



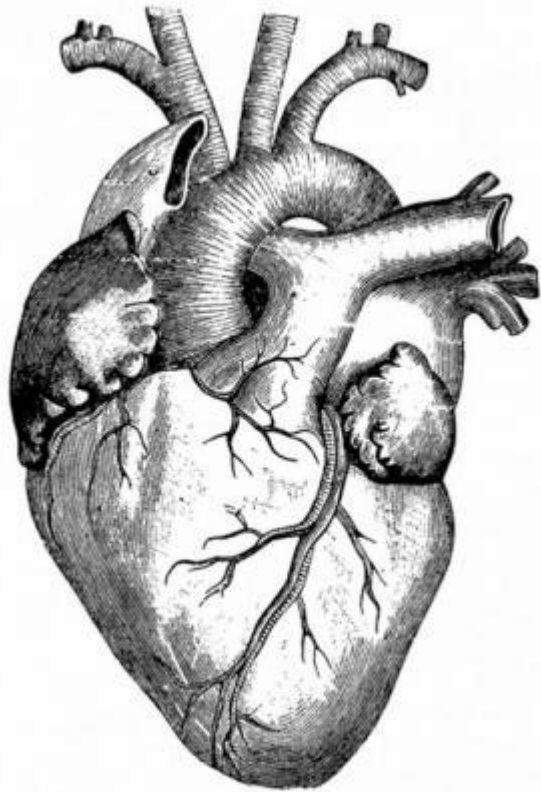
Procesy stochastyczne w kardiologii od elektrofizjologii do zmienności rytmu serca cz. 1

Monika Petelczyc

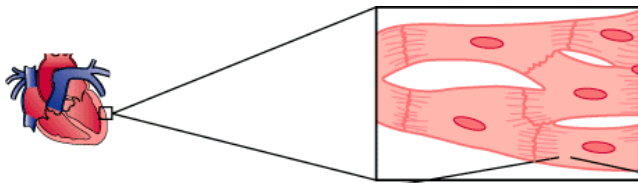
Wydział Fizyki

Politechnika Warszawska

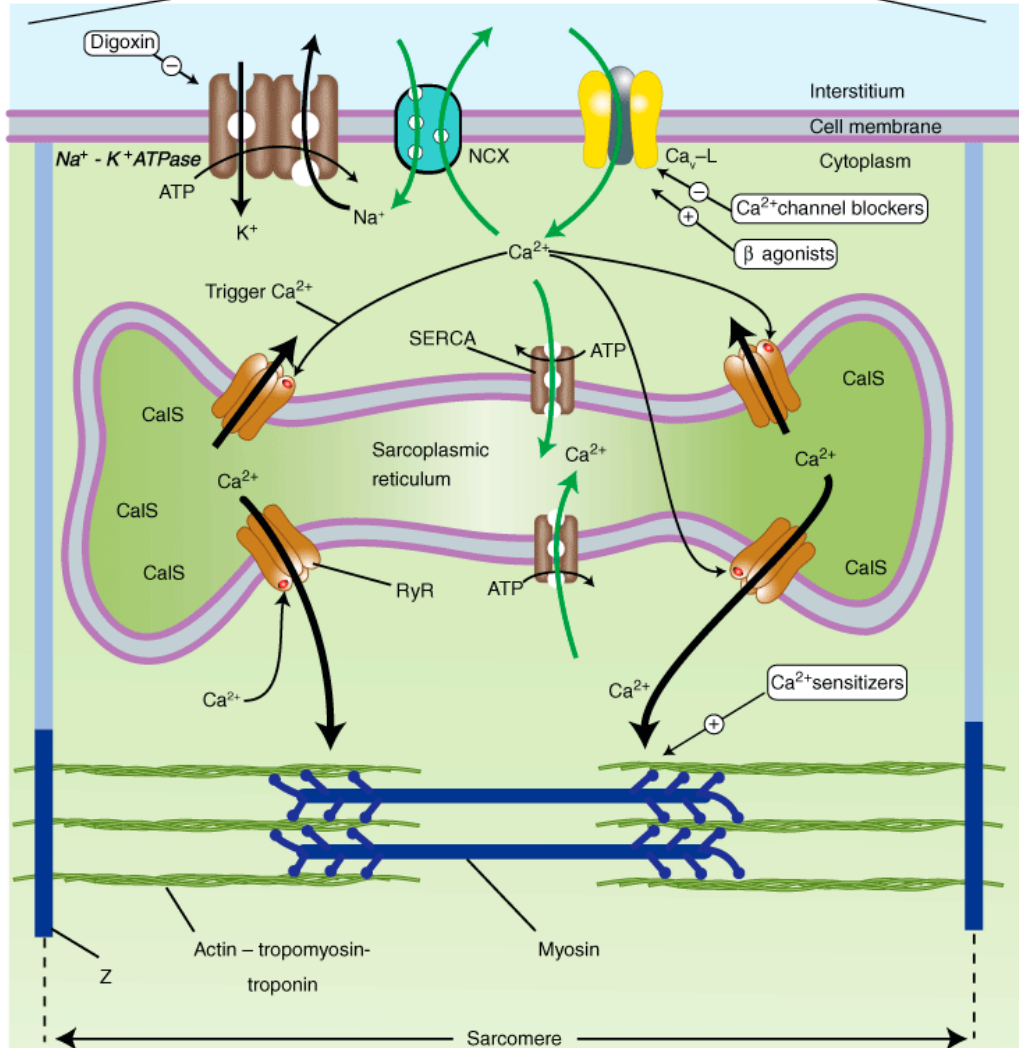
Od poziomu makro... do komórki



<http://www.myofilament.org/PhotosAndMovies/movies.htm>



Skurcze serca - gospodarka jonowa na poziomie komórkowym



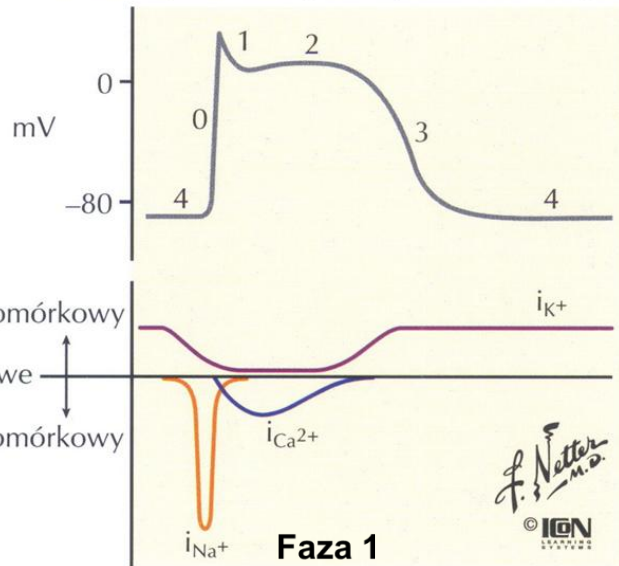
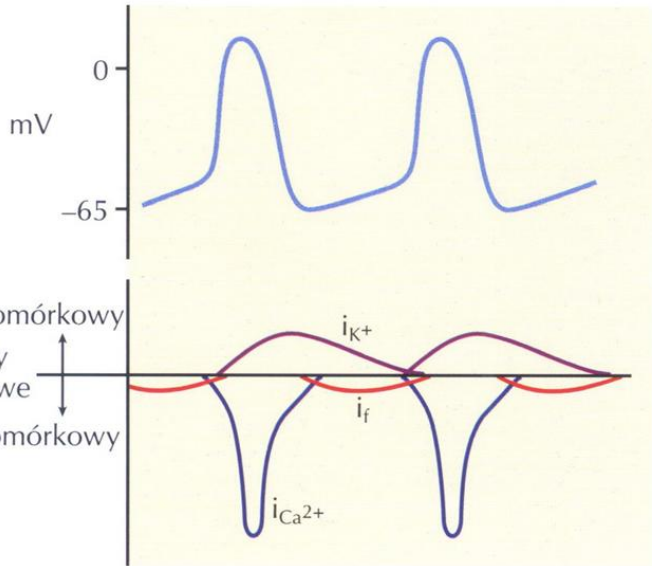
Source: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ: *Basic & Clinical Pharmacology*, 11th Edition: <http://www.accessmedicine.com>

Potencjał czynnościowy

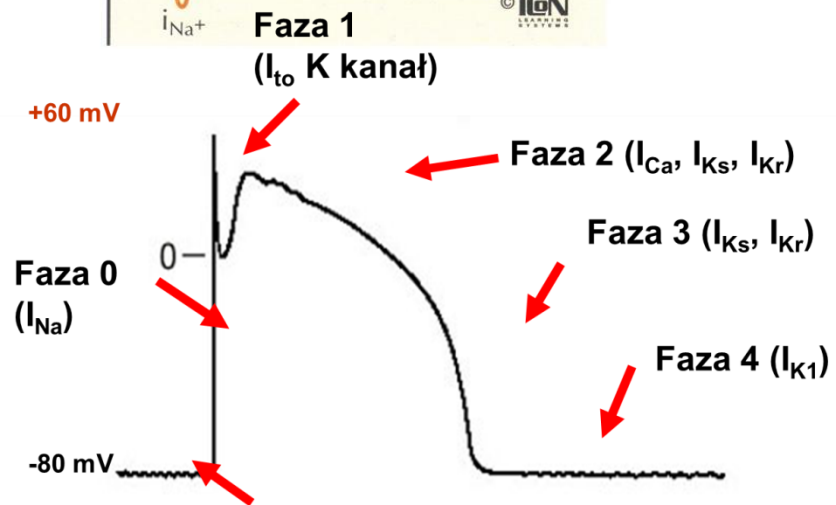
Potencjał czynnościowy komórek węzła SA

Potencjał czynnościowy miocytów komorowych

T. Wierzba, wykład z Elektrofizjologii

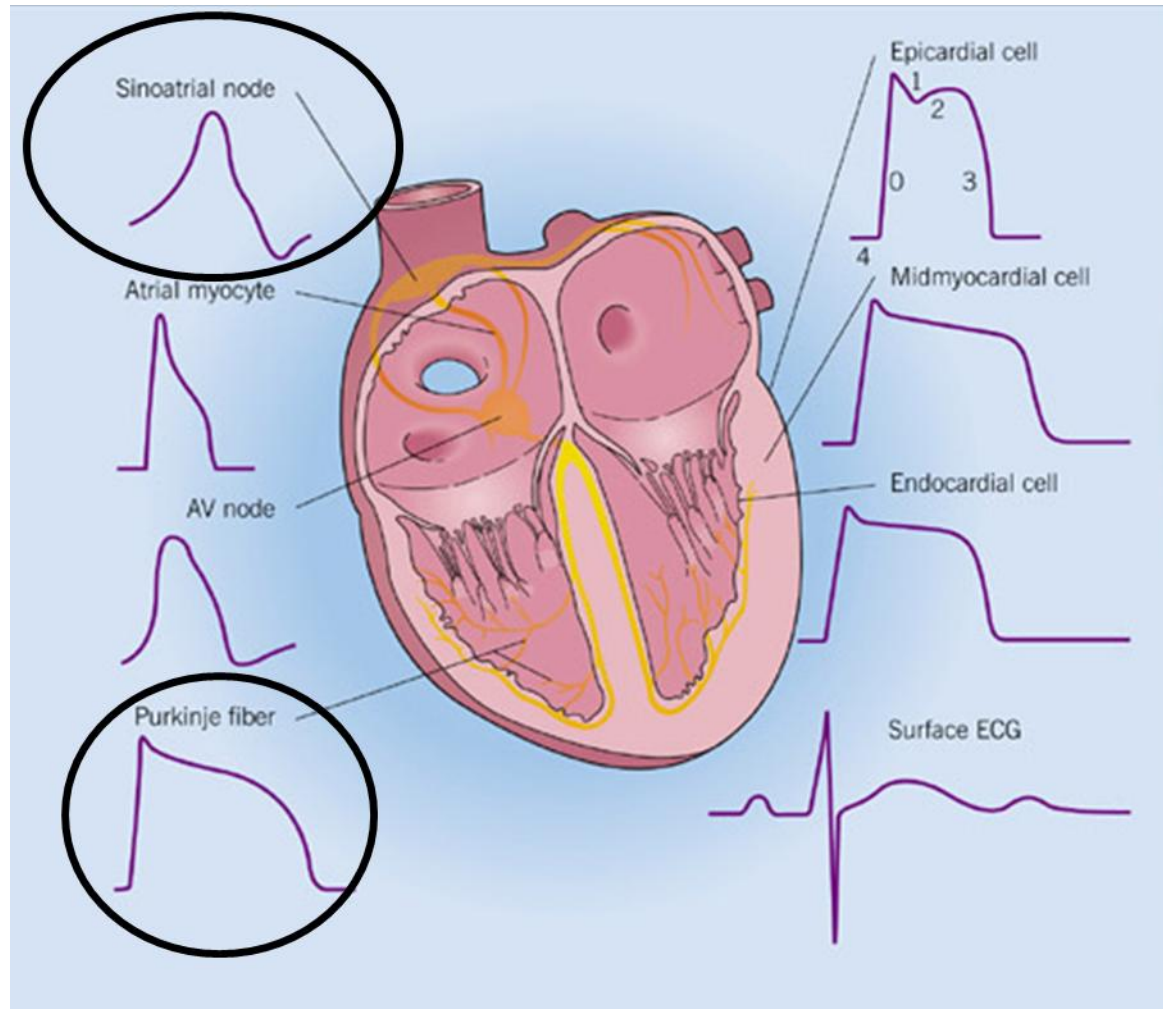


Description of current	Ions	Symbol	Nernst Potential	Tissue
sodium channel	Na	I_{Na}	+ 60 mV	A,V, Purkinje fibers
L-type calcium channel	Ca	$I_{Ca,L}$	+ 120 mV	all
potassium (rapid) channel	K	$I_{K,R}$	-100 mV	all
Potassium (slow) channel	K	$I_{K,S}$	-100 mV	all
Potassium (transient outward) channel	K	$I_{K,TO}$	-100 mV	all
pacemaker or "funny" channel	K and Na	I_F	- 35 mV	SA, AV, PF

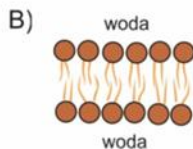
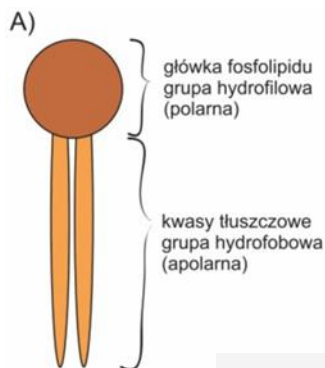


Faza 4 – potencjał spoczynkowy

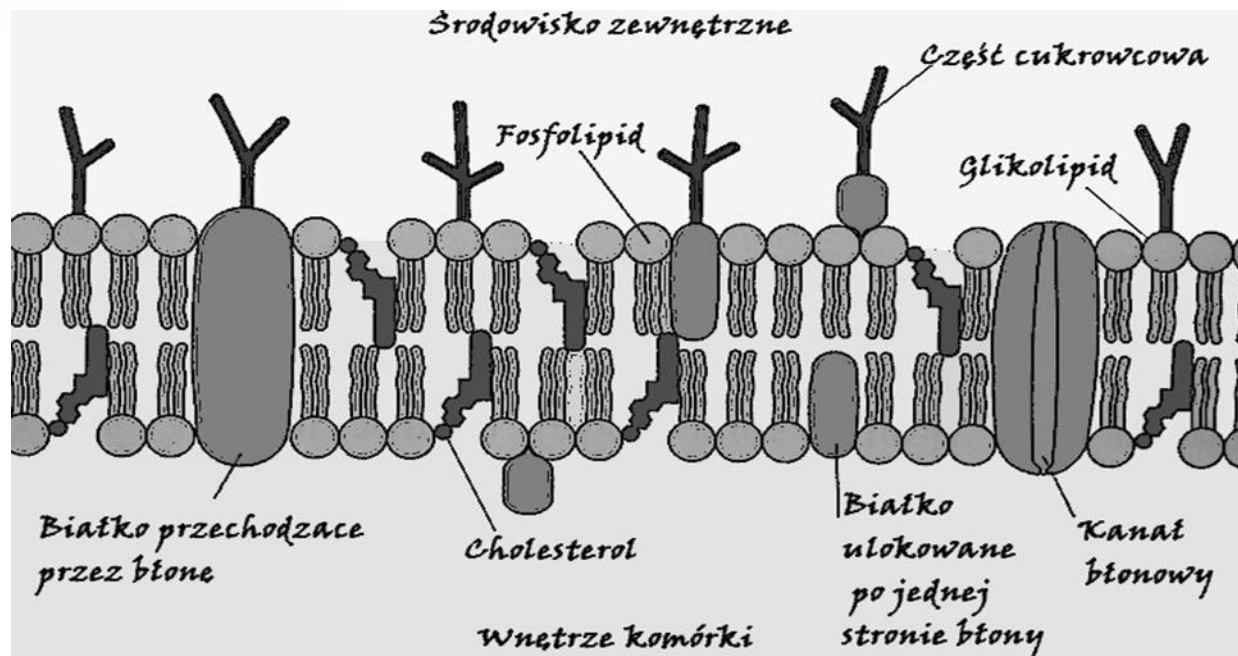
Potencjał czynnościowy



Element kluczowy - błona komórkowa

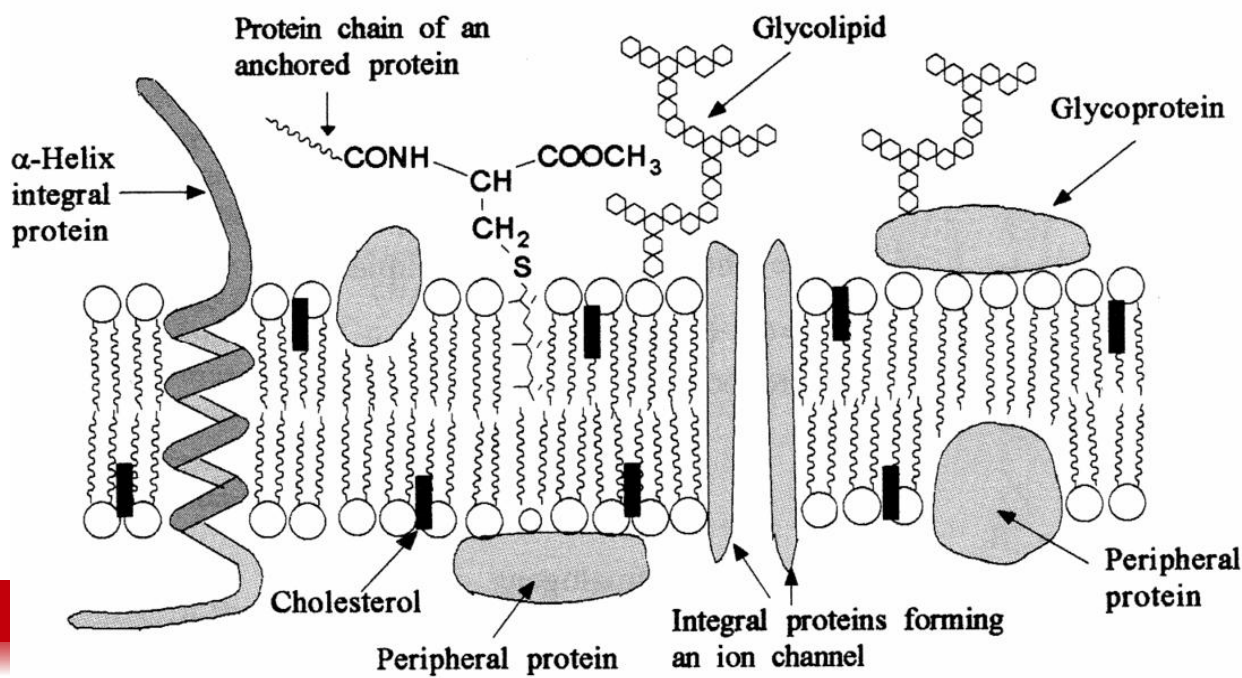


Dopiero w latach 70-tych poprzedniego wieku powstał model płynnej mozaiki (Singer i Nicolson) błonę tworzy dwuwarstwa lipidowa, białka są w niej zanurzone w różnym stopniu (a nie umieszczone na powierzchni). Błona taka wykazuje asymetrię i dynamikę.



Po co te białka w błonie?

- Transportują przez błony małe cząstki (np. pompa sodowa).
- Utrzymują łączność pomiędzy komórkami lub z cytoszkieletem (tzw. białka wiążące)
- Pośredniczą w przekazywaniu informacji ze środowiska zewnętrznego do komórki
- Są enzymami działającymi po jednej ze stron błony bądź w jej wnętrzu

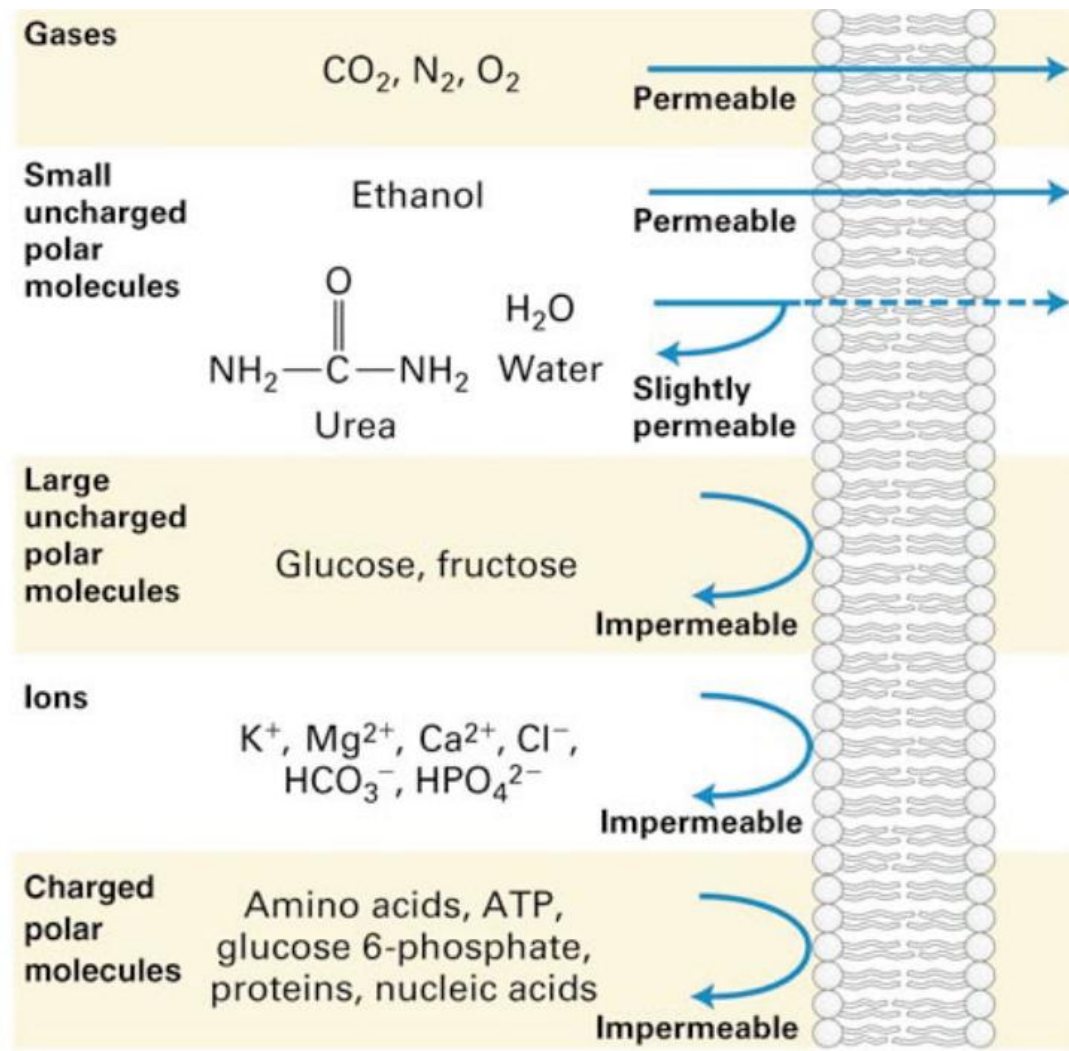


Co przechodzi przez błonę?

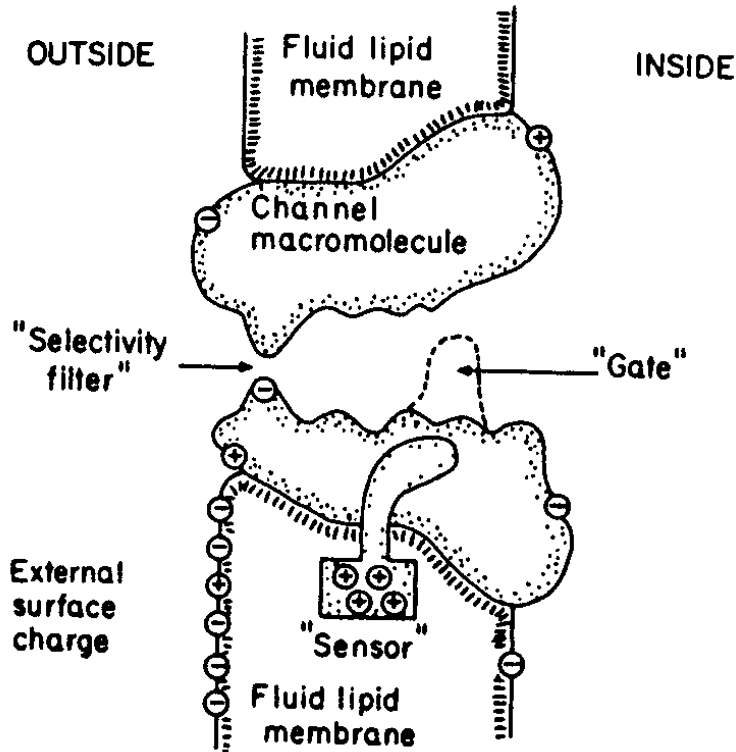
Substancja	H ₂ O	Gliceryna	Glukoza	Cl ⁻	Na ⁺
Przepuszczalność [cm/s]	10 ⁻²	5*10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹²

Przepuszczalność błony dla danej substancji zależy od rozmiaru i ładunku jej cząsteczki.

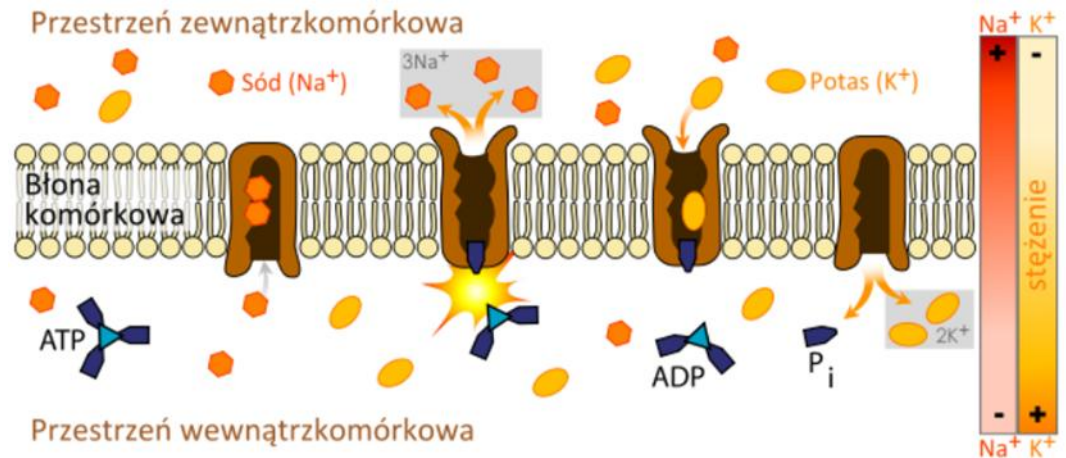
Cząsteczki wody przedostają się przez szczelinę w warstwie lipidowej, powstałą na skutek chwilowego odchylenia się łańcucha kwasu tłuszczowego.



Co służy do transportu?



Kanał jonowy aktywowany potencjałem

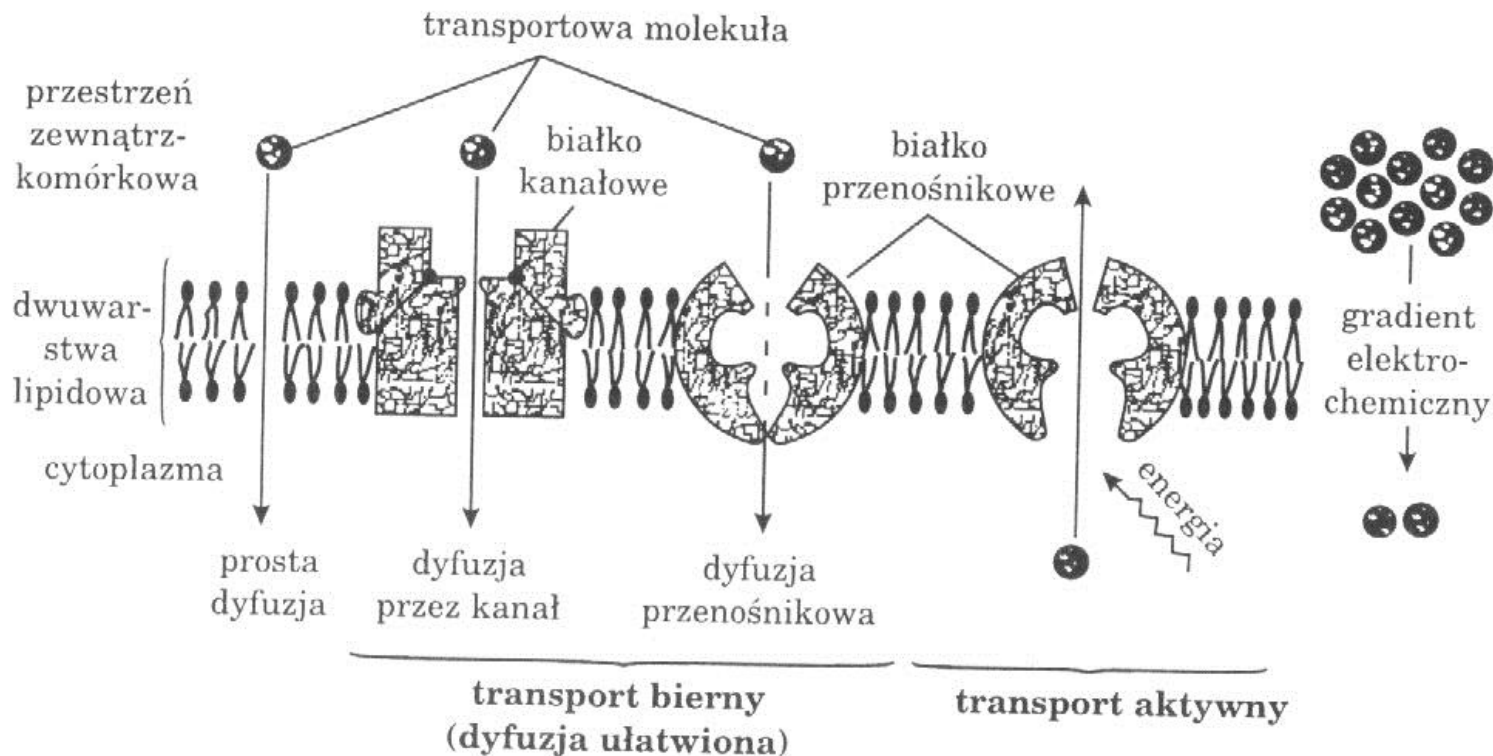


pump

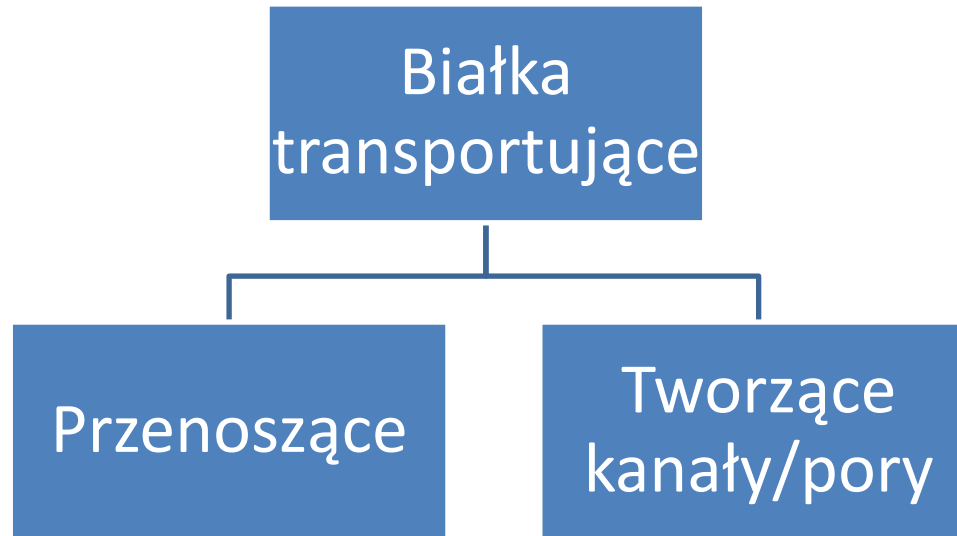
Transport przez błonę

- **Wymagany jest bodziec termodynamiczny:**
 - Różnica stężeń danej substancji po obu stronach błony
 - Różnica potencjałów elektrycznych wewnątrz i na zewnątrz błony
 - Różnica ciśnień hydrostatycznych
 - Różnica ciśnień osmotycznych
- Nie wystarczy sama różnica – odnosimy ją do grubości bariery (błony): dlatego mówimy o **gradientcie danego bodźca**
- **Podstawowe typy transportu:**
 - Bierny** – nie wymaga nakładu energii
 - Aktywny** – odbywa się przeciwko istniejącym bodźcom

Transport przez błonę



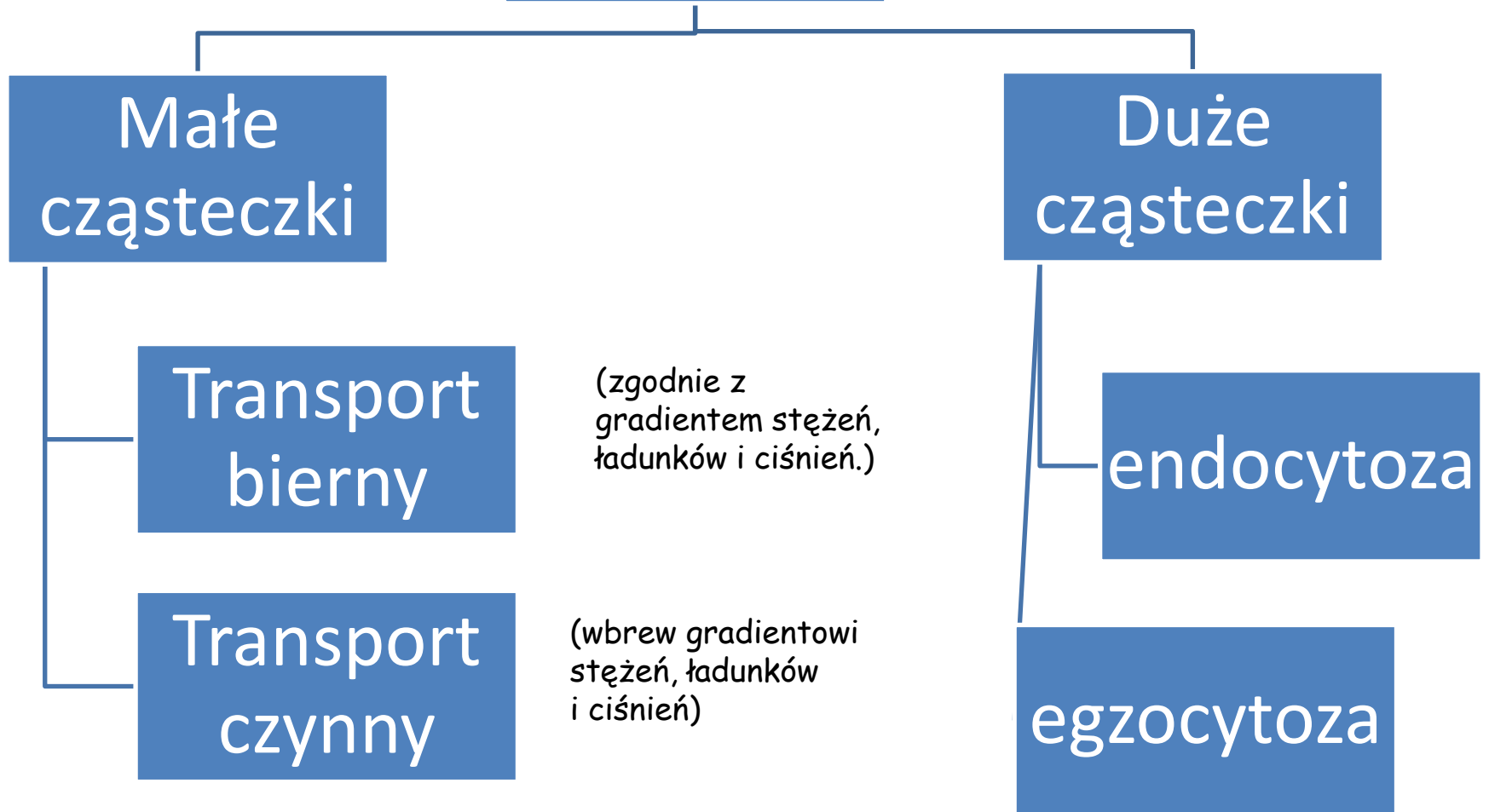
Rys. 4. Mechanizm transportu substancji przez błonę komórkową (DOŁOWY 1996)



- Wiążą cząsteczki, które mają być przetransportowane
- Wiązanie skutkuje zmianą konformacji i wymaga energii

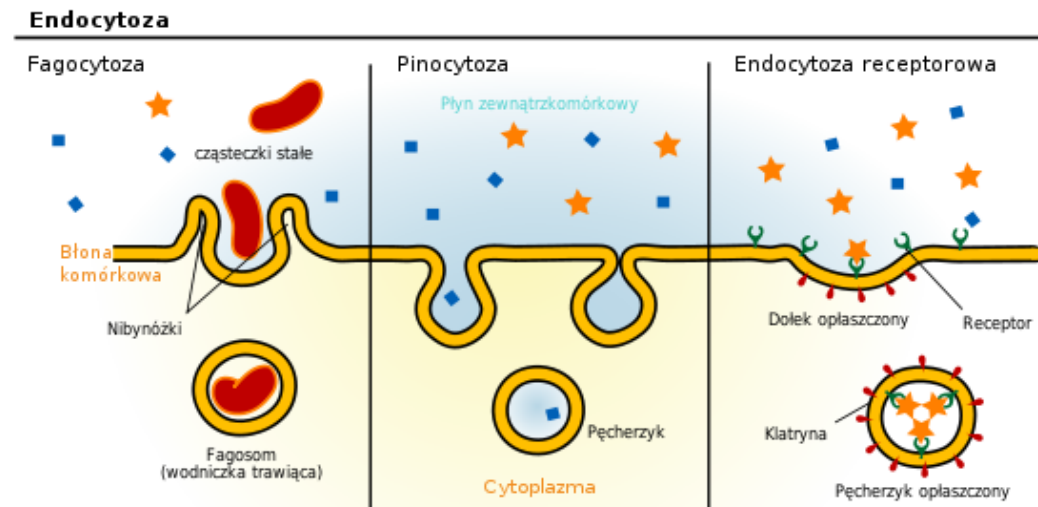
- Długie polipeptydowe łańcuchy przenikające przez błonę komórkową
- Powstaje przez to obszar umożliwiający przechodzenie przez błonę substancji hydrofilowych bez kontaktu z hydrofobowym wnętrzem błony
- Transport odbywa się pod wpływem bodźców chemicznych, elektrycznych, mechanicznych

Transport przez błony



Transport dużych cząsteczek

- W procesie **endocytozy** komórka pochłania materiał pochodzący z zewnątrz.
- W wyniku fagocytozy komórka pochłania duże cząstki. Proces ten polega na otoczeniu pochłanianych cząsteczek przez mikrofałdy błony komórkowej. Gdy cząstki są już całkowicie otoczone, dochodzi do fuzji z **lizosomami**, w których następuje rozkład pochłoniętego materiału.
- Inną formą endocytozy jest pinocytoza, w wyniku której komórka pobiera z zewnątrz materiał w postaci rozpuszczonej. Małe kropelki płynu zostają uwięzione w mikrofałdach błony komórkowej, z której odrywają się po stronie cytoplazmy drobne pęcherzyki.
- Endocytoza receptorowa – pobieranie substancji poprzez związanie z receptorem na powierzchni błony



Transport bierny

- **Dyfuzja prosta:** strumień przenoszonej substancji jest wprost proporcjonalny do gradientu stężenia (współczynnik proporcjonalności to przepuszczalność błony)
- Proces ten opisuje prawo Ficka
- Tak transportowane są np. cząsteczki CO_2 , etanolu, N_2

wysokie stężenie substancji



niskie stężenie substancji

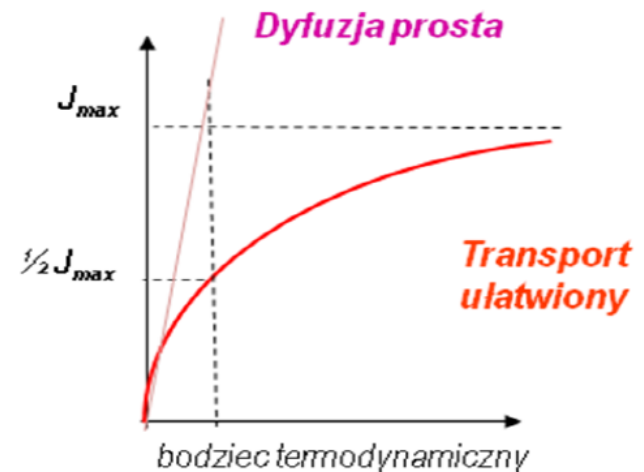
TABLE 1 Calculations of Time Required for Diffusion to Become 90% Complete

Distance, λ	Time, t
100 Å	0.1 μs
0.1 μm	0.01 ms
1 μm	1 ms
10 μm	100 ms
100 μm	10 s
1 mm	16.7 min
1 cm	28 h

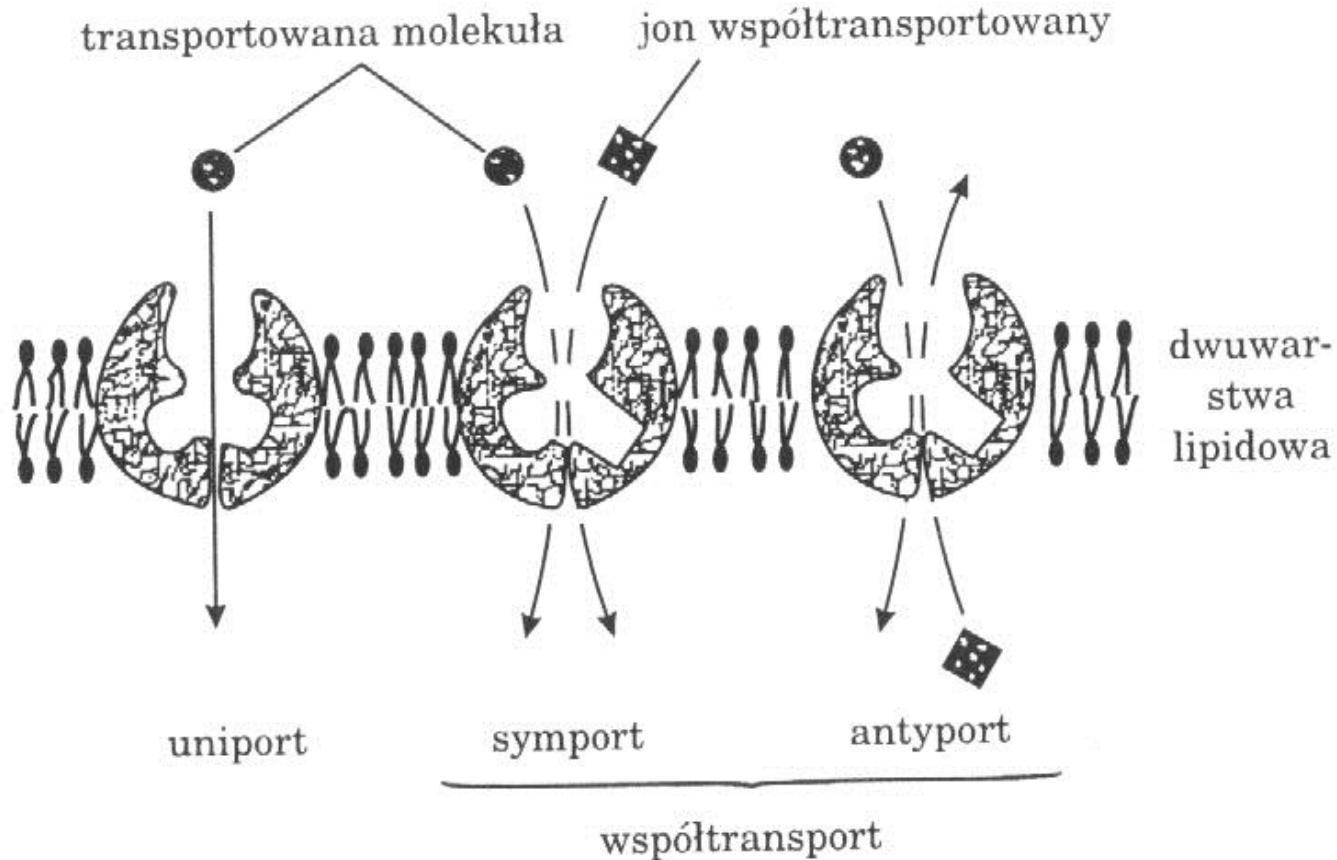
Transport bierny cd

- Dyfuzja ułatwiona: liczba pośredniczących struktur (nośników: pory/kanaly) jest ograniczona, dlatego strumień ulega nasyceniu.

Kanady białek błonowych wykazują selektywność jonową i nie są ustawicznie otwarte



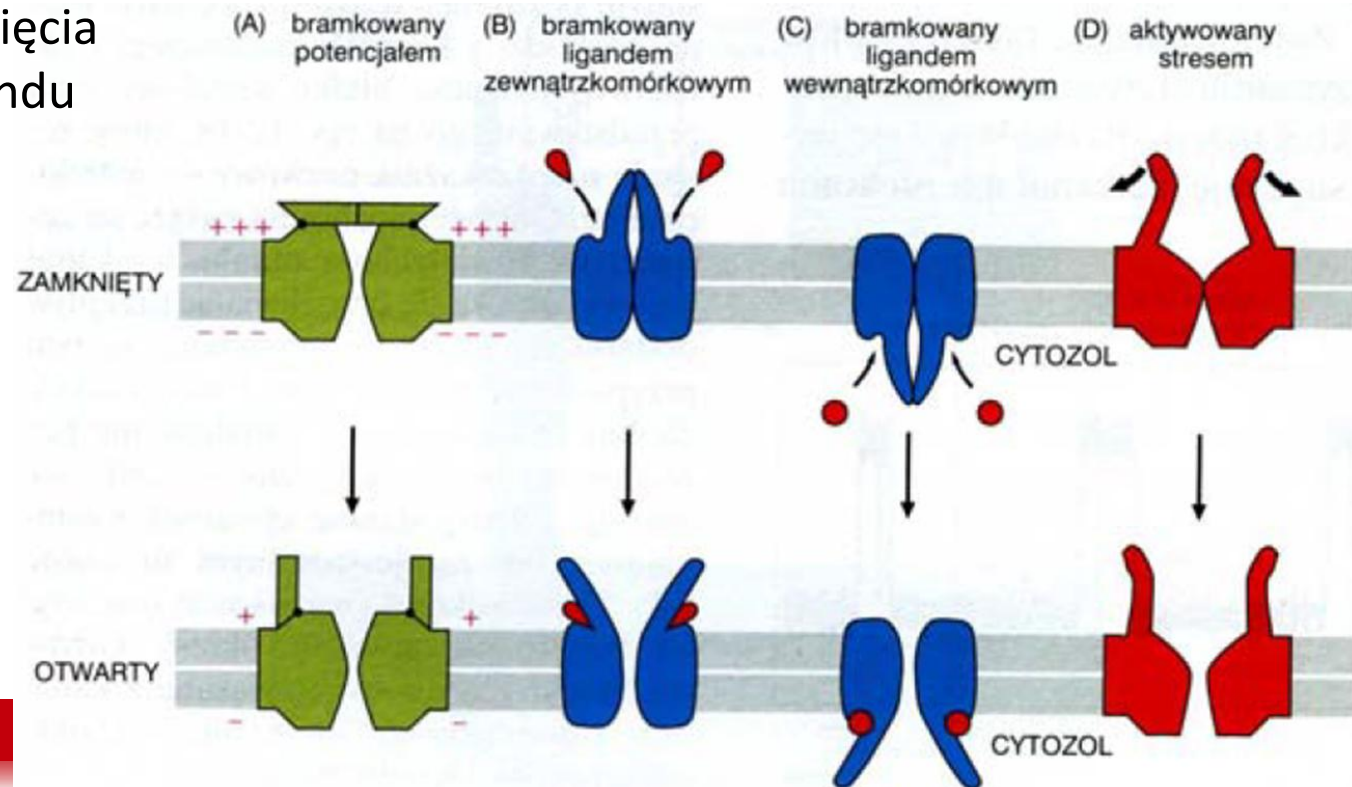
Typy transportu na nośnikach



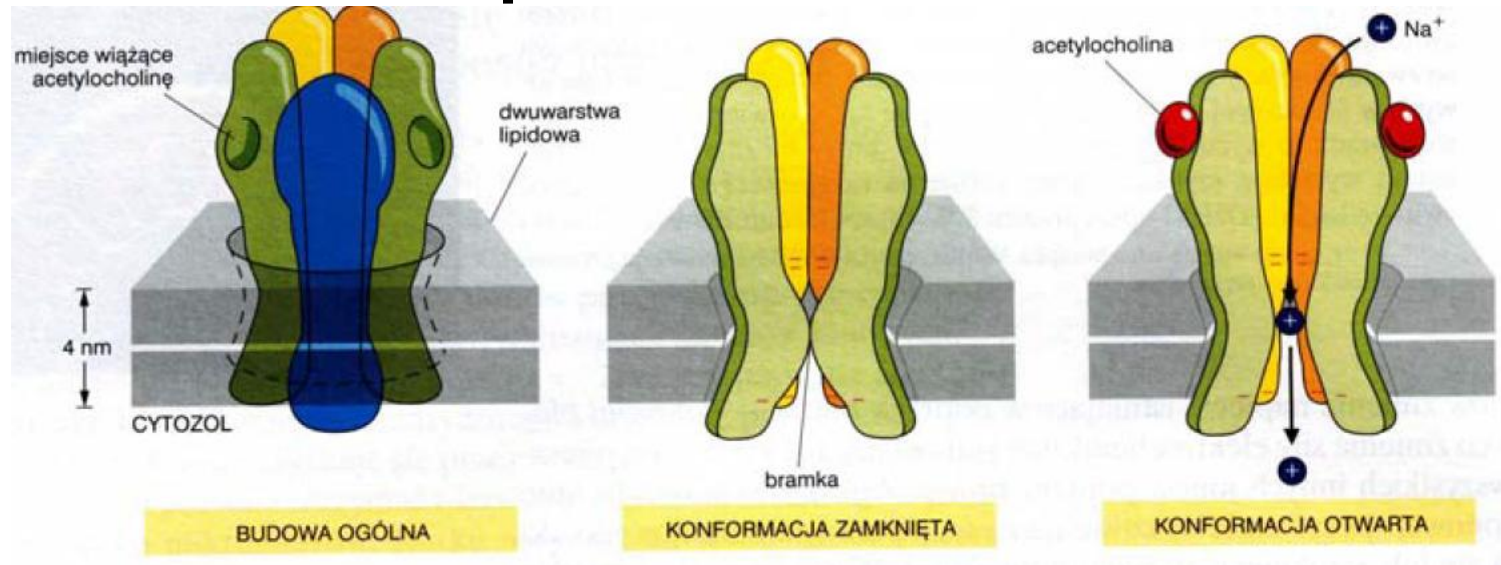
Rys. 5. Uniport, symport, antiport (DOŁOWY 1996)

Kanały jonowe - wszystko albo nic

- posiadają zdolność do kontrolowanego przepuszczania jonów.
- występowanie w nich tzw. pora wodna – hydrofilowa przestrzeń wewnątrz białka, przez którą jony mogą przenikać przez błonę komórkową
- rodzaje czynnika otwierającego (aktywującego) kanały jonowe:
 - zależne od napięcia
 - zależne od ligandu
 - aktywowane naprężeniem mechanicznym



Kanał sodowy aktywowany acetycholiną (czyli przekaźnikiem)



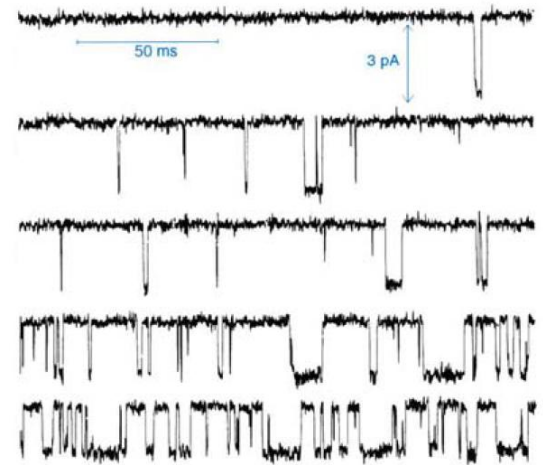
- wiązanie acetylocholiny zachodzi w czasie krótszym niż $100 \mu\text{s}$.
- przejście ze stanu zamkniętego w otwarty jest bardzo szybkie, ok. $30 \mu\text{s}$.
- przez otwarty kanał z łatwością przepływają jedno- i dwuwartościowe małe kationy, lecz nie aniony. To skutek rozkładu ładunków wewnątrz kanału. Po obydwu stronach najwęższej części kanału znajdują się ujemnie naładowane łańcuchy boczne aminokwasów.

Kanały jonowe

- przepuszczanie jonów nie zależy od wielkości czynnika aktywującego.
- **zaistnienie czynnika powodującego otwarcie kanału wpływa jedynie na prawdopodobieństwo tego, że kanał będzie znajdował się w stanie otwartym (proces stochastyczny!)**

Ale, wielkość czynnika otwierającego wpływa (w pewnym stopniu) na ilość kanałów jonowych w błonie znajdujących się w stanie otwartym.

- Pomiar Sakmanna i Nehera pozwoliły wyznaczyć szybkość przenoszenia jonów - 10^7 na sekundę przez kanał!



Potencjał równowagowy – potencjał Nersta

- Przegroda rozdziela roztwory o dwóch stężeniach jonów
- Będzie zachodziła dyfuzja (zgodnie z gradientem stężeń)
- Przepływ jonów pomiędzy roztworami można zatrzymać wytwarzając pomiędzy nimi odpowiednią różnicę potencjałów.
- Pole elektryczne będzie powodowało ruch jonów (migrację) w stronę przeciwną do kierunku dyfuzji
- stężenia jonów w obu przedziałach przestaną się zmieniać.

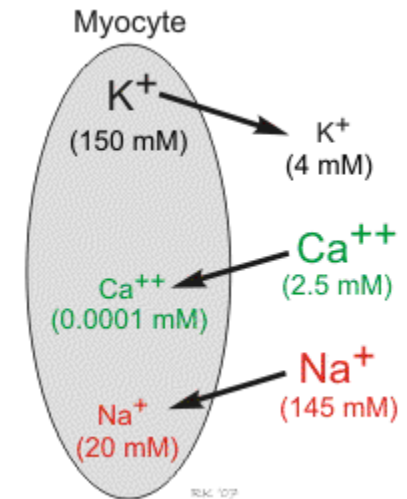
Potencjał równowagowy Nersta

$$U = \frac{RT}{zF} \ln \frac{c_1}{c_2}$$

z- wartościowość jonu

F-stała Faradaya

c_i -stężenia jonu po obu stronach błony



Jon	Potencjał Nersta
K^+	-81mV
Na^+	+55mV
Cl^-	-81mV

Równanie Goldmana-Hodgkina-Katza,

Prąd elektryczny w błonie jest przenoszony tylko przez jony Na^+ , K^+ i Cl^- .
Dla stanu stacjonarnego komórki otrzymujemy zależność na potencjał błonowy V_m :

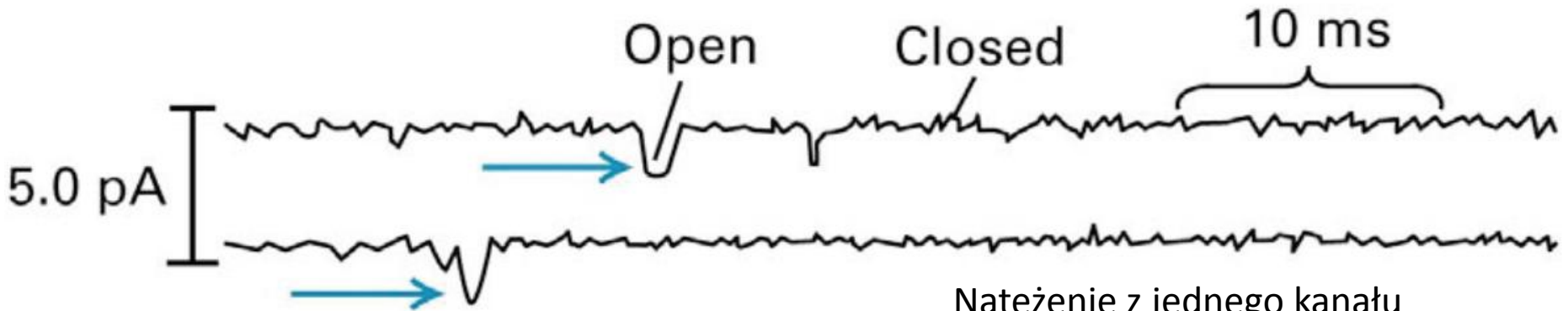
$$V_m = \frac{RT}{F} \frac{P_K [K^+]_w + P_{Na} [Na^+]_w + P_{Cl} [Cl^-]_o}{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_w}$$

$$P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1.0 : 0.04 : 0.45.$$

Ograniczenia!

- można je stosować tylko do opisu transportu jonów w kanałach o wystarczająco dużej średnicy pory kanału
- dla roztworów o rozcieńczeniu zapewniającym brak oddziaływań między transportowanymi jonami, w kanałach są przemieszczane pojedyncze jony rozdzielone cząsteczką wody!

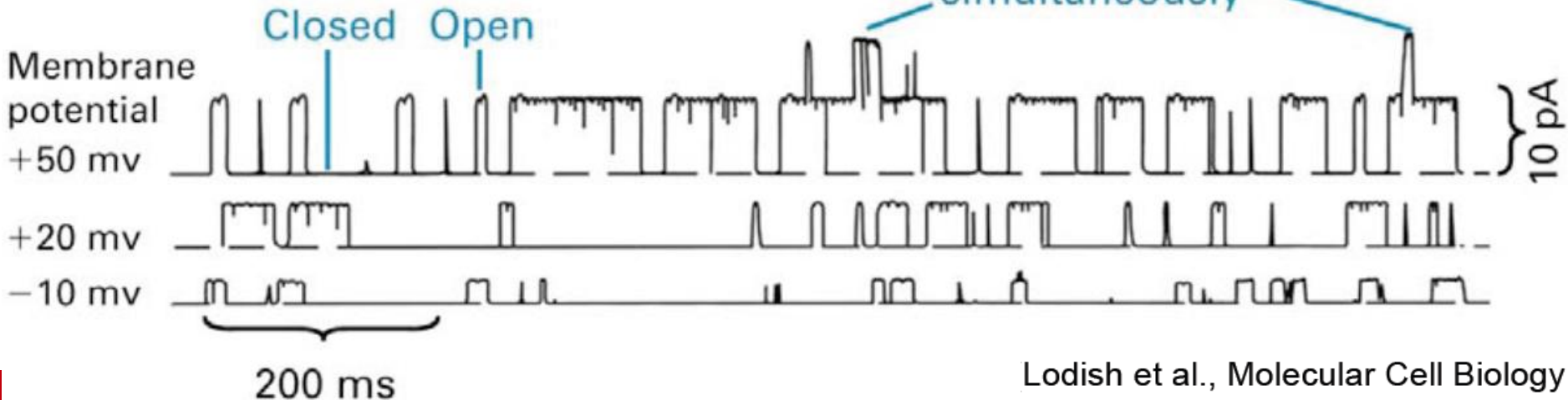
Gdzie te procesy stochastyczne?



Szukamy prawdopodobieństw otwarcia kanału, czasu otwarcia

Natężenie z jednego kanału potasowego średnio to 1,6 pA, czyli około 9900jonów/ms

Two channels open simultaneously



Problem I - modelowanie ruchu jonu/ów w kanale

- Cząstka poruszająca się w obecności siły tarcia – współczynnik γ zależy od lepkości ośrodka i promienia cząsteczki

$$m \frac{dv}{dt} = -m\gamma v$$

- Rozwiązanie tego równania sugeruje, że cząstka się zatrzyma, ale... cząsteczki wody i jony są porównywalnej wielkości, a w stanie równowagi termicznej oczekujemy, że:

$$\langle v^2 \rangle = \frac{3kT}{m}$$

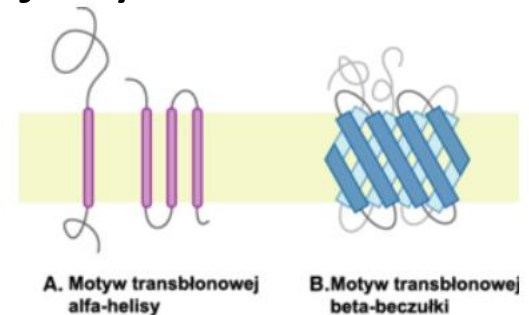
- Zatem naturalnym równaniem na dynamikę jest

$$m \frac{dv}{dt} = -m\gamma v + \mathbf{F}_R$$

↘ Siła Langevina

Ale to nie wszystko...

- W tym równaniu „Newtona” brakuje siły odpowiedzialnej za oddziaływanie elektrostatyczne. Składają się na nie 4 składniki:
 - Wypadkowy potencjał błony komórkowej
 - Polarność wnętrza kanału - Białka błonowe (integralne) tworzące kanał układają się tak, że ich polarna część (z aminokwasów) wyściela jego wnętrze
 - Ładunek niesiony przez transportowane jony
 - Oddziaływanie elektrostatyczne jonów ze ściankami kanału



Symulacje numeryczne

- Warunki brzegowe – na końcach kanału umieszcza się duże (jak duże?) rezerwuary jonów potasu (lub sodu) oraz chloru (jon, który opuści grupę, jest „elastycznie” zawracany)
- Potencjał między warstwami błony uproszczony do obrazu kondensatora płaskiego
- Koncentracja jonów po obu stronach jest utrzymywana na stałym poziomie na zasadzie prądu płynącego przez obwód zamknięty
- Warto dodać, że liczba jonów w miejscu wejścia do kanału, powinna być opisana rozkładem bimodalnym

Symulacje numeryczne cd.

- Zauważmy, że:

$$\langle x^2 \rangle = \frac{2kT}{m\gamma} [t - \gamma^{-1}(1 - \exp(-\gamma t))].$$

Mamy stałą relaksacji, która dla jonów potasu i chloru jest rzędu 30 fs. Gdy całkując równanie Langevina bierzemy $\Delta t \gg 30\text{fs}$:

$$\langle x^2 \rangle = \frac{2kT}{m\gamma} t.$$

Czyli błądzenie przypadkowe

A jeśli wykorzystamy $\Delta t < 30\text{fs}$:

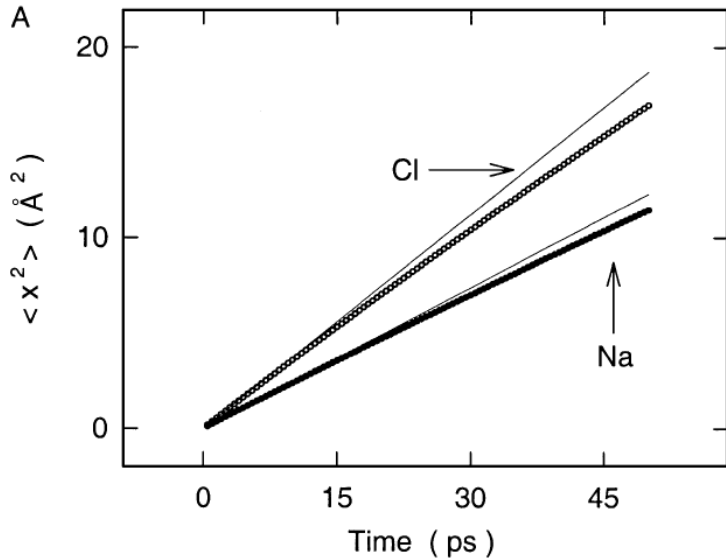
$$\langle x^2 \rangle = \frac{kT}{m} t^2.$$

Czyli ruch ze stałą prędkością „termalną”

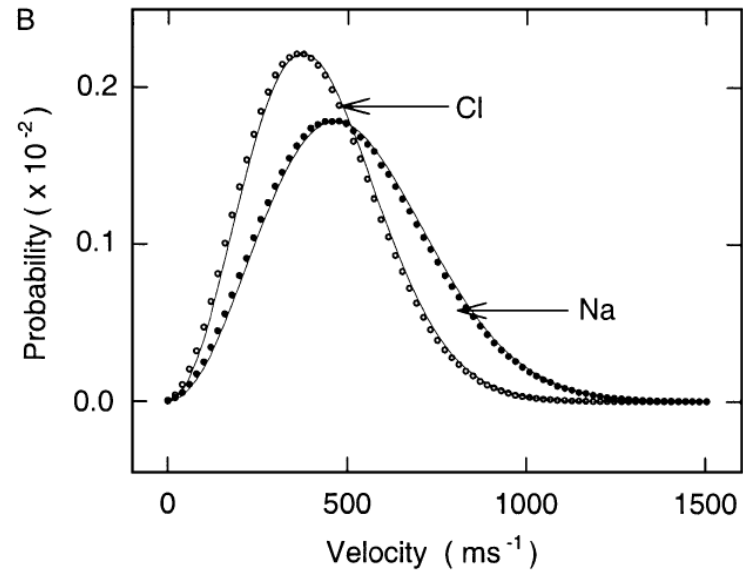
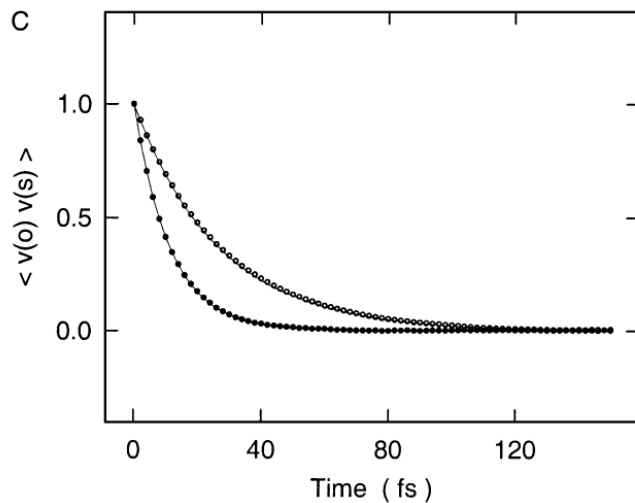
Gdy siły, które wpływają na jon zmieniają się bardzo szybko należy uwzględnić krótkie czasy (2fs), bo wówczas zmienia się również geometria samego kanału jonowego.

Można też połączyć obie skale czasowe – wewnątrz kanału brać krótkie, a poza nim dłuższe (S. H. Chung et al. Biophys. J. 77, 2517-2533)

Symulacje numeryczne - test



Współczynniki nachylenia są o 7% mniejsze niż przewidywane teoretycznie



$$\langle v(0)v(s) \rangle = \frac{kT}{m} \exp(-\gamma |s|).$$

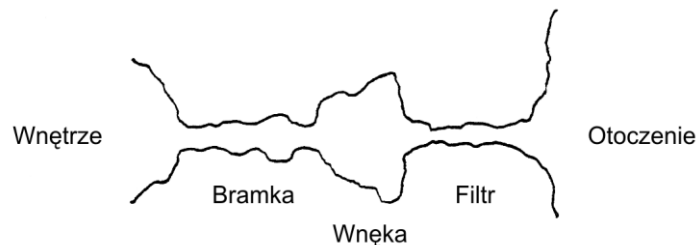
Słabe strony metody

- Parametry wejściowe równania muszą być znane z innych metod np. z dynamiki molekularnej (**współczynnik przenikalności dielektrycznej dla cząsteczek wody**, stała dyfuzji)
- Założenie o stałości białek kanału (i nie chodzi tu o zmiany konformacji cząsteczek – trwają dłużej niż penetracja kanału przez jon, ale ruchy obrotowe tych białek są szybkie)

Kanał potasowy (KcsA)



KChan_1.wmv



Schemat przekroju kanału potasowego

- Składa się z trzech jednostek
- przekrój poprzeczny pory wodnej zmienia się wzdłuż osi kanału.
- W części „do otoczenia” komórki filtr o długości 1,2 nm – najważniejsza pod kątem selektywności: rozróżnia jony potasu (promień 1.33Å) i sodu (0.95Å)
- W obszarze filtru występują dwa jony potasu, przedzielone cząsteczką wody, obecność trzeciego wywołuje przepływ prądu
- W części środkowej jest szeroka wnęka o długości około 1,0 nm, mogąca pomieścić kilkadziesiąt cząsteczek wody.
- W części zwróconej do wnętrza komórki (o długości 2,0 nm) zlokalizowane są podjednostki odpowiedzialne za zamykanie i otwieranie kanału

http://biology.anu.edu.au/hosted_sites/langevin/animations2-ie-old.html

Wyniki

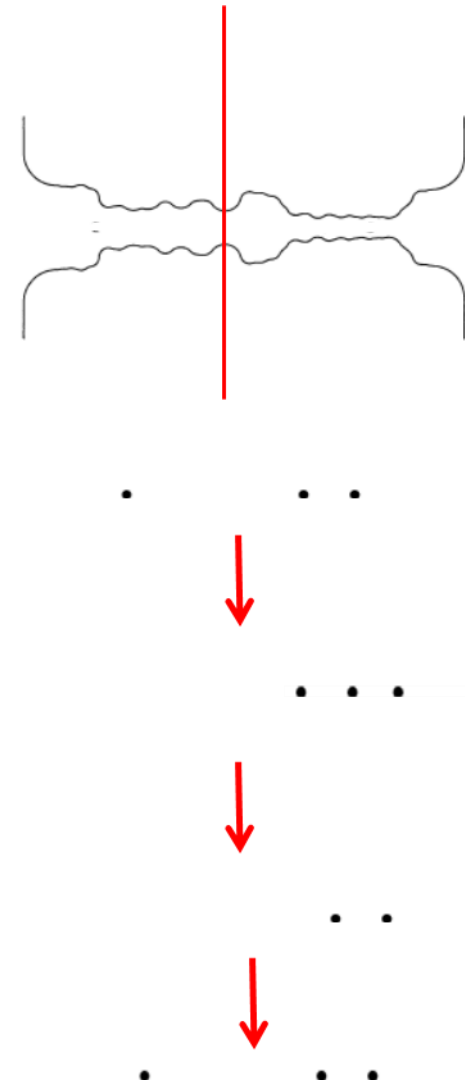
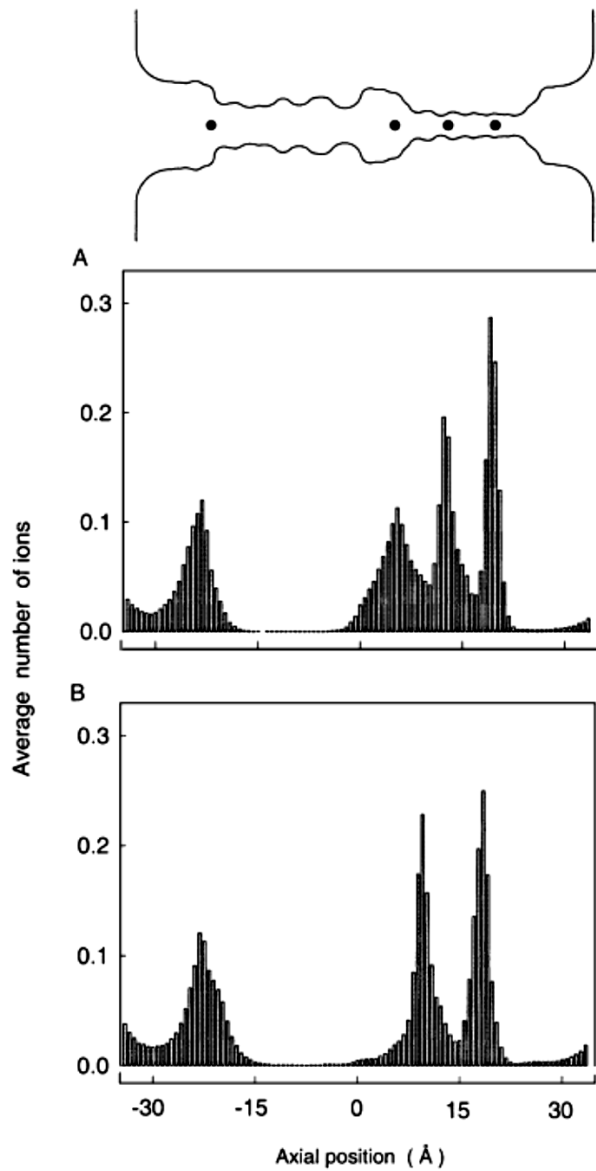
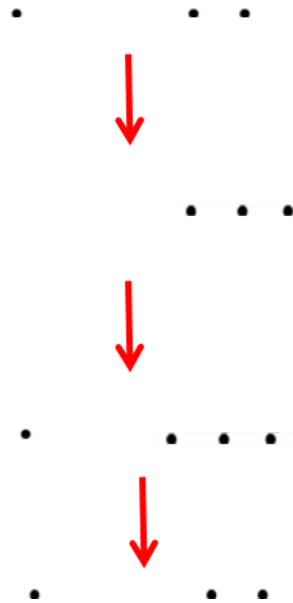
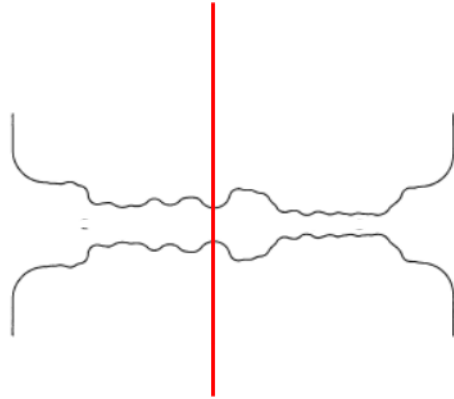
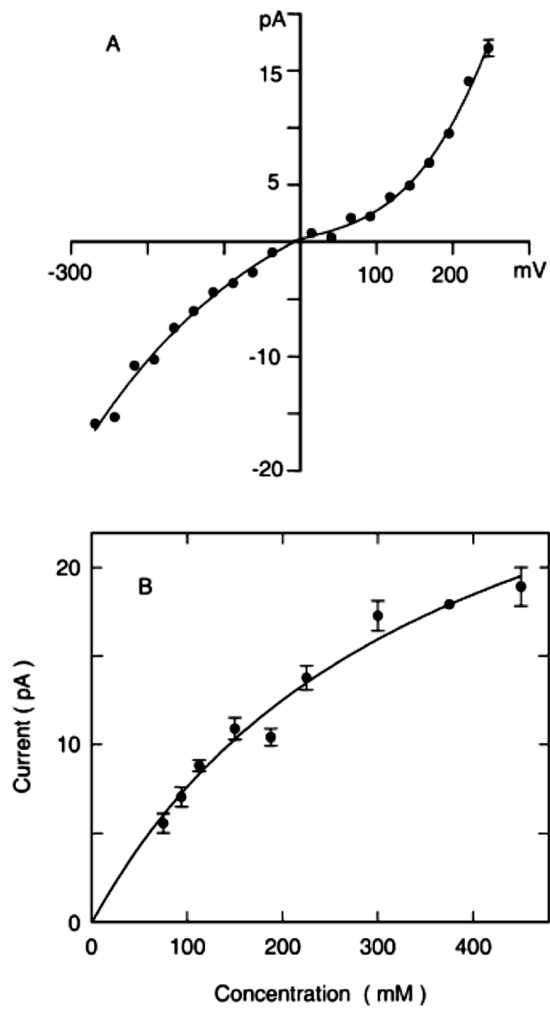


Fig. 3. Average number of ions in the channel with no applied field (A) and with an applied field of 10^7 V/m (B). The channel is divided into 100 sections, and the average number of ions in each section is calculated over a simulation period (0.1 μ s). The outline of the channel and the approximate locations of ions in the absence of an applied field are shown in the inset.

A gdy zwiększymy koncentrację



Charakterystyka prądowo-napięciowa



BD pozwala również zmierzyć średnie czasy przebywania w poszczególnych elementach kanału:

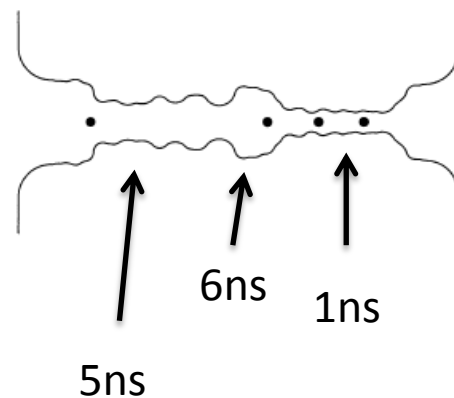


Fig. 4. The current-voltage (A) and current-concentration (B) curves obtained from BD simulations.

Kanał Ca^{2+}

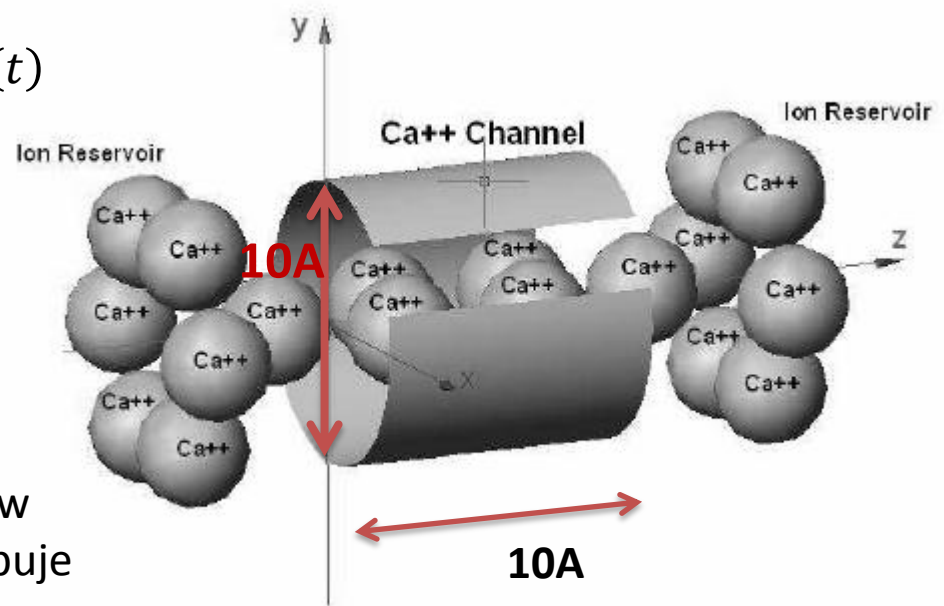
- Stochastyczny model Langevin-Lorentz-Poisson (LLP – 2007, S. Coco, D. S. M. Gazzo, A. Laudani & G. Pollicino)

$$m \frac{dv}{dt} = -h\mathbf{v} + q(\mathbf{E}_T + \mathbf{v} \times \mathbf{B}_T) + N(t)$$

$$\nabla^2 \varphi + q \iiint_{\Omega} f(P) d\Omega = 0$$

$$\mathbf{E}_T = -\nabla \varphi + \mathbf{E}_{ESO}$$

h-współczynnik tarcia (wynika z oddziaływania z cząsteczkami wody)
 \mathbf{E}_T oraz \mathbf{B}_T – całkowite pola panujące w kanale, to ostatnie nie zawsze występuje
 $N(t)$ – siła Langevina



Opis modelu cd.

$$\nabla^2 \varphi + q \iiint_{\Omega} f(P) d\Omega = 0$$
$$\mathbf{E}_T = -\nabla \varphi + \mathbf{E}_{ESO}$$

f(P)- rozkład przestrzenny
cząstki (jonu)

- Pole elektryczne jakiemu podlega jon jest sumą pola pochodzącego od kanału oraz pola pochodzącego od towarzyszących jonów
- Zakłada się stacjonarny przepływ jonów przez kanał
- Celem modelu jest wyznaczenie charakterystyki prądu jonowego vs. napięcie błony.
- Wprowadzono założenia dotyczące iteracji (numeryka problemu – skala czasu, warunki początkowe)

Założenia-warunki symulacji

- Najpierw jony w roztworze (rozkład Poissona+przypadkowe położenie początkowe)
- Czasy dojścia ujścia do kanału – opisane rozkładem eksponencjalnym z założeniem braku pamięci (tzn. to się dzieje w tym kroku zależy TYLKO od kroku poprzedniego! – tu tzw. Process Poissona)

Wyniki

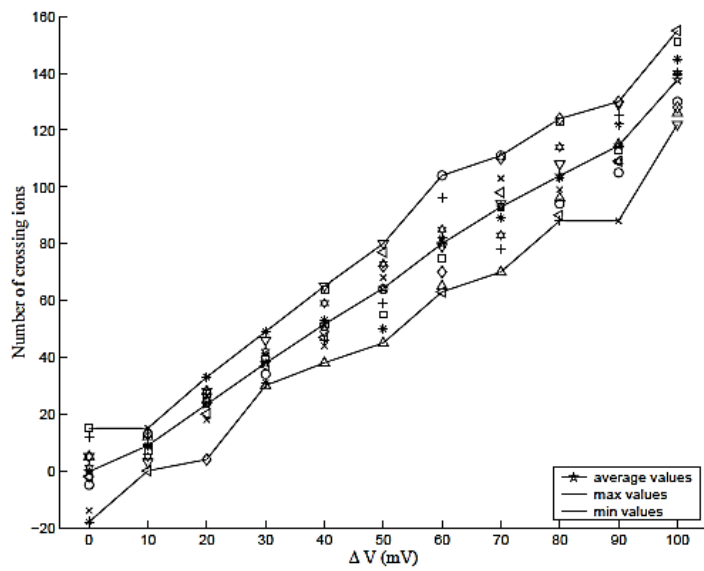


Fig. 2. Number of ions exiting the channel versus transmembrane voltage (stochastic injection)

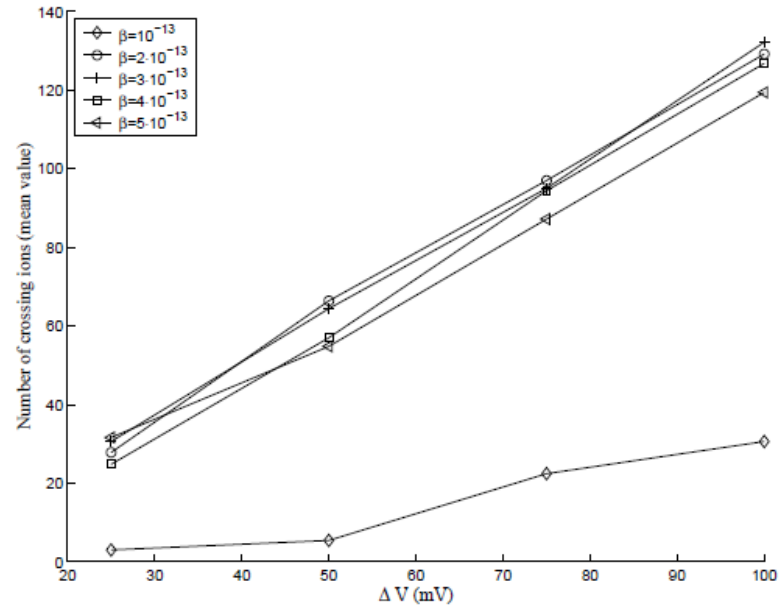
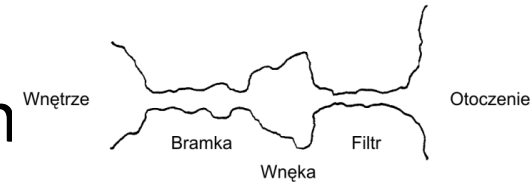


Fig. 3. Number of ions exiting the channel versus transmembrane voltage for different values of friction coefficient

Kanał jonowy i procesy...

- Markowa i niemarkowskie - różnych skalach czasowych - nadają się do opisu dynamiki przepływu jonów K przez kanał
- Dwie skale czasowe: oscylacyjny charakter dyfuzji przez filtr kanału (czas oscylacji \gg czas dyfuzji)
- Niemarkowskość pochodzi od wody! W kanale jonowym zmienia swoją lepkość. Ruch cząsteczek wody w filtrze to proces bez pamięci, we wnętrze (tzw. basket) to proces niemarkowski.



Fluktuacje: kanał otwarty/zamknięty

Długość sygnału ok. 25s, próbkowanie 10kHz

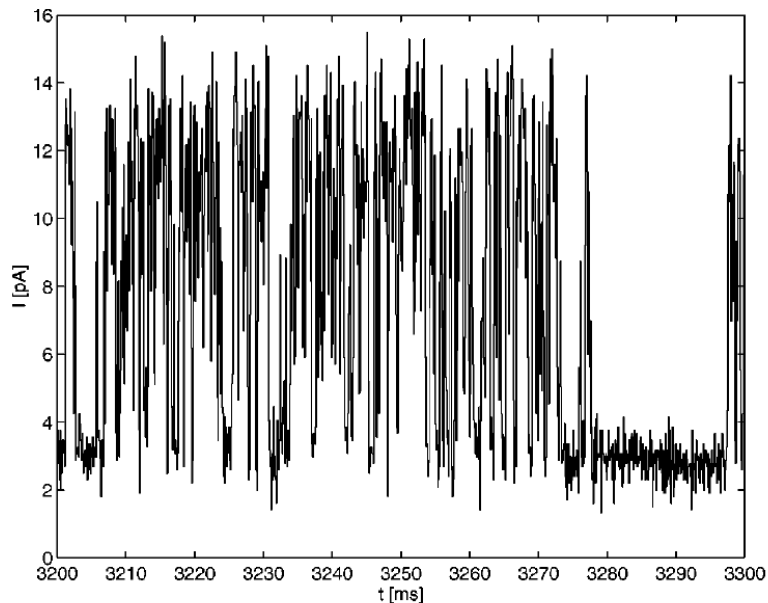
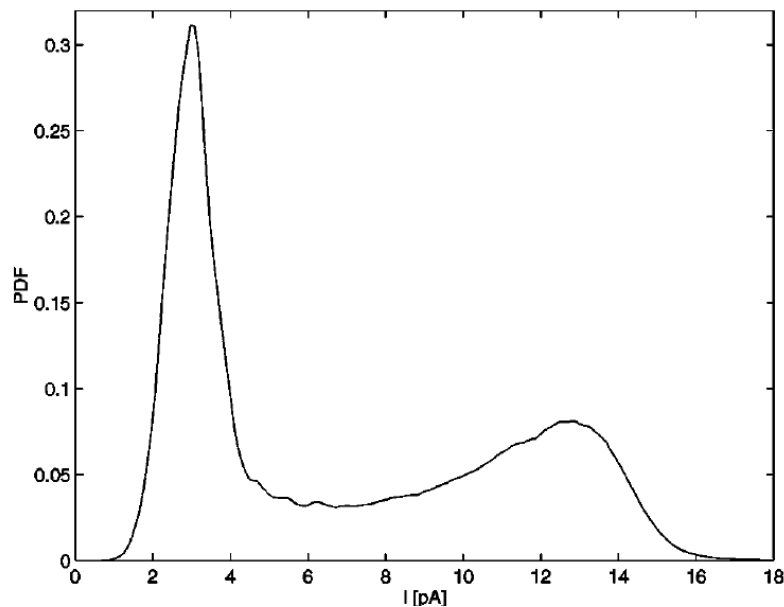


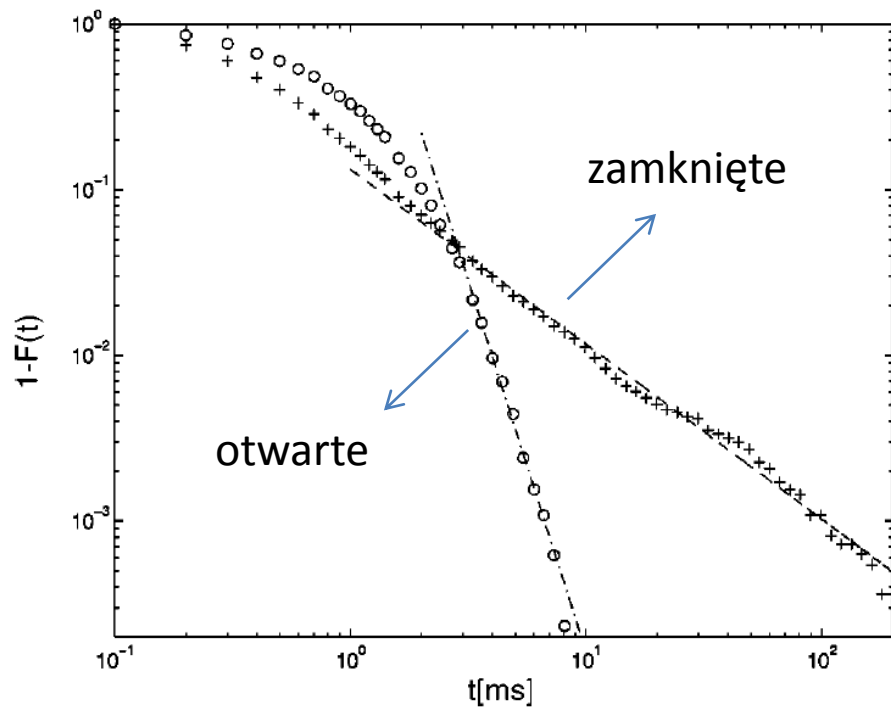
FIG. 1. A part of patch clamp recording of the single BK channel current I (pA) vs time (s), at a pipette potential of +60 mV.

Średnie czasy:
otwarcia kanału 0.79 ± 0.01 ms
zamknięcia kanału 0.84 ± 0.01 ms



Gęstość prawdopodobieństwa wartości prądu jonowego

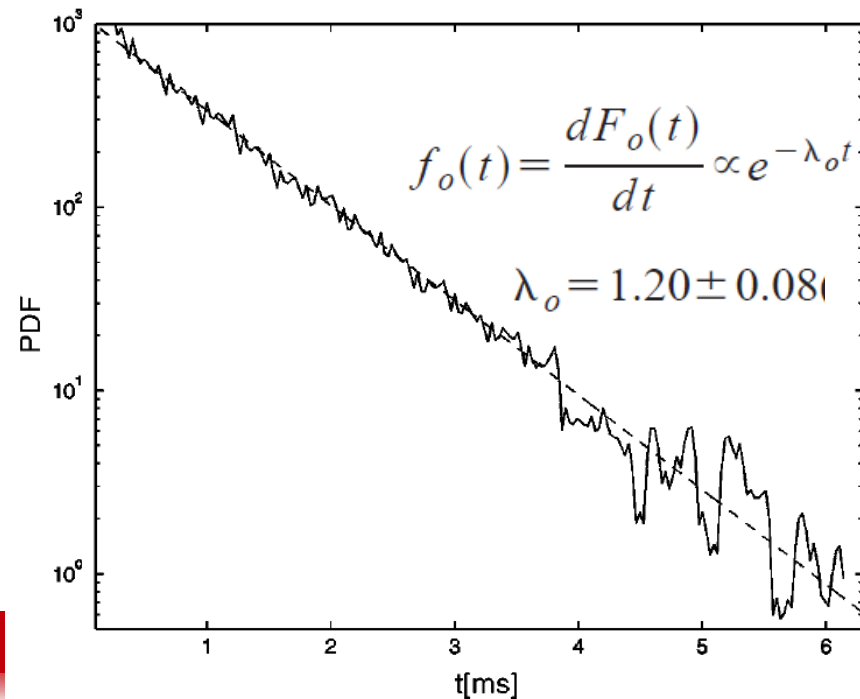
Rozkłady czasów zamknięcia/otwarcia



$$f_c(t) = \frac{dF_c(t)}{dt} \propto t^{-(D_c+1)}$$

$$P\{T_c > t\} = 1 - F_c(t) \propto t^{-D_c}$$

Głębsza analiza pokazała, że dla czasów otwarcia lepiej dopasować rozkład eksponencjalny niż potęgowy:



Jakie są z tego wnioski?

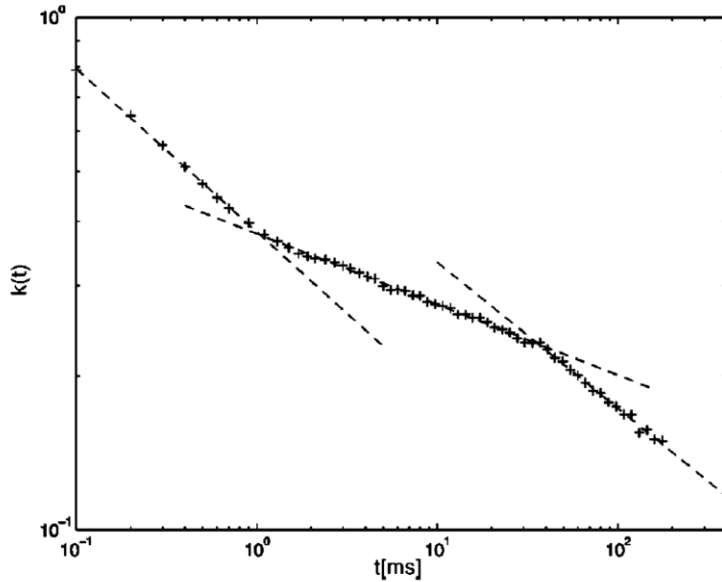


FIG. 8. The autocorrelation function of the experimental current signal decreases with three different power laws: $t^{-\alpha_\kappa}$ where $\alpha_\kappa = 0.32 \pm 0.04$ for $t < 1$ ms, $\alpha_\kappa = 0.14 \pm 0.02$ for $1 \text{ ms} < t < 40$ ms, and $\alpha_\kappa = 0.28 \pm 0.10$ for $t > 40$ ms.

Transport przez kanał jonowy to
Fractional Brownian Motion!

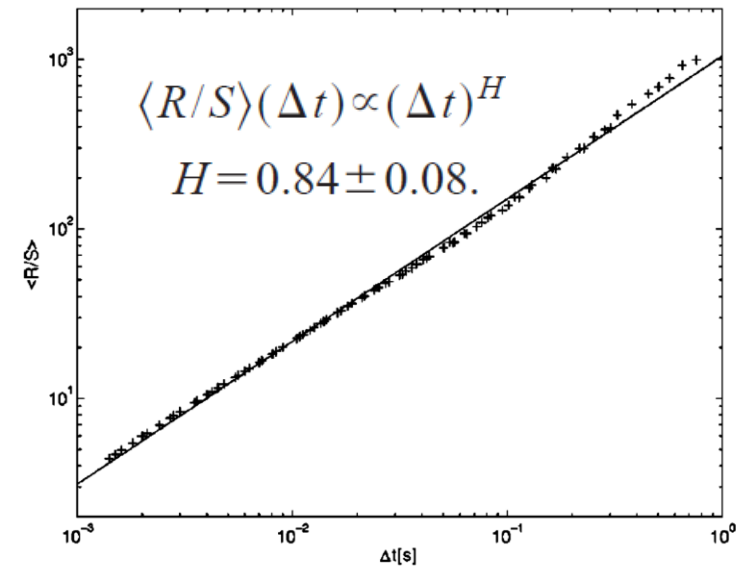


FIG. 9. The rescaled range $\langle R/S \rangle$ as a function of time-lag Δt . The slope of the straight line determines the Hurst exponent in Eq.

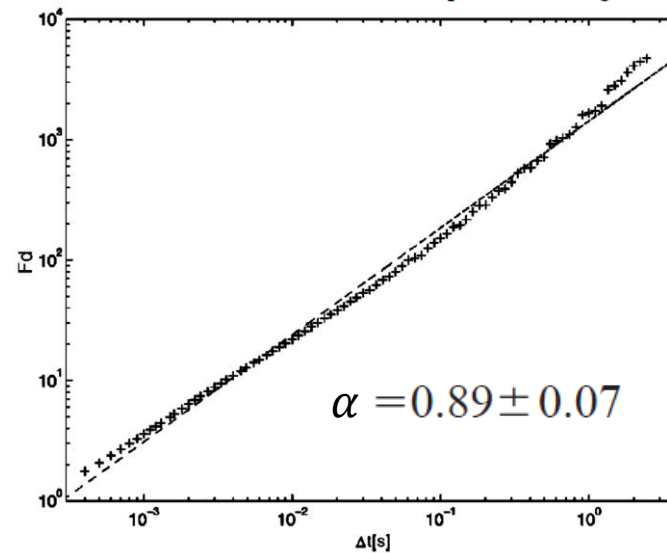


FIG. 10. The dependence of F_d on the time-lag Δt in the detrended fluctuation analysis. Plot in log-log scale determines the power exponent α .

$$F_d(\Delta t) \propto (\Delta t)^\alpha$$

Budowa serca

