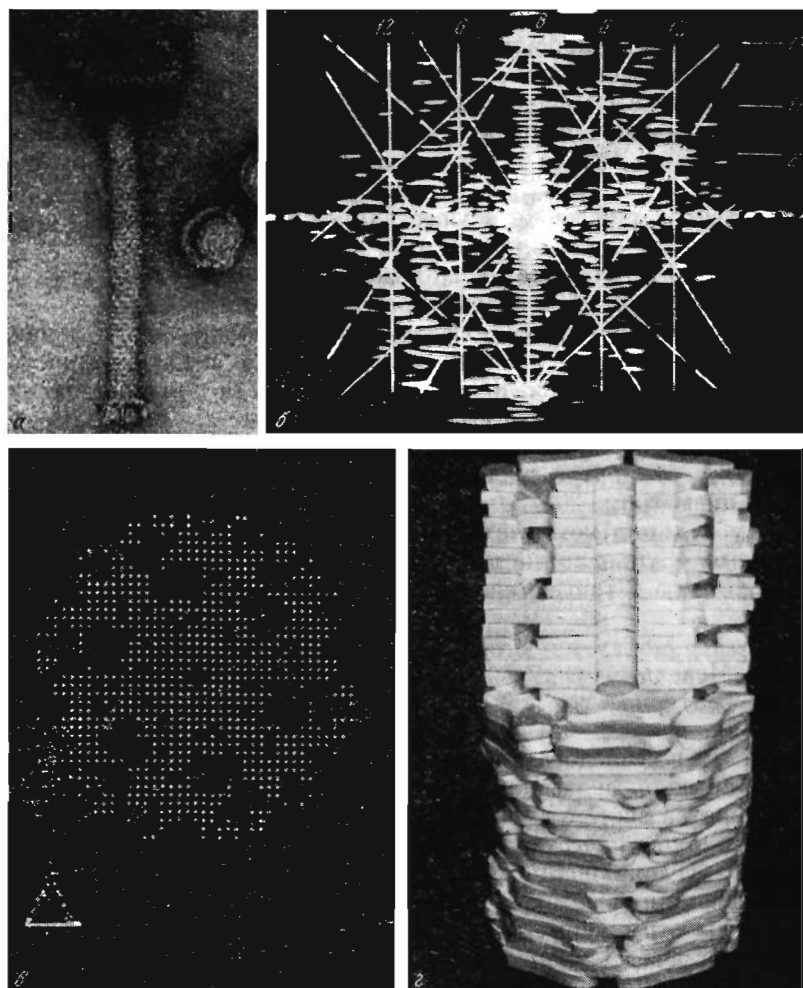


Рис. 107. Структура растянутого отростка бактериофага Н-17

а — электронно-микроскопическая фотография бактериофага; б — дифракционная картина от растянутого отростка с нанесенной на нее обратной решеткой; в — одно из рассчитанных на УЦВМ сечений отростка на экране дисплея (внизу — гистограмма распределения значений оптической плотности в сечении с указанием уровня ограничения); г — модель отростка (удаленная часть позволяет увидеть внутреннюю структуру)

Электронно-микроскопическое изображение чехла оказалось эквивалентным 51 проекции элементарной асимметричной группировки. Фотометрирование электронно-микроскопического изображения отростка фага проводилось на микроденситометре при дискретном перемещении предметного столика с шагом 10 мкм и с прямоугольной щелью в плоскости изображения размером 30×50 мкм.

Синтез сечений диска осуществлялся методом модифицированного обратного проектирования на квадратной сетке с шагом 6 Å в пространстве объекта. Использовалась УЦВМ с оперативной памятью объемом 16 двенадцатиразрядных киловслов.

Одно из сечений диска, сфотографированное с экрана дисплея УЦВМ, показано на рис. 107, в. Модель отростка бактериофага Н-17 показана на рис. 107, г. Она собрана из дисков, повернутых друг относительно друга на угол, равный $2\pi q/p$ рад. Каждый диск имеет центральный канал диаметром около 30 Å. На расстоянии 60 Å от центра диска расположены шесть спиральных каналов диаметром 20—30 Å. На периферии диска расположены шесть субъединиц, которые соединяются с центральной частью диска мостиками. Субъединица в радиальном направлении имеет размер около 40 Å, а в тангенциальном — около 80 Å.

Модель структуры сокращенного отростка бактериофага

Сложности в исследовании сокращенных форм отростков бактериофагов обычно связываются со значительными вариациями в структуре за счет ее деформации. Это проявляется в первую очередь в плохом качестве картин оптической дифракции, которую они дают. С сокращенного отростка фага Н-17 были отобраны четкие дифракционные картины, позволяющие установить основные параметры структуры. В процессе сокращения растянутый отросток претерпевает значительные изменения.

На электронно-микроскопическом снимке сокращенной структуры можно выделить два основных семейства спиралей (рис. 108, а): спирали с малым периодом, наклоненные под углом 15° к горизонтальной оси, и спирали с большим периодом, составляющие с вертикальной осью 6° . На дифракционной картине (рис. 108, б) этим спиральям соответствуют системы рефлексов на 1-й, 16-й и 17-й слоевых линиях. Причем спирали с малым периодом обладают 6-кратной симметрией, а спирали с большим периодом — 12-кратной симметрией. Эти данные согласуются с результатами, полученными на сокращенном отростке фага Т4 [19]. На 33-й слоевой линии на отдельных дифракционных картинах можно наблюдать слабый меридианальный рефлекс, соответствующий,

видимо, предельным по разрешению деталям в изображении. Его можно обнаружить только при больших экспозициях и развернутой относительно отростка маске. Исходя из элементарных геометрических соотношений, можно показать, что при полученных параметрах дифракционной картины узлы обратной решетки с ординатами $y_1 + 2y_2$, расположенные на линиях $m = 1$ и $m = -1$, действительно будут лежать на меридиане (y_1 и y_2 — соответственно ординаты рефлексов на 1-й и 16-й слоевых линиях (рис. 108, в)).

Правило отбора [7] для такой структуры имеет вид: $l = 33m + 16n/N$, где $N = 6$. Таким образом, каждая из шести прерывных спиралей с основным периодом около 660 Å содержит 33 субъединицы в 16 оборотах.

На основании данных дифракционного анализа была осуществлена трехмерная реконструкция сокращенного отростка методом модифицированного обратного проектирования [10, 11].

Рассчитанное сечение показано на рис. 108, г. Отличительная особенность его состоит в следующем. В сокращенной структуре произошло полное отделение чехла от стержня и между ними образовался зазор, ширина которого составляет примерно 30—35 Å, в отличие от структуры растянутого чехла, где между стержнем и чехлом имелись связи.

Хорошее совпадение формы впадин и выступов центральной части сечения и внутренней части чехла, их «комплементарный» характер могут свидетельствовать о плотном прилегании этих частей друг к другу в растянутом отростке. Устранение зазора и более плотная упаковка субъединиц чехла уменьшают диаметр сокращенного отростка, равного 270 Å, до поперечных размеров растянутой формы.

Характерный вид имеет стержень в сечении. Форма шестиконечной структуры, с длиной лучей примерно 25—30 Å, которую имеет стержень, ассоциируется с формой базальной пластинки, которую она приобретает, иницируя сокращение отростка (переход «шестиугольник — шестиконечная звезда») [20]. Сходство усиливается тем, что лучи звезды слегка наклонены в одну сторону. Весьма близкое изображение, полученное в результате цифровой фильтрации изображения базальной пластинки, приведено в работе [14]. Выполненная реконструкция позволяет говорить о том, что подобная форма характерна не только для центральной зоны базальной пластинки, но и для внутренней структуры сокращенного отростка. Центральный канал стержня имеет диаметр около 50 Å. Это несколько больше диаметра канала растянутого отростка. Не вполне удовлетворительное совпадение формы при наложении изображений сечений поличехлов и сокращенной формы базальной пластинки, отмеченное Амосом и Клугом [14], по-видимому, объясняется малым диаметром пустующей зоны в се-

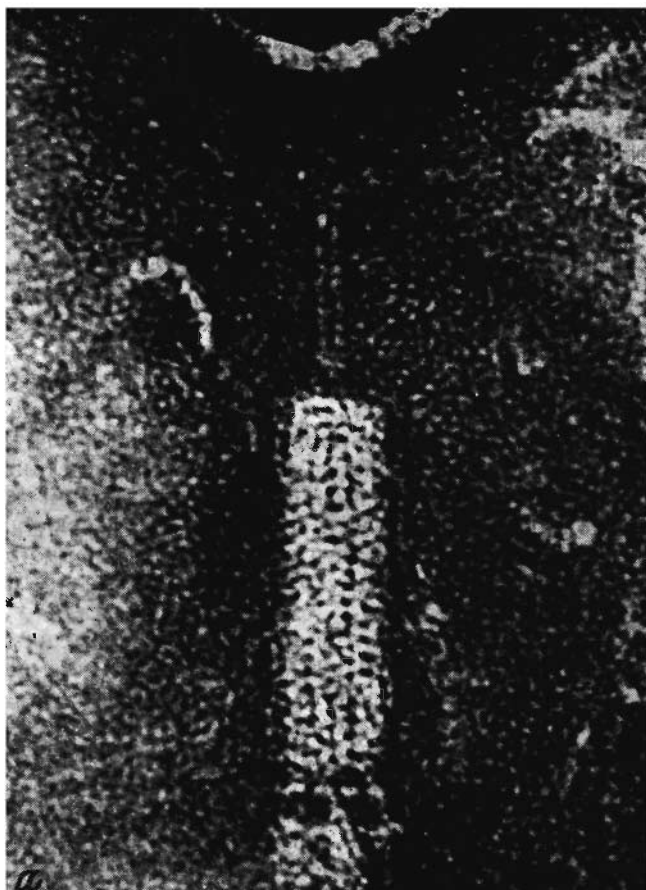


Рис. 108. Структура сокращенного отростка бактериофага Н-17

а — электронно-микроскопическая фотография бактериофага (лучшим по качеству оказалось изображение отростка, при сокращении чехла которого произошло отделение последнего от головки); *б* — дифракционная картина от сокращенного отростка; *в* — график n, l (n — порядок функции Бесселя, l — номера слоевых линий) и радиальная проекция структуры; *г* — рассчитанное на УЦВМ сечение сокращенного отростка на экране дисплея (внизу — гистограмма распределений плотности в сечении с указанием уровня ограничения); *д* — трехмерная модель сокращенного отростка

чений поличехлов. Реконструкция показывает, что структура, имеющая форму шестиконечной звезды с наклоненными лучами в центральной части базальной пластинки, вероятно, должна быть связана со стержнем и в результате сокращения полностью отделилась от чехла. Наличие зазора между стержнем и чехлом

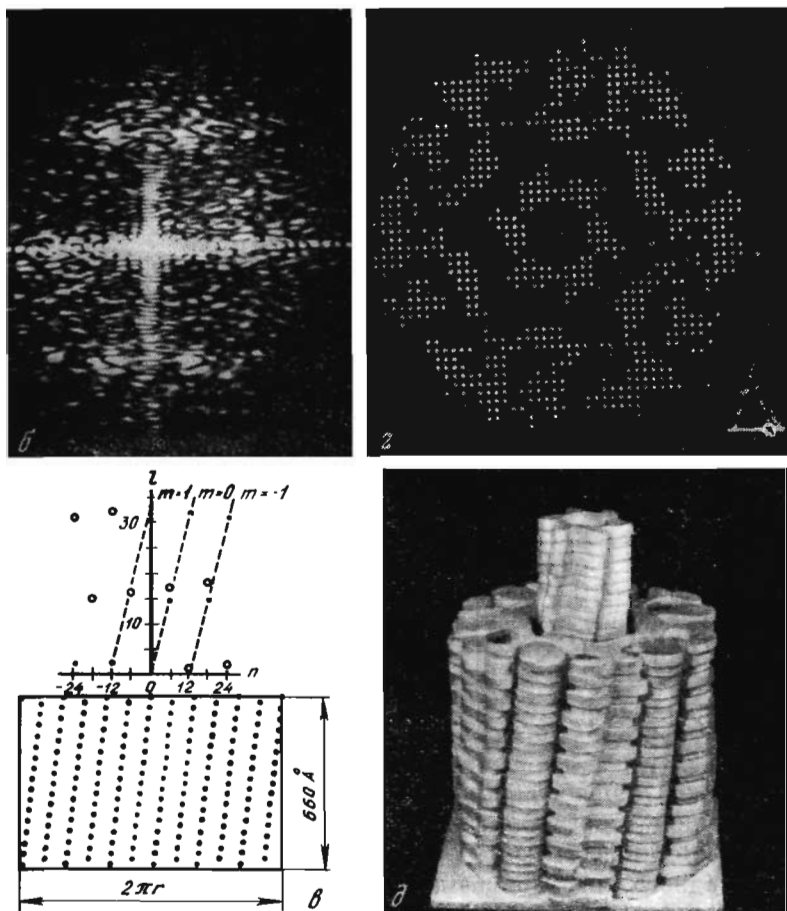


Рис. 108 (окончание)

можно увидеть и в радиальных распределениях плотности сокращенного отростка, стоящего на торце (рис. 4, б, в [14]). Возможно, что поличехлы имеют внутренний диаметр, несколько меньший, чем сокращенный чехол.

Изменения формы субъединиц чехла связаны с изменением характера укладки полипептидной цепи. По данным реконструкции, каждая из субъединиц имеет два концевых утолщения неравной величины, выступающих на поверхности чехла, связанных между собой перемычкой, спрятанной внутри. Каждая из семейства спиралей с большим периодом образована совокуп-

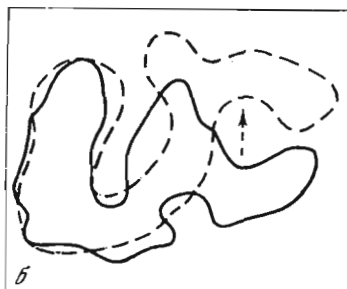
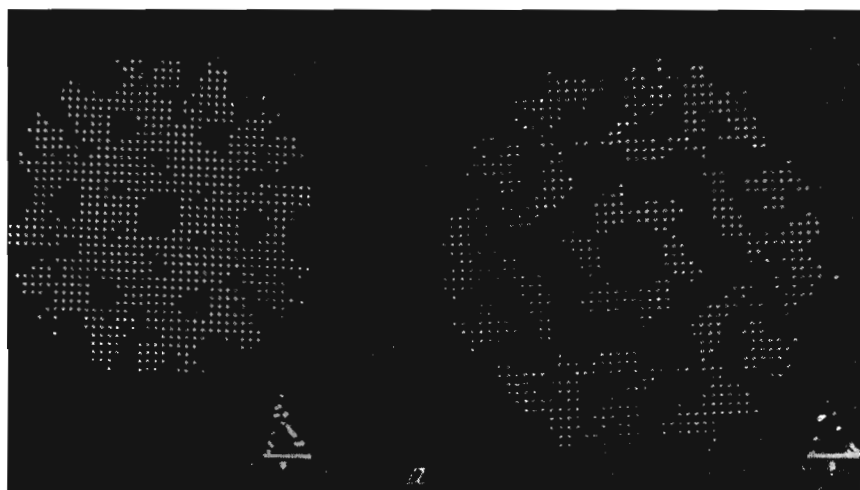


Рис. 109. Сравнение структурных перестроек в растянутом и сокращенном отростках бактериофага Н-17

а — сечения растянутого (слева) и сокращенного (справа) отростка;

б — усредненные изображения сечений субъединицы растянутого и сокращенного чехла

ностью одного вида концевых утолщений. Различие в размерах в какой-то степени маскируется достаточно плотной упаковкой на поверхности чехла. Спирали малого периода сформированы путем чередования концевых утолщений обоих видов вдоль каждого витка (рис. 108, б). Изменение формы определяет изменение в положении и числе контактных групп в субъединицах.

На периферии чехла проходят шесть внутренних спиральных каналов, вытянутых в тангенциальном направлении, суженных в центральной части и напоминающих цифру 8 с размерами $30 \times 100 \text{ \AA}$.

Сравнение сечения сокращенного и растянутого отростков (рис. 109, а) позволяет предполагать, что растянутый отросток представляет собой неустойчивое состояние структуры как по длине, так и по ширине. Отросток растянут и одновременно компактно свернут. Причем стабилизирующей структурой является

стержень. Косвенным подтверждением этому могут служить данные морфогенеза, согласно которым стержень является матрицей, на которой происходит сборка чехла [21]. Совокупность событий, приводящих к реорганизации структуры при сокращении, выглядит так. Реорганизация базальной пластинки сопровождается структурными перестройками в стержне, в результате которых он (или какая-то неописанная пока структура, плотно прилегающая к нему) приобретает форму шестиконечника с несколько наклоненными в одну сторону лучами. Возможно, что стержень имеет подобную форму и в растянутом отростке, но ее не удастся наблюдать из-за плотного прилегания чехла и стержня. Разрыв определенных связей приводит к отделению чехла от стержня и образованию зазора между ними. Чехол разворачивается и одновременно укорачивается. Субъединицы чехла при этом, совершая одновременно две формы движения — подуге увеличивающегося радиуса при уширении чехла и в вертикальном направлении при укорочении, в результате движутся по коническим винтовым линиям, совпадающим, возможно, с переходными спиралями в модели Муди [22].

Более детального анализа заслуживает характер перестроек, происходящих в субъединицах при сокращении. В сечениях сокращенного чехла можно идентифицировать участки, соответствующие внутренним спиральным каналам растянутой структуры. Они лежат в вершинах зазора, образовавшегося между чехлом и стержнем. Они расположены на расстоянии около 60 Å. В результате сокращения и отделения чехла от стержня спиральные каналы оказываются незамкнутыми со стороны, обращенной к центру отростка. Кроме того, отделение субъединиц сокращенного чехла друг от друга происходит за счет разрыва боковых стенок спиральных каналов. Таким образом, можно более четко определить локализацию структуры в сечении растянутого чехла, из которой в результате разрыва определенных связей и конформационного перехода формируются субъединицы сокращенного чехла. Она ограничена местами потенциальных разрывов между субъединицами и внутренним спиральным каналом. На рис. 109, б совмещены усредненные по шести результатам восстановления изображения сечений субъединиц растянутого и сокращенного чехла (сплошная линия соответствует субъединице растянутого чехла, пунктирная — сокращенного). В обоих случаях субъединицы имеют близкую форму, напоминающую рыболовный крючок. Преобразование формы при сокращении должно включать в себя, по-видимому, движение большего концевой утолщения (вдоль направления указанной стрелкой) и некоторую модификацию концевых утолщений.

Итак, на примере трехмерной модели отростка бактериофага показано, что методы восстановления объемных биологических

структур дают наглядное представление о механике пространственных перестроек «биологических молекулярных машин».

Теперь перейдем к изложению метода, позволяющего изучать рельеф поверхности клеток.

9.4. Голографический синтез объемного изображения поверхности клеточной мембраны

Реология клеточных мембран

Реология рассматривает вопросы течения и деформации сплошных сред. Все тела, встречающиеся в природе, обладают в той или иной степени текучестью.

Если для многих «простых» жидкостей вязкость постоянна (это заметил еще Ньютон), то в коллоидах вязкость становится переменной величиной. Возникновение в жидких дисперсных системах и растворах полимеров пространственных структур, образуемых сцеплением частиц или макромолекул, вызывает резкое повышение вязкости. В «структурированных жидкостях» работа внешней силы затрачивается не только на преодоление обычной (ньютоновской) вязкости, но и на разрушение структуры.

Вязкость цитоплазмы клеток прежде всего связана со структурой составляющих ее биополимеров и органоидов. Абсолютная вязкость цитоплазмы колеблется от 2 до 50 спз ($1 \text{ спз} = 10^{-3} \text{ н} \cdot \text{с}/\text{м}^2$). Она меняется в различных частях клетки и в разные периоды клеточного цикла. В пределах от $+12 \div 15$ до $+40 \div 50^\circ$ вязкость цитоплазмы постоянна, вне этих пределов она увеличивается [23].

Плазматические мембраны клеток обладают заметной эластичностью и низким поверхностным натяжением ($0,1\text{—}2,0$ дин/см). Клетки легко деформируются, но при снятии нагрузки они, как правило, приобретают первоначальную форму, определяемую белковым каркасом. Бактериальные и животные клетки благодаря белковому каркасу способны выдержать большое осмотическое давление внутри клетки (до 20 атм). Если с помощью лизоцима убрать белковый каркас и оставить только плазматическую мембрану, то клетка приобретает шаровидную форму. Это объясняется тем, что эластичная плазматическая мембрана стремится образовать форму с минимальным запасом энергии [24].

В физической механике существует теория упругих пленок, основанная на работах К. Ф. Гаусса и У. Гиббса, но все попытки приложения этой теории к описанию мембран живых клеток не увенчались успехом.

Возникает вопрос: можно ли к цитоплазме и мембранам живой клетки (т. е. гетерогенным системам, обладающим свойства-

ми гомеостаза, имеющим внутри себя обратные связи) применять понятия физической механики, а именно понятие вязкости, коэффициентов поверхностного натяжения, модуля упругости и т. д.?

Клетка является динамической системой, поэтому необходимо исследовать не абсолютные значения коэффициентов, используемых в физической механике, а локальное изменение этих величин во времени и пространстве. При этом следует учитывать три момента.

1. Упаковка молекул фосфолипидов и белков наязывает мембране, состоящей из них, такую форму, при которой электрический заряд внутри слоя будет минимальным. Поэтому такая пленка легко искривляется в очень малых пределах (пока не произойдет некоторое ее сжатие), а затем для ее дальнейшего искривления требуются большие усилия. Таким образом, изменения вязкости и коэффициента поверхностного натяжения имеют нелинейный характер.

2. Мембрана живой клетки находится на грани фазового перехода от кристаллической структуры к аморфной, т. е. коэффициент вязкости по поверхности мембраны меняется от точки к точке и находится в состоянии динамического равновесия, по-видимому, управляемого белками-«скрепками». Другими словами, часть участков мембраны переходит в аморфное состояние, в свою очередь другая часть переходит в кристаллическое. Это условие также делает классическую теорию гибких пленок несправедливой для биологических мембран.

3. Известно утверждение «мембрана рождает мембрану», т. е. наличие мембраны служит «затравкой» для дальнейшего увеличения ее поверхности, а рост мембраны никак не учитывается в существующей теории.

Чтобы избежать перечисленных выше трудностей в применении классической теории упругих пленок к биологическим мембранам, было предложено [25] выделить и отдельно описывать три типа реакции мембран при воздействии на них: первый — изменение формы без изменения площади поверхности при низком модуле упругости (т. е. чистая деформация); второй — увеличение поверхности без изменения формы (т. е. чистый рост) и, наконец, третий — локальное изменение кривизны мембраны за счет местного молекулярного воздействия (например, разжижение мембраны, локальное изменение вязкости). Во втором случае мембране приписывается большой коэффициент упругости. Она как бы пружинит, противодействуя изменению формы. Очевидно, что третий тип реакции мембран активный, а поэтому наиболее сложный. Экспериментально определить изменение коэффициента вязкости по поверхности мембраны чрезвычайно трудно, поэтому о нем судят косвенно по изменению эластических констант под действием осмотического давления. Однако даже такое грубое приближение

дает возможность вычислить величины взаимодействующих сил, возникающих в молекулярных слоях мембран за счет электростатических зарядов.

В работе [26] в основу классификации положены физико-химические феномены, поддерживающие целостность мембраны при растягивающих воздействиях. При разрыве мембран возможны два варианта разрушения — лизис и фрагментация. Фрагментация требует в 1000 раз меньше энергии, чем лизис. На основании этого указывалось на существование трех физико-химических факторов, удерживающих целостность мембраны и противодействующих ее разрушению:

- 1) поверхностное стягивание в результате химического контакта за счет ближайшего окружения, находящегося вне мембраны (например, гидрофобные взаимодействия);

- 2) поддержание устойчивости оболочки за счет слабых сил молекулярного сцепления внутри мембраны (двумерные, жидкостные характеристики);

- 3) поддержание устойчивости оболочки за счет сильных молекулярных взаимодействий (свойства участков мембран, близкие к свойствам твердого тела).

Таким образом, наиболее слабым местом, определяющим разрыв мембран, является сцепление между двумя липидными слоями. Эти два слоя начинают «скользить» друг относительно друга, приводя к фрагментации мембран [26].

В настоящее время задача реологии клеточных мембран только поставлена. Для ее решения необходимы чувствительные методы локального определения кривизны мембран. Одним из таких методов служит непосредственное наблюдение формы клеточных мембран. Описанный ниже метод, разработанный в Институте биологической физики АН СССР [27], позволяет определять локальную кривизну клеточных мембран по электронно-микроскопическим изображениям клеток.

Синтез голограммы по набору ракурсных снимков

Синтез голограмм из некогерентно записанных снимков производится в случаях, когда непосредственная запись объемных изображений затруднительна или невозможна из-за отсутствия в соответствующем диапазоне источников когерентного излучения (например, в электронной микроскопии, рентгенографии). Снимки, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа, благодаря значительной глубине фокуса обладают заметным «эффектом объемности». Однако более точная оценка размеров выступающих деталей и рельефа на них затруднительна из-за отсутствия параллакса.

В основе метода лежит особенность нашего зрения, позволяющая замесить трехмерный предмет, рассматриваемый одним глазом с данной точки, соответствующим двумерным изображением, полученным методом центрального проецирования с центром в этой же точке. При наблюдении обоими глазами двух плоских изображений, отличающихся на соответствующий ракурсный угол, можно получить стереопару и образ объемного предмета. Составная голограмма позволяет запастись целый набор таких стереопар в значительном угловом диапазоне. Это создает при рассматривании восстановленного изображения полную иллюзию реального предмета. С помощью специальных методов могут быть измерены геометрические параметры поверхности объекта.

Процесс синтеза голограмм состоит из двух этапов: получения двумерных изображений объекта под различными углами зрения и трансформирования этих изображений в голограмму. Двумерные изображения, являющиеся исходным материалом для синтеза голограммы, обычно представляют собой фотографии объекта, снятые с помощью некогерентных источников в видимом [28—30], рентгеновском диапазонах длин волн [31, 32] или в электронном пучке [33]. Эти снимки получают, поворачивая объект вокруг оси, проходящей через центр объекта, либо перемещая регистрирующую систему вокруг объекта. Информация о различных ракурсах объекта объединяется затем на одной голограмме путем последовательного экспонирования участков голограммы или многократным экспонированием всей голограммы с соответствующими двумерными изображениями совместно с опорным пучком. Между экспозициями производятся взаимные перемещения элементов системы регистрации голограммы, перемещение маски с прямоугольным отверстием или угловое перемещение двумерного изображения (поворот самой голограммы). Восстановленное изображение представляет собой объемное изображение.

При синтезе голограммы большое значение имеет максимальный угол обзора реконструированного трехмерного изображения.

В методе, предложенном в Институте биологической физики АН СССР [27], синтез составной голограммы осуществляется по набору ракурсных снимков, полученных на сканирующем электронном микроскопе с сохранением нормального бинокулярного параллакса в одном (например, горизонтальном) направлении, а диапазон углов зрения увеличивается за счет записи голограмм ракурсных снимков не только по горизонтали, но и по вертикали. При просмотре составной голограммы от одного края до другого по вертикали создается эффект вращения трехмерного изображения. Потеря вертикального параллакса несущественна для трехмерного восприятия. Составная голограмма представляет собой прямоугольную матрицу из $m \times n$ прямоугольных элементов.

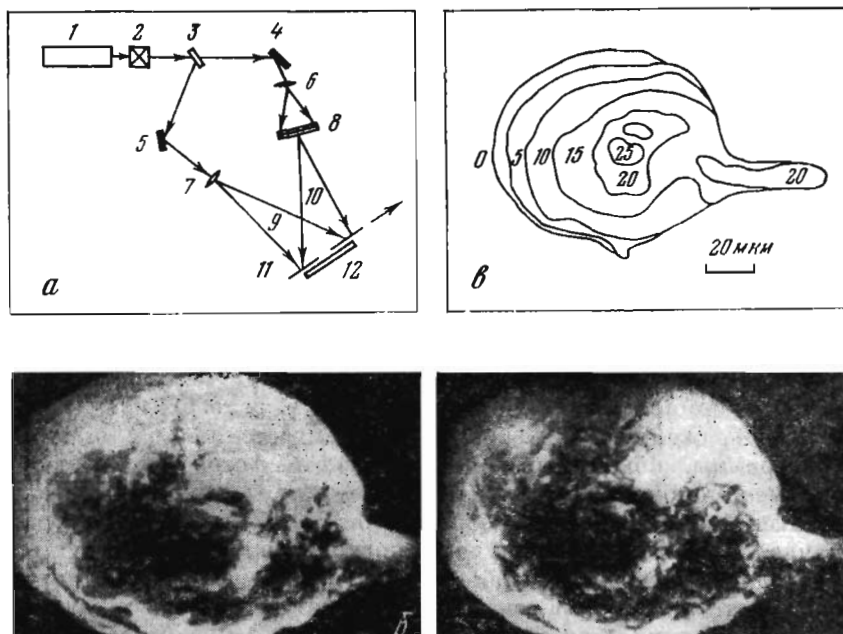


Рис. 110. Синтез составной голограммы

a — оптическая схема установки: 1 — лазер, 2 — затвор с реле времени, 3 — полупрозрачное зеркало, 4, 5 — зеркало, 6, 7 — микрообъективы с точечными диафрагмами, 8 — диапозитив с рассеивателем, 9 — опорный пучок, 10 — предметный пучок, 11 — передвигаемая щель, 12 — голограммная пластинка; *б* — два снимка мнимого трехмерного изображения нейрона, образующего стереопару (сняты фотоаппаратом с расстояния 25 см от мнимого изображения при базисе 65 мм); *в* — линии равной кривизны в изображении изолированного нейрона большого прудовика *Limnaea stagnalis*, полученные в результате измерения восстановленного изображения методом «светящейся сетки»

Оптическая схема установки приведена на рис. 110, *a*. Регистрация голограммы осуществляется с помощью гелий-неонового лазера 1 с длиной волны излучения 632,8 нм. Экспозиция голограммных элементов матрицы производилась с помощью затвора 2, управляемого реле времени. Размеры элемента голограммы 10 × 10 мм. Размеры диапозитивов 50 × 50 мм. Расстояние от голограммной пластинки до диапозитива 20 см, от наблюдателя до голограммной пластинки 5 см. Для получения голограммы использовались пластинки типа ВР-Л. Восстановленное с голограммы изображение обладает эффектом трехмерности. Два изображения, образующие стереопару, показаны на рис. 110, *б*. В качестве примера рассмотрим поверхность изолированного нейрона большого прудовика *Limnaea stagnalis*. Ракурсные снимки

изучаемого микрообъекта получены на сканирующем электронном микроскопе JSM-U3, работающем в режиме вторичной электронной эмиссии, с помощью гониометра с определенным угловым шагом $\Delta\varphi$. Предельный диапазон углов наклона гониометра — $5-46^\circ$ был расширен с помощью специально изготовленного устройства поворота объекта. На объект напылялся в вакуумной камере тонкий слой углерода, а затем серебра. Снимки (диапозитивы) устанавливались на гониометрический столик и освещались через матовое стекло. Затем последовательно голографировались на элементах составной голограммы через прямоугольную щель, расположенную вплотную к голограммной пластинке. Размеры щели могли регулироваться в двух взаимно перпендикулярных направлениях, а сама щель перемещалась с помощью микрометрического винта.

Ориентация диапозитивов должна быть нормальной к линии, соединяющей центр диапозитивов с центром отверстия в маске. Индикатриса рассеяния матового стекла обеспечивает перенос информации в данную точку голограммы со всех точек диапозитива.

Изучение геометрии изображения объекта производилось следующим образом. Светящаяся точка (торец световода диаметром 0,5 мм) совмещалась при бинокулярном наблюдении с характерными точками изображения с помощью трехкоординатного устройства перемещения, снабженного шкалой отсчета. Для изучения топографии поверхности объекта использовались также светящиеся сетки, перемещаемые с определенным шагом в направлении наблюдения. Для каждого положения сетки определялся контур поверхности объекта, совпадающий при бинокулярном наблюдении с плоскостью сетки. Светящаяся сетка изготавливалась фотографическим способом и подсвечивалась через матовое стекло. На рис. 110, в представлены контуры одинаковой кривизны поверхности объекта, снятые с помощью светящейся сетки.

От чего зависит разрешение данного метода? При переносе информации с диапозитивов на элементы одного из горизонтальных рядов голограммной пластины центр щели, через которую происходит экспонирование, располагается в той части плоскости, которая соответствовала угловому положению объекта при получении двумерного диапозитива. Последующие ряды матрицы записываются аналогично, но соответствуют сдвинутым на некоторый угол $\Delta\beta$ ракурсам обзора объекта. Полный диапазон углов обзора объекта при этом составляет

$$\theta = (m - 1)\Delta\varphi + (n - 1)\Delta\beta, \quad (9.19)$$

где m — число элементов ряда матриц, $\Delta\varphi$ — угловой шаг гонио-

метра микроскопа при получении ракурсных снимков; n — число рядов голограммной матрицы.

Размеры диапозитивов, вводимых в систему синтеза составных голограмм, должны быть достаточными для обеспечения рассматривания с расстояния наилучшего зрения без потери четкости изображения, сформированного электронным микроскопом, а кроме того, не слишком большими, так как при этом увеличиваются габариты всей системы для синтеза составных голограмм.

При выборе размеров элементов голограммной матрицы приходится идти на компромисс между необходимостью плавного изменения ракурса объемного изображения при переходе от элемента к элементу матрицы и возможностью наблюдения всего объекта через один элемент голограммной пластины. Чем меньше будет ракурсных снимков (а следовательно, и синтезированных с них элементов составной голограммы), тем ниже будет разрешение деталей рассматриваемого объекта. Наблюдение изображения одним глазом через более чем один элемент матрицы приводит к искажению изображения. Изображения, синтезируемые разными элементами матрицы, соответствуют разным точкам наблюдения. Ограниченность числа точек наблюдения определяет предел разрешения наблюдаемых деталей.

Рассмотрим еще один метод — построение трехмерных моделей структур ферментов на основе анализа их электронно-микроскопических изображений. В качестве примера возьмем фермент — лейцинаминопептидазу. Работа по уточнению структуры этого фермента была проведена в Институте биологической физики АН СССР совместно с сотрудниками Центрального института молекулярной биологии АН ГДР [34].

9.5. Моделирование структуры биологических макромолекул

Исследование структуры ферментов

Разнообразие ферментов очень велико. Они представляют собой сравнительно большие белковые молекулы (молекулярный вес от 10^4 до 10^6), высокоспецифичные по отношению к субстрату. Это определяется структурным соответствием фермента (его активного центра) и субстрата. Механизм взаимодействия «субстрат — фермент» не может быть выяснен полностью, если не известна пространственная конфигурация молекул субстрата и фермента.

Основные структурные характеристики фермента и субстрата (размеры, вес в гидратированном состоянии и полный поверхностный заряд) можно определить в растворах физико-химическими

методами. Также можно определить число активных центров, т. е. сколько молекул субстрата могут быть связаны с одной молекулой фермента (чаще всего — от 1 до 4). По данным дисперсии оптического вращения можно рассчитать долю упорядоченных (регулярно скрученных) и неупорядоченных (скрученных нерегулярно) участков, в некоторых случаях удается получить информацию о распределении химических групп в области активного центра.

Многие белки удается получить в кристаллическом виде и с помощью рентгеноструктурного анализа воссоздать точную модель структуры молекулы с разрешением до 1,5—2 Å. Однако сложности рентгеноструктурного анализа, связанные с получением информации о фазах рассеиваемого излучения, а также трудоемкость вычислений заставляют искать новые возможности в области электронной микроскопии для анализа биологических макромолекул.

Приведем краткую характеристику фермента, используемого для иллюстрации возможностей исследования макромолекул в электронной микроскопии. Лейцинаминопептидаза (ЛАП) — фермент, гидролитически расщепляющий пептиды со свободной аминогруппой у N-концевого аминокислотного остатка. Молекулярный вес ЛАП, выделенной в кристаллической форме из хрусталика быка, 326 000. Молекула ЛАП состоит из шести идентичных субъединиц с молекулярным весом $54\,000 \pm 4000$ [35]. Агрегация субъединиц может быть различной, исключена, по-видимому, лишь плоская гексагональная упаковка [35]. Возможна агрегация субъединиц в форме тригональной призмы или октаэдра (рис. 111, а) [35, 36].

Целью работы явилось уточнение пространственной организации кристаллических агрегатов ЛАП по электронно-микроскопическим данным с использованием моделирования на УЦВМ и оптической обработки изображений в когерентных системах [34]. Необходимо было уточнить, под каким углом две группы тримеров расположены по отношению друг к другу.

Интерпретация электронно-микроскопических изображений кристаллической лейцинаминопептидазы

На рис. 111, б показано электронно-микроскопическое изображение кристаллических агрегатов ЛАП с увеличением 300 000. С целью исключения артефактов для контрастирования использовали как катионные (уранилаксалат), так и анионные (метил-аминовольфрамат) контрастирующие вещества.

Негатив электронно-микроскопического изображения ЛАП (рис. 111, б) помещали в дифрактометр. Описание дифрактометра

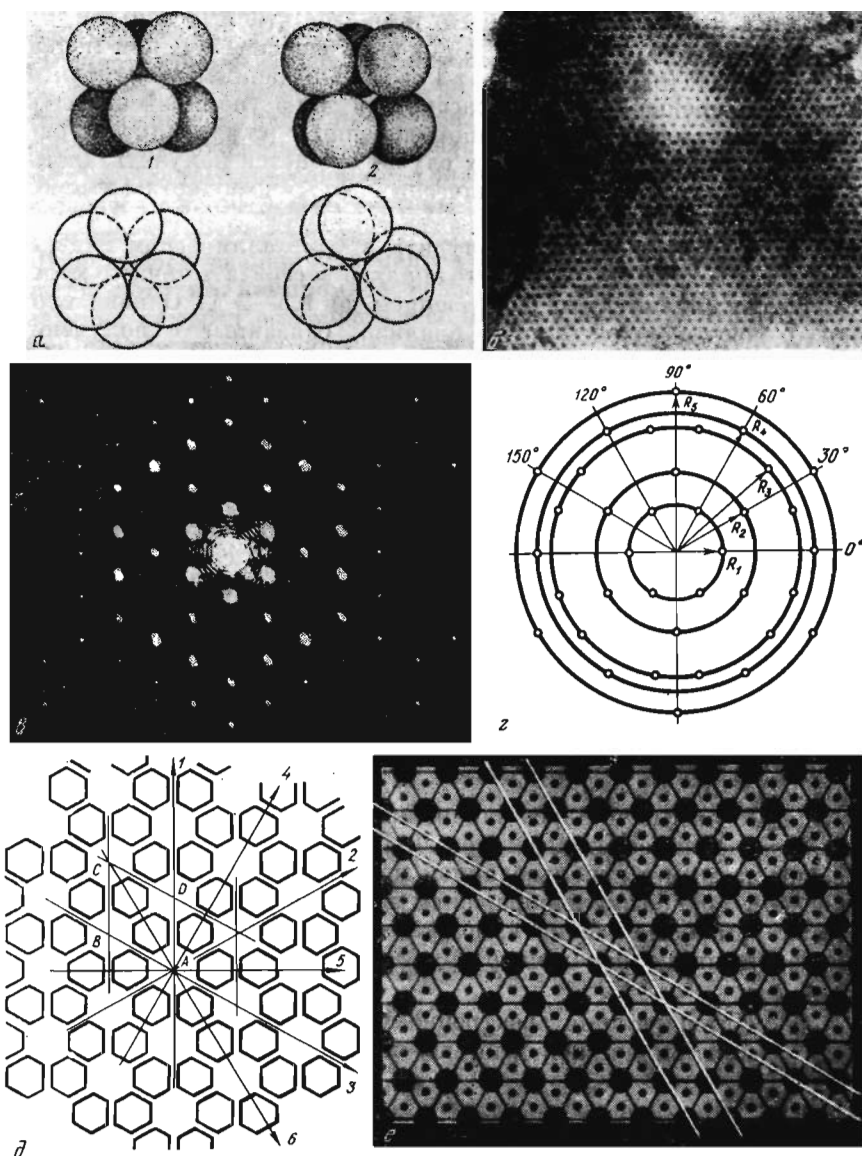


Рис. 111. Анализ электронно-микроскопического изображения кристаллической лейцинаминопептидазы методами оптической обработки изображений а — возможная агрегация субъединиц (1 — модель Дамашуна [35]; 2 — уточненная нами модель); б — электронно-микроскопическое изображение; в — дифракционный спектр участка изображения; г — схема расположения дифракционных максимумов в спектре; д, е — модельные изображения, полученные в результате анализа спектра

имеется в работе [2]. Дифракционный спектр участка микрофотографии приведен на рис. 111, *в*. Как показали замеры, дифракционные максимумы спектра располагаются на концентрических окружностях (рис. 111, *з*), радиусы которых представляются рядом чисел: $1, \sqrt{3}, \sqrt{7}, 3, 2, \sqrt{3}, \dots$ В соответствии с выражением (9.3) от спектра изображения можно перейти опять к плоскому изображению. При построении модельных изображений использовались статистические параметры расположения дифракционных максимумов в спектре.

На рис. 111, *д, е* показаны модельные изображения с истинным характером симметрии. Распределение энергии в спектре по направлениям $0, 60, 120^\circ$ (рис. 111, *в, з*) соответствует распределению интенсивности в структуре вдоль направлений, указанных стрелками *1, 3, 2* (поворот на 90° , рис. 111, *д*); составляющие спектра вдоль направлений $30, 90, 150^\circ$ (рис. 111, *з*) соответствуют распределениям интенсивности в структуре по направлениям, указанным стрелками *6, 5, 4* (рис. 111, *д*). Положение рефлексов на окружности радиусов R_1 и R_2 (рис. 111, *в, з*) соответствует расстояниям в реальной структуре d_2 и d_1 (рис. 111, *е*).

Проекция каждой пары тримеров обладает симметрией третьего порядка, узлы решетки представляют собой центры симметрии шестого порядка (рис. 111, *д*). Элементарная ячейка $ABCD$ путем трансляций вдоль направлений *1, 3* формирует изображение структуры.

Следующий этап обработки изображения состоял в том, чтобы точно определить геометрические параметры элементарной ячейки структуры. Для этого была проведена двумерная амплитудная фильтрация электронно-микроскопического изображения [2]. Результатом фильтрации явился «очищенный» от шумов участок электронно-микроскопического снимка, на котором видно, что пара тримеров в проекции представляет собой шестиугольник с неравными сторонами (рис. 112, *а*). Чтобы убедиться в этом, с помощью денситометра оптическая плотность каждого участка отфильтрованного снимка была оцифрована. Затем участки одинаковой плотности были соединены линией. Одно из изображений пары тримеров, ооконтуренное линией равной плотности, показано на рис. 112, *б*, где a и b — стороны шестиугольника. На основе измерений величин a и b была построена гистограмма (рис. 112, *в*). Из гистограммы видно, что отношение наиболее вероятных значений сторон шестиугольника составляет $1,6\text{--}1,7$, а распределение близко к нормальному.

Итак, после проведенных измерений (рис. 112, *в*), имея априорную информацию о возможной агрегации субъединиц в пространстве (рис. 111, *а*), можно с помощью моделирования на УЦВМ попытаться определить угловое расположение субъединиц по отношению друг к другу.

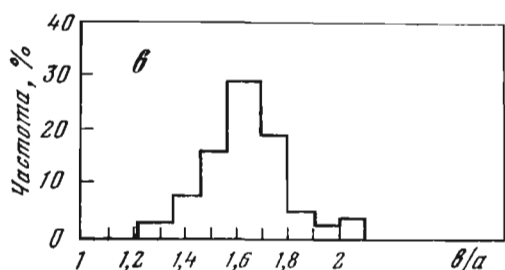
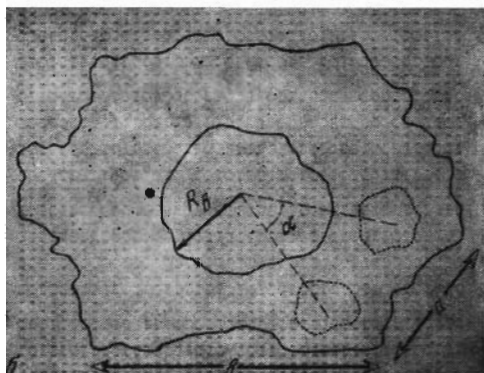
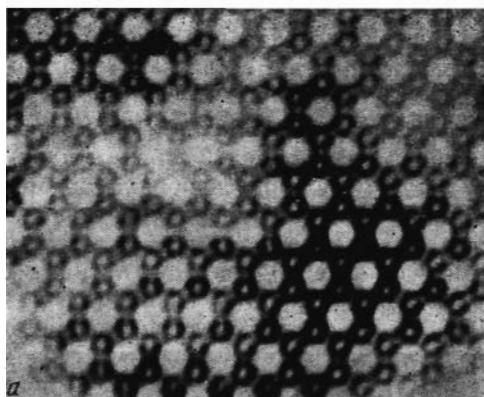


Рис. 112. Определение размера сторон шестиугольника, образованного парой тримеров

а — изображение кристаллической лейцинаминопептидазы, полученное в результате оптической фильтрации;
б — контур равной оптической плотности;
в — гистограмма распределения соотношения сторон

При изучении реальных биологических структур мы сталкиваемся с трудностями при их описании. Поэтому для задач моделирования исследуемая объемная система нуждается в некоторых упрощениях.

Эти упрощения должны обеспечить построение математической модели, содержащей в себе основные элементы ори-

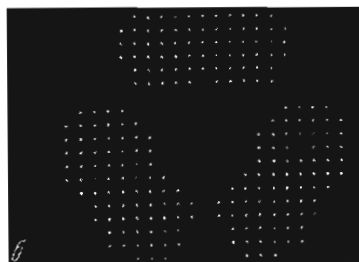
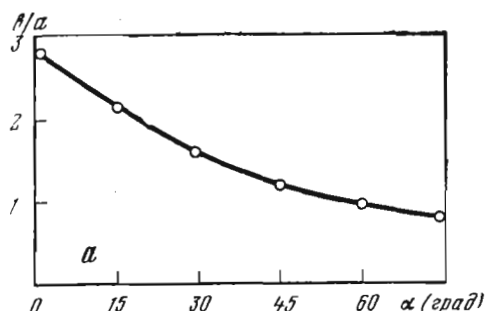


Рис. 113. Результат моделирования структуры кристаллической лейцинаминопептидазы на УЦВМ

а — изменение соотношения сторон шестиугольника в зависимости от углового расположения пары тримеров; б — условное изображение пары тримеров на экране дисплея

гинала и в то же время обеспечивающей возможность анализа структуры оптимальным образом.

В данном случае каждый тример на первом этапе моделирования на УЦВМ был представлен в виде трех шариков равномерной плотности. Структурная связь между тримерами в одной плоскости заменялась условием касания соседних тримеров и соответствующих тримеров в параллельной плоскости. Варьировался угол поворота α верхнего тримера относительно нижнего в пределах $0-75^\circ$. Построенные таким образом модификации модели обрабатывались с помощью УЦВМ путем введения математического оператора, соответствующего формированию реального изображения структуры в электронном микроскопе [см. выражение (9.1)]. Полученные цифровые массивы распределения плотности модельного «изображения» структуры сравнивались с массивом плотности пары тримеров на электронно-микроскопической фотографии структуры, полученным на денситометре. За критерий близости выбирался минимум среднеквадратичных отклонений, вычисленный по соответствующим точкам массива реальной структуры и модельных вариантов, полученных при разных углах ориентации тримеров. Кроме математического критерия оценки проводилась визуальная оценка близости модели и объекта с помощью дисплея, а также цифровых распечаток рассматриваемых массивов, также производилось сравнение и по двумерным спектрам. Для этого с помощью быстрого преобразования Фурье на УЦВМ строились «дифракционные» картинки от разных модификаций моделей и сравнивались с дифракционными спектрами реальной структуры.

Моделирование с использованием УЦВМ позволило в процессе работы выявлять между моделью и реальным объектом как сходство, так и расхождения, обусловленные или построением модели,

или влиянием случайных «шумов». Последовательное сглаживание таких расхождений приводило к постепенному уточнению модели. В результате было рассчитано отношение длин сторон как функция от взаимного угла поворота пары тримеров, расположенных в двух параллельных плоскостях (рис. 113, а). Соотношению сторон $b/a = 1,6 \div 1,7$ соответствовал угол $\alpha = 30 \div 40^\circ$. На рис. 113, б показано одно из изображений модели, рассчитанной на УЦВМ, сфотографированное с экрана дисплея.

Таким образом, сочетание оптической обработки изображений с математическим моделированием структуры на УЦВМ помогает количественной интерпретации пространственной организации объекта. Оба метода исследования дополняют друг друга, подсказывая новые пути для более успешного моделирования.

Глава десятая

АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР ПО ИХ ИЗОБРАЖЕНИЯМ. ГЛИЯ—СОСУДЫ, ХРОМОСОМЫ

10.1. Преобразование изображений клеток в цифровую форму

В предыдущей главе сделан акцент на анализе пространственной организации клеточных структур в диапазоне разрешения электронного микроскопа. В этой главе остановимся на методах определения геометрических параметров изображений, полученных с помощью оптического микроскопа, на примерах исследования морфологии хромосом и некоторых срезов ткани.

Математические методы исследования изображений представляют собой различные способы формального описания двумерных конфигураций оптической плотности с учетом дополнительной информации и целей исследования. В таком виде математическое описание клеточных структур является частным случаем задачи распознавания образов.

Для машинного исследования оптических и геометрических характеристик клеток требуется преобразовать оптическое изображение препарата $I(x, y)$ в цифровой код. Для этого необходим сканирующий оптический микроскоп.

Трудности построения сканирующих оптических микроскопов связаны с необходимостью получения хорошего соотношения сигнал/шум при малой площади сканирующего элемента (до 10^{-8} мм^2).

Требуемая величина соотношения сигнал/шум зависит от конкретной постановки задачи. Например, для подсчета числа ядер клеток соотношение сигнал/шум допускается $4 \div 5$, а для измерения геометрических параметров с ошибкой не более 2% должно быть $50 \div 90$. Кроме того, существует множество факторов, искажающих форму сигнала, несущего информацию о структуре клетки (дифракция, нестабильность источников света и светоприемников, расфокусировка и т. д.). Влияние этих факторов на точность измерений проанализировано в работах [39, 50]. В настоящее время создано несколько типов сканирующих оптических микроскопов, в которых ошибки в получении информации о структуре клеток сведены к минимуму.

Сканирующие системы осуществляют последовательный просмотр поля изображения, выполняя фиксированные шаги вдоль направления осей x, y , и измеряют оптический сигнал после очередного шага. Таким образом, осуществляются квантование плоскости изображения и представление самого изображения в виде матрицы, связывающей значение оптического сигнала с координатами точки, где он был измерен. Процесс квантования приводит к геометрическим искажениям, которые в общем случае трудно поддаются учету [40–42, 50].

Дискретизация оптической плотности структуры объекта $I(x, y)$ по амплитуде также приводит к различного рода искажениям. Естественно, что квантование значений функции тесно связано с квантованием ее аргументов, однако указанные случаи геометрических искажений предполагали наличие черно-белого изображения, т. е. $I(x, y) = 1$ при (x, y) , принадлежащем к A ; $I(x, y) = 0$ при (x, y) за пределами A , где A — множество точек объекта. Реальные изображения биологических структур имеют полутона, которые, с одной стороны, обусловлены переменной прозрачностью самих объектов, а с другой — связаны с ограниченным пространственным разрешением приборов, формирующих изображение.

Удобно процесс получения изображения рассматривать в частотной области. С помощью преобразования Фурье распределение интенсивности света на изображении можно представить как результат наложения пространственных синусоидальных составляющих. В таком случае устройство ввода изображения можно рассматривать как фильтр низких частот, хорошо пропускающий низкие пространственные частоты (т. е. крупные детали изображения) и ослабляющий высокие частоты (т. е. мелкие детали).

Частотная характеристика изображения описывается выражением (9.2):

$$S_{из}(\omega_x, \omega_y) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} I_{из}(x, y) \exp[-j(\omega_x x + \omega_y y)] dx dy.$$

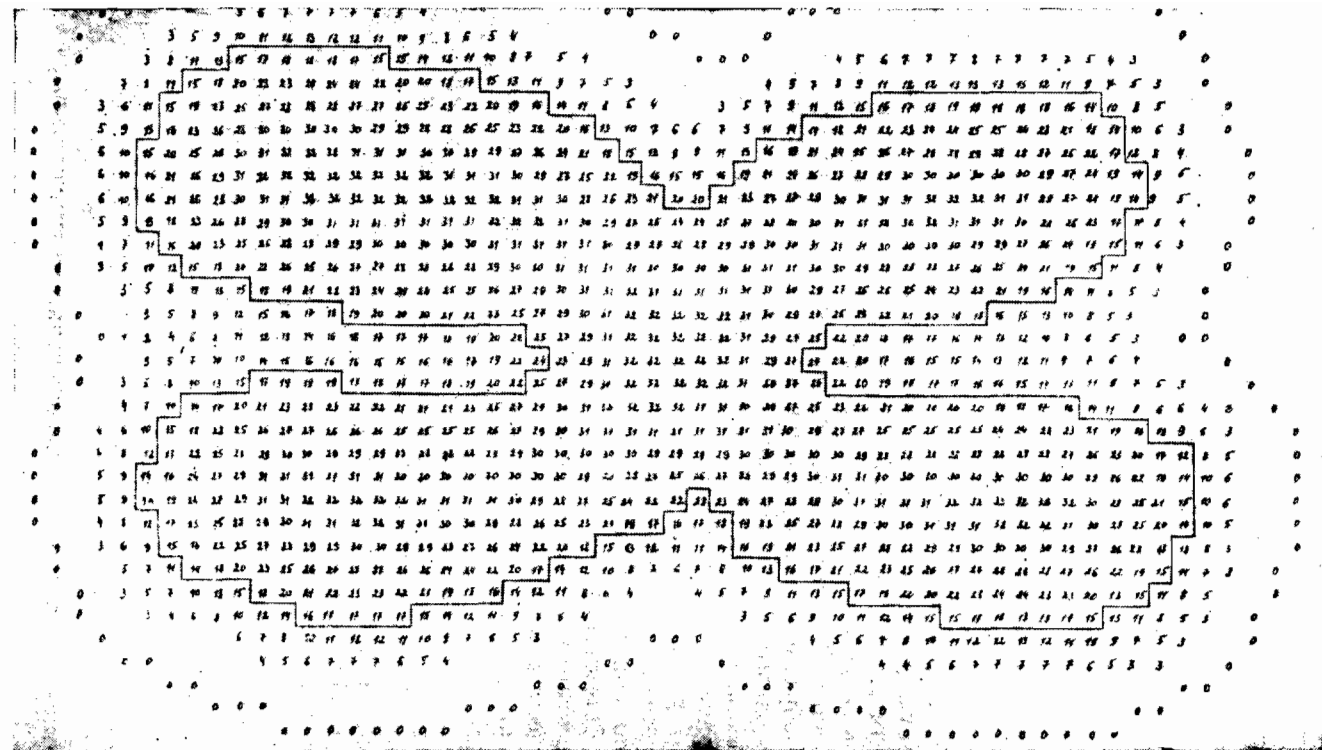


Рис. 114. Модель дифракции света на хромосоме

Сплошная линия — истинная граница хромосомы

Восстановление изображения в частотной области может быть осуществлено путем коррекции аппаратной функции системы (см. раздел 9.1):

$$S(\omega_x, \omega_y) = S_{из}(\omega_x, \omega_y) G(\omega_x, \omega_y), \quad (10.1)$$

где $S(\omega_x, \omega_y)$ — частотная характеристика восстановленного изображения, $G(\omega_x, \omega_y)$ — функция, корректирующая частотную характеристику устройства ввода и процесс дискретизации. Сказанное означает, что для восстановления частотной характеристики изображения необходимо соответствующим образом изменить амплитуды его частотных составляющих.

После корректирования частотной характеристики необходимо сделать переход в действительную область и определить истинное распределение интенсивностей света на изображении:

$$I(x, y) = \frac{1}{4\pi^2} \iint_{-\infty}^{+\infty} S(\omega_x, \omega_y) \exp[j(\omega_x x + \omega_y y)] d\omega_x d\omega_y. \quad (10.2)$$

Подобный способ восстановления изображения позволяет уменьшить искажения, вызванные процессом ввода и дискретизацией. Однако он связан с большим количеством вычислений. Кроме того, иногда он малоэффективен, так как значительный подъем частотной характеристики в области высоких частот может вызвать дополнительное «зашумление» изображения. Изображение хромосом на метафазной пластинке является таким изображением, где высокочастотные пространственные гармоники имеют существенное значение. В то же время световой микроскоп, работающий в видимой области, не пропускает высокочастотные составляющие.

Основная трудность при анализе изображений состоит в определении того, что следует считать границей объектов. Поскольку существует непрерывная функция плотности $I(x, y)$, то нельзя объективно указать такого значения уровня ограничения, где плоскость $I(x, y) = \text{const}$ соответствовала бы реальной форме объекта. В качестве иллюстрации на рис. 114 представлена модель дифракции на хромосоме в предположении, что истинное изображение имело бы во всех точках, принадлежащих хромосоме, значение яркости, равное 32 условным единицам. Как видно, ни одна линия изоплотности не соответствует истинной границе хромосомы.

Естественной моделью объекта являлась бы функция $I(x, y)$ типа:

$$\begin{aligned} I(x, y) &= P_0 & \text{при } f(x, y) \leq 0, \\ I(x, y) &= P_\Phi & \text{при } f(x, y) > 0, \end{aligned} \quad (10.3)$$

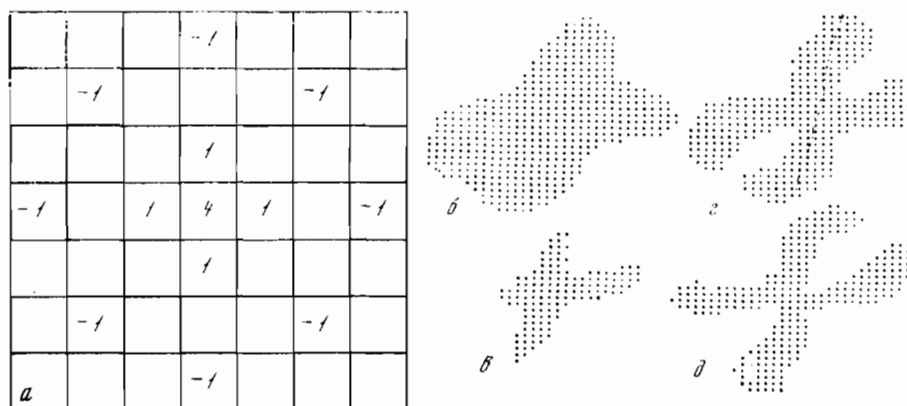


Рис. 115. Коррекция изображений

a — матрица весов; *б, в* — изображения хромосомы до корректровки при двух уровнях ограничения; *г, д* — изображения той же хромосомы после корректровки при тех же уровнях ограничения

где P_0 — уровень плотности объекта, P_Φ — уровень плотности фона. При этом границей объекта является линия разрыва значений P , определяющая контур объекта $f(x, y) = 0$. Преобразование плотности изображения в соответствии с указанной моделью объекта называют бинаризацией изображения (превращением полутонного изображения в черно-белое).

В настоящее время в распоряжении исследователей имеется много эвристических методов коррекции изображений, обеспечивающих подчеркивание границ объектов [45]. Применяют преобразование изображения с помощью локального оператора Лапласа [46]. В цифровой форме это выражается в виде суммирования с некоторыми весами оптических плотностей в данной и соседних с ней точках (рис. 115, *a*). Такое преобразование понижает до нуля уровень плотности в районе, где он был примерно постоянным.

Практически распределение весов выбирается исходя из визуального исследования результатов преобразования. Для каждого устройства ввода необходимо свое распределение весов.

На рис. 115, *б, д* приведены результаты обработки изображения одной хромосомы. Видно, что в результате коррекции бинарное изображение объекта становится менее критичным к выбору порога дискриминации плотности. Вместе с тем преобразование с помощью весовой матрицы требует значительно меньше вычислений (только 12 суммирований на каждую точку раstra). Интересный алгоритм для выбора порога в наиболее крутом месте усредненного фронта нарастания плотности предложен в работах [48—49].

Однако, несмотря на большое количество методов для коррекции границ клеток (обычно в литературе они называются методами предобработки), истинные границы удается найти далеко не всегда. Возможно, поэтому многие исследователи рассматривают бинарное преобразование как выбор подходящего уровня ограничения, а весь дальнейший анализ стремятся выполнить так, чтобы на него как можно меньше влияли погрешности определения границ.

10.2. Определение морфометрических параметров клеток и клеточных структур

Алгоритм определения геометрических параметров выпуклых фигур

Актуальность развития математических методов исследований геометрии фигур выпуклой формы (круги, эллипсы) не вызывает сомнения. К этой задаче сводится анализ морфологии эритроцитов, клеток паренхиматозных органов и других однослойных биологических объектов (одноклеточных водорослей, дрожжевых клеток, колоний бактерий и т. д.).

В табл. 7 дана сводка одиннадцати алгоритмов для получения количественных параметров двумерных фигур [50].

Алгоритмы описания клеточных структур сложной формы

Важными задачами клеточной биологии, имеющими большое прикладное значение, являются задачи построения лейкоцитарной формулы крови, диагностики раковых клеток и построения кариотипа.

Последняя, по-видимому, наиболее сложная из задач такого типа. Основная трудность состоит в том, что морфология метафазной хромосомы чрезвычайно разнообразна и во многом определяется процессами, протекающими при приготовлении препаратов, которые невозможно учесть.

На примере анализа изображений метафазных хромосом человека рассмотрим основные аспекты методов опознавания и измерения параметров биологических структур.

Процесс анализа может быть разделен на четыре этапа. На первом осуществляется выделение изолированных объектов, и вся совокупность точек изображения разделяется на связанные области. Это можно осуществить путем прослеживания внешних

Таблица 7

Сводка машинных алгоритмов планиметрии (получение количественных параметров двумерных фигур)

Код	Операция, реализуемая алгоритмом	Алгоритм	Обозначения в формулах
П-1-1	Счет фигур выпуклой формы	$N = \sum_{i=1}^N \bar{n}_i \Delta n_{i+1} = \sum_{i=1}^N n_i \Delta \bar{n}_{i+1}$	N — число фигур; n_i — хорда, образовавшаяся при пересечении объекта i -й строкой; n_{i+1} — хорда, образовавшаяся при пересечении объекта $(n+1)$ -й строкой; $\bar{n}$ — знак отрицания.
П-1-2	Счет фигур любой формы	$N = \sum_{i=1}^N n_i - \sum_{i=1}^N n_i \Delta n_{i+1}$	Обозначения те же, что и в П-1-1
П-2-1	Измерение среднего диаметра $\bar{d} = [\rho \sum n_i] / N$ кругов		$\bar{d}$ — средний диаметр кругов; ρ — шаг развертки; значение N определяется по алгоритму П-1
П-2-2	Получение интегральной кривой $\Delta l_i = l_i - k \Delta$; распределения кругов по диаметрам (метод последовательных приращений)	$N = \sum n_i (\Delta l_i) \Delta n_{i+1} (\Delta l_{i+1})$	l_i — длина i -й хорды; Δ — дискретное приращение длины $k = 0, 1, 2, \dots, j$, где $j \Delta \gg l_{\max}$; остальные обозначения те же, что и в П-1-1
П-3-1	Определение площади фигур (метод суммирования длин хорд)	$S_j = \rho \sum l_i$	S_j — площадь j -го объекта; l_i — длина i -й хорды; ρ — шаг развертки;
П-3-2	Определение площади фигур с помощью интеграла по контуру путем единичных приращений	$S_j = \oint_c y dx$	c — граница объекта; dx — единичные приращения по оси x ; y — значение ординаты
П-4-1	Определение периметра фигур (метод вписанного многоугольника)	$L_j = \sum_{i=1}^n [\sqrt{\Delta l_{i1}^2 + \rho^2} + \sqrt{\Delta l_{i2}^2 + \rho^2}]$	L_j — периметр j -го объекта; Δl_{i1} — разность между началами хорд на i -й и $(i+1)$ -й строке, Δl_{i2} — разность между соответствующими концами тех же хорд; n — число хорд;

Таблица 7 (продолжение)

Код	Операция, реализуемая алгоритмом	Алгоритм	Обозначения в формулах
П-4-1а	Модифицированная запись алгоритма П-4-1	$L_j = 0,7 \sum_{i=1}^n [(l_i - l_{i-1}) + 2\rho]$	l_i — длина i -й хорды. Остальные обозначения те же, что и в П-4-1
П-4-1б	Вторая модифицированная запись алгоритма П-4-1	$L_j = (l_1 + l_n + 4\rho) + \sum_{i=2}^{n-1} [l_i - l_{i-1} + \rho]$	То же
П-4-2	Определение периметра фигуры по Бюффону	$L_j = \frac{\pi}{4} \rho (k_1 + k_2)$	k_1 — число пересечений контура фигуры растром развертки по направлению x ; k_2 — число пересечений контура фигуры растром развертки по направлению y
П-5	Выделение контура фигуры (программа «клоп»)	$i_1 \quad i_2$ $000 \rightarrow 100 \rightarrow 0 (\Delta)$ $100 \rightarrow 110 \rightarrow 0 (\Delta)$ $110 \rightarrow 111 \rightarrow +\frac{\pi}{2} (\Delta)$ $111 \rightarrow 110 \rightarrow 0 (\Delta)$ $110 \rightarrow 100 \rightarrow -\frac{\pi}{2} (\Delta)$ $110 \rightarrow 110 \rightarrow 0 (2\Delta)$	i_1, i_2 — значение видеосигнала в трех интервалах (фон — первый уровень дискриминации, первый уровень — второй уровень, выше второго уровня) на двух соседних шагах; $+\pi/2 (\Delta)$ — поворот на один шаг; $-\pi/2 (\Delta)$ — то же, против часовой стрелки; $0 (\Delta)$ — один шаг без изменения направления; $0 (2\Delta)$ — два шага без изменения направления
П-6	Определение максимальной и минимальной осей эллипса	- Используется алгоритм П-5 - Затем контур разбивается на n точек - Вычисляется: $d_i(i+k) = \sqrt{(x_i - x_{i+k})^2 + (y_i - y_{i+k})^2}$	x_i, y_i — координаты произвольно выбранной точки на контуре эллипса; $d_i(i+k)$ — расстояние от выбранной точки до остальных точек контура; Δd_i — приращение расстояния. Изменение знака Δd_i соответствует одному из концов большой оси эллипса x_1, y_1

Таблица 7 (продолжение)

Код	Операция, реализуемая алгоритмом	Алгоритм	Обозначения в формулах
П-6	Определение максимальной и минимальной осей эллипса	4. Вычисляется: $d_i(t+k) - d_i(t+k+1) = \Delta d_i$. Если $\Delta d_i > 0$, то вычисления продолжаются, если $\Delta d_i < 0$, то вычисления прекращаются. Это точка $x_1 y_1$ 5. Поиск второго конца оси аналогичен описанному выше, только $x_i = x_1$, а $y_i = y_1$ 6. Концы малой оси эллипса определяются путем минимизации площади треугольника, построенного на большой оси с вершиной, скользящей по контуру фигуры	
П-7	Определение коэффициента скошенности эллиптической фигуры	$q = \frac{\overline{O_1 O_2}}{\overline{AB}}$	q — коэффициент скошенности; $\overline{AB}$ — большая ось эллипса; O_1 — проекция вершины треугольника, имеющего наименьшую площадь, построенного на большой оси с вершиной на контуре эллипса, расположенного справа от оси; O_2 — то же, слева от оси; $\overline{O_1 O_2}$ — расстояние между точками O_1 и O_2
П-8	Определение коэффициента прямоугольности фигуры	$p = (a_1 + a_2)(b_1 + b_2)/S$	p — коэффициент прямоугольности; S — площадь объекта, определенная по алгоритму П-3; a_1 и a_2 — малые полуоси объекта; b_1 и b_2 — большие полуоси объекта, определенные по алгоритму П-6

Таблица 7 (окончание)

Код	Операция, реализуемая алгоритмом	Алгоритм	Обозначения в формулах
П-9	Определение коэффициента сложности (вытянутости, изрезанности) фигуры	$\gamma_j = L_j^2/S_j$ (для круга $\gamma = 4\pi$; при отклонении от круга увеличивается)	γ_j — коэффициент сложности j -го объекта; L_j — периметр объекта; S_j — площадь объекта
П-10	Статистическое определение степени эллиптичности фигур	$k = f(x/\sqrt{s})$; $\chi = \sum d_{bj}/N$; $d_{bj} = \sum n$; $S = \text{const}$	k — коэффициент степени эллиптичности; χ — безразмерный параметр; d_{bj} — вертикальный размер микрообъекта; n — число хорд;
П-11	Определение центра тяжести фигуры (метод последовательного объединения центров хорд)	$Z_{n, n+1} = (x_{n+1} - x_n)/2$ $Z'(l')$; $Z''(l'') \equiv Z_1(l' + l'')$ $Z_1 Z'/Z_1 Z'' = l''/l'$ $Z_1(l' + l''); Z'''(l''') \equiv Z_2(l' + l'' + l''')$ и т. д.	Z_n — координата центра тяжести хорды; x_{n+1} , x_n — координаты концов хорды; l^i — i -я хорда фигуры

и внутренних границ всех объектов с помощью алгоритма прослеживания контура или с помощью алгоритмов, основанных на проверке перекрытия хорд соседних строк матрицы изображения.

На втором этапе осуществляется анализ изолированных объектов с целью определения и описания их существенных особенностей, позволяющих идентифицировать их в качестве объектов, подлежащих исследованию.

На третьем этапе для объектов, подлежащих исследованию, измеряются их информативные параметры.

Четвертый этап представляет собой статистическую обработку результатов измерений и классификацию объектов во всей исследованной выборке объектов.

Основная задача при исследовании изображений биологических структур состоит в разработке алгоритмов, выполняющих описание структуры, инвариантное к трансляции и поворотам объектов. Кроме того, алгоритмы должны учитывать нормальную либо довольно значительную вариабельность биологических структур.

В качестве примера рассмотрим алгоритмы для описания изображения хромосом. Условно их можно разделить на абстрактные, которые не опираются на специфику исследуемой структуры, и конкретные — эвристические, которые учитывают особенности морфологии объектов.

Абстрактные алгоритмы анализа изображений можно рассматривать как аппроксимацию функции $I(x, y)$ с определенным критерием точности. В качестве подобного алгоритма рассмотрим описание изображений хромосом с помощью моментных инвариантов [51].

Идея метода была выдвинута в работе [52], где показано, что можно составить алгебраические комбинации двумерных моментов, которые будут инвариантны по отношению к размерам объектов и их ориентации в поле зрения.

Двумерное изображение может быть довольно полно охарактеризовано набором двумерных моментов вида

$$m_{nq} = \iint_{-\infty}^{+\infty} x^n y^q I(x, y) dx dy, \quad (10.4)$$

где $n = 0, 1, 2, \dots$, $q = 0, 1, 2, \dots$, $I(x, y)$ — функция распределения оптической плотности изображения.

От обычных моментов легко осуществить переход к центральным моментам:

$$\mu_{nq} = \iint_{-\infty}^{+\infty} (x - \bar{x})^n (y - \bar{y})^q I(x, y) d(x - \bar{x}) d(y - \bar{y}), \quad (10.5)$$

где $\bar{x} = m_{10}/m_{00}$, $\bar{y} = m_{01}/m_{00}$.

Центральные моменты инвариантны относительно сдвига изображения. Из них с помощью алгебраических операций можно скомбинировать моментные инварианты, не зависящие от изменения размеров фигур и их поворота на плоскости изображения.

Чем более высокие порядки моментов используются для составления описания образа, тем более тонкие различия в изображении объектов можно улавливать. Однако определение моментов требует большого объема вычислений, а с ростом порядка момента пропорционально падает точность вычислений. Поэтому ограничиваются комбинациями из центральных моментов не выше третьего порядка.

Для описания хромосомы с целью ее опознавания используются семь абсолютных ортогональных моментов инвариантов, скомбинированных из центральных моментов первого, второго и третьего порядков, например:

$$\begin{aligned} Q_1 &= \mu_{20} + \mu_{02}, \\ Q_2 &= \sqrt{(\mu_{20} + \mu_{02})^2 + 4\mu_{11}^2}, \\ Q_3 &= \sqrt{(\mu_{30} - 3\mu_{12})^2 + (3\mu_{21} - \mu_{03})^2} \end{aligned} \quad (10.6)$$

и т. п.

Набор из семи подобных выражений составляет описание каждой хромосомы. Таким образом, это описание является вектором в семимерном пространстве признаков. В этом пространстве вводится мера, которая характеризует степень близости исследуемых объектов:

$$D = \sum_{i=1}^7 |Q_i - Q'_i| / \sum_{i=1}^7 |Q_i + Q'_i|, \quad i = 1, 2, \dots, 7, \quad 0 < D < 1, \quad (10.7)$$

где Q_i — абсолютный ортогональный момент (один из семи), характеризующий первую хромосому, Q'_i — абсолютный ортогональный момент (также один из семи), характеризующий вторую хромосому. Очевидно, что величина D является нормированным расстоянием, определяющим сходство двух объектов (гомологичных хромосом).

Применение метода моментных инвариантов ограничивается тем, что инвариантные моменты существенно зависят от относительных перемещений частей объекта. Кроме того, результаты анализа, выраженные в виде конкретных значений набора моментных инвариантов, не поддаются морфологической интерпретации.

В качестве примеров разработки морфологических языков описания рассмотрим эвристические алгоритмы анализа хромосом.

Описание объектов секущими плоскостями и линиями. При пересечении изображения объекта секущей плоскостью, нормальной

к поверхности изображения в сечении, получается одномерная функция

$$I(x, y) \xrightarrow{y=ax+b} I(\omega), \quad (10.8)$$

которую называют профилем сечения $I(\omega)$. Если исследуется бинарное изображение, то профиль представляет собой разрывную функцию.

Идея метода описания изображения объекта, например хромосомы, секущими состоит в определении ее продольной оси с последующим нахождением поперечных профилей сечений или хорд. Поскольку выделение продольной оси хромосомы сопряжено с большими трудностями, то, как правило, применяют способы различного ее приближенного определения.

В первом алгоритме такого типа [53] продольная ось хромосомы аппроксимируется большей стороной описанного прямоугольника минимальной площади. Специфическая морфология хромосом описывается в терминах числа пересечений ее внешнего контура с линиями, проведенными перпендикулярно к продольной оси объекта. Такое описание позволяет выделить секущую линию, проходящую через центромеру хромосомы.

Дальнейшее развитие эта идея получила в работе [54], где использованы восемь фиксированных направлений для аппроксимации продольной оси.

Рассмотрим два более поздних метода нахождения продольной оси хромосомы [55, 56]. Пусть найдена продольная ось в виде $y = f(x)$. Проведя секущие плоскости в каждой точке оси перпендикулярно к ней, получим набор профилей $I_i(\omega_i)$, где $i = 1, 2, \dots, n$ и n — общее число точек на оси. Поставив каждой точке продольной оси в соответствие интеграл от функции профиля $\sum_{\omega_i} I_i(\omega_i)$, можно получить кривую изменения суммарной оптической плотности вдоль продольной оси хромосомы:

$$G(k) = \sum_{\omega_i} I_i(\omega_i). \quad (10.9)$$

Минимум функции $G(k)$, где $1 < k < n$, соответствует центромерному участку, а точка k — центромере. Главная трудность в рассмотренной процедуре состоит в достаточно точном определении продольной оси.

В работе [56] предлагается рассматривать две функции — G'_i и G''_i , аналогичные функции (10.9), но представляющие собой суммы оптических плотностей точек, лежащих соответственно справа и слева от продольной оси хромосомы. Тогда появляется возможность сформулировать критерий для определения точности нахождения продольной оси хромосомы по степени схожести функ-

ций G'_i и G''_i , а сама задача нахождения продольной оси объекта может рассматриваться как минимизация функционала

$$V[y(x)] = \sum_{i=1}^{i=n} F[G'_i - G''_i]. \quad (10.10)$$

Алгоритм, предложенный в работе [57], состоит в определении такой продольной оси, для которой правый и левый плотностные профили были бы одинаковы по расположению максимумов и минимумов. В качестве первого приближения к такой линии выбирается ось инерции объекта, соответствующая минимуму второго центрального момента. Итерационная процедура определения продольной оси обеспечивает аппроксимацию только одного изгиба хромосомы с помощью дуги окружности.

Выделение остова (скелета) объекта. Эти методы позволяют представлять объекты в виде совокупности линий (точек), соответствующих максимальной плотности изображения. Описание и анализ получившегося таким образом «скелета» основаны на общих идеях лингвистического подхода [37] и используют результаты из теории графов.

Остановимся на одном из таких методов [47], предложенном специально для анализа хромосом. Он основан на последовательном отбрасывании граничных точек хромосомы, приводящем к ее «утонению». При этом отбрасываются только такие точки фигуры, которые не нарушают ее связности. Процедура многократно применяется к объекту, пока не останется ни одной точки, чье отбрасывание не нарушило бы связности.

Все точки полученного скелета разделяются на три класса: «точки дуги», имеющие соседние точки; «точки концов», имеющие только одну соседнюю точку; «точки пересечения», имеющие больше двух соседних точек. Эти три типа точек и соотношение между ними можно представить в виде графа или его матрицы смежности. Опознавание хромосом осуществляется путем сравнения графа исследуемого объекта с графами эталонных хромосом.

Описание контура (границы) объекта. Эти методы представляются достаточно универсальными для широкого круга задач анализа изображений.

Их идея состоит в выработке языка, описывающего границу объекта, и последующей синтаксической идентификации предъявляемых изображений (один из вариантов лингвистического подхода к распознаванию изображений [37]).

Чаще всего в качестве описания контура используется кривизна, так как она инвариантна к трансляции, вращениям объекта с точностью до циклических сдвигов контура, отражает глобальные и локальные особенности контура. Использование аналитического метода вычисления кривизны сопряжено с трудностями,

вызванными дискретным заданием границы объекта. Поэтому чаще используют эвристические аналоги кривизны [46, 57, 58].

В Институте биологической физики АН СССР начиная с 1968 г. ведутся исследования морфологии клеточных структур математическими методами [60, 61] и был разработан алгоритм для анализа хромосом, использующий контур как первичное описание объекта [62—64]. Работу алгоритма анализа внешнего контура можно разделить на три этапа:

- 1) формальное описание контура кривизной;
- 2) нахождение характерных точек контура;
- 3) опознавание хромосом путем сравнения с эталоном.

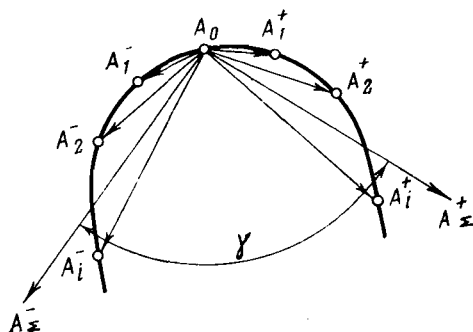
Контур хромосомы представляет собой чередующиеся определенным образом участки различной степени выпуклости и вогнутости. Характер этого чередования, длины соответствующих дуг и расстояния между ними задают как форму, так и геометрические параметры хромосомы. Для описания кривизны контура используется эвристический аналог понятия кривизны, обеспечивающий сглаживание локальных изменений контура и достаточно просто реализуемый вычислительной процедурой. Для определения кривизны в точке A_0 дискретного контура рассмотрим участок контура, состоящий из $2k + 1$ точек: $A_{-k} \dots A_{-1} \dots A_0, A_{+1} \dots A_k$, такой, что A_0 находится в его середине (рис. 116). Соединим A_0 векторами со всеми точками A_i ($i = 1, \dots, k$) и построим суммарные вектора $A_{\Sigma}^{+} = \sum_{i=1}^k A_0 A_i$; $A_{\Sigma}^{-} = \sum_{i=1}^k A_0 A_{-i}$. Угол γ между векторами A_{Σ}^{+} и A_{Σ}^{-} , очевидно, характеризует поведение контура в окрестности точки A_0 (величина окрестности определяется выбором значения параметра k), а величина κ дает нам искомый эвристический аналог кривизны в точке A_0 :

$$\kappa(A_0) = \begin{cases} 1 + \cos \gamma & \text{при } 0 \leq \gamma \leq \pi, \\ -1 - \cos \gamma & \text{при } \pi \leq \gamma \leq 2\pi. \end{cases}$$

Из определения кривизны видно, что она может принимать значения от -2 до $+2$, причем знак ее зависит от того, является ли участок контура, содержащий точку A_0 , выпуклым или вогнутым.

Хотя хромосомы метафазной пластинки характеризуются нестабильной морфологией, их можно объединить в небольшое число устойчивых типов-эталонов. В зависимости от расстояния между концами плечей хромосомы рассматривались три эталона неискаженных хромосом: 1) с разошедшимися хроматидами (четыреплечие); 2) с одной разошедшейся парой хроматид (трехплечие); 3) с разошедшимися концами хроматид (рис. 117). При автоматическом анализе хромосом необходимо находить точки контура, в которых кривизна принимает экстремальные значения

Рис. 116. Определение кривизны контура



(рис.118). Для выделения последних вводится понятие сильного экстремума (максимума или минимума). Точка x называется точкой сильного максимума типа ϵ ($\epsilon > 0$), если найдутся точки y и z , такие, что $y < x < z$ и $f(x) - f(y) > \epsilon$, $f(x) - f(z) > \epsilon$ и для любой точки v из интервала (yz) будет $f(x) \geq f(v)$. Аналогично вводится понятие сильного минимума.

Величина ϵ представляет собой функцию вида

$$\epsilon = (\kappa_{\max} - \kappa_{\min}) \alpha, \quad 0 < \alpha < 1, \quad (10.11)$$

где $\kappa_{\max}$ и $\kappa_{\min}$ — максимальное и минимальное значения кривизны. Постоянная α выбирается в зависимости от того, какие детали контура учитываются при анализе.

Число экстремальных точек дает представление о типе хромосомы, к которому может принадлежать данный объект. Однако оно

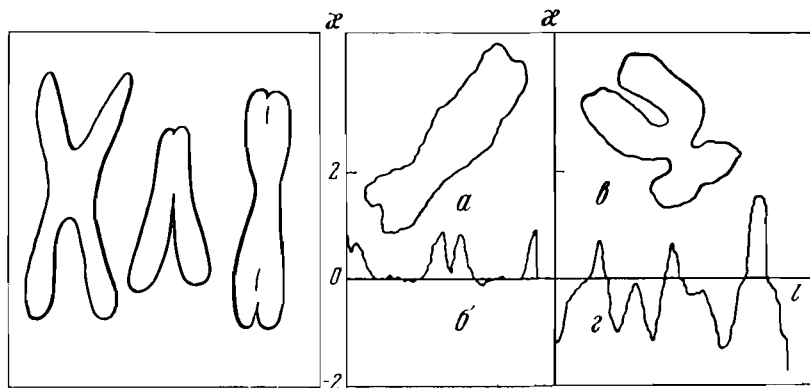


Рис. 117. Эталоны хромосом

Рис. 118. 3- и 4-плечая хромосомы

a — контур 3-плечей хромосомы; $б$ — изменение кривизны контура 3-плечей хромосомы; $в$ — контур 4-плечей хромосомы; $г$ — изменение кривизны контура 4-плечей хромосомы

не является достаточной основой для идентификации объекта.

Поэтому используется специальный метрический тест, отражающий естественное представление о симметричном расположении характерных точек на хромосоме. В нем отдельно рассматривается каждый из трех типов хромосом. Если условия теста не выполняются, делается вывод о том, что объект не принадлежит к данному типу хромосомы.

Каждый объект путем последовательного уменьшения числа точек локального экстремума проверяется на соответствие эталонам до тех пор, пока объект не будет признан хромосомой или нехромосомой при числе точек, меньшем четырех.

В заключение следует отметить, что эвристические алгоритмы основываются на выделении существенных признаков биологических объектов. В качестве таких признаков могут выступать отдельные точки или линии на изображении объектов, иногда целые области. Например, для хромосом наиболее важными для распознавания являются: концы плеч и центромера; линии — продольные оси хроматид и линия, проходящая через центромеру и рассекающая хромосому на два плеча (линия центромеры); области — центромерная область, характеризующаяся наименьшей оптической плотностью, и т. д. Очевидно, что все эти существенные морфологические признаки хромосомы связаны между собой и могут быть определены через другие виды описаний изображения, в частности через геометрию границы объектов.

Поскольку основная задача эвристических алгоритмов состоит не в полном описании функции $I(x, y)$, а в описании только ее существенных для распознавания особенностей, то у исследователя имеется относительно большая свобода выбора алгоритма описания (морфологического языка). Этим объясняется обилие различных эвристических алгоритмов анализа изображений биологических структур и, в частности, хромосом. Однако указанная выше особенность накладывает и существенные ограничения на эвристические алгоритмы. Как правило, невозможно доказать полезность алгоритма формальным путем. Эксперимент — единственный критерий качества использованного языка описания. Кроме того, эвристические алгоритмы являются конкретными методами исследования данного класса структур, и нет никаких иных оснований, кроме интуиции и эксперимента, для использования их на другом классе объектов.

Фактически в каждый эвристический алгоритм вкладывается некоторая феноменологическая модель объекта, отражающая наиболее существенные с точки зрения исследователя черты реальной структуры.

Ниже рассмотрим примеры количественного исследования клеточных структур с использованием методов автоматического анализа оптических изображений.

10.3. Исследование глиально-сосудистой системы головного мозга

Глиально-сосудистая система

Глиальные клетки — один из основных структурных и функциональных компонентов центральной нервной системы [65—74]. Существенным моментом является исследование взаимодействия комплекса сосуд — глия, являющегося составной частью системы сосуд — глия — нейрон и сосуд — глия — нервное волокно [75—81]. Одним из наиболее часто встречающихся видов патологии мозга является сосудистая [82].

Представляется актуальным количественное исследование глии в нормальном мозге и при его патологии. Для этого необходимо определить изменение удельного количества глиальных клеток при сосудистых поражениях мозга. Это было достигнуто с помощью одного из простейших стереологических алгоритмов, позволяющего осуществлять подсчет числа шаров в единице объема (см. табл. 7, алгоритм П-1-1 с коррекцией [50]). При этом определяется число всех клеток в срезе (n) (сюда входят как целые шары, так и фрагменты) и площадь среза s , на которой они расположены. Кроме того, вычисляется средний радиус клеток (шаров) $\bar{r}$, и на основе этих данных определяется общее число клеток в единице объема (N_V), например, по формуле

$$N_V = n/(\rho + 2\bar{r})s, \quad (10.12)$$

где n — число объектов («пятен») в срезе, ρ — толщина среза, s — площадь среза, $\bar{r}$ — средний диаметр шара.

В каждом исследуемом случае сосудистый процесс достигал различной степени выраженности, поэтому необходимо было выделить существенные характеристики (признаки), описывающие состояние патологии мозга. Подобные признаки в случаях патологии должны удовлетворять следующим требованиям: 1) отсутствовать в нормальных объектах; 2) отражать распространенность, локализацию и глубину патологического процесса; 3) характеризовать вид патологии.

Вопросам оценки структурных перестроек при патологическом сосудистом процессе посвящена обширная литература [84—92]. Патоморфологические признаки описывают как характер перестроек, так и стадию развития процесса [82, 93].

Методика исследования

Подсчет числа ядер глиальных клеток и их среднего диаметра проводился на основе алгоритмов П-1-1 и П-2-1 (см. табл. 7).

Исследовалось белое вещество головного мозга человека при норме и сосудистой патологии; глиальные клетки считали в определенных участках.

Исследования велись на 14 объектах (7 — норма, 7 — сосудистая патология) (табл. 8). Число глиальных клеток определяли в 50 блоках в соответствии со схемой вырезки [94] (рис. 119, а). От каждого блока использовали 13 срезов. Фиксацию мозга проводили 10%-ным раствором формалина, вырезанные блоки заливали в целлоидин. Приготавливали срезы толщиной 15 мкм (диаметр ядра клетки ~ 4,5 мкм [83]). Одно из основных требований к окраске препаратов — достижение максимального оптического контраста исследуемых структур по отношению к межклеточной среде. Данному требованию удовлетворяет окраска по методу Ниссля, применение которой позволяет также определить набор качественных характеристик состояния клеточных структур визуальным путем [95].

Для получения количественного выражения патоморфологических признаков был применен следующий метод. Допустим, что имеется n случаев патологического процесса ($n = 7$), каждый из которых характеризуется набором из m признаков ($m = 9$). В табл. 9 признаки могут принимать только два значения:

$$x_{ij} = \begin{cases} 0 & \text{— нет признака,} \\ 1 & \text{— есть признак,} \end{cases} \quad (10.13)$$

где $1 \leq i \leq n$, $1 \leq j \leq m$. Ограничение (10.13) не имеет принципиального значения; признаки в общем случае могут иметь большее число градаций. Таким образом, каждый признак по всему патологическому процессу характеризуется функцией $f_i(x_1, x_2, \dots, x_m)$. Весовой коэффициент (полезность) каждого признака определяется частотой его появления. Ввиду сильной коррелированности отдельных патоморфологических признаков весовой коэффициент каждого признака определялся как

$$k_j = \frac{\sum_{i=1}^n x_{ij}}{\sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^n x_{ij}}. \quad (10.14)$$

Тогда степень, структурных перестроек Q_i для каждого случая может быть найдена в виде

$$Q_i = \sum_{j=1}^m x_{ij} \cdot k_j. \quad (10.15)$$

Таблица 8

Клиническая и патологоанатомическая характеристика экспериментального материала

Возраст, годы	Клинический диагноз	Патологоанатомический диагноз
32	Острое отравление	Сосудистая паталогия отсутствует
32	Острая асфиксия	То же
35	Острое отравление	»
42	Острый холецистит	»
42	Ретикулосаркома желудка	»
43	Насильственная смерть	»
50	Острое отравление	»
84	Церебральный атеросклероз с психическими нарушениями	Атеросклероз сосудов головного мозга. Атрофия коры полушарий головного мозга
76	Церебральный атеросклероз. Остаточные явления нарушения мозгового кровообращения	Гипертоническая болезнь. Общий атеросклероз
70	Состояние после операции по поводу гипернефромы правой почки	Атеросклеротические бляшки сосудов головного мозга
78	Состояние после операции грыже-сечения по поводу ущемленной левосторонней паховой грыжи. Остаточная сердечно-сосудистая недостаточность	Атеросклероз с преимущественным поражением сосудов мозга (липоидоз)
66	Гипертоническая болезнь III стадии. Общий атеросклероз с преимущественным поражением сосудов сердца, мозга	Гипертоническая болезнь. Атеросклероз сосудов мозга (липоидоз, липосклероз)
69	Гипертоническая болезнь III стадии. Церебральный атеросклероз с явлениями выраженного слабумия и судорожным синдромом	Гипертоническая болезнь. Церебральный атеросклероз. Общий атеросклероз
80	Церебральный атеросклероз с тревожнопараноидным синдромом и выраженным снижением личности по органическому типу	Церебральный атеросклероз. Атрофия серого вещества лобных и теменных долей. Общий атеросклероз

По отношению к каждой конкретной выборке случаев патологии удобно пронормировать степень структурных перестроек Q_i по максимальному встречающемуся значению

$$S_i = Q_i / Q_{\max}. \quad (10.16)$$

Величина S_i характеризует степень патологического процесса для i -го случая по отношению к случаю самой высокой степени патологии, встретившемуся в эксперименте.

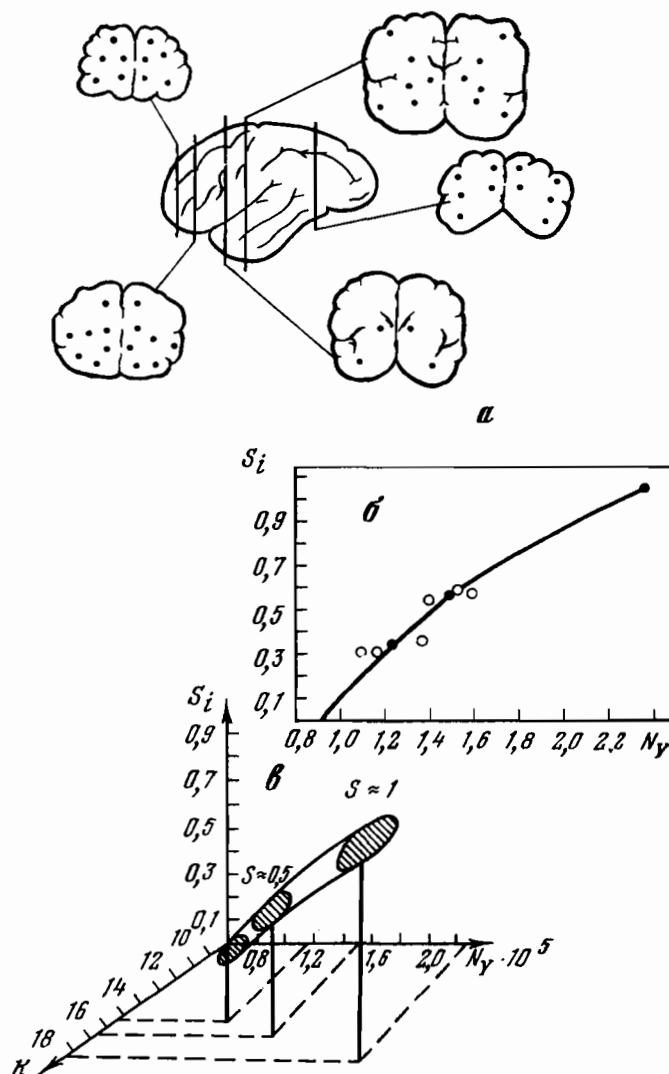


Рис. 119. Связь изменения количества глиальных клеток в головном мозгу человека со степенью его сосудистой патологии

а — схема получения материала из различных участков мозга (отмечены точками) для подсчета глиальных клеток; б — увеличение числа глиальных клеток белого вещества мозга при нарастании степени сосудистой патологии; в — поведение глиальных клеток при сосудистом поражении мозга. N_y — удельное количество глиальных клеток; K — коэффициент асимметрии (в %); S_i — степень сосудистой патологии. По мере роста патологии сосудов растет разброс коэффициента асимметрии (зачерненные области)

Таблица 9

Пример расчета величин S_i , характеризующих степень патологического процесса

При- знаки (m)	Случаи (n)							Сумма по строкам	K_i
	1	2	3	4	5	6	7		
1	0	0	0	1	0	0	0	1	0,036
2	1	1	1	0	0	0	0	3	0,107
3	0	1	1	0	1	0	0	3	0,107
4	1	0	0	0	0	0	0	1	0,036
5	1	1	1	1	0	1	1	6	0,215
6	1	1	1	1	0	0	1	5	0,178
7	0	1	1	1	1	0	1	5	0,178
8	1	0	0	0	0	1	1	3	0,107
9	0	0	1	0	0	0	0	1	0,036
Q_i	0,643	0,785	0,821	0,607	0,285	0,322	0,678	—	—
S_i	0,78	0,96	1	0,74	0,35	0,39	0,85	—	—

Модель глиально-сосудистой патологии

В норме среднее число глиальных клеток в 1 мм^3 белого вещества для всех исследованных объектов равно около 90 тыс. при колебаниях от 76 тыс. до 114 тыс. для разных наблюдений. Средняя величина коэффициента вариации удельного количества глиальных клеток в исследуемых участках равна 20,5% при колебаниях от 10,5 до 25,9% в отдельных наблюдениях.

Для сравнения распределения их удельного количества в разных полушариях был использован коэффициент асимметрии

$$K = \frac{\sum (N_{V_a} - N_{V_6})}{nN_V} \cdot 100\%, \quad (10.17)$$

где K — коэффициент асимметрии, N_{V_a} — удельное количество глиальных клеток в симметричном участке того полушария, где оно больше; N_{V_6} — где оно меньше; n — число наблюдений, N_V — среднее удельное количество глиальных клеток.

Значения коэффициентов асимметрии в исследованных нормальных объектах колебались в пределах 1,1—13,2%, средняя величина была равна 7,5%. Распределение удельного количества глиальных клеток в белом веществе разных долей головного мозга характеризуется высокой равномерностью (табл. 10). В нормальном мозге глия белого вещества представляет собой струк-

Таблица 10

Основные показатели распределения глиальных клеток белого вещества различных долей нормального мозга человека

Доля мозга	Число проанализированных блоков	Среднее удельное количество глиальных клеток, тыс./мм ³	Среднее квадратичное отклонение, тыс./мм ³	Коэффициент вариации
Лобная	64	93,3	18,2	19,3
Височная	28	91,9	15,4	16,8
Теменная	41	87,7	13,0	14,8

туру, элементы которой достаточно равномерно заполняют объем мозга, т. е. корреляцию между числом глиальных клеток и местными особенностями архитектоники мозга найти не удастся [94]. При сосудистой патологии среднее число глиальных клеток в белом веществе мозга человека колеблется от 112 тыс. до 234 тыс. в 1 мм³. Средняя величина коэффициента вариации удельного количества глиальных клеток по всем блокам при исследовании сосудистой патологии также возрастает и равна 26,8%, с колебаниями до 10,5 до 36,8% для отдельных объектов. При сосудистой патологии по сравнению с нормой происходит достоверное возрастание числа глиальных клеток, коэффициента вариации и коэффициента асимметрии в идентичных участках мозга [96].

В каждом из исследуемых объектов сосудистая патология достигала различной степени выраженности. Полученные количественные выражения степени структурных перестроек выражались следующими показателями:

$$S_1, \quad S_2, \quad S_3, \quad S_4, \quad S_5, \quad S_6, \quad S_7.$$

$$1,000 \quad 0,556 \quad 0,512 \quad 0,345 \quad 0,551 \quad 0,289 \quad 0,292$$

При сопоставлении отмечалось хорошее совпадение возрастания степени патологии с увеличением числа глиальных клеток в целом по белому веществу головного мозга человека (рис. 119, б).

Анализ кривой показал, что она подчиняется логарифмическому закону и описывается выражением

$$S_n = \ln N_V - 12, \quad (10.18)$$

где S_n — показатель сосудистой патологии, N_V — среднее число глиальных клеток в 1 мм³.

Найденная закономерность является доказательством тесной связи статистических параметров распределения клеток глии со степенью сосудистой патологии.

Если учесть изменение коэффициента асимметрии в распределении числа ядер глиальных клеток (рис. 119, в), то может быть построена феноменологическая модель реакции клеток глии на степень сосудистого поражения. Интерпретация модели включает в себя два процесса. С одной стороны, процесс перемещения глиальных клеток в очаги поражения сосудов с тем, чтобы скомпенсировать связанную с поражением нехватку питательных веществ. Этим объясняется увеличение неоднородности распределения глиальных клеток. С другой стороны, компенсаторная реакция выражается в общем увеличении числа глиальных клеток. По-видимому, эти два компенсаторных процесса тесно между собой связаны, что проявляется в характере кривой.

10.4. Модель сокращения длины хромосом в митозе

Вариабельность длины хромосом

Фундаментальным понятием, на котором основана идентификация хромосом и анализ кариотипа, является понятие о гомологичных хромосомах [61, 97, 98].

Сущность процедуры описания кариотипа и идентификации индивидуальных хромосом заключается в последовательно парном сравнении хромосом и нахождении на основе принципа «наибольшего морфологического подобия» гомологичных хромосом.

Морфологическое сходство гомологичных хромосом не является абсолютным, и различия между ними (гетероморфизм гомологов) могут достигать измеримого уровня. В основе гетероморфизма гомологов могут лежать как специфические, так и неспецифические факторы. Например, в паре потенциально спутничных хромосом один из гомологов может резко отличаться от партнера длиной спутничной нити или же спутник его вообще не выявляется. Это явление связано, если исключить артефакты методического характера, с особенностями функциональных взаимоотношений гомологичных генов, локализованных в спутничном районе. Известно также, что на протяжении митоза хромосомы претерпевают последовательно усиливающееся укорочение.

Можно выделить две группы факторов, определяющих вариацию морфометрических параметров хромосом, — методические и биологические. Методические факторы лежат в основе артефактной вариации, обусловленной нестандартностью приготовления препаратов и ошибками измерений хромосом. Опыт показывает, что вклад артефактной вариации в общую дисперсию выборочных значений параметров хромосом относительно невелик [98, 99].

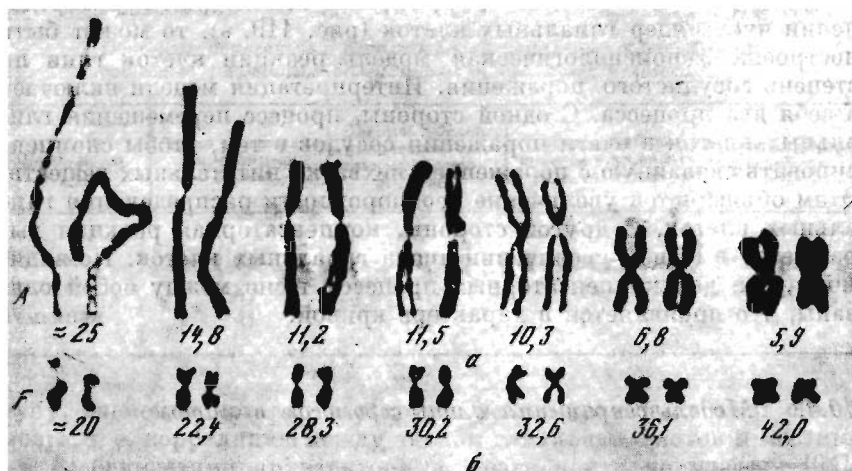


Рис. 120. Вариация длины митотических хромосом и эффект спирализации
 а — 1-я и 2-я хромосомы на разных стадиях колхицинированного митоза, цифрами обозначены средние длины (в мкм) хромосом; б — 19-я и 20-я хромосомы из тех же клеток, цифрами обозначен центромерный индекс (в %)

Основной причиной высокой вариации морфометрических параметров хромосом являются биологические факторы. Как известно, культуры клеток, в которых исследуют хромосомы, существенно асинхронны относительно момента, когда разные клетки вступают в ту или иную стадию митоза. Кроме того, на протяжении митоза хромосомы претерпевают последовательно усиливающуюся спирализацию, приводящую к значительному уменьшению их длины и к их утолщению. Поскольку при фиксации материала для приготовления препаратов различные клетки захватываются на разных стадиях цикла митотической спирализации хромосом, хромосомные наборы их разных клеток характеризуются часто резкими различиями в длине и толщине хромосом (рис. 120). Например, длина хромосом 1-й пары кариотипа человека в клетках, вполне доступных для анализа, может варьировать от 14 до 4 мкм. Столь высокая вариация длины одной и той же хромосомы в разных клетках, естественно, усложняет статистический анализ и снижает его эффективность.

Известно, что длинные хромосомы уменьшаются в процессе спирализации в большей степени, чем короткие, и по мере укорочения длинное плечо каждой хромосомы сокращается в большей степени, чем ее короткое плечо [97, 100, 105].

Линейная модель спирализации

Необходимость построения модели спирализации хромосом в митозе вытекает из общей задачи автоматизации процесса кариотипирования [62]. При этом задачу кариотипирования полезно разбить на два этапа, считая, что на первом этапе производится классификация индивидуальных хромосом. На втором этапе на основе уже сделанной классификации хромосом нескольких метафазных пластинок выносятся некоторое суждение о кариотипе в целом, т. е. выясняются, во-первых, число хромосом в классах и, во-вторых, средние значения некоторого набора параметров классов. Указанные этапы не являются независимыми, поэтому задачу кариотипирования имеет смысл решать итеративным путем, чередуя все более уточняющуюся классификацию хромосом и вынесение некоторых предварительных суждений о кариотипе. При описании явления спирализации одна из главных задач состоит в определении параметра t , отражающего стадию спирализации. В качестве его оценки были предложены различные величины, такие, как, например, индекс спирализации, суммарная длина набора [61, 98, 100]. Эффективность этих параметров основана на том, что изменение длины любого плеча или всей хромосомы в зависимости от изменения длины другой хромосомы (плеча) или суммарной длины набора хорошо аппроксимируется линейной зависимостью [101, 102]. Практически в выборках кариотипируемых хромосом обычно не попадаются сильно спирализованные наборы с межклассовыми переходами. Широко используемый метод построения кариограмм с использованием относительных длин хромосом [102] можно рассматривать как приведение наборов хромосом к одной стадии спирализации по суммарной длине набора. Представим хромосомный набор в виде

$$\begin{aligned} x_1^i &= a_1 \sum_{j=1}^m x_j^i + b_1, \\ &\cdot \quad \cdot \quad \cdot \quad \cdot \quad \cdot \quad \cdot \quad \cdot \\ x_m^i &= a_m \sum_{j=1}^m x_j^i + b_m, \end{aligned} \tag{10.19}$$

где m_i — число хромосом в наборе, x_j^i — хромосома i -го набора.

Наличие непропорционального изменения длин хромосом выражается в наличии свободного члена b_m .

В тех случаях, когда цель кариотипирования — выявление небольших отклонений параметров хромосом от нормы, более перспективным, чем нормирование результатов измерений или отбор метафаз, будет вычисление некоторого набора параметров, характеризующих кариотип индивида в целом. Такими пара-

метрами, в частности, могут служить коэффициенты a_i , b_i линейной модели спирализации хромосом. В случае, когда наборы содержат полное число хромосом, значения этих коэффициентов можно достаточно точно оценить обычными методами регрессионного анализа. Для неполных наборов, наиболее типичных при автоматических способах анализа кариотипа, эта техника оказывается неудовлетворительной из-за ошибок в определении суммарной длины набора. В такой ситуации более точными окажутся оценки параметров линейной модели методом наименьших квадратов.

Будем рассматривать следующую линейную модель изменения средних величин и дисперсий длин хромосом на разных стадиях спирализации:

$$x_i = a_i t + b_i, \quad D(x_i) = \sigma_i^2 S^2, \quad (10.20)$$

где x_i — средняя длина хромосомы, t и S — нормализующие множители для среднего и дисперсии, $D(x_i)$; a_i , b_i , σ_i — параметры модели. Целью является нахождение по возможности лучших оценок для a_i , b_i , σ_i исходя из имеющихся измерений различных метафазных пластинок. При этом предполагается, что классификация хромосом во всех наборах уже произведена¹.

Опишем подробнее принятую статистическую модель. Пусть x_{ijk} — результат измерения j -й хромосомы в i -м классе в k -й метафазной пластинке:

$$x_{ijk} = a_i t_k + b_i + \varepsilon_{ik}, \quad (10.21)$$

где

$$i = 1, \dots, n; \quad j = 1, \dots, r_i; \quad k = 1, \dots, N.$$

Здесь a_i , b_i — коэффициенты линейной зависимости от нормализующего множителя t , n — число классов, r_i — число хромосом в i -м классе, N — число метафазных пластинок, ε_{ik} — случайная величина, характеризующая отклонение x_{ijk} от $\bar{x}_{ik}$; $\bar{\varepsilon}_{ik} = 0$; $D(\varepsilon_{ik}) = \sigma_i^2 S_k^2$.

Будем рассматривать лишь те метафазные пластинки, где в каждом классе произведены измерения по крайней мере двух хромосом ($r_i \geq 2$).

Перейдем к оценке параметров модели. Оценим сначала величины σ_{ik}^2 по формулам

$$\sigma_{ik}^2 = \frac{1}{r_i - 1} \sum (x_{ijk} - \bar{x}_{ik})^2, \quad (10.22)$$

¹ Предлагаемый метод оценки параметров оказывается, практически, мало чувствительным к ошибкам классификации при использовании достаточно большого числа метафазных пластинок.

где

$$\bar{x}_{ik} = \frac{1}{r_i - 1} \sum_j x_{ijk}. \quad (10.23)$$

Оценку для σ_i^2 находим, производя усреднение σ_{ik}^2 по k :

$$\hat{\sigma}_i^2 = \frac{1}{N} \sum \sigma_{ik}^2, \quad (10.24)$$

а S_k^2 определяем как

$$\hat{S}_k^2 = \frac{1}{n} \sum_i \left(\frac{\sigma_{ik}}{\sigma_i} \right)^2. \quad (10.25)$$

Перейдем к вычислению оценок для векторов $\mathbf{a} = (a_1, \dots, a_n)$ и $\mathbf{b} = (b_1, \dots, b_n)$. Эти векторы задают прямую в n -мерном пространстве, проходящую через точку b с направляющим вектором $\mathbf{a}$.

Задача их оценки представляет собой небольшое видоизменение известной в статистике задачи о линейной функциональной зависимости между несколькими случайными переменными [56]. Оценки для a_i , b_i ищутся путем минимизации квадратичной формы

$$H = \sum_{ijk} (x_{ijk} - a_i t_k - b_i)^2 / (\sigma_i S_k)^2, \quad (10.26)$$

при некотором условии нормировки вектора $\mathbf{a}$. Способ вычисления коэффициентов a_i и b_i приведен в работе [103].

Таким образом, количественные параметры a_i и b_i рассмотренной выше феноменологической модели спирализации хромосом в митозе (10.20) могут быть вычислены непосредственно в процессе измерения. В сущности полную линейную модель для всего хромосомного набора следует рассматривать как морфометрический кариотип исследованного объекта.

Если в широко распространенных морфометрических методах построения кариотипа стремились избавиться от спирализации, считая ее фактором, мешающим правильной классификации хромосом, то в данном случае явление спирализации используется для получения дополнительной информации, что обеспечивает более точную классификацию хромосом.

*Глава одиннадцатая*ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЛИНЕЙНОЙ СТРУКТУРЫ
БИОПОЛИМЕРОВ*11.1. Анализ первичной последовательности
нуклеиновых кислот*

В настоящее время считается общепризнанным, что молекулы нуклеиновых кислот представляют запись всей или почти всей наследственной информации, определяющей жизнедеятельность клетки [106—108]. Однако ряд вопросов не может быть решен без накопления экспериментальных данных о первичной структуре нуклеиновых кислот, т. е. последовательности нуклеотидов. Установление нуклеотидных последовательностей прошло путь от работы, выполненной на тРНК из дрожжей, имевшей всего 78 нуклеотидов [109], до расшифровки первичных структур высокомолекулярных вирусных и рибосомальных РНК, состоящих из сотен и даже тысяч нуклеотидов [110—114].

Практически во всех работах использовался так называемый блочный метод, основанный на расщеплении молекулы РНК на блоки различной длины, расшифровке последовательностей в коротких блоках и восстановлении последовательности всей молекулы на основе перекрывания блоков, полученных в разных разбиениях. Другой метод определения первичной структуры путем последовательного отщепления (или наращивания) концевых нуклеотидов и концевого анализа на каждом шаге оказывается эффективным лишь для последовательностей малой длины (~ 10 мономеров) [115]. Вариант такого подхода применялся также как дополнительный способ получения блоков [110, 116]. Метод определения первичной последовательности путем отщепления концевых нуклеотидов требует большую дополнительную информацию и пока не может конкурировать с блочным методом [117].

Для ускорения процесса расшифровки последовательностей необходимы либо разработка новых методов, либо усовершенствование блочного метода и переводение его в рамки ординарных процедур. В последнем случае необходимо решение вопросов, касающихся анализа возможностей блочного метода и создания эффективных алгоритмов, позволяющих планировать эксперимент. Значительное число возникающих при этом задач может быть решено при помощи математических методов. Кратко опишем свойства биохимической информации, используемые в блочном методе.

Большинство молекул РНК представляют собой последовательности четырех типов нуклеотидов: гуанина (G), урацила (U), цитозина (C) и аденина (A). В молекулах некоторых РНК встре-

чаются редкие «минорные» нуклеотиды. Молекула РНК полярна, ее концы не эквивалентны друг другу, поэтому принят определенный порядок записи нуклеотидной последовательности. Блочный метод основан на возможности разрыва цепи РНК при помощи ферментов — нуклеаз, каждый из которых рвет цепь только в определенном месте. Например, для разрыва РНК обычно используются панкреатическая рибонуклеаза и рибонуклеаза T1. Первый из этих ферментов разрывает цепь РНК непосредственно справа от пиримидиннуклеотидов (U, C), а второй — справа от пуридиннуклеотида G. Если расщепление проводится так, что молекула РНК рвется после каждого нуклеотида, к которому специфична данная рибонуклеаза, то такое расщепление называется полным, или исчерпывающим, гидролизом данной нуклеазой. Если условия расщепления подобраны так, что молекула рвется лишь после части нуклеотидов, то такое расщепление называется неполным, или частичным, гидролизом. Информация о продукте частичного гидролиза задается обычно продуктами его полных гидролизом. Если есть возможность разрывать цепь с помощью разных ферментов, то можно выявить совпадающие при наложении участки фрагментов и «составить из кусочков» всю последовательность.

Поясним метод следующим сравнением: представим себе, что предыдущее предложение написано несколько раз в виде одной строки на различных полосках бумаги, а затем эти полоски разрезаны разными способами. Например, в одном случае на отдельном кусочке бумаги оказываются три слова: «если есть возможность», а на другом — следующие за ними два слова: «разрывать цепь». В другом случае слова «возможность» и «разрывать» находятся вместе, а слово «цепь» — отдельно. Тогда можем сделать вывод, что группа с концевым словом «возможность» и группа, начинающаяся со слова «разрывать», составляют непрерывную последовательность слов. Принцип очень прост. На практике для восстановления длинных цепей требуется множество заключений такого типа.

В первых работах [118, 119] на основе последовательности случайных чисел строилась одна или несколько статистических последовательностей четырех символов. Исследовалась возможность однозначной реконструкции нуклеотидных последовательностей по перекрывающимся фрагментам, полученным расщеплением четырьмя, тремя или двумя ферментами, специфичными к одному символу каждый.

Были предприняты попытки создания компьютерных алгоритмов для построения нуклеотидных и белковых¹ последователь-

¹ Следует заметить, что математическая задача восстановления последовательностей аминокислот в белках, в принципе, аналогична задаче восстановления последовательности нуклеотидов. Но для реальных белков задача

ностей из перекрывающихся продуктов полных гидролизом [122—125]. Построение нуклеотидной последовательности осуществляется в этих алгоритмах путем полного перебора всех возможных последовательностей перекрывающихся продуктов, что требует очень больших затрат машинного времени.

Еще в 1959 г. Розен обратил внимание на то, что первичная структура биополимеров может быть описана в виде слова в определенном алфавите, и указал на возможность применения здесь понятий теории свободной полугруппы [120, 121]. Эта идея была использована в работе [126]. Задача о построении последовательности перекрывающихся продуктов двух полных гидролизом может быть интерпретирована также в терминах теории графов (задача о построении эйлерова пути) [127].

Ниже рассмотрен математический подход к установлению первичной структуры нуклеиновых кислот.

11.2. Математическая постановка проблемы

Формулировка задачи в виде восстановления слов

Структуру биополимера будем рассматривать как слово в некотором алфавите. Отдельным фрагментам, которые получаются гидролизом (полным или частичным), соответствуют подслова определяемого слова. Для наглядности изложения будем пользоваться геометрическим представлением слов. На рис. 121 показан фрагмент молекулы 5SPHK *E. coli* в виде двух разбиений с помощью нуклеаз на подслова. Одно из разбиений соответствует гидролизу панкреатической рибонуклеазой (подслова x_i), другое — рибонуклеазой T1 (подслова y_j).

Введем основные определения. Подслово x_2 является перекрытием подслов y_2 и y_3 , подслово x_3 — перекрытием подслов y_3 и y_4 и т. д. Пусть $y_j = a_i x_j b_i$, тогда части подслов a_i и b_i называются граничными, а подслово x_j — внутренним для подслова y_j . Например, подслово x_4 является внутренним для подслова y_4 .

Задачу восстановления слова можно сформулировать следующим образом. Пусть H — набор произвольных подслов. Найти: а) условия существования, б) единственности и в) способ построения некоторого слова z , для которого подслова из набора H_1 , принадлежащего H , образуют единую последовательность перекрывающихся подслов, а остальные подслова набора H являются внутренними подсловами подслов из набора H_1 .

.....
эта не является сложной, так как белковые цепи построены из 20 типов структурных единиц, а не из четырех, как нуклеиновые кислоты, при одинаковой или даже меньшей длине белковых цепей.

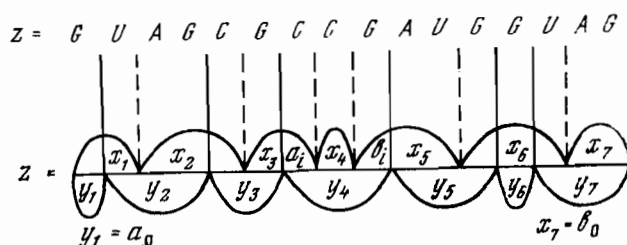


Рис. 121. Два полных гидролиза фрагмента молекулы 5S РНК *E. coli* в виде наборов подслов

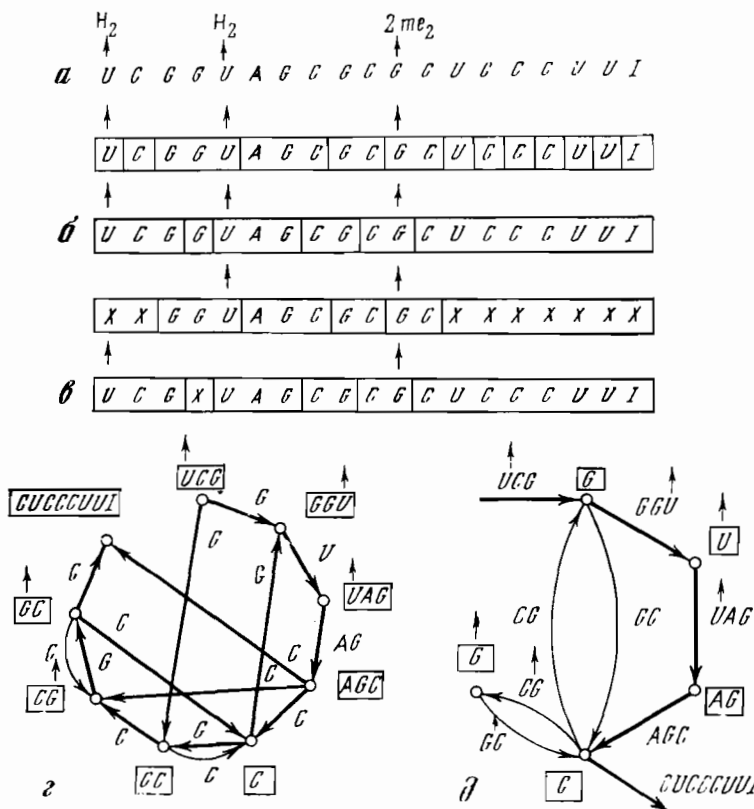


Рис. 122. Исходная информация в виде графов (два полных гидролизата фрагмента тРНК)

а — исходное слово; б — два разбиения слова: разрыв по буквам U и C и разрыв по букве G; в — отбрасывание внутренних подслов; г — граф подслов (задача Гамильтона); д — граф перекрытий подслов (задача Эйлера)

Обычно накладывается ограничение на искомую последовательность: она должна содержать определенное число каждой из букв.

Прежде чем дать решение этой задачи, покажем, как ее можно сформулировать на другом математическом языке.

Формулировка задачи в терминах теории графов

Для каждого подслова x_i из H выберем все подслова y_j , с которыми подслово x_i перекрывается справа, перекрытие подслов x_i и y_j соответствует бинарному отношению $\Delta = \{(x_i, y_j)\}$ на множестве H , такому, что в Δ входят пары элементов, соответствующие перекрывающимся подсловам.

Любое бинарное отношение на множестве H может быть изображено в виде матрицы или в виде ориентированного графа [135, 136, 139].

Подсловам можно поставить в соответствие множество вершин графа. Если подслово, соответствующее x_i , перекрывается справа с подсловом, соответствующим y_j , то вершины x_i и y_j соединяются направленным ребром, идущим из x_i в y_j . На ребрах указываются буквы, по которым происходит перекрытие. Проведение этой процедуры для всех точек приводит к построению ориентированного графа, соответствующего бинарному отношению Δ (рис. 122). Построению последовательности всех перекрывающихся подслов соответствует построение в ориентированном графе пути, проходящего в направлении ребер через все вершины по одному разу. Такой путь в графе называется гамильтоновым путем (или циклом, если путь замкнут). Впервые задача о поиске гамильтонова цикла была поставлена в 1877 г., однако до сих пор нет эффективной процедуры нахождения гамильтонова пути в произвольном графе и методов доказательства существования такого пути. У известных алгоритмов сложность вычислений (число элементарных операций) определения гамильтонова цикла растет, как экспонента числа вершин. Это связано с перебором большого числа вариантов движения по графу.

Если набор подслов H таков, что для каждого подслова известны его граничные буквы, то может быть построено бинарное отношение $\Delta' = \{(a_i, b_j)\}$, такое, что Δ' будет представлять собой пары перекрытий (правые и левые), входящие в каждое подслово. В этом случае перекрываниям подслов можно поставить в соответствие вершины графа, а ребрам — сами подслова, выбрав направление ребра, например от левого перекрытия к правому (рис. 122, б).

Построение последовательности всех перекрывающихся подслов соответствует нахождению в таком ориентированном графе пути, проходящего через все ребра по одному разу. Такой путь

называется эйлеровым. Впервые эта задача была сформулирована в 1736 г. Для эйлерова пути известны эффективные алгоритмы и условия существования такого пути.

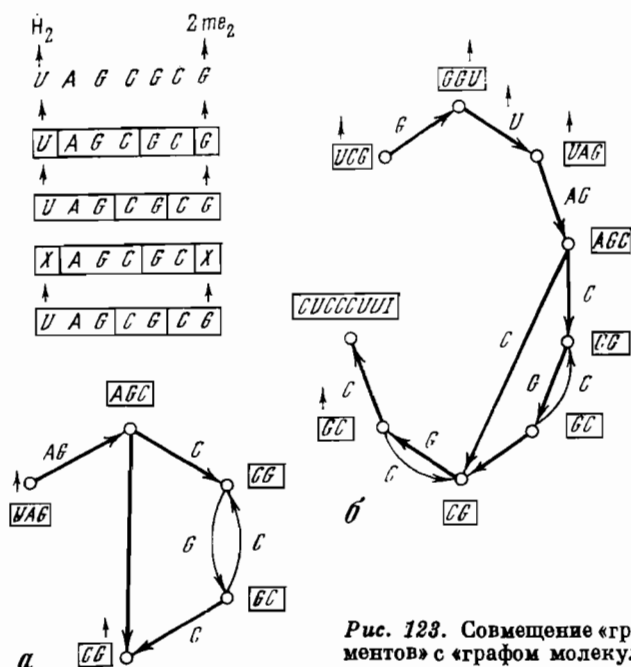
В терминах теории графов решение задачи восстановления слова можно интерпретировать как стремление заменить задачу Гамильтона задачей Эйлера.

Сведение задачи нахождения гамильтонова пути к задаче нахождения эйлерова пути можно рассматривать непосредственно на графе бинарных отношений подслов Δ [131]. Если бинарное отношение Δ , определяющее граф, таково, что множество его ребер (граничных букв) разбивается на непересекающиеся подмножества¹, то каждому ребру такого графа G можно поставить в соответствие вершину нового графа G' , а каждой вершине графа G — ребро графа G' (граф G назовем «сопряженным» графу G'). Если исходная информация представляет собой набор подслов, полученных полными гидролизами, то всегда можно построить сопряженный граф и тем самым свести задачу восстановления слова к задаче Эйлера. Необходимым и достаточным условием существования гамильтонова цикла в ориентированном графе общего вида G является наличие в этом графе суграфа (т. е. графа $\tilde{G}$, у которого отсутствует часть ребер), такого, что сопряженный ему граф есть эйлеров (эйлеровым называется граф, в котором есть эйлеров цикл). В общем случае способ нахождения такого суграфа не известен.

Задача о единственности восстанавливаемого по исходной информации H слова на графах интерпретируется как единственность гамильтонова или эйлерова пути и может быть решена построением всех возможных путей. В графах на рис. 122 возможны несколько путей. Способом борьбы с неоднозначностью ответа является пополнение исходной информации, например за счет увеличения числа полных или частичных гидролизатов, что позволяет уменьшить число ребер на графе бинарных отношений.

Если информация задана продуктами полных гидролизатов всей молекулы и полных гидролизатов ее фрагментов, полученных частичным гидролизом, то для молекулы и фрагментов можно построить ориентированные графы («граф молекулы» и «графы фрагментов»). Очевидно, что множества вершин графов фрагментов будут подмножествами вершин графа молекулы, а множество ребер графов фрагментов — подмножествами ребер графа молекулы. Искомый гамильтонов путь должен проходить только через те ребра, входящие или выходящие из общих для этих графов вершин, которые являются общими для этих графов. Формально

¹ Множество H распадается на непересекающиеся подмножества S , если все слова набора являются внешними и использованы специальные виды перекрывания подслов.



когда у всех фрагментов один из концов общий. Использование именно таких фрагментов довольно широко практикуется биохимиками [109, 110]. Кроме того, условие связности «графа фрагмента» также ограничивает возможные способы его совмещения с «графом молекулы». Поэтому оказывается полезным использовать процедуру идентификации во многих практически встречающихся задачах восстановления первичной структуры РНК.

Рассмотрение задачи восстановления слов в терминах теории графов обеспечивает наглядность рассуждений, однако непосредственное использование графов для решения конкретных задач неудобно.

Разработано два типа алгоритмов для решения задачи восстановления слов: первоначально на основе кодирования исходной информации в виде состава второго ранга восстанавливаемого слова [128—130, 132], а затем на основе алгебраического метода подстановок [131, 133—135].

11.3. Восстановление слов по составу второго ранга

Пусть дано некоторое слово z и пусть a_0, b_0 — первая и последняя буквы этого слова. Рассмотрим все двубуквенные подслова слова z . Пусть подслово $a_i b_i$ (см. рис. 121) k раз входит в z . Образует упорядоченную пару $\langle a_i b_i, k \rangle$. Объединим все такие упорядоченные пары в одно множество и добавим к нему две граничные пары $\langle a_0 1 \rangle, \langle b_0, 1 \rangle$. Полученное множество обозначим через $C_2[z]$. Таким образом вводится оператор, который слову z ставит в соответствие множество $C_2[z]$.

Рассмотрим множество пар, состоящее из следующих элементов: два граничных элемента $\langle a_0, 1 \rangle, \langle b_0, 1 \rangle$ и p внутренних $\{\langle a_i b_i, k_i \rangle\}$, $1 \leq i \leq p$. При этом a_0, b_0, a_i, b_i — произвольные части подслова, k_i — натуральные числа и если $a_i b_i = a_q b_q$, то $k_i = k_q$. Множество такого типа называется составом второго ранга. Пусть дано множество L_2 , являющееся составом второго ранга. Если существует слово z , которое является решением уравнения $L_2 = C_2[z]$, то L_2 есть состав второго ранга слова z . Задача восстановления слова заключается в реконструкции неизвестного слова по заданному составу второго ранга этого слова. К этому сводится задача установления первичной структуры по полным гидролизам [128, 129].

При построении соответствующих алгоритмов и решении вопроса единственности восстанавливаемого слова существенную роль играют регулярные преобразования слов. Пусть слово можно представить в одной из форм:

$$z_1 = x_1 a x_2 b x_3 a x_4 b x_5 \quad (1), \quad z_2 = y_1 c y_2 c y_3 c y_4 \quad (2),$$

где a, b, c — части подслов, $x_1, x_2, x_3, x_4, x_5, y_1, y_2, y_3, y_4$ — произвольные слова. Тогда каждое из слов соответственно для (1) и (2) $z'_1 = x_1 a x_4 b x_3 a x_2 b x_5$, $z'_2 = y_1 c y_3 c y_2 c y_4$ есть результат регулярного преобразования слова z . Слово z тогда и только тогда однозначно восстанавливается по своему составу второго ранга, когда оно не изменяется никаким регулярным преобразованием.

Сложность алгоритма, восстанавливающего слово (или проверяющего его существование и единственность), определяется элементарными операциями, число которых не превосходит n^4 , где n — число букв в восстанавливаемом слове [130].

Располагая данными полного гидролиза и накладывая определенные ограничения на данные частичного гидролиза, можно использовать метод, который уменьшает возможный перебор. Этот метод называется алгоритмом покрытий [132].

Приближенная оценка времени вычисления указанного алгоритма имеет вид $n^k (p!)^2$, где p — среднее число фрагментов частичного гидролиза, n — число букв в восстанавливаемом слове, $k = 3 \div 4$. Основной перебор определяется величиной p . При m различных частичных гидролизом оценка сложности примет вид $n^k (p!)^m$.

11.4. Метод подстановки при восстановлении слов

Как было отмечено, отношение Δ разбивает множество H на подмножества $[S_i (i = 1, \dots, m)]$, где m — число подслов в наборе H таких, что в каждое множество S_i входят лишь элементы, соответствующие подслову, с которыми перекрывается справа подслово x_i . Например, если подслово $x_i = x_i a_i$, то в подмножество S_i входят все подслова типа $a_i y_j, a_i y'_{j+1}$ и т. д. Последовательности всех перекрывающихся подслов из набора H называются Δ -цепями [131]. Эквивалентными считают любые две последовательности, в которых элементы, стоящие на одинаковых местах, соответствуют равным подсловам. Все эквивалентные друг другу последовательности составляют некоторые классы эквивалентности Δ -цепей.

Таким образом, существование единственной Δ -последовательности (слова) соответствует существованию единственного класса эквивалентности на множестве всех Δ -цепей.

Для дальнейшего изложения удобнее рассматривать замкнутые Δ -цепи. Для этого будем считать, что конечное подслово перекрывается справа только с начальным, а начальное слева — только с конечным.

Подстановкой из m элементов $x_i (i = 1, \dots, m)$ называется взаимно-однозначное отображение множества H на себя. Подстановку можно записать в форме разбиения на циклы. При этом

за каждым элементом в строку выписывается элемент, на который он отображается, пока не встретится уже выписанный элемент; такая последовательность заключается в скобки и называется циклом (последний выписанный в ней элемент отображается на первый). Затем выписываются остающиеся элементы до тех пор, пока все они не окажутся выписанными в виде не имеющих общих элементов циклов.

Подстановка, не разложимая на циклы, т. е. представляющая собой единый цикл, называется конечным циклом. Всякая Δ -циклическая цепь является конечным циклом, в котором за каждым x_i следует элемент из S_i .

Для определения Δ -циклической цепи необходимо построить произвольную Δ -подстановку (возможно, не являющуюся конечным циклом), а затем последовательно проводить попарные объединения¹ циклов этой подстановки, пока не придем к конечному циклу.

Все совпадающие множества S_{iq} можно объединить в одно S_i , а все элементы x_{iq} , которым соответствуют эти равные множества, — в одно множество M_i ($i \leq m$). В этом случае Δ -подстановке соответствует отображение элементов каждого множества M_i на элементы соответствующего множества S_i , а все возможные Δ -подстановки могут быть записаны в виде схемы

$$\left(\begin{array}{c|c|c|c|c|c} M_1 & M_2 & M_3 & \dots & M_k \\ \hline S_1 & S_2 & S_3 & \dots & S_k \end{array} \right) \quad (11.1)$$

Множества M_i ($i = 1, \dots, k$) объединяют подслова x_i , имеющие одинаковые правые граничные части, а множества S ($i = 1, \dots, k$) объединяют подслова y_i , имеющие одинаковые левые граничные части.

Например, построим схему фрагмента молекулы РНК (см. рис. 121).

$$\left(\begin{array}{c|c|c|c|c|c} 1 & 2 & 3 & 4 & 5 & 6 \\ \hline GU & AGC & CG & GAU & UAG & UAG \\ GGU & GC & CCG & & & \\ \hline UAG & CG & GC & & & \\ UAG & CCG & GGU & AUG & AGC & GU \\ \hline GAU & & GAU & & & \end{array} \right)$$

¹ Объединение циклов — результат произведения двух независимых циклов на транспозицию элементов из обоих этих циклов, например $(1\ 2\ 3)(4\ 5\ 6)(3\ 4) = (1\ 2\ 4\ 5\ 6\ 3)[138]$.

Часть схемы между двумя вертикальными чертами будем называть блоком.

Необходимое и достаточное условие существования класса Δ -подстановок — возможность установления взаимно-однозначного соответствия между элементами каждой пары множеств M_i и S_i , т. е. равенство чисел элементов в них. Это эквивалентно условию существования эйлера графа.

Возможность построения конечного цикла легко проверяется путем последовательного объединения циклов любой построенной подстановки. Такое объединение осуществляется в этом случае очень легко, достаточно провести транспозицию пары элементов, входящих в разные циклы.

Например: выбираем подслово GU из первого столбца и подслово, на которое оно отображается, UAG . Для подслова UAG находим подслово, на которое оно отображается в столбце 6: GU . Получаем первый цикл (GU, UAG). Аналогичным путем строится следующий цикл: ($AGC, CG, GC, CCG, GAU, AUG, GGU, UAG$). Объединение указанных циклов приводит к конечному циклу ($GU, UAG, AGC, CG, GC, CCG, GAU, AUG, GGU, UAG$). Отбрасывая перекрывающиеся части подслов, получаем исходное слово (см. рис. 121).

Если такой процесс попарного объединения, проводимый в одном произвольном случайно выбранном порядке, не приводит к построению конечного цикла, то конечный цикл на множестве H не существует.

Вопрос о единственности конечного цикла легко решается с использованием метода, аналогичного рассмотренным ранее регулярным преобразованиям (см. раздел 11.3). Так, на множестве H единственный класс эквивалентности Δ -цепей определен тогда и только тогда, когда в случайно выбранной Δ -цепи не существует двух пар элементов x_p, x_q и y_r, y_k , принадлежащих к одному множеству S_i , расположенных в цепи следующим образом: $\dots x_p \dots y_r \dots x_q \dots y_k$ (в частном случае r может равняться q) и таких, что x_p не эквивалентно x_q .

Алгоритм построения последовательности путем объединения циклов имеет порядок менее m^3 , где m — число подслов в наборе H , а проверка единственности построенной последовательности не превосходит m^4 .

Учет продуктов частичного гидролиза осуществляется также с использованием схемы (11.1). Если имеются перекрывающиеся продукты частичного гидролиза, то в тождественных им частях схемы появляются дополнительные блоки [133]. Дробление блоков уменьшает число элементов в каждом новом блоке и соответственно число возможных Δ -цепей, так как в Δ -цепи за каждым элементом верхней строки блока должен следовать какой-нибудь элемент нижней строки. Это эквивалентно уменьшению числа

ребер в «графе молекулы» при наложении на него «графа фрагментов», полученного частичным гидролизом.

Важным моментом при учете информации о частичных гидролизатах является возможность идентификации тождественных подслов.

Проверка условий существования Δ -цепи и само ее построение осуществляются по модифицированной схеме так же, как было ранее описано для схемы полных гидролизатов, однако несколько усложняется методика проверки единственности.

11.5. Оптимизация биохимического эксперимента

Планирование эксперимента

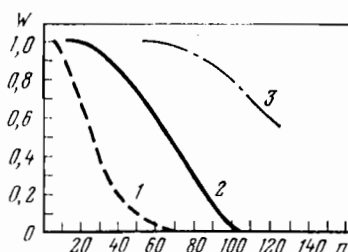
Поскольку учет информации о частичных гидролизатах ведет к уменьшению числа ребер в «графе молекулы» (см. рис. 122), то необходимо использовать фрагменты, позволяющие ликвидировать ребра графа, которые порождают неединственность пути. В одних случаях можно с достаточной определенностью указать требуемый продукт частичного гидролиза и именно его выделять из смеси, например когда один из порождающих неоднозначность элементов входит в концевой продукт.

В других случаях по нуклеотидному составу случайно выбранного частичного гидролизата можно определить, содержится ли в нем элемент, порождающий неоднозначность. Если такого элемента нет, то проводить анализ этого частичного гидролизата не имеет смысла. Планирование эксперимента может быть также облегчено, если в последовательности имеются минорные нуклеотиды (рис. 124).

Определение первичной структуры РНК блочным методом использует перекрывание нуклеотидных последовательностей продуктов различных полных гидролизатов. Нуклеотидная последовательность продуктов определяется для каждого гидролиза, и, таким образом, последовательность нуклеотидов в участках пере-

Рис. 124. Длина последовательностей нуклеотидов, восстанавливаемая однозначно

1 — два полных гидролизата;
2 — три полных гидролизата;
3 — четыре полных гидролизата, W — доля однозначно восстанавливаемой последовательности длины n



крывания определяется несколько раз. В ряде случаев можно устранить такое дублирование [133, 134].

Так, если участок перекрывания имеет характерный нуклеотидный состав, то по известной последовательности этого участка в продукте одного из полных гидролизом можно определить, в каком из внешних продуктов другого полного гидролиза он содержится. Если невозможно выбрать одно решение, то проводится биохимическое определение последовательности в указанных продуктах.

Использование нескольких полных гидролизом

Математическая формулировка критерия единственности слова позволяет определить, какую среднюю длину нуклеотидной последовательности $\bar{n}$ можно однозначно восстановить по данным только нескольких полных гидролизом.

К решению этой задачи можно подойти с двух сторон. Во-первых, можно считать, что нуклеотидные последовательности представляют собой случайно выбранные последовательности из четырех символов [118, 119]. Но такой подход оставляет в стороне возможную неслучайность реальных нуклеотидных последовательностей. Поэтому были использованы уже расшифрованные первичные структуры нуклеиновых кислот [138]. Для этих последовательностей проводилось их условное разбиение на продукты полных гидролизом по каждому из нуклеотидов G, U, C, A. Под-

Таблица 11

Эффект применения математического метода с использованием трех полных гидролизом для однозначного восстановления первичной структуры РНК

Показатель	Фрагмент цистрона из РНК фага R 17 [140]		5S РНК E. coli [141]		5-концевой фрагмент РНК фага Q β [110]	
Число нуклеотидов	57		120		175	
Метод	Традиционный	Математический	Традиционный	Математический	Традиционный	Математический
Общее число продуктов полных гидролизом	22	34	40	55	47	77
Число расшифрованных биохимически продуктов полных гидролизом	9	6	16	13	26	19
Число продуктов частичных гидролизом	5	1	108	6	14	2

считывалось, какая часть последовательностей данной длины восстанавливается однозначно. Сглаженные кривые результатов этого анализа приведены на рис. 124.

Средняя длина $\bar{n} = \left[\sum_i n_i W(n_i) \right] / \left[\sum_i W(n_i) \right]$, где $W(n_i)$ — доля однозначно восстанавливаемых последовательностей длины n_i , равняется для двух гидролизом 18 нуклеотидам, для трех — 36, для четырех — ~70. Для четырех гидролизом не удалось получить всю кривую из-за малого числа длинных молекул РНК, расщепленных к настоящему времени.

Таким образом, использование каждого нового полного гидролиза, специфичного к одному нуклеотиду, увеличивает среднюю длину последовательности, однозначно восстанавливаемой по данным только полных гидролизом, примерно в два раза.

В табл. 11 приведены данные, позволяющие сравнивать количества биохимической информации, необходимой для однозначного восстановления структуры трех РНК традиционными методами, использующими два полных гидролиза, и математическим методом, использующим три полных гидролиза. Из табл. 11 видно, что число различных продуктов трех полных гидролизом больше, чем двух полных гидролизом примерно в полтора раза. Однако число олигонуклеотидов, структуру которых надо определять биохимическими методами, уменьшается. Использование описанных методов позволяет в 5—18 раз уменьшить количество продуктов частичного гидролиза, необходимое для достижения однозначности.

Поскольку получение и анализ продуктов частичного гидролиза — одна из наиболее сложных и трудоемких биохимических операций, то значительное уменьшение их числа свидетельствует об эффективности разработанных методов. Можно надеяться, что использование математических методов восстановления слов позволит значительно продвинуться вперед в определении первичной структуры нуклеиновых кислот.

ЛИТЕРАТУРА

Часть 1

1. Волькенштейн М. В. Физика ферментов. М., «Наука», 1967.
2. Волькенштейн М. В. Молекулярная биофизика. М., «Наука», 1975.
3. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., «Мир», 1966.
4. Иост Х. Физиология клетки. М., «Мир», 1975.
5. Кротович В. Л. Введение в энзимологию. М., «Наука», 1967.
6. Ленинджер А. Биохимия. М., «Мир», 1976.
7. Малер Г., Кордес Ю. Основы биологической химии, М., «Мир», 1970.
8. Mahler H. R., Cordes E. H. Biological chemistry. New York, Harper and Row, 1971.
9. Уэбб Л. Ингибиторы ферментов и метаболизма. М., «Мир», 1966.
10. Дженткс В. Катализ в химии и энзимологии. М., «Мир», 1972.
11. Darnall D. W., Klotz I. M. Subunit constitution of proteins: a table.— Arch. Biochem. and Biophys., 1975, 166, p. 651—682.
12. Brown A. J. Enzyme action.— J. Chem. Soc., 1902, 81, p. 373—400.
13. Henri V. Theorie generale de l'action de quelques diastases.— C. r. Acad. sci., 1902, 135, p. 916—930.
14. Henri V. Lois générales de l'action des diastase. Paris, Hermann et Ci, 1903.
15. Michaelis L., Menten M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung.— Biochem. Z., 1913, 49, S. 333—343.
16. Briggs G. E., Haldane J. B. S. A note on the kinetics of enzyme action.— Biochem. J., 1925, 19, p. 338—339.
17. Chance B. The kinetics of the enzyme-substrate compound of peroxidase.— J. Biol. Chem., 1943, 151, p. 553—561.
18. Jagi K., Ozawa T. Crystallization of Michaelis complex of D-amino acid oxidase.— BBA, 1962, 60, p. 200—201.
19. Jagi K., Ozawa T. Shape and volume of the crystal of D-amino acid oxidase Michaelis complex.— J. Biochem., 1963, 53, p. 162—163.
20. Haldane J. B. S. Enzymes. London, Lonzmans, 1930.
21. Dixon M., Thurlow S. Studies on xanthine oxidase. II. The dynamics of the oxidase system.— Biochem. J., 1924, 18, p. 976—988.
22. Ivanov V. I., Karpeisky M. J. Dynamic three-dimensional model for enzymic transamination.— Advances Enzymol., 1969, 32, p. 21—56.
23. Моно Ж., Жакоб Ф. Общие выводы: телеономические механизмы в процессах клеточного обмена, роста и дифференцировки. В кн.: Регуляторные механизмы клетки. М., «Мир», 1964, с. 477—497.
24. Monod J., Jacob F. Genetic repression, allosteric inhibition and cellular differentiation.— In: Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis. M. Locke (Ed.). N. Y. Acad. Press, 1963, p. 120—143.
25. Monod J., Wyman J., Changeux J.-P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model.— J. Mol. Biol., 1965, 12, p. 88—118.
26. Бессекерский В. А., Попов Е. П. Теория систем автоматического регулирования. М., «Наука», 1972.
27. Большая Медицинская Энциклопедия, т. 3. М., «Советская

- Энциклопедия», 1976, с. 149—156.
28. *Novick A., Szillard L.* Experiments with the chemostat on the rates of amino acids synthesis in bacteria.— In: *Dynamics of Growth Processes*. Princeton Univ. Press, 1954, p. 21—37.
29. *Умбургер Г.* Подавление активности фермента конечным продуктом как механизм обратной связи.— В кн.: *Регулярные механизмы клетки*. М., «Мир», 1964, с. 390—407.
30. *Umbarger H.* Regulation of amino acid metabolism.— *Annual Rev. Biochem.*, 1969, 38, p. 323—370.
31. *Stadtman E. R.* Mechanisms of enzyme regulation in metabolism.— In: *The Enzymes*, v. 1. 3rd ed. P. D. Boyer (Ed.). N. Y., Acad. Press, 1970, p. 397—459.
32. *Newsholme E. A., Start C.* Regulation in metabolism. London, John Wiley and Sons, 1973.
33. Итоги науки и техники. Сер. биол. химия, т. 4. Аллостерическая регуляция ферментов. М., ВИНТИ, 1971.
34. Итоги науки и техники. Сер. биол. химия, т. 8. Аллостерические ферменты. М., ВИНТИ, 1975.
35. *Bodenstein M.* Eine Theorie der photochemischen Reaktionsgeschwindigkeiten.— *Z. phys. Chemie*, 1913, 85, s. 329—397.
36. *Семенов Н. Н.* Кинетика сложных гомогенных реакций. I. Общая теория сложных реакций.— *ЖФХ*, 1943, 17 (4), с. 187—214.
37. *Тихонов А. Н.* О зависимости решений дифференциальных уравнений от малого параметра.— Матем. сб., 1948, 22 (64), с. 193—204.
38. *Тихонов А. Н.* О системах дифференциальных уравнений, содержащих параметры.— Матем. сб., 1950, 27 (69), с. 147—156.
39. *Тихонов А. Н.* Системы дифференциальных уравнений, содержащих малые параметры при производных.— Матем. сб., 1952, 31 (73), с. 575—586.
40. *Васильева А. Б.* О дифференциальных уравнениях, содержащих малые параметры.— Матем. сб., 1952, 31 (73), с. 587—644.
41. *Градштейн И. С.* Применение теории устойчивости к теории дифференциальных уравнений с малыми множителями при производных.— Матем. сб., 1953, 32 (74), с. 263—286.
42. *Васильева А. Б., Бутузов В. Ф.* Асимптотические разложения решений сингулярно возмущенных уравнений. М., «Наука», 1973.
43. *Мищенко Е. Ф., Розов Н. Х.* Дифференциальные уравнения с малым параметром и релаксационные колебания. М., «Наука», 1975.
44. *Heineken F. G., Tsuchiya H. M., Aris R.* On the mathematical status of the pseudo-steady state hypothesis of biochemical kinetics.— *Math. Biosci.*, 1967, 1, p. 95—113.
45. *Reich J. G., Sel'kov E. E.* Mathematical analysis of metabolic networks.— *FEBS Letters*, 1974, 40, Suppl., S. 119—127.
46. *King E. L., Altman C.* A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reactions.— *J. Phys. Chem.*, 1956, 60, p. 1375—1378.
47. *Volkenstein M. V., Goldstein B. N.* A new method for solving the problems of the stationary kinetics of enzymological reactions.— *Biochim. et biophys. acta*, 1966, 115, p. 471—477.
48. *Берж К.* Теория графов и ее применения. М., ИЛ, 1962.
49. *Сецу С., Рид М. Б.* Линейные графы и электрические цепи. М., «Высшая школа», 1971.
50. *Харари Ф.* Теория графов. М., «Мир», 1973.
51. *Бессонов Л. А.* Линейные электрические цепи. М., «Высшая школа», 1974.
52. *Koshland D. E., Nemethy G., Filmer D.* Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits.— *Biochem.*, 1966, 5, p. 365—385.

53. Frieden C., Colman R. F. Glutamate dehydrogenase concentration as a determinant in the effect of purine nucleotides on enzymatic activity.— J. Biol. Chem., 1967, 242, p. 1705—1715.
54. Курганов В. И. Кинетический метод расчета констант ассоциации белковых молекул.— Мол. биол., 1967, 1, с. 17—27.
55. Гольдштейн В. Н., Волькенштейн М. В. О кооперативности в двухсубстратных реакциях.— Мол. биол., 1971, 4, с. 555—565.
56. Porova S. V., Sel'kov E. E. Generalization of the model by Monod, Wyman and Changeux for the case of a reversible monosubstrate reaction $S \xrightleftharpoons{R, T} P$. FEBS Letters, 1975, 53, 269—273.
57. Попова С. В., Сельков Е. Е. Обобщение модели Моно, Уаймена и Шанжэ на случай многосубстратных реакций.— Мол. биол., 1976, 10, с. 1116—1126.
58. Cleland W. W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products.— Biochim. et biophys. acta, 1963, 67, p. 104—137.
59. Blangy D., Buc H., Monod J. Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from *Escherichia coli*.— J. Mol. Biol., 1968, 31, p. 13—35.
60. Курганов В. И. Кинетический анализ обобщенной модели Моно, Уаймена, Шанжэ.— Мол. биол., 1974, 8, с. 244—252.
61. Smith G. D., Roberts D. V., Kuchel P. W. Active site directed effectors of allosteric enzymes.— Biochim. et biophys. acta, 1975, 377, p. 197—202.
62. LeJohn H. B. Unidirectional inhibition of glutamate dehydrogenase by metabolites.— J. Biol. Chem., 1968, 243, p. 5126—5131.
63. Sanner T. The unidirectional inhibition of glutamate dehydrogenase from *Blastocladiella emersonii*.— Biochim. et biophys. acta, 1972, 258, p. 689—700.
64. Stalon V., Ramos F., Wiame J.-M. Regulation of the catabolic ornithine carbamoyltransferase of *Pseudomonas fluorescens*.— Europ. J. Biochem., 1972, 29, p. 25—35.
65. Андронов А. А., Витт А. А., Хайкин С. Э. Теория колебаний. М., Физматгиз, 1963.
66. Андронов А. А., Леонтович Е. А., Гордон И. И., Майер А. Г. Качественная теория динамических систем второго порядка. М., «Наука», 1966.
67. Андронов А. А., Леонтович Е. А., Гордон И. И., Майер А. Г. Теория бифуркаций динамических систем на плоскости. М., «Наука», 1967.
68. Сельков Е. Е. О возможности возникновения автоколебаний в ферментативных реакциях с субстратным и продуктным угнетением.— В кн.: Колебательные процессы в биологических и химических системах. М., «Наука», 1967, с. 93—112.
69. Krebs H. A. The Pasteur effect and the relation between respiration and fermentation.— In: Essays in Biochemistry. P. N. Campbell, F. Dickens (Eds). New York, Acad. Press, 1972, p. 1—34.
70. Каймачников Н. П., Сельков Е. Е. Простейший биохимический автогенератор — открытая ферментативная реакция $S \rightleftharpoons P$ с субстратным угнетением.— Биофизика, 1976, 21, с. 428—433.
71. Каймачников Н. П., Сельков Е. Е. Гистерезис и множественность динамических режимов в открытой двухсубстратной ферментативной реакции с субстратным угнетением.— Биофизика, 1975, 20, с. 703—708.
72. Sel'kov E. E. Nonlinearity of multienzyme systems.— In: Analysis and Simulation of Biochemical Systems. H. C. Hemker, B. Hess (Eds). North-Holland, Amsterdam, 1972, p. 145—161.
73. Самойленко В. А., Сельков Е. Е. О возможности существования автоколебаний и нескольких

- альтернативных стационарных состояний в ферментативной реакции с субстратным и продуктным угнетением.— Биофизика, 1972, 17, с. 862—868.
74. Баутин Н. Н. Поведение динамических систем вблизи границ области устойчивости. М., Гостехиздат, 1949.
75. Сельков Е. Е., Дынный С. Н. Гистерезис и множественность стационарных состояний в открытой реакции $S \xrightarrow{E(R,T)} P$ катализируемой олигомерным ферментом $E(R,T)$.— Биофизика, 1976, 21, с. 214—219.
76. Franck U. F. Models for biological excitation processes.— Progr. Biophysics, 1956, 6, p. 171—206.
77. Franck U. F. Modelle zur biologische Erregung.— Studium gen., 1965, 18, S. 313—329.
78. Franck U. F. Oscillatory behaviour, excitability and propagation phenomena on membranes and membrane like interfaces. In: Biological and Biochemical Oscillators.— B. Chance e. a. (Eds.) New York, Acad. Press, 1973, p. 7—30.
79. Franck U. F. Kinetic feedback processes in physico-chemical oscillatory systems. Faraday Symposium, v. 9, Physical chemistry of oscillatory phenomena. Chemical Society. London, 1974, p. 137—149.
80. Сельков Е. Е. Исследование механизма гликолитических колебаний. Релаксационная модель. — В кн.: Математические модели биологических систем. М., «Наука», 1971, с. 5—24.
81. Sel'kov E. E., Belz A. On the mechanism of single-frequency glycolytic oscillations.— In: Biological and Biochemical Oscillators. B. Chance e. a. (Eds.) New York, Acad. Press, 1973, p. 197—220.
82. Sel'kov E. E. Nonlinear theory of regulation of the key step of glycolysis.— Studia biophysica, 1972, 33, p. 167—176.
83. Сельков Е. Е. Математический анализ механизма одночастотных колебаний гликолитических интермедиатов. Канд. дис. Пушкино, 1972.
84. Жаботинский А. М. Концентрационные автоколебания. М., «Наука», 1974.
85. Geier T., Reich J. G. A note on the glycolytic phosphofructokinase oscillator.— Studia biophysica, 1977, 62, p. 59—66.
86. Goldbeter A., Lefever. R. Dissipative structures for an allosteric model. Application to glycolytic oscillations.— Biophys. J., 1972, 12, p. 1302—1315.
87. Belz A., Chance B. Phase relationship of glycolytic intermediates in yeast cells with oscillating metabolic control.— Arch. Biochem. and Biophys., 1965, 109, p. 585—595.
88. Hess B., Brand K., Pye K. Continuous oscillations in a cell-free extract of *S. carlsbergensis*.— BBRC, 1966, 23, p. 102—108.
89. Pye K., Chance B. Sustained sinusoidal oscillations of reduced pyridine nucleotide in a cell-free extract of *Saccharomyces carlsbergensis*.— Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1966, 55, p. 888—894.
90. Chance B., Pye K., Higgins J. Waveform generation by enzymatic oscillators.— I. E. E. Spectrum, 1967, 4, p. 79—86.
91. Frenkel R. Control of reduced diphosphopyridine nucleotide oscillations in rat heart extracts.— Arch. Biochem. and Biophys., 1968, 125, p. 157—177.
92. Hess B., Boiteux A. Control of glycolysis.— In: Regulatory Functions of Biological Membranes. J. Järnefelt (Ed.). Amsterdam, Elsevier Publ. Co., 1968, p. 148—162.
93. Hess B., Boiteux A., Krüger J. Cooperation of glycolytic enzymes. Advances in Enzyme Regulation. G. Weber (Ed.). Oxford, Pergamon Press, 1969, p. 149—167.
94. Pye K. Biochemical mechanisms underlying the metabolic oscillations.

- lations in yeast.— *Canad. J. Bot.*, 1969, 47, p. 271—285.
95. *Klitzing L., von, Betz A.* Metabolic control in flow systems. I. Sustained glycolytic oscillations in yeast suspension under continual substrate infusion.— *Arch. Mikrobiol.*, 1970, 71, p. 220—225.
96. *Betz A., Klitzing L. von.* Cyclic phenomena in biological systems.— *J. Interdisc. Cycle. Res.*, 1971, 2, p. 111—120.
97. *Hess B., Boiteux A.* Oscillatory phenomena in biochemistry.— *Annual Rev. Biochem.*, 1971, 40, p. 237—258.
98. *Törnheim K., Lowenstein J. M.* The purine nucleotide cycle. III. Oscillations in metabolite concentrations.— *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, p. 2670—2677.
99. *Törnheim K., Lowenstein J. M.* The purine nucleotide cycle. IV. Interactions with oscillations of the glycolytic pathway in muscle extracts.— *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, p. 3241—3247.
100. *Törnheim K., Lowenstein J. M.* The purine nucleotide cycle. Control of phosphofructokinase and glycolytic oscillations in muscle extracts.— *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, p. 6304—6314.
101. *Circadian clocks.* J. Aschoff (Ed.). Amsterdam, North-Holland, 1965.
102. *Sweeney B.* Rhythmic phenomena in plants. London, Acad. Press, 1969.
103. *Bünning E.* The physiological clock. Circadian rhythms and biological chronometry, 3rd rev. ed. London, Engl. Univ. Press, 1973.
104. The molecular basis of circadian rhythms. J. W. Hastings, H.-G. Schweiger (Eds). West Berlin, Dahlem Konferenzen, 1976.
105. *Сельков Е. Е.* Анализ временной организации полиферментных систем. IV Межд. биофиз. конгресс. Пушчино, IUPAB и АН СССР, 1973, с. 437—460.
106. *Higgins J.* A chemical mechanism for oscillation in glycolytic intermediates.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1964, 51, p. 989—999.
107. *Higgins J.* The theory of oscillating reactions.— *Indust. and Engng Chem.*, 1967, 59 (5), p. 19—62.
108. *Dynnik V. V., Sel'kov E. E., Semashko L. R.* Analysis of the adenine nucleotide effect on the oscillatory mechanism of glycolysis.— *Studia biophysica*, 1973, 41, p. 193—214.
109. *Dynnik V. V., Sel'kov E. E.* On the possibility of self-oscillations in the lower part of the glycolytic system.— *FEBS Letters*, 1973, 37, p. 342—346.
110. *Динник В. В., Сельков Е. Е.* Генератор колебаний в нижней части гликолитической системы.— *Биофизика*, 1975, 20, с. 288—292.
111. *Динник В. В., Сельков Е. Е.* Двухчастотные колебания в гликолитической системе.— *Биофизика*, 20, 1975, с. 293—297.
112. *Dynnik V. V., Sel'kov E. E.* Self-oscillations in the lower part of the glycolytic system. Two alternative mechanisms.— *Studia biophysica*, 1977, 63, p. 9—23.
113. *Dynnik V. V., Sel'kov E. E.* Mathematical models for double-periodical oscillations mechanisms of glycolytic system.— *Studia biophysica*, 1977, 65, p. 183—204.
114. *Delbrück M.* A note in: *Colloques internationales du Centre National de la Recherche scientifiques*, v. 8. Unites biologiques douces de contintie genetique. Paris, C. N. R. S., 1949, p. 33—35.
115. *Spangler R. A., Snell F. M.* Sustained oscillation in a catalytic chemical system.— *Nature*, 1961, 191, p. 457—458.
116. *Spangler R. A., Snell F. M.* Transfer function analysis of an oscillatory model of chemical system.— *J. Theor. Biol.*, 1967, 16, p. 381—405.
117. *Жакоб Ф., Моно Ж.* Регуляция активности генов.— В кн.:

- Регуляторные механизмы клетки. М., «Мир», 1964, с. 278—304.
118. Андреев В. М. Критические явления в открытых системах. — ЖФХ, 1962, 36, с. 42—52.
 119. Чернавский Д. С., Гризоров Л. Н., Полякова М. С. Моделирование триггерных схем Жакоба и Моно.— В кн.: Колебательные процессы в биологических и химических системах. М., «Наука», 1967, с. 138—148.
 120. Гризоров Л. Н., Полякова М. С., Чернавский Д. С. Модельное исследование триггерных схем и процесса дифференциации.— Мол. биол., 1967, 1, с. 410—418.
 121. Романовский Ю. М., Степанова Н. В., Чернавский Д. С. Математическое моделирование в биофизике. М., «Наука», 1975.
 122. Ратнер В. А. Генетические управляющие системы. Новосибирск, «Наука», 1966.
 123. Ратнер В. А. Молекулярно-генетические системы управления. Новосибирск, «Наука», 1975.
 124. Szilard L. The control of the formation of specific proteins in bacteria and in animal cells.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1960, 46, p. 277—292.
 125. Кэксер Г. Кинетические модели развития и наследственности.— В кн.: Моделирование в биологии. М., ИЛ, 1963, с. 42—64.
 126. Heinmets F. Quantitative cellular biology. An approach to the quantitative analysis of life processes. N. Y., Marcel Dekker, 1970.
 127. Babloyanz A., Nicolis G. Chemical instabilities and multiple steady state transitions in Monod-Jacob type models.— J. Theor. Biol., 1972, 34, p. 185—192.
 128. Knorre W. A., Bergter F., Simon Z. Multistability in metabolic system.— Studia biophysica, 1975, 49, p. 81—89.
 129. Goodwin B. C. Temporal organization in cells.— Acad. Press, New York—London, 1963.
 130. Goodwin B. C. An entrainment model for timed enzyme synthesis in bacteria.— Nature, 1966, 209, p. 479—481.
 131. Сельков Е. Е. Исследование условий возникновения периодических колебаний в системах реакций с обратной связью.— В кн.: Колебательные процессы в биологических и химических системах. М., «Наука», 1967, с. 81—93.
 132. Morales M., McKay D. Biochemical oscillations in «controlled» system.— Biophys. J., 1967, 7, p. 621—625.
 133. Griffith J. S. Mathematics of cellular control processes.— J. Theor. Biol., 1968, 20, p. 202—216.
 134. Landahl H. D. Some conditions for sustained oscillations in biochemical chains with feedback inhibition.— Bull. Math. Biophys., 1969, 31, p. 775—787.
 135. Walter C. F. The occurrence and the significance of limit cycle behaviour in controlled biochemical system.— J. Theor. Biol., 1970, 27, p. 259—272.
 136. Анохин Ю. М., Сельков Е. Е. О колебательной неустойчивости синтеза субъединичных ферментов.— В кн.: Колебательные процессы в биологических и химических системах, т. 2. Пущинский науч. центр, 1971, с. 80—83.
 137. Walter C. Kinetic and thermodynamic aspects of biological and biochemical control mechanisms.— In: Biochemical Regulatory Mechanisms in Eucariotic Cells. E. Kun, S. Grisolia (Eds). New York, J. Wiley, 1972, p. 355—489.
 138. Viniegra-Gonzalez G. Stability properties of metabolic pathways with feedback interactions.— In: Biological and Biochemical Oscillators. B. Chance et al., (Eds). New York, Acad. Press, 1973, p. 41—59.
 139. Rapp P. Analytic procedures for large dimension nonlinear biochemical oscillators.— BioSystems, 1975, 7, p. 92—100.
 140. Tyson J. J., Othmer H. G. The dynamics of feedback control

- circuits in biochemical pathways.— *Progr. Theor. Biol.*, 1977, 9, p. 39—98.
141. *Sel'kov E. E.* 1973. Analysis of stoichiometric regulation of energy metabolism.— In: VII International Berlin Symposium on Structure and Function of Erythrocytes. Berlin, August, 1973. Soc. Exp. Med. and Acad. Sci. GDR, 1973, p. 4—8.
 142. *Sel'kov E. E.* Analysis of stoichiometric regulation of energy metabolism.— In: VII International Berlin Symposium on Structure and Function of Erythrocytes. Berlin, August 1973, S. M. Rapoport, F. Jung (Eds). Berlin, Acad. Verl., 1976, p. 17—19.
 143. *Каймачников Н. П., Сельков Е. Е.* Автокатализ в стехиометрической модели энергетического метаболизма.— *Биофизика*, 1976, 21, с. 220—224.
 144. *Sel'kov E. E.* Stabilization of energy charge, oscillations and multiplicity of stationary states in energy metabolism as a result of purely stoichiometric regulation.— *Europ. J. Biochem.*, 1975, 59, p. 151—157.
 145. *Glende M., Drabsch H., Reich J. G., Sel'kov E. E.* Zur Stellung des Orthophosphates in Energietoffwechsel der Zelle.— *Studia biophysica*, 1975, 52, p. 141—154.
 146. *Reich J. G., Sel'kov E. E., Geler Th., Dronova V.* Elementary properties of energy—regenerating pathways. *Studia biophysica*, 1976, 54, p. 57—76.
 147. *Reich J. G., Sel'kov E. E., Geier Th., Dronova V.* Dynamic properties of energy-regenerating pathways. Z-shaped hysteresis of the load characteristics.— *Studia biophysica*, 1976, 59, p. 11—138.
 148. *Reich J. G., Sel'kov E. E., Glende M., Geier Th., Dronova V., Schulmeister Th.* On the compensatory effect of phosphate in carbohydrate catabolism.— *Studia biophysica*, 1976, 60, p. 41—59.
 149. *Reich J. G., Sel'kov E. E., Glende M., Geler Th., Dronova V., Nürnberg G.* Alternative steady-states of the phosphorylated intermediates of the carbohydrate metabolism (beak-shaped hysteresis).— *Studia biophysica*, 1976, 61, p. 205—222.
 150. *Дынный В. В., Сельков Е. Е., Овчинников И. А.* Влияние рециркуляции NAD^+ на механизм стабилизации АТФ в цитоплазме.— *Биохимия*, 1977, 42, с. 1567—1576.
 151. *Каймачников Н. П., Сельков Е. Е.* Математическая модель адаптации энергетического метаболизма клетки. Учет влияния АТФ на активность и концентрацию фермента инициаторной ступени.— *Биофизика*, 1977, 22, с. 241—246.
 152. *Bohnensack R., Sel'kov E. E.* Stoichiometric regulation in the citric acid cycle. I. Linear interactions of intermediates.— *Studia biophysica*, 1977, 65, 161—173.
 153. *Bohnensack R., Sel'kov E. E.* Stoichiometric regulation in the citric acid cycle. II. Non-linear interactions.— *Studia biophysica*, 1977, 66, 47—63.
 154. *Bohnensack R., Sel'kov E. E.* Stoichiometric regulation in the citric acid cycle. III. Non-linear autocatalysis by the glyoxylate shunt.— *Studia biophysica*, 1977, 66, 81—87.
 155. *Опарин А. И.* Происхождение жизни. М., «Московский рабочий», 1924.
 156. *Кальвин М.* Химическая эволюция. М., «Мир», 1971.
 157. *Кеньон Д., Стейнман Г.* Биохимическое предопределение. М., «Мир», 1972.
 158. *Руттен М.* Происхождение жизни (естественным путем). М., «Мир», 1973.
 159. *Degani Ch., Halman M. M.* Chemical evolution of carbohydrate.— *Nature*, 1967, 216, p. 1207.
 160. *Дэгли С., Никольсон Д.* Метаболические пути. М., «Мир», 1973.
 161. *Кулаев И. С.* Биохимия высокомолекулярных полуфосфатов. Изд-во МГУ, 1975.

162. *Reeves R. E.* A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase.— *J. Biol. Chem.*, 1968, **243**, p. 3202—3204.
163. *Reeves R. E.* Phosphopyruvate carboxylase from *Entamoeba histolytica*.— *Biochim. et biophys. acta*, 1970, **220**, p. 346—349.
164. *Reeves R. E.* Carbohydrate metabolism in *Entamoeba histolytica*.— In: *Comparative Biochemistry of Parasites*. H. Van den Bossche (Ed.). New York, Acad. Press, 1972, p. 351—358.
165. *Reeves R. E., South D. J., Blytt H. J., Warren L. G.* Pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate-1-phosphotransferase. A new enzyme with the glycolytic function of 6-phosphofructokinase.— *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, p. 7737—7741.
166. *Lotka A. J.* Für Theorie der periodischen Reaktionen.— *Z. phys. Chem.*, 1910, **72**, p. 508—511.
167. *Lotka A. J.* Contribution to the theory of periodic reactions.— *J. Phys. Chem.*, 1910, **14**, p. 271—274.
168. *Pavlidis T., Kauzmann W.* Toward a quantitative biochemical model for circadian oscillations.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1969, **132**, p. 338—348.
169. *Rapoport T. A., Heinrich R., Rapoport S. M.* Regulatory principles of glycolysis in erythrocytes in vivo and in vitro. A minimal comprehensive model describing steady states, quasi-steady states and time-dependent processes.— *Biochem. J.*, 1976, **154**, p. 449—469.
170. *Атуллаханов Ф. И., Витвицкий В. М., Жаботинский А. М., Холоденко Б. Н., Эрлих Л. И.* Количественная модель гликолиза эритроцита. I. Зависимость стационарной скорости гликолиза от концентрации АТФ.— *Биофизика*, 1977, **22**, с. 483—487.
171. *Сельков Е. Е., Дынный С. Н.* Гистерезис, множественность стационарных состояний и автоколебания в открытом футильном цикле, одна из реакций которого ингибируется субстратом.— *Биохимия*, 1976, **41**, с. 1677—1683.
172. *Сельков Е. Е.* Временная организация энергетического метаболизма и клеточные часы.— В кн.: *Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние организма*. М., «Наука», 1977, с. 20—24.

Часть 2

1. *Hodgkin A., Huxley A.* A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.— *J. Physiol.*, 1952, **117**, p. 500—544.
2. *Noble D.* A modification of the Hodgkin—Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pacemaker potentials.— *J. Physiol.*, 1962, **160**, p. 317—352.
3. *McAllister R. E., Noble D., Tsien R. W.* Reconstruction of the electrical activity of cardiac Purkinje fibres.— *J. Physiol.* 1975, **251**, p. 1—50.
4. *Frankenhauser B., Huxley A.* The action potential in the myelinated nerve fibre of *Xenopus laevis* as computed on the basis of voltage clamp data.— *J. Physiol.*, 1964, **171**, p. 302—315.
5. *Adrian R., Peachey L.* Reconstruction of the action potential of frog sartorius muscle.— *J. Physiol.*, 1973, **235**, p. 103—131.
6. *Huxley A.* Ion movements during nerve activity.— *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1959, **81**, p. 221—246.
7. *Huxley A.* Excitation and con-

- duction in nerve: quantitative analysis.— Science, 1964, 145, p. 1154—1159.
8. Cole K. Ions, potentials and nerve impulse.— In: Electrochemistry in Biology and Medicine. T. Shedlovsky (Ed.). N. Y., Wiley, 1955, p. 120—140.
9. Cole K. Effect of polarization on membrane ion currents.— Biophys. Soc. Abstrs, 1958, 12, p. 22.
10. Fitz Hugh R., Antosiewicz H. Automatic computation of nerve excitation-detailed corrections and additions.— J. Soc. Industr. Appl. Math., 1959, 7, N 4, p. 447.
11. Fitz Hugh R. Impulses and physiological states in theoretical models of nerve membrane.— Biophys. J., 1961, 1, p. 445—446.
12. Fitz Hugh R. Computation of impulse initiation and saltatory conduction.— Biophys. J., 1962, 2, p. 11—21.
13. Ходоров Б. И. Общая физиология возбудимых мембран. М., «Наука», 1975.
14. Тихонов А. Н. Системы дифференциальных уравнений, содержащие малые параметры при производных.— Матем. сб., 1952, 31 (73), № 3, с. 575—586.
15. Понтрягин Л. С. Асимптотическое поведение решений систем дифференциальных уравнений с малым параметром при высших производных.— Изв. АН СССР. Сер. мат., 1957, 21, № 5, с. 605—626.
16. Вазов В. Асимптотические разложения решений обыкновенных дифференциальных уравнений.¹ М., «Мир», 1968.
17. Васильева А. Б. Асимптотические методы в теории обыкновенных дифференциальных уравнений с малыми параметрами при старших производных.— Журн. вычислит. мат. и мат. физ., 1963, 3, № 4, с. 611—642.
18. Zeeman E. Differential equations for the heartbeat and nerve impulse.— In: Towards a Theoretical Biology, v. 4. Edinburgh Univ. Press, 1972, p. 8—67.
19. Tasaki I., Hagiwara S. Demonstration of two stable potential states in the squid giant axon under tetraethylammonium chloride.— J. Gen. Physiol., 1957, 40, p. 859—885.
20. Андронов А. А., Витт А. А., Хайкин С. Э. Теория колебаний. М., Физматгиз, 1965.
21. Lenfant J., Mironneau J., Aka J. Activite repetitive de la fibre sinoauriculaire de grenouille.— J. Physiol. (Paris), 1972, 64, p. 5—18.
22. Hagiwara S., Oomura J. The critical depolarization for the spike in the squid.— Japan J. Physiol., 1958, 8, p. 234.
23. Кринский В. И., Кокос Ю. М. Анализ уравнений возбудимых мембран. I. Сведение уравнений Ходжкина — Хаксли к системе второго порядка.— Биофизика, 1973, 18, с. 506—511.
24. Кокос Ю. М., Кринский В. И. Анализ уравнений возбудимых мембран. II. Оценка электрофизиологических характеристик по нуль-изоклинам редуцированных уравнений Ходжкина — Хаксли.— Биофизика, 1973, 18, с. 878—885.
25. Кринский В. И., Кокос Ю. М. Анализ уравнений возбудимых мембран. III. Мембрана волокна Пуркинье. Сведение уравнений Нобла к системе второго порядка и анализ автоматии по нуль-изоклинам.— Биофизика, 1973, 18, с. 1067—1073.
26. Кокос Ю. М., Кринский В. И., Морев О. А. Анализ уравнений возбудимых мембран. IV. Применение метода нуль-изоклин для анализа мембраны волокна Пуркинье.— Биофизика, 1974, 19, с. 493—498.
27. Krinsky V., Porotcov V., Kokoz Ju. A new method for description of excitable cell membrane on the basis of voltage clamp experiments.— IV. In-

- tern. Biophys. Congr. Moscow, 1972, Abstr., 3, p. 339.
28. Krinsky V., Porotikov V. Method for analysis of drug action on muscle and nerve membranes from voltage clamp data.—*Studia biophysica*, 1973, 39, N 2, p. 69—80.
29. Krinsky V., Kokoz Y., Fomin S. Small parameter method in Hodgkin—Huxley type models.—*V. Intern. Biophys. Congr. Amsterdam*, 1975, Abstr., p. 118.
30. Tasaki I., Singer I., Watanabe A. Observations of excitation of squid giant axons in sodium-free external media.—*Amer. J. Physiol.*, 1966, 211, p. 746—754.
31. Tasaki I. Nerve excitation. Illinois, Charles Thomas Publ., 1968.
32. Tasaki I., Takenaka T. Effects of various potassium salts and proteases upon excitability of intercellularly perfused squid giant axons.—*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1964, 52, p. 804—810.
33. Ходоров Б. И. Проблема возбудимости. Л., «Медицина», 1969.
34. Imanishi S. Calcium—sensitive discharges in canine Purkinje fibers.—*Japan. J. Physiol.*, 1971, 21, p. 443—463.
35. Scherf D. Studies on auricular tachycardia caused by aconitine administration.—*Proc. Soc. Exptl Biol. (N. Y.)*, 1947, 64, p. 233—239.
36. Schmidt H., Schmitt O. Effect of aconitine on the sodium permeability of the node of Ranvier.—*Pflüg. Arch. ges. Physiol.*, 1974, 349, p. 133—148.
37. Цинцадзе М. А., Саксон М. Е., Кукушкин Н. И. Аккомодационные свойства сердечных волокон.—*Биофизика*, 1974, 19, с. 505—509.
38. Lieberstein H. On the Hodgkin—Huxley partial differential equation.—*Math. Biosci.*, 1967, 1, p. 45—69.
39. Кринский В. И., Поротиков В. И., Кокос Ю. М., Морнеев О. А., Ровинский А. Б., Филиппов А. К., Храмов Р. Н. Применение метода нуль-изоклин для оценки электрофизиологических характеристик по данным фиксации потенциала.—*В кн.: Биофизика мембран. Каунас*, 1973, с. 384—390.
40. Schmidt H., Stämpfli R. Die Wirkung von Tetraäthylammoniumchlorid auf den einzelnen Ranvier-Shen Schnürring.—*Pflüg. Arch. ges. Physiol.*, 1966, 287, p. 311—325.
41. Deck K. A., Trautwein W. Ionic currents in cardiac excitation.—*Pflüg. Arch. ges. Physiol.*, 1964, 280, 63—80.
42. Narahashi I., Hoas H. DDT: Interaction with nerve membrane conductance changes.—*Science*, 1967, 157, N 3795, p. 1438—1441.
43. Hille B. The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion.—*J. Gen. Physiol.*, 1967, 50, p. 1287—1302.
44. Ochi R. The slow inward current and the action of manganese ions in guinea-pigs myocardium.—*Pflüg. Arch. ges. Physiol.*, 1970, 316, p. 81—94.
45. Кринский В. И., Перцов А. М., Кокос Ю. М., Кузьминич С. Б. Анализ электрофизиологических характеристик мембран трабекулы предсердия лягушки по ионным токам при фиксации потенциала методом нуль-изоклин.—*Биофизика*, 1977, 22, с. 102—107.
46. Перцов А. М., Шаповалова Л. М., Щеглова Е. П. Поведение мембраны трабекулы предсердия лягушки при длительном действии внешнего тока.—*Биофизика*, 1977, 22, с. 294—299.
47. Храмов Р. Н. Исследование уравнений мембраны перехвата Ранвье с помощью метода малого параметра. Материалы конференции «Математическая теория биологических процессов». Калининград, 1976, с. 430—431.

Часть 3

1. Кринский В. И., Холопов А. В. Явление эха в возбудимой ткани.— *Биофизика*, 1967, 12, с. 524—528.
2. Wiener N., Rosenblueth A. The mathematical formulation of the problem of conduction of impulses in a network connected excitable elements, specifically in cardiac muscle.— *Arch. Inst. Cardiol. Mex.*, 1946, 16, p. 205—265.
3. Балаховский И. С. Некоторые режимы движения возбуждения в идеальной возбудимой ткани.— *Биофизика*, 1965, 10, с. 1063—1067.
4. Кринский В. И. Распространение возбуждения в неоднородной среде (режимы, аналогичные фибрилляции сердца).— *Биофизика*, 1966, 11, 676—683.
5. Жаботинский А. М., Заикин А. Н. Пространственные эффекты в автоколебательной химической системе.— В кн.: Колебательные процессы в биологических и химических системах, т. 2. Пушинский науч. центр, 1971, с. 279—283.
6. Zaikin A. N., Zhabotinsky A. M. Concentration wave propagation in two-dimensional liquid-phase self-oscillating system.— *Nature*, 1970, 225, p. 535—537.
7. Жаботинский А. М., Заикин А. Н. О механизме возникновения ведущих центров.— В кн.: Колебательные процессы в биологических и химических системах, т. 2. Пушинский науч. центр, 1971, с. 288—291.
8. Островский Л. А., Яхно В. Г. Формирование импульсов в возбудимой среде.— *Биофизика*, 1975, 20, с. 489—493.
9. Клочков Б. Н., Островский Л. А., Яхно В. Г. Характерные параметры процессов реверберации в волокнах Пуркинье.— В кн.: Математическое моделирование биологических систем. Калининград, 1976.
10. Casten R. G., Cohen H., Lagerstrom P. A. Perturbation analysis of an approximation to the Hodgkin-Huxley theory.— *Quart. Appl. Math.*, 1975, 32, p. 365—402.
11. Mines G. P. On dynamic equilibrium of the heart.— *J. Physiol.*, 1913, 46, p. 349—383.
12. Garrey W. E. The nature of fibrillary contraction of the heart.— *Amer. J. Physiol.*, 1914, 33, p. 397—414.
13. Moe G. K., Reinboldt W. C., Abildskow S. A. A computer model of atrial fibrillation.— *Amer. Heart J.*, 1964, 67, p. 200—220.
14. West Th. C., Landa J. F. Minimal mass required for induction of a sustained arrhythmia in isolated atrial segments.— *Amer. J. Physiol.*, 1962, 202, p. 232—236.
15. Watanabe Y., Dreifus L. S. Newer concepts in the genesis of cardiac arrhythmias.— *Amer. Heart J.*, 1969, 76, p. 114—135.
16. Moe G. K., Mendez C. Basis of pharmacotherapy of cardiac arrhythmias.— *Modern concepts of cardiovascular disease*, 1962, 31, p. 739—749.
17. Vaughan Williams E. M. Classification of antiarrhythmic drugs.— In: *Symposium on Cardiac Arrhythmias*. AB Astra, Soder talje, Sweden, 1970, p. 449—472.
18. Vaughan Williams E. M. Classification of antidysrhythmic drugs.— *Pharmac. and Therap.*, 1975, 1, p. 1—24.
19. Hoffman B. F., Bigger J. T. Antiarrhythmic drugs.— In: *Drugs Pharmacology in Medicine*, ed. 4. I. R. Du Plasma (Ed.). N. Y., McGraw Hill, 1971, p. 824—852.
20. Кринский В. И. Фибрилляция в возбудимых средах.— *Проблемы кибернетики*, 1968, № 20, с. 59—80.
21. Krinsky V. I. Mathematical mo-

- dels of cardiac arrhythmias (spiral waves). In: International Encyclopedia of Pharmacology. Pergamon Press. London, 1977.
22. Беркинблит М. Б. Периодическое блокирование импульсов в возбудимых тканях.— В сб.: Модели структурно-функциональной организации некоторых биологических систем, 1966, с. 131—158.
23. Winfree A. T. Spiral waves of chemical activity.— Sci., 1972, 175, p. 634—636.
24. Winfree A. T. Scroll-shaped waves of chemical activity in three dimensions.— Science, 1973, 181, p. 937—939.
25. Шербунов А. И., Кукушкин Н. И., Саксон М. Е. Ревербератор в системе взаимосвязанных волокон, описываемых уравнением Нобла.— Биофизика, 1973, 18, с. 519—525.
26. Гулько Ф. Б., Петров А. А. Механизм образования замкнутых путей проведения в возбудимых средах.— Биофизика, 1972, 17, с. 261—270.
27. Маркин В. С., Чизмаджев Ю. А. Свойства многокомпонентной возбудимой среды.— Биофизика, 1971, 16, с. 119—127.
28. Winfree A. T. Rotating solutions to reaction-diffusion equations in simply-connected medium.— SIAM-AMS Proc., 1974, 8, p. 13—31.
29. Саксон М. Е., Кукушкин Н. И., Букаускас Ф. Ф. Ретроградное возбуждение в миокарде и его роль в генезе аритмий уязвимой фазы сердечного цикла. 1971. Деп. № 4274-72.
30. Brooks G. M., Hoffmann B. F., Suckling K. E., Ortas E. Excitability of the heart. Grune and Stratton. N. Y., 1955.
31. Rosenbluth A. Ventricular Echoes.— Amer. J. Physiol., 1958, 195, p. 53—60.
32. Кринский В. И., Фомин С. Ф., Холопов А. В. О критической массе при фибрилляции.— Биофизика, 1967, 12, с. 908—914.
33. Noble D. A modification of the Hodgkin—Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pace-maker potential.— J. Physiol., 1962, 160, p. 317—352.
34. Burn J., Williams E. V., Walker J. The production of block and auricular fibrillation in the heart—lung preparation by inhibitors of cholinesterase.— Brit. Heart J., 1955, 17, p. 431—447.
35. Wit A. L., Cranefield P. F., Hoffman B. F. Slow conduction and reentry in the ventricular conducting system. Circ. Res., 1972, 30, p. 11—22.
36. Букаускас Ф. Ф., Саксон М. Е., Кукушкин Н. И. В кн.: Электрическая стимуляция сердца. Каунас, 1972, с. 172.
37. Решетилов А. Н. Возникновение эктопического фокуса (эхо) в модели сердечных клеток.— Биофизика, 1974, 19, с. 499—504.
38. Winfree A. T. Wavelike activity in biological and chemical media.— In Lecture Notes in Biomathematics, v. 2. Berlin, Springer, 1975, p. 241—260.
39. Zhabotinsky A. M., Zaikin A. N. Autowave processes in a distributed chemical system.— J. Theor., 1973, 40, p. 45—61.
40. Яхно В. Г. Об одной модели ведущего центра.— Биофизика, 1975, 20, с. 669—674.
41. Решетилов А. Н., Перцов А. М., Кринский В. И. Явление уязвимости. Анализ на 2-х математических моделях.— Биофизика, 1977, 22, с. 1024—1028.
42. Allesie M., Bonke F., Schopman F. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. — Circ. Res., 1973, 33, p. 54—52.
43. Allesie M., Bonke F., Schopman F. Clinical Res., 1976, 39, p. 168—177.
44. Розенштраух Л. В., Холопов А. В. Количество источников возбуждения, их рождение и гибель при фибрилляции предсердий.— Биофизика, 1971, 16, с. 111—118.
45. Розенштраух Л. В., Холопов А. В.,

- Юшманова А. В. Биофизика, 1970, 15, с. 690—699.
46. Кринский В. И., Кокос Ю. М. Анализ уравнений возбудимых мембран. III. Мембрана волокна Пуркинье. Сведение уравнений Нобла к системе второго порядка и анализ автоматии по нуль-изоклинам.— Биофизика, 1973, 18, с. 1067—1073.
47. Szekeres L., Papp G. J. Experimental cardiac arrhythmias and antiarrhythmic drugs. Budapest, 1971.
48. Гельфанд И. М., Цетлин М. Л. О континуальных моделях управляющих систем.— ДАН СССР, 1960, 131, с. 1242—1245.
49. Романовский Ю. М., Чернавский Д. С. О взаимной синхронизации автоколебательных реакций, протекающих во многих объемах, связанных диффузией.— В кн.: Колебательные процессы в биологических и химических системах, т. 2. Пушинский науч. центр, 1971, с. 296—299.
50. Беркинблит М. Б., Калинин Д. И., Ковалев С. А., Чайлазян Л. М. Изучение на модели Нобла синхронизации спонтанно активных миокардиальных клеток, связанных высокопроницаемым контактом.— Биофизика, 1975, 20, с. 121—125.
51. Кринский В. И., Крейцер Г. П., Перцов А. М., Кукушкин Н. И., Сергеев Ю. В. Исследование антиаритмических воздействий на модели возбудимой среды.— В кн.: Модели структурно-функциональной организации биологических систем. Москва—Дубна, 1972, с. 70—78.
52. Саксон М. Е., Кукушкин Н. И., Букаускас Ф. Ф. Ретроградное возбуждение в миокарде и его роль в генезе аритмий уязвимого периода.— Биофизика, 1972, 17, с. 856—861.
53. Кринский В. И. Нестационарная скорость распространения импульса, латентность и их связь с фибрилляцией.— Биофизика, 1971, 16, с. 87—94.
54. Перцов А. М., Кринский В. И. Проведение в электрически связанных клетках: мембранный механизм латентности и сердечные аритмии.— Биофизика, 1973, 18, с. 688—693.
55. Кринский В. И., Кукушкин Н. И., Саксон М. Е. Предсказание уязвимости по измерениям латентности и длительности экстрасистолического ответа.— В кн.: Ритм сердца в норме и патологии. Вильнюс, 1970, с. 350—358.
56. Кринский В. И., Кукушкин Н. И., Саксон М. Е. Уменьшение латентности как критерий эффективности антиаритмических средств.— Биофизика, 1971, 16, с. 488—493.
57. Кукушкин Н. И., Саксон М. Е. Предсказание аритмии в миокарде лягушки.— Биофизика, 1971, 16, с. 904—910.
58. Кукушкин Н. И., Саксон М. Е., Букаускас Ф. Ф. Соотношение мембранных и системных параметров в генезе уязвимости миокарда. Биофизика мембран, ч. 1. Материалы симпозиума. Каунас, 1971, с. 518—523.
59. Hodgkin A. L., Huxley A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.— J. Physiol. London, 1952, 117, p. 500—544.
60. Mc Allister R. E., Noble D., Tsien R. W. Reconstruction of the electrical activity of cardiac Purkinje fibres.— J. Physiol., 1975, 251, p. 1—50.
61. Bessieu A. Analyse, selon le modele de Hodgkin—Huxley, des conductances membranaires du myocarde de grenouille.— J. Physiol. Paris. 1972, 64, p. 647—670.
62. Zeeman E. C. Differential equations for the heartbeat and nerve impulse.— In: Towards a Theoretical Biology, p. 48—67. Edinburg Univ. Press, 1972.
63. Fitz Hugh R. Impulses and physiological states in theoretical models of nerve membrane.—

- Biophys. J., 1961, 1, p. 445—466.
64. *Fitz Hugh R.* Thresholds and plateaus in the Hodgkin-Huxley nerve equations.— J. Gen. Physiol., 1960, 43, p. 867—896.
 65. *Fitz Hugh R.* Motion picture of nerve impulse propagation using computer animation.— J. Appl. Physiol., 1968, 25, p. 628—630.
 66. *Кокос Ю. М., Кринский В. И., Мориев О. А.* Анализ уравнений возбудимых мембран. IV. Применение метода нуль-изоклин для анализа мембраны волокна Пуркинье.— Биофизика, 1974, 19, p. 493—498.
 67. *Kinsky V. I., Porotcov V. I.* Method for analysis of drugs action on muscle and nerve membrane from voltage clamp data (null-clines method).—Studia biophysica, 1973, 39, p. 69—80.
 68. *Кринский В. И., Фомин С. В., Холопов А. В.* О критической массе при фибрилляции.— Биофизика, 1967, 12, с. 908—914.
 69. *Scott A. C.* Electrophysics of a nerve fiber.— Rev. Mod. Phys., 1975, 47, p. 486—533.
 70. *Van der Pol.* On relaxation oscillation.— Philos. Mag., 1926, 7, p. 928—992.
 71. *Андронов А. А., Леонтович Е. А., Гордон И. И., Майер А. Г.* Качественная теория динамических систем второго порядка. М., «Наука», 1966.
 72. *Андронов А. А., Витт А. А., Хайкин С. Э.* Теория колебаний. М., Физматгиз, 1959.
 73. *Андронов А. А., Леонтович Е. А., Гордон И. И., Майер А. Г.* Теория бифуркаций динамических систем на плоскости. М., «Наука», 1967.
 74. *Ильинова Т. М., Хохлов П. В.* К волновым процессам в линиях с нелинейным сопротивлением.— Радиотехника и электроника. 1963, 8, с. 2006—2015.
 75. *Nagumo J., Yoshizawa S., Arimoto S.* Bistable transmission lines.— IEEE Trans. Commun. Technol., 1965, 12, p. 400—420.
 76. *Nagumo J., Arimoto S., Yoshizawa S.* An active pulse transmission line simulating nerve axon.— Proc. IRE, 1962, 50, p. 2061—2070.
 77. *Rinzel J.* Spatial stability of traveling wave solutions of a nerve conduction equation.— Biophys. J., 1975, 15, p. 975—988.
 78. *Тасаки И.* Проведение нервного импульса. М., ИЛ, 1957.
 79. *Щербунов А. И., Кринский В. И., Перцов А. М.* Ведущий центр в одномерной возбудимой среде.— В кн.: Модели структурно-функциональной организации биологических систем. М., 1972, с. 95—100.
 80. *Решетиллов А. Н.* Десинхронизация сокращений сердечной мышцы. Канд. дис. Пушкино, 1974.
 81. *Кринский В. И., Перцов А. М., Решетиллов А. Н.* Исследование одного механизма возникновения эктопического очага возбуждения на модифицированных уравнениях Ходжкина — Хаксли.— Биофизика, 1972, 17, с. 271—277.

Часть 4

1. *Вайнштейн Б. К.* Трехмерная электронная микроскопия биологических макромолекул.— УФН, 1973, 109, с. 455—460.
2. *Иваницкий Г. Р., Куниский А. С.* Исследование микроструктуры объектов методами когерентной оптики. М., Энергия, 1974.
3. *Мизель К.* Основы теории микроскопа. М., Гостехиздат, 1955.
4. *Laue M. V.* Materiewellen und ihre Interferenzen. Leipzig, 1948.
5. *Bragg W. L.* The structure of some crystals as indicated by their diffraction of X-rays.— Roy. Soc. Proc., A, 1913, 89, p. 248—277.

6. De Roster D. T., Klug A. Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs. — *Nature*, 1968, 217, p. 130—132.
7. Вайнштейн Б. К. Дифракция рентгеновых лучей на цепных молекулах. М., Изд-во АН СССР, 1963.
8. Вайнштейн Б. К. Синтез проектирующих функций. — ДАН СССР, 1971, 196, с. 1072—1076.
9. Вайнштейн Б. К., Михайлов А. М. Некоторые свойства синтеза проектирующих функций. — Кристаллография, 1972, 17, с. 258—261.
10. Вайнштейн Б. К., Орлов С. С. К теории восстановления функций по их проекциям. — Кристаллография, 1972, 17, с. 253—256.
11. Ramachandran G. N., Lakshminarayana A. V. Three-dimensional reconstruction from radiographs and electron micrographs: application of convolutions instead of Fourier transforms. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1971, 68, p. 2236—2250.
12. Тихоненко А. С. Ультроструктура вирусов бактерий. М., «Наука», 1968.
13. Гендон Ю. З., Поглазов Б. Ф., Тихоненко Т. И. Нуклеиновые кислоты и белки вирионов. М., «Наука», 1975.
14. Амос L. A., Klug A. Three-dimensional image reconstructions of the contractile tail of T4 bacteriophage. — *J. Mol. Biol.*, 1975, 99, p. 51—73.
15. Единцов И. М., Ивановичий Г. Р., Куниский А. С. Трехмерная реконструкция растянутого отростка бактериофага H-17 *Bacillus mycoides*. — ДАН СССР, 1975, 224, с. 704—707.
16. Единцов И. М., Ивановичий Г. Р., Куниский А. С. Трехмерная реконструкция сокращенного отростка бактериофага H-17 *Bacillus mycoides*. — ДАН СССР, 1976, 228, с. 473—478.
17. Михайлов А. М., Вайнштейн Б. К. Электронно-микроскопическое определение трехмерной структуры растянутого отростка бактериофага T6. — Кристаллография, 1971, 16, с. 505—509.
18. Агол В. И., Атабеков И. Г., Крылов В. Н., Тихоненко Т. И. Молекулярная биология вирусов. М., «Наука», 1971.
19. Moody M. F. Structure of the sheath of bacteriophage T4. — *J. Mol. Biol.*, 1967, 25, p. 167—187.
20. Simon L. D., Anderson T. F. Structure of bacteriophage T4. — *Virology*, 1967, 32, p. 279—282.
21. Kikuchi Y., King J. Assembly of the tail of bacteriophage T4. — *J. Supramolec. Structure*, 1975, 3, p. 24—34.
22. Moody M. F. Sheath of bacteriophage T4. Contraction mechanism deduced from partially contracted sheath. — *J. Mol. Biol.*, 1973, 80, p. 613—635.
23. Heilbrunn L. V. The viscosity of protoplasm. Washington, 1958.
24. Шарон Н. Стенка бактериальной клетки. — В кн.: Молекулы и клетки, вып. 5, М., «Мир», 1970, с. 106—119.
25. Scales D., Sabbadini R., Inesi G. Assembly of protein particles in normal and dystrophic sarcoplasmic membranes. — *Proc. Fifth Intern. Biophys. Congr. Copenhagen*, 1975.
26. Murer H., Berner W., Evers J., Hoffmann N., Kinne R. Solute transfer across renal plasma membrane vesicles. — *Proc. Fifth Intern. Biophys. Congr. Copenhagen*, 1975.
27. Гариев А. М., Куниский А. С., Мячин Е. Т. Синтез голограмм по набору ракурсных некогерентно зафиксированных снимков для целей электронно-микроскопического анализа. — Квантовая электроника, 1975, 2, с. 2303—2308.
28. Pole R. V. Holographic stereograms. — *Appl. Phys. Letts*, 1967, 10, p. 20—225.
29. Mc Crickerd I. T., George N. Stereoscopic image. — *Appl. Phys. Letts*, 1968, 12, p. 10—12.

30. *De Bitetto D. I.* Holographic panoramic stereograms synthesized from white light recordings.— *Appl. Optics*, 1969, 8, p. 1740—1741.
31. *Groh G., Kock M.* 3-D display of X-ray images by means of holography.— *Appl. Optics*, 1970, 9, p. 775—776.
32. *Groh G.* Holographic tomography using a circular synthetic aperture.— *Appl. Optics*, 1971, 10, p. 2549—2550.
33. *Hoder D.* Holographic synthesized scanning electron microscope pictures.— *Appl. Optics*, 1972, 11, p. 2387—2388.
34. *Вангерман Г., Елинцов И. М., Иваицкий Г. Р., Куиский А. С., Райхельт Р., Цыганов М. А.* Интерпретация электронно-микроскопических изображений кристаллических агрегатов лейцинамипептидазы.— *Биофизика*, 1977, 22, № 5.
35. *Carpenter F. H., Harrington K. T.* Intermolecular cross-linking of monomeric proteins and cross-linking of oligomeric proteins as a probe of quaternary structure.— *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, p. 5580—5586.
36. *Damaschun G., Damaschun H., Hanson H., Müller J. J., Pürschel H. V.* Zur Quartärstruktur der Leucinaminopeptidase.— *Studia biophysica*, 1973, 35, N 1, S. 59—60.
37. Автоматический анализ сложных изображений. Под ред. Э. М. Бравермана. М., «Мир», 1969.
38. *Надь Ж.* Цифровая обработка изображений, полученных при дистанционном исследовании природных ресурсов. Распознавание образов при помощи цифровых вычислительных машин. М., «Мир», 1974, с. 92—123.
39. *Иваицкий Г. Р., Литинская Л. Л., Шихматова В. Л.* Автоматический анализ микрообъектов. М., «Энергия», 1967.
40. *Hardy G. H., Landau E.* The lattice points of a circle.— *Proc. Roy. Soc., A*, 1924, 105, p. 244—258.
41. *Hua L. K.* The lattice points in a circle.— *Quart. J. Math.*, 1942, 13, p. 18—29.
42. *Ingham A. E.* On two classical lattice point problems.— *Proc. Cambridge Philos. Soc.*, 1940, 36, p. 131—138.
43. *Kendall D. G.* On the number of lattice points in side a random oval.— *Quart. J. Math.*, 1948, 19, p. 1—26.
44. *Titchmarsh E. C.* The lattice points in a circle.— *Proc. London Math. Soc.*, 1934, 38, p. 96—115.
45. *Розенфельд А.* Распознавание и обработка изображений. М., «Мир», 1972.
46. *Neurath P. W., Gallus G., Selles W. D.* Interactive computer-aided chromosome analysis.— *J. Advancement Med. Instrumentation*, 1970, 4, p. 6—14.
47. *Mendelsohn M. L., Mayall B. H., Prewitt J. M. S.* Approaches to the automation of chromosome analysis.— *Proc. U. C. L. and N.I.H. Conf. Biol. Image Processing. California, U.S.A.*, 1967, p. 117—123.
48. *Mendelsohn M. L., Hungerford D. A., Mayall B. H., Perry B., Conway T., Prewitt J. M. S.* Computer-oriented analysis of human chromosomes II.— *Ann. N. Y., Acad. Sci.*, 1969, 157, p. 376—392.
49. *Mayall B. H., Mendelsohn M. L.* Deoxyribonucleic acid cytophotometry of stained human leukocytes.— *J. Histochem. and Cytochem.*, 1970, 18, N 6, p. 383—407.
50. *Иваицкий Г. Р.* Методы машинного анализа морфологии клеток и срезов ткани. Докт. дис. Пушино, 1970.
51. *Butler I. M., Butler M. K., Stround A.* Automatic classification of chromosomes.— In: *Data acquisition and processing in biology and medicine*. K. Enslein (Ed.). N. Y. Pergamon Press, 1964, 3, p. 261—275.
52. *Ming-Kuel Hu.* Visual pattern

- recognition by moment in variants.— IRE Trans. on Inform. Theor., 1962, 8, p. 179—187.
53. *Neurath P. W., Fale K. A., Bablouzian B. L., Warms T. H., Serbagi R. C.* Human chromosome analysis by computer — an optical pattern recognition problem.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1966, 128, p. 1013—1028.
 54. *Gallus G., Montanaro N., Macca-carro A.* A problem of pattern recognition in the automatic analysis of chromosomes: locating the centromere.— J. Computer and Biomed. Res., 1968, 2, p. 187—197.
 55. *Rutovitz D.* Machines to classify chromosomes?— In: Proceedings of Edinburgh Conference on Human Radiation Cytogenetics. Amsterdam, North Holland, 1967, p. 58—89.
 56. *Aillo M., Albano A., Levi G.* Localization of centromere.— J. Computer and Biomed. Res., 1970, 4, p. 110—112.
 57. *Ledley R. S., Lubs H. A., Ruddle F. H.* Introduction to chromosome analysis.— Comput. Biol. Med., 1972, 2, p. 107—123.
 58. *Ledley R. S.* High-speed automatic analysis of biomedical pictures.— Science, 1964, 146, 216—223.
 59. *Hilditch I., Rutovitz D.* Chromosome recognition.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1969, 157, p. 339—364.
 60. *Иваницкий Г. Р., Гартштейн В. П.* Геометрия живого. М., «Знание», 1971.
 61. *Гиндилис В. М., Иваницкий Г. Р.* Современные проблемы машинного анализа хромосом.— В кн.: Современные проблемы машинного анализа биологических структур. М., «Наука», 1970, с. 40—47.
 62. *Агаджанян Ж. М., Брюшков В. П., Гартштейн В. П., Иваницкий Г. Р.* Автоматическая система для анализа хромосом.— В кн.: Сканирующая техника в исследовании клеточных популяций, клеток, органоидов и макромолекул. Пушкинский науч. центр. 1973, с. 153—168.
 63. *Гартштейн В. П.* Разработка и реализация алгоритмов машинного анализа хромосом. Канд. дис. Пушкино, 1972.
 64. *Сметанич Я. С., Казанович Я. Б., Гартштейн В. П., Кузнецова Л. Г., Гиндилис В. М.* Автоматический анализ плоской фигуры по ее контуру (на примере хромосом).— В кн.: Методы и техника машинного анализа биологических структур. М., «Наука», 1972, с. 5—22.
 65. *Снесарев П. Е.* Неврология. Руководство по неврологии, т. 1. М., Медгиз, 1955.
 66. *Glees P.* Neuroglia, morphology and function. Oxford, 1955.
 67. *Galambos M.* A glia-neuron theory of brain function.— Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 1961, 47, N 1, p. 30—35.
 68. *Hyden H.* Dynamic aspects of the neuron, cilia relationship.— In: The Neuron. H. Hyden (Ed.). Amsterdam, 1967, p. 179—199.
 69. *King J. S.* A light and electron microscopic study of perineuronal cilia cells and processes in the rabbit neocortex.— Anat. Rec., 1968, 161, N 1, p. 111—124.
 70. *Hamberger A., Hyden N.* Inverse enzymatic changes in neurons and cilia during increased function and hypoxia.— J. Cell Biol., 1963, 16, p. 521—525.
 71. *Johnston P. V., Roots B. L.* Nerve membranes. A study of the biological and chemical aspects. Oxford, 1972, p. 1—274.
 72. *Peters A.* The formation and structure of myelin sheaths in the central nervous system.— J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1960, 8, p. 431—446.
 73. *Блинков С. М., Глезер И. И.* Мозг человека в цифрах и таблицах. М.— Л., «Медицина», 1964.
 74. *Rowland L. P., Mettler F. A.* Cell concentration and laminar thickness in the frontal cortex

- of psychotic patients; studies on cortex removed at operation.— J. Compar. Neurol., 1949, 90, p. 255—280.
75. *Castan P.* Les fonctions metabolique de la astroglie cerebrale, element fondamental de la barriera hemato-encephalique.— J. Neurol. Sci., 1968, 6, N 2, p. 237—241.
76. *Gerschenfeld H. M., Wald F., Zadunaisky J. A., De Robertis E. D. P.* Function of astroglia in the water-ion metabolism of the central nervous system.— Neurology, 1959, 9, p. 412—425.
77. *Reinhard L., Friede M. D.* The enzymatic response of astrocytes to varios ions in vitro.— J. Cell. Biol., 1964, 20, p. 5—15.
78. *Александровская М. М.* Изменения нейрово-глиальных соотношений как одна из структурных основ барьерных механизмов центральной нервной системы.— В кн.: Проблемы гистогематических барьеров. М., «Наука», 1965, с. 288—293.
79. *Hild W., Tasaki I.* Morphological and phiriological properties of neurons and glial cells in tissue culture.— J. Neurophysiol., 1962, 25, p. 277—304.
80. *Hyden H.* Recent advances in biological psychiatry. N. Y., 1963.
81. *Robertis E., Hersch M. D., Gerschenfeed M., Wald F.* Cellular mechanism of myelination in the central nervous system.— J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1958, 4, p. 651—656.
82. *Дудаев Н. А.* Корреляция количества глиальных клеток со степенью сосудистого поражения головного мозга человека (машинная методика исследований). Канд. дис. М., 1971.
83. *Иваницкий Г. Р., Дудаев Н. А., Гартштейн В. П.* Оптимизация подготовки препаратов для количественных исследований. Отчет № 2, тема 16-ИБФ-68. Лаборатория машинного анализа биологических структур и процессов, ИБФ АН СССР. Пущино, 1968.
84. Гипертоническая болезнь. Атеросклероз. Инфаркт миокарда. М., Медгиз, 1956.
85. *Мясников А. Л.* Атеросклероз (происхождение, клинические формы, лечение). М., Медгиз, 1960.
86. *Мясников А. Л.* Гипертоническая болезнь и атеросклероз. М., «Медицина», 1965.
87. *Kornyey St.* Distinction between arteriosclerotic and hypertensive changes in the walls of the cerebral vessels.— Acta morphol. Acad. scient hung., 1967, 15, N 2, p. 125—127.
88. *Хайме Ц. Б.* Проблемы клиники и терапии психических заболеваний. М., Госмедиздат, 1949.
89. *Ракальский Ю. Е., Казакова П. Б.* Вопросы клиники и патогенеза психических нарушений при сосудистых заболеваниях головного мозга. М., «Медицина», 1963.
90. *Bondareff W.* Histology of the aging nervous system.— Advances Gerontol. Res., v. 1. New York — London, Acad. Press, 1964.
91. *Бортник С. М., Михайлова-Лукашева В. Д., Бортник Э. М.*, К вопросу о возрастных морфологических изменениях коркового отдела двигательного анализатора.— ДАН БССР, 1966, 10, № 1, с. 65—67.
92. *Цыбуляк Г. Н., Смышной Д. И.* Морфологические изменения в нервной системе при столбняке.— Бюл. эксп. биол. и мед., 1966, 61, № 4, с. 32—36.
93. *Блинков С. М., Дудаев Н. А., Иваницкий Г. Р.* Опыт использования вычислительной техники в количественных морфологических исследованиях мозга. Тезисы докл. III Всесоюз. совещ. по проблемам автоматизации анализа изображений микроструктур. Пущино, 1971, с. 70—71.

94. Блинков С. М., Иваницкий Г. Р. О количестве глиальных клеток в головном мозге человека (подсчеты на вычислительной машине).— Биофизика, 1965, 10, с. 817—825.
95. Жаботинский Ю. М. Нормальная и патологическая морфология нейрона. Л., «Медицина», 1965.
96. Дудаев Н. А., Иваницкий Г. Р. Сканирующая техника в исследованиях морфологии мозга.— В кн.: Сканирующая техника в исследовании клеточных популяций, клеток, органоидов. Пушкинский науч. центр, 1973, с. 40—58.
97. Основы цитогенетики человека. Под ред. А. А. Прокофьевой-Бельговской. М., «Медицина», 1969, с. 40—58.
98. Гиндилис В. М. Принципы идентификации хромосом человека. Канд. дис. М., 1967.
99. Павулоне С. А., Иорданский А. Б., Гиндилис В. М. Сравнительный морфометрический анализ хромосом *Allium sera* L. и *Allium fistulosum* L.— Генетика, 1970, 6, с. 40—55.
100. Sasaki M. Identification of human chromosomes.— Chromosome, 1961, 11, p. 175—190.
101. Ахьяев Е. В., Гартштейн В. П., Гиндилис В. М. К вопросу о принципах количественного анализа карiotипов. Тезисы докл. III Всесоюз. совещ. по проблемам автоматизации анализа изображений микроструктур. Пущино, 1971, с. 67—69.
102. Иорданский А. Б., Кружинь А. Р., Павулоне С. А., Бадаев Н. С., Дерягин Г. В. Влияние дифференциальной спирализации на линейные и относительные параметры хромосом.— ДАН СССР, 1971, 201, № 2, с. 469—472.
103. Казанович Я. В. Метод наименьших квадратов в линейной модели спирализации хромосом.— Биофизика, 1977, (в печати).
104. Rutovitz D., Hilditch I. Normalization of chromosome measurements.— Comput. Biol. Med., 1972, 2, p. 167—179.
105. Low D. A., Selles W. D., Neurath P. W. Bager's theorem applied to chromosome classification.— J. Computers and Biomed. Res., 1970, 4, p. 561—571.
106. Watson J. D., Crick F. H. C. A structure for deoxyribose nucleic acid, general implications of the structure of deoxyribonucleic acid.— Nature, 1953, 171, p. 737—738, 964—967.
107. Nirenberg M. W. The genetic code II.— Scient. Amer., 1963, 208, N 3, p. 80—93.
108. Уотсон И. Д. Молекулярная биология гена М., «Мир», 1967.
109. Holly R. W., Appgar J., Everett G. A., Madison J. T., Marquise M., Merrill S. H., Penswick J. R., Zamir A. Structure of ribonucleic acid.— Science, 1965, 147, p. 1462—1470.
110. Billeter M. A., Dahlberg T. E., Goodman H. M., Hidley T., Weissman C. Sequence of the first 175 nucleotides from the 5'-terminus of Q-RNA synthesized in vitro.— Nature, 1969, 224, p. 1083—1086.
111. Min Jou W., Hegeman G., Fiers W. Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein.— Nature, 1972, 237, p. 82—88.
112. Mills D. R., Cramer F. R., Spetgman S. Complete nucleotide sequence of replicating RNA molecule.— Science, 1973, 180, p. 916—925.
113. Rubin G. M. About nucleotide sequence of DNA.— Eur. J. Biochem., 1974, 41, p. 197—201.
114. Ehressman C., Stiegler P., MacKic R. A., Zimmerman R. A., Ebel J. P., Fellner P. Structure of DNA.— Nucleic. Acids Res., 1975, 2, p. 265—278.

115. *Holley R. W., Madison J. T., Zanir A.* A new method for sequence determination of large oligonucleotides.— *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1964, 17, 389—394.
116. *Sanger F., Brownlee G. G., Barrell B. G.* A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides.— *J. Mol. Biol.*, 1965, 13, p. 373—398.
117. *Sanger F., Coulson A. R.* A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.— *J. Mol. Biol.*, 1975, 94, p. 441—448.
118. *Туманян В. Г., Киселев Л. Л.* О расшифровке последовательности нуклеотидов в транспортных рибонуклеиновых кислотах.— *Биофизика*, 1968, 13, с. 147—153.
119. *Rice W. E., Bock R. M.* The problem of sequence determination in transfer RNA.— *J. Theor. Biol.*, 1963, 4, p. 260—267.
120. *Rosen R.* Determination of sequences in DNA I.— *Bull. Math. Biophys.*, 1959, 21, p. 71—80.
121. *Rosen R.* Determination of sequences in DNA II.— *Bull. Math. Biophys.*, 1959, 21, p. 289—292.
122. *Bernhard S. A., Bradley D. F., Douda W. Z.* Method for sequence determination with computer IBM.— *J. Res. Development*, 1963, 7, p. 246—250.
123. *Rice W. E., Bock R. M.* The problem of sequence determination.— *J. Theor. Biol.*, 1963, 4, p. 300—302.
124. *Merrill C. R., Mosimann J. E., Bradley D. F., Shapiro M. B.* Reconstruction of protein and nucleic acid sequences.— *BBRC*, 1965, 19, p. 255—270.
125. *Dayhoff M. O.* Computer aids to protein sequence determination.— *J. Theor. Biol.*, 1964, 8, p. 97—112.
126. *Mosimann J. E., Shapiro M. B., Merrill C. R., Bradley D. F., Vinton J. E.* Reconstruction of protein and nucleic acid sequence: IV. The algebra of free monoids and the fragmentation stratagem.— *Bull. Math. Biophys.*, 1966, 28, p. 235—260.
127. *Hutshinson G.* Evaluation of polymer sequence fragment data using graph theory.— *Bull. Math. Biophys.*, 1969, 31, N 3, p. 541—562.
128. *Сметанич Я. С.* О восстановлении слов.— *ДАН СССР*, 1971, 201, № 4, с. 798—800.
129. *Полозов Р. В., Сметанич Я. С., Сухорукоев Б. И.* К определению первичной структуры гетерополимеров.— *Биофизика*, 1972, 17, с. 688—695.
130. *Сметанич Я. С.* О восстановлении слов. Труды мат. ин-та АН СССР, 1973, 133, с. 183—202.
131. *Юджан Б. Х., Рашин А. А.* Определение первичной структуры линейных макромолекул. I—IV.— *Биофизика*, 1974, 19, с. 405—409, 613—615, 805—813, 976—982.
132. *Сметанич Я. С., Полозов Р. В.* Об алгоритмах установления первичной структуры биополимеров.— *Bull. Math. Biol.*, 1977 (в печати).
133. *Рашин А. А., Юджан Б. Х., Киселев Л. Л., Маго М. А.* Оптимизация блочного метода определения нуклеотидных последовательностей.— *Биоорг. хим.*, 1977, 3, № 3, с. 356—383.
134. *Юджан Б. Х., Рашин А. А.* Определение первичной структуры линейных макромолекул V. Учет информации о нескольких полных гидролизах.— *Биофизика*, 1977 (в печати).

135. *Berge C.* Theorie des graphes et ses applications. Dunod. Paris, 1958.
136. *Харари Ф.* Теория графов. М., «Мир», 1974.
137. *Курош А. Г.* Курс высшей алгебры. М., Физматгиз, 1963.
138. *Barrel B. G., Glork B. F. C.* Handbook of nucleic acid sequences. England, Toynson—Bruwers, 1974.
139. *Басакер Р., Саати Т.* Конечные графы и сети. М., «Наука», 1974.
140. *Adams M. J., Jeppesen P. G., Sanger F., Barrell B. G.* Nucleotide sequence from the coat protein cistron of R 17 bacteriophage.— *Nature*, 1969, 223, p. 1009—1014.
141. *Brownlee G. G., Sanger F., Barrell B. G.* The sequence of 5 S ribosomal ribonucleic acid.— *J. Mol. Biol.*, 1968, 34, p. 379—412.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Автокатализ в энергетическом метаболизме 85
Автоколебания 49, 106, 108
— в гликолизе 78
— в энергетическом метаболизме 100
Авторегуляция 20
Аденилаткиназная (КФ 2.7.4.3) реакция 90
Адреналин 194
Аккомодация 113, 118
Аконитин 115
Аконитиновые потенциалы действия 115
Активаторы ферментов 19
Активный (каталитический) центр фермента 16
Аллостерическая
— регуляция 41, 83, 92, 97
— функция 34
Аллостерические
— модификаторы 20
— ферменты 20
Аллостерический (регуляторный) центр фермента 20
Анодно-размыкательное возбуждение 119
Антиаритмические вещества
— — индерал 195
— — прокаинамид 195
— — скрининг 200
— — хинидин 196
— — этmozин 195
«Антитермодинамическое» действие олигомерных ферментов 43
Аппаратная функция системы 204
Аритмогенные вещества 194
Аспаратаминотрансфераза (КФ 2.6.1.1.) 19
Ацетил-КоА-синтетаза (КФ 6.2.1.1), регуляция 93, 98
Ацетилхолин 194, 195
Ацил-КоА-синтетазы (КФ 6.2.1.2, 6.2.1.3), регуляция 93, 98
Бактериофаг 216
Бесконечность фазовой плоскости 49
Бинарное изображение 242
Бифуркационные значения параметров 49
Быстрое движение 48
Виньетирование 204
Возбудимая среда
— — винеровская 143
— — гетерогенная (неоднородная) 146, 150
— — гомогенная (однородная) 141
— — свойства 141, 145
Волна возбуждения, условия реентри 198
Временная организация клетки 4
Входная характеристика
— — инициаторной ступени 87, 88
— — открытой реакции 51, 60
Вырожденная модель 51
Выходная характеристика энергетического метаболизма 86, 87
Вязкость цитоплазмы 226
Гамильтонов
— путь 270
— цикл 270
Гистерезис
— входной характеристики 51
— — — реакции 51, 60
— — — энергетического метаболизма 88
— выходной характеристики реакции 51, 53
— нагрузочной характеристики энергетического метаболизма 90, 97
— нуль-изоклины 52

- Главные изоклины 47
 Гликолиз 78, 83, 85
 Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.12) 78
 Глутаматдегидрогеназа (КФ 1.4.1.3), регуляция 42
 Голограмма 207
 Гониометр 231
 Граница объекта 241
 Граф биохимической реакции 22
 Граф ориентированный
 — — молекулы 272
 — — реакции 22
 — — фрагментов полимера 272

 Дельта-функция 204
 Денситометр 220
 Дифрактометр 218
 Длина волны 206

 Задача восстановления слов 268

 Изоклины 47, 110
 Изопланатическая оптическая система 203
 Изоэнтальпические модификаторы 20
 Изопитратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.41), регуляция 96
 Ингибиторы ферментов 19
 Интеграл свертки 213
 Ионные токи мембраны 122

 Карбомилфосфат трансфераза (КФ 2.1.3.3), регуляция 43
 Кариотипирование 261
 Качественные методы анализа 46
 Квазистационарная
 — входная характеристика 51, 60
 — выходная характеристика 51, 53, 66
 — концентрация 21
 — скорость 24
 Квазистационарное состояние
 — — в модели второго порядка 48
 — — в ферментативной реакции 21

 Квантование (дискретизация) изображения 239
 α -Кетоглутаратдегидрогеназа (КФ 1.2.4.2), регуляция 96
 Кинетическая модель 16, 85
 Клетки
 — глиальные 255
 — нейроны 255
 Клеточные часы 100
 Константа
 — Михаэлиса 17, 26, 28
 — Михаэлиса, кажущаяся 26
 — субстратного угнетения 18, 27
 Контрастирование 202
 Контур объекта 241
 Конформационные изменения ферментов 19, 30
 Конформация фермента 19, 31, 232
 Кривизна
 — контура 251
 — мембраны 230
 Ксантиноксидаза (КФ 1.2.3.2), субстратное угнетение 19

 Латентность 185, 189
 Лейцинаминопептидаза 233
 Линейное приближение 48
 Линейность оптических систем 203
 Линия
 — кратности корней характеристического уравнения 50, 55
 — моностационарности 50, 55
 — нейтральности 50, 55

 Математическая модель
 — — мембран 103, 105, 139
 — — спиральных волн 141
 — — уязвимости 172
 — — фибрилляции 178
 Математическая модель второго порядка
 — — — — исследование в линейном приближении 48
 — — — — методы качественного анализа 46
 — — — — нуль-изоклины 47

- — — — параметрический портрет 50
- — — — релаксационная 47
- — — — стационарная (особая) точка 47
- — — — фазовый портрет 47
- Медленное движение 48
- Метод
- Боденштейна — Семенова (метод квазистационарных концентраций) 21
- графов 21
- малого параметра 21, 48
- Микрореентри, условия 197
- Минорные нуклеотиды 267
- Многоцентровые ферменты 20
- Множественность
- динамических режимов 68
- стационарных состояний 50, 68
- Модель
- Дельбрюка 78
- Коппленда 31
- Лотки 96
- Михаэлиса — Ментен 17
- Моно — Уаймена — Шанжэ 30, 38
- Нобла 103
- Павлидиса — Козмена 96
- Спэнглера — Снелла 78
- Франкенхойзера 139
- Фридена — Курганова 31, 36
- Хиггинса 96
- Ходжкина — Хаксли 105
- Модель открытой реакции
- — — $S_1 \xrightarrow{E} S_2$ с продуктивной активацией 74
- — — $S_1 + S_2 \xrightarrow{E} S'_1 + S'_2$ с субстратным угнетением 59, 73, 75
- — — $S_1 \xrightleftharpoons{E(R,T)} S_2$, катализируемой олигомером E (R, T) 64
- — — $S_1 + S_2 \xrightarrow{E(R,T)} S'_1 + S'_2$ с субстратным угнетением 67
- — — $S_1 \xrightleftharpoons{E} S_2$ с субстратным угнетением 52, 66
- Модификаторы ферментов 19
- Нагрузочная характеристика энергетического метаболизма 88, 91, 92
- Негрубая (вырожденная) стационарная точка 49
- Нестационарные режимы в открытых реакциях 46, 52, 59, 64, 68, 78
- Нуль-изоκлины 47, 110, 112, 116, 124, 126, 132, 133, 136, 139
- Одноцентровый фермент 20, 25
- Окислительное фосфорилирование 85
- Олигомерный фермент 31
- Организация
- временная 4
- на основе специфичности 80
- пространственная 4
- Особая (стационарная) точка 47
- Параметрический портрет
- — математической модели 50
- — открытой реакции 56, 57, 61, 67
- Первичная структура
- — нуклеиновых кислот 266
- — полиферментной системы 80
- Пируваткарбоксилаза (КФ 6.4.1.1), регуляция 93, 98
- Пируваткиназа (КФ 2.7.1.40), регуляция 78, 96
- Плечи хромосомы, центромера 254
- Повторные ответы 127
- Полиферментная система 77
- Потенциал действия 107
- Предельный переход 51
- Предельный цикл
- — неустойчивый 49
- — устойчивый 49, 58
- Представляющая точка 47
- Преобразование Пуанкаре 49
- Преобразование Фурье
- — обратное 205
- — прямое 204
- Продленные потенциалы действия 132
- Продуктивная активация ферментов 40, 41, 44, 78

- Пространственные частоты 206
 Пространство
 — обратное 207
 — реальное (действительное) 206
 Распространение волн
 — — нестационарное 197
 — — стационарное 197
 Ревербератор
 — в двумерной среде 150, 152, 154
 — визуально наблюдаемый 152
 — в модели Нобла 152
 — внутренняя зона 154
 — возникновение в неоднородной среде 150
 — возникновение в однородной среде 155
 — в трехмерной среде 152
 — размер, минимальный размер 156
 — размножение 178
 — распад, продолжительность цикла 155
 Регуляторная функция 33, 93, 95, 96, 98, 99
 Регуляторные ферменты 20, 30
 Регуляция генов 79
 Регуляция ферментов
 — — аллостерическая 20
 — — изостерическая 20, 40, 41
 Реентри (см. ревербератор)
 — математические модели 144
 — условия 197
 Реология клеточных мембран 226
 Рибонуклеаза
 — панкреатическая 267
 — T1 267
 Седло 48
 Сигмоидальная кинетическая кривая 38, 40
 Системный эффект 78
 Сканирующий микроскоп
 — — оптический 238
 — — электронный 228
 Скачкообразная деполяризация 113
 Скорость
 — .Деполяризация, максимальная $E_{\max}$ 198
 — минимальная 199
 — неустойчивая 199
 — размножения источников волн 178
 — распространения волн 195
 Сложный фокус 49
 Состав второго ранга 273
 Спектр — изображения (частотная характеристика изображения) 204
 — объекта (частотная характеристика объекта) 205
 Спирализация
 — первичной структуры полиферментной системы 81
 — хромосом, набор 262
 Спиральные волны (см. ревербератор)
 Стационарная (особая) точка 47
 Стехиометрическая
 — структура 81
 — эффективность энергетического метаболизма 86
 Субстратное угнетение
 — — открытой ферментативной реакции 52, 59, 65, 78
 — — ферментов 18, 27, 30, 39, 43, 52, 78
 ТЕА (тетраэтиламмоний) 133
 Теорема А. Н. Тихонова 51, 104, 106
 Третичная структура полиферментной системы 83
 Триггер биохимический 71, 78,
 Триггерные свойства
 — — мембран 113
 — — ферментативных реакций 71, 78
 Угнетение конечным продуктом 20
 Узел 48
 Уравнение скорости реакции
 — — — $S_1 \xrightarrow{E} S_2$ 17
 — — — $S_1 \xrightleftharpoons{E} S_2$ 26
 — — — $S_1 \xrightleftharpoons{E} S_2$ с субстратным угнетением 27

- — — $S_1 \xrightleftharpoons{E(R,T)} S_2$ 35, 37
- — — $S_1 + S_2 \xrightarrow{E} S_3 + S_4$ с упорядоченным присоединением субстратов 28, 29
- — — $S_1 + S_2 \xrightarrow{E} S'_1 + S'_2$ с субстратным угнетением 30
- — — $S_1 + S_2 \xrightleftharpoons{E(R,T)} S_3 + S_4$ 45
- — — $\Sigma S_i \xrightleftharpoons{E(R,T)} \Sigma S_j$, $E(R, T)$ олигомер, подверженный переходам $R_0 \rightleftharpoons T_0$ 34
- — — $\Sigma S_i \xrightleftharpoons{E(R,T)} \Sigma S_j$, $E(R, T)$ тетрамер, обратимо диссоциирующий на два димера $R_0 \rightleftharpoons 2T_0$ 37
- Уравнения возбудимой мембраны
- — — Зимана 105
- — — Нобла 2-го порядка (N_2) 104
- — — Нобла 4-го порядка (N_4) 103
- — — построение по записям ионных токов 123
- — Франкенхойзера 139
- — — Ходжкина — Хаксли 2-го порядка ($H - H_2$) 105
- — — Ходжкина — Хаксли 4-го порядка ($H - H_4$) 105
- Устойчивая деполяризация 111
- Устойчивость стационарных точек 48
- Уязвимость
- возникновение 172
- математические модели 179, 180
- Фазовый портрет математической модели 47
- Фазовый портрет, нуль-изоклины уравнений
- — — мембран, построенных по вольт-амперным кривым 129, 130
- — — — Нобла 109, 110
- — — — Ходжкина — Хаксли ($H - H_2$) 108, 110
- Фермент-субстратный комплекс 16
- Фибрилляция
- критическая масса 184
- математические модели 178
- параметры, ее контролирующие 179
- условия возникновения 178
- Фокус 48
- Фокусные величины 49
- Фосфофруктокиназа (КФ 2.7.1.11), регуляция 52, 78, 93, 98, 100
- Фруктозо-1,6-бисфосфатаза (КФ 3.1.3.11), регуляция 100
- Функция
- отношения 32, 36
- скорости 33
- Футильные субстратные циклы 99, 100
- Характеристическое уравнение 48
- Центр 49
- Цикл без контакта 49
- Цитратсинтетаза (КФ 4.1.3.7), регуляция 96
- Частотная характеристика
- — изображения (спектр изображения) 204
- — объекта (спектр объекта) 205
- Эйлеров
- путь 271
- цикл 271
- Эквивалентные модели реакций 73
- Энергетический метаболизм
- — аллостерическая регуляция 92, 97
- — вторичная структура 81
- — входная характеристика инициаторной ступени 87, 88
- — первичная структура 80
- — стехиометрическая модель 85
- — третичная структура 83
- Эффект депонирования 76
- Эхо (ведущий центр) 160
- Ядро реакций 81

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОТ АВТОРОВ	3
ВВЕДЕНИЕ	4

1 * МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Глава первая

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ НЕПРОТОЧНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

1.1. Два направления в моделировании ферментативных реакций	14
1.2. Ферменты — белковые катализаторы и регуляторы	16
1.3. Метод графов	21
1.4. Модели реакций, катализируемых одноцентровыми ферментами	25
1.5. Модели реакций, катализируемые олигомерными ферментами	30
1.6. Свойства реакции $S_1 \xrightleftharpoons{E(R, T)} S_2$	37
1.7. Свойства двухсубстратной реакции $S_1 + S_2 \xrightleftharpoons{E(R, T)} S_3 + S_4$	44

Глава вторая

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОТОЧНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

2.1. Общие методы исследования системы обыкновенных дифференциальных уравнений второго порядка	46
2.2. Модель открытой реакции $S_1 \xrightleftharpoons{E} S_2$ с субстратным угнетением	52
2.3. Модель двухсубстратной реакции с субстратным угнетением	59
2.4. Динамика открытых реакций, катализируемых олигомерными ферментами	64
2.5. Разнообразие поведения открытых ферментативных реакций	68
2.6. Эквивалентные математические и кинетические модели	73
2.7. Эффект депонирования	76

Глава третья

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОЛИФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ

3.1. Полиферментные системы и их модели	77
3.2. Уровни функциональной организации полиферментных систем	79
3.3. Простая модель стехиометрической структуры энергетического метаболизма	85
3.4. Два класса аллостерических регуляторных связей, контролирующих энергетический метаболизм	92

2 * МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ВОЗБУДИМЫХ МЕМБРАН

Глава четвертая

КАЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ МОДЕЛЕЙ МЕМБРАН

4.1. Построение уравнений второго порядка для моделей Ходжкина — Хаксли и Нобла. Точность аппроксимации.....	102
4.2. Фазовые портреты систем второго порядка.....	103
4.3. Исследование основных режимов мембраны аксона кальмара с помощью качественных методов	108
4.4. Исследование основных режимов мембраны волокна Пуркинье сердца с помощью качественных методов.....	109
4.5. Математические детали асимптотического сведения уравнений Ходжкина — Хаксли к системе второго порядка $N - N_2$	115
	119

Глава пятая

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА, ИОННЫЕ ТОКИ И ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕМБРАН

5.1. Построение фазового портрета мембраны по записям ионных токов при фиксации потенциала	122
5.2. Техника анализа мембран по записям ионных токов.....	123
5.3. Фазовые портреты мембран сердечной, нервной и мышечной клеток	125
5.4. Анализ действия веществ на мембраны	129
5.5. Предсказание электрофизиологических эффектов с помощью качественных методов	131
5.6. Границы применимости анализа мембран по фазовому портрету	134
5.7. Оценка на математических моделях мембран точности построения фазового портрета по записям ионных токов.....	137
	138

3 * ВОЗБУДИМЫЕ СРЕДЫ. ВОЛНЫ И АВТОВОЛНОВЫЕ ПРОЦЕССЫ

Глава шестая

РЕВЕРБЕРАТОР — ИСТОЧНИК СПИРАЛЬНЫХ ВОЛН В ВОЗБУДИМЫХ СРЕДАХ

6.1. Автоволновые процессы в возбудимых средах	141
6.2. Распространение волн в однородной среде. Спиральная волна, вращающаяся вокруг отверстия, и ревербератор	141
6.3. Возникновение ревербератора в простейшей неоднородной среде	144
6.4. Ревербератор в более детальных моделях.....	147
6.5. Свойства ревербератора как источника волн. Размножение ревербераторов в неоднородной среде Время жизни	152
6.6. Ревербератор и сердечные аритмии. Уязвимость сердечной ткани	157

Глава седьмая

**ЭХО — ИСТОЧНИК КОНЦЕНТРИЧЕСКИХ ВОЛН
В ВОЗБУДИМЫХ СРЕДАХ** 160

- | | |
|--|-----|
| 7.1. Эхо в простейших моделях. Источник эха и ревербератор | 161 |
| 7.2. Источник эха в моделях, описываемых обыкновенными дифференциальными уравнениями | 166 |
| 7.3. Эхо в непрерывных возбудимых средах | 169 |
| 7.4. Эхо в модели клеток сердца. Уязвимость | 172 |

Глава восьмая

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИСТОЧНИКОВ ВОЛН
АВТОВОЛНОВЫЕ ПРОЦЕССЫ И СЕРДЕЧНЫЕ АРИТМИИ** 175

- | | |
|---|-----|
| 8.1. Фибрилляция сердечной мышцы | 175 |
| 8.2. Синхронизация при взаимодействии источников волн | 177 |
| 8.3. Размножение ревербераторов и фибрилляция | 178 |
| 8.4. Взаимодействие источников эха | 181 |
| 8.5. Связь параметров возбудимых сред с характеристиками дифференциального уравнения мембраны | 185 |
| 8.6. Стационарные и нестационарные режимы распространения | 190 |
| 8.7. Результаты микроэлектродного исследования уязвимости | 194 |
| 8.8. О параметрах, контролирующих уязвимость в математических моделях и в миокарде | 196 |
| 8.9. Следствия из моделей для антиаритмических веществ | 198 |

**4 * ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР**

Глава девятая

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ОБЪЕМНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР.
ВИРУСЫ, ФЕРМЕНТЫ** 202

- | | |
|--|-----|
| 9.1. Процесс формирования изображений | 202 |
| 9.2. Математические основы объемной реконструкции | 207 |
| 9.3. Модель трехмерной структуры отростка бактериофага | 216 |
| 9.4. Голографический синтез объемного изображения поверхности клеточной мембраны | 226 |
| 9.5. Моделирование структуры биологических макромолекул | 232 |

Глава десятая

**АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР ПО ИХ ИЗОБРАЖЕНИЯМ
ГЛИЯ — СОСУДЫ, ХРОСОМЫ** 238

- | | |
|---|-----|
| 10.1. Преобразование изображений клеток в цифровую форму | 238 |
| 10.2. Определение морфометрических параметров клеток и клеточных структур | 243 |
| 10.3. Исследование глиально-сосудистой системы головного мозга | 255 |
| 10.4. Модель сокращения длины хромосом в митозе | 261 |

Глава одиннадцатая

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЛИНЕЙНОЙ СТРУКТУРЫ
БИОПОЛИМЕРОВ

266

11.1 Анализ первичной последовательности нуклеиновых кислот.....	266
11.2. Математическая постановка проблемы	268
11.3. Восстановление слов по составу второго ранга.....	273
11.4. Метод подстановки при восстановлении слов	274
11.5. Оптимизация биохимического эксперимента.....	277

ЛИТЕРАТУРА.....	280
-----------------	-----

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ.....	304
---------------------------	-----

Генрих Романович Иваницкий
Валентин Израилевич Кринский
Евгений Евгеньевич Сельков

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Утверждено к печати
Институтом биологической физики
Академии наук СССР

Редактор

Л. Б. Каминир

Редактор издательства

Н. А. Потехина

Художник

Л. С. Эрман

Художественный редактор

И. К. Каприлова

Технический редактор

Ю. В. Рылина

Корректор

Н. И. Казарина

ИБ № 7268.

Сдано в набор 12/IX 1977 г. Подпис. к печ. 28/XII 1977 г.

Формат 60×90^{1/16}. Бумага № 1

Гарнитура обыкновенная

Печать высокая

Усл. печ. л. 19,5. Уч.-изд. л. 19,8. Тираж 2600

Т-21639. Тип. зак. 2839

Цена 2 р. 20 к.

Издательство «Наука»

117415, Москва, В-415, Профсоюзная ул., 94а

2-я типография издательства «Наука»,

121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 10.