

К. А. АСТАБАТЯН, А. М. ДОЛАБДЖЯН

К ТЕХНИКЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ОТВЕДЕНИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

За последнее десятилетие методика микроэлектродной регистрации электрической активности различных возбудимых единиц прочно вошла в арсенал электрофизиологических лабораторий, проявив широкие возможности в раскрытии интимных механизмов основных биологических процессов — возбуждения и торможения.

Ввиду отсутствия отечественного производства цельного комплекса аппаратуры, необходимой для внутриклеточных исследований, каждая лаборатория по-своему решает ряд технических проблем, связанных со спецификой микроэлектродного отведения. В настоящей работе представлены основные характеристики некоторых оригинальных схем различных блоков, разработанных нами.

Основная техническая задача внутриклеточных отведений сводится к регистрации постоянного потенциала (трансмембранного потенциала или тока покоя), а также быстрых и медленных колебаний потенциалов идентифицированных единиц. В экспериментах, где исключен визуальный контроль проникновения микроэлектрода внутрь клетки, наиболее достоверным критерием прокола мембраны нейрона является регистрация отрицательного постоянного потенциала, который в условиях минимального повреждения может достигать десятков милливольт и удерживаться в течение значительного времени. В ряде случаев на его фоне возникают потенциалы действия (импульсы), имеющие одинаковую амплитуду. Суть внутриклеточных исследований заключается в изучении этих электрических проявлений деятельности клеток и их изменений под воздействием различных влияний.

На рис. 1 приведена блок-схема установки для проведения внутриклеточных микроэлектродных исследований, которая позволяет:

1. Усиливать и регистрировать постоянные потенциалы отдельных клеток;
2. Усиливать и регистрировать без искажений быстрые и медленные колебания биопотенциалов;
3. Визуально и на слух контролировать фоновую и вызванную электрическую активность;

4. Производить магнитофонную запись исследуемых потенциалов для последующего воспроизведения;
5. Регистрировать исследуемые процессы на фотопленку;
6. Производить электрическое раздражение различных образований;
7. Согласовать во времени работу различных блоков установки и дистанционно управлять фоторегистратцией в избранном режиме.

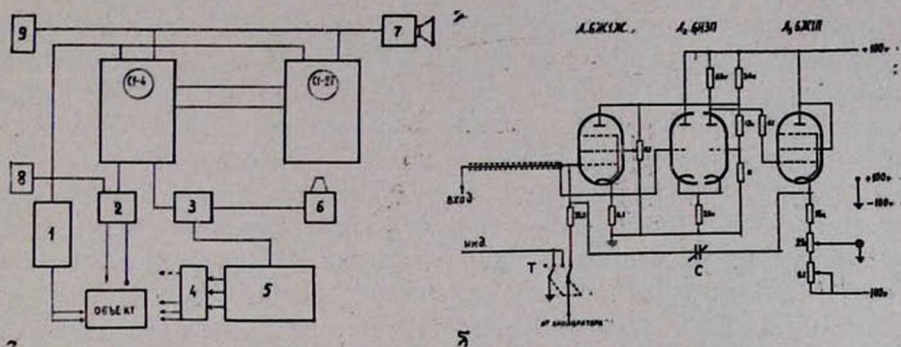


Рис. 1. а) блок-схема установки для внутриклеточного исследования электрической активности отдельных нейронов: 1 — усилитель переменного тока; 2 — предварительный усилитель постоянного тока; 3 — полуавтомат для дистанционного управления фоторегистратцией; 4 — разделительный трансформатор с коммутатором; 5 — стимулятор; 6 — фоторегистратор; 7 — усилитель низкой частоты с динамическим громкоговорителем; 8 — самописец для регистрации трансмембранного потенциала; 9 — магнитофон; C1-4 — электронный осциллоскоп для визуального контроля; C1-27 — электронный осциллоскоп, с экрана которого производится фоторегистратция; б) принципиальная электрическая схема предварительного усилителя постоянного тока (с возможностью компенсации «паразитных» емкостей).

При разрешении специальных задач установка может быть дополнена необходимыми узлами, как например: источниками звукового и слухового раздражения, анализаторами, пересчетными и программирующими устройствами и т. д.

В настоящее время для внутриклеточных отведений используются стеклянные микроэлектроды, технология изготовления которых представлена в обширной литературе [2, 3, 5 и др.]. Надо отметить, что ряд важных требований, в частности к усилительной технике, исходит из свойств самих микроэлементов. Микроэлектрод, изготовленный из стекла пирекс с диаметром кончика около 0,5 μ , заполненный 3М KCl и погруженный на 2 мм в раствор 0,1М KCl, имеет отрицательный потенциал около 10 мв, сопротивление 10 Мом и емкость порядка 2 пф [4]. Если сигнал, отводимый микроэлектродом, подать на вход обычного усилителя, входное сопротивление которого ($R_{вх}$) значительно ниже сопротивления электрода ($R_{эл}$), то значение входного сигнала понизится в $\frac{R_{вх}}{R_{вх} + R_{эл}}$ раз, что крайне нежелательно [2]. С другой стороны, наличие емкостных свойств микроэлектрода и «паразитных» емкостей в системе нейрон-микроэлектрод-усилитель должно привести к значительному искаже-

нию формы и амплитуды быстрых компонентов регистрируемых потенциалов действия. Чтобы свести до минимума влияние вышеотмеченных факторов, разработан ряд входных и усилительных схем, принципиальная особенность которых сводится к значительному уменьшению сеточного тока входного каскада, при котором увеличивается входное сопротивление последнего, и к уменьшению постоянной времени входной цепи.

Электрическая схема одного из вариантов подобных входных устройств, разработанного у нас, приведена на рис. 16. Первый каскад выполнен по схеме катодного повторителя на пентоде 6Ж1Ж, работающего в режиме, близком к электрометрическому. Сеточный ток предлагаемой схемы порядка 2×10^{-11} а, входное сопротивление около 10^9 ом. Настройка компенсации «паразитной» емкости производится переменной емкостью С по принципу положительной обратной связи сведением до минимума искажений формы прямоугольных калибровочных импульсов, выдаваемых специально собранным генератором. Второй каскад устройства является усилительным. На выходе схемы включен катодный повторитель на лампе 6Ж1П, работающий в триодном режиме. Питание анодных цепей осуществляется от сухих батарей типа БАС-80, а питание накальных цепей — от кислотного аккумулятора типа СТС-98. Блок выполнен на отдельном шасси и помещен в металлический корпус.

Для визуального наблюдения исследуемых процессов в установке использован осциллоскоп С1-4, трубка которого заменена на двухлучевую типа 16Л03И. Один из ее лучей предназначается для микроэлектродной регистрации, другой — для наблюдения суммарной электрической активности или калибровки по времени. Оба луча работают синхронно, т. к. их горизонтальная развертка осуществляется одним и тем же внутренним генератором.

В первом канале используется усилитель постоянного тока осциллоскопа С1-4, а во втором — отдельный усилитель переменного тока с высоким коэффициентом усиления и широкой полосой пропускания.

Для электрического раздражения различных структур в установку включен генератор прямоугольных импульсов, работающий в одиночном и непрерывном режимах, а также выдающий серии стимулов с различным количеством и частотой следования импульсов в ней. При непосредственном приложении импульсов от генератора к объекту на вход усилителя может попасть сигнал значительной величины, регистрируемый в виде так называемого артефакта, что, в свою очередь, может привести даже к запираанию усилителя. Для предотвращения этого в настоящее время применяются разделительные трансформаторы или радиочастотные устройства, подключающиеся на выход стимуляторов. Далее импульс поступает в распределительный блок и лишь потом прикладывается к тому или иному раздражаемому образованию.

Фоторегистрацию исследуемых процессов удобно производить с экрана отдельного осциллоскопа, имеющего минимальное послесвечение,

который подключается параллельно к осциллоскопу визуального наблюдения (рис. 1а).

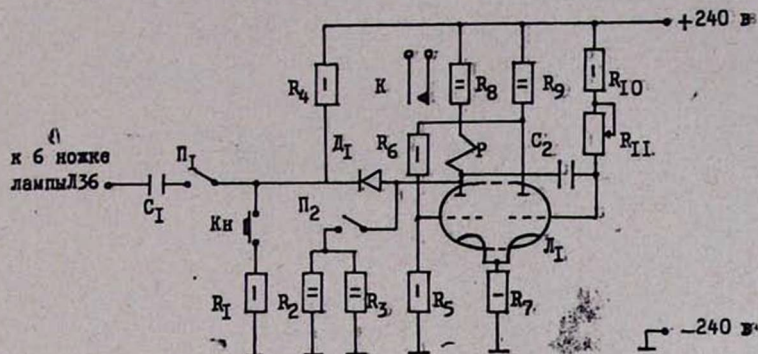


Рис. 2. Электрическая схема полуавтомата для дистанционного управления фоторегистрацией: L_1 — лампа типа 6Н8С; P — реле типа РМУГ; D_1 — диод типа Д2Ж; R_1 — 0,1 Мом, R_2 и R_3 — 62 ком, R_4 — 0,1 Мом, R_5 — 24 ком, R_6 — 0,2 Мом, R_7 — 2,2 ком, R_8 — 5,1 ком, R_9 — 3 ком, R_{10} — 0,3 Мом, R_{11} — 1,5 Мом, C_1 — 100 пф, C_2 — 1 мкф, K — контакты реле (объяснение в тексте).

Согласование работы различных узлов установки и дистанционное управление фоторегистрацией осуществляется полуавтоматом, схема которого дана на рис. 2 [1]. На лампе 6Н8С собран ждущий мультивибратор. В анодной цепи лампы имеется реле P (рис. 2), контакты которого включают цепь питания электродвигателя лентопротяжного механизма. Запуск схемы производится отрицательными импульсами, поступающими с катода лампы L_{36} (см. схему осциллографа). Импульс возникает при возвращении луча в исходное положение. При этом срабатывает реле и пленка перемещается на один кадр. Время перемещения регулируется изменением постоянной времени $(R_{10} + R_{11}) \times C_2$. Кнопка $K_{\text{н}}$ (рис. 2) служит для разового ручного пуска схемы. При включении контакта Π_2 (рис. 2) замыкаются контакты реле и тем самым включается питание электродвигателя, что позволяет производить непрерывную регистрацию. Весь каскад монтируется на месте лампы L_{10} осциллографа С1-4.

Известно, что экспозиция на фотопленку при съемках с экрана осциллографов зависит от скорости пробега луча. Следовательно при изменении указанной скорости, что бывает необходимым в условиях эксперимента, полученные фотокadres бывают различной плотности, а последнее затрудняет качественное отпечатывание. Для предотвращения этого разработан блок управления яркостью лучей, схема которого дана на рис. 3. Напряжение управления яркостью передается через лампу L_2 на модулирующий электрод осциллографа С1-27. Яркость на экране устанавливается минимальная, а подбор необходимой яркости производится потенциометром R_1 (рис. 3).

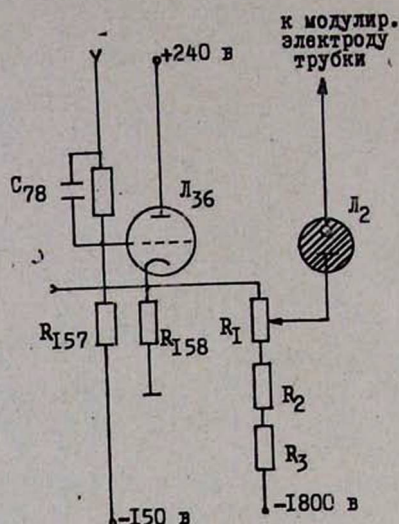


Рис. 3. Электрическая схема блока управления яркостью лучей осциллоскопа С1-27: R_1 — 180 ком, R_2 — 1,0 Мом, R_3 — 1,0 Мом, L_2 — лампа типа СГ-303С.

Все вышеописанные узлы прошли испытание в условиях эксперимента в течение длительного периода, что позволило установить их стабильность в работе и удобство в эксплуатации.

Институт физиологии
АН АрмССР

Поступило 19/II 1970 г.

Կ. Ա. ԱՍՏԱԲԱԹՅԱՆ, Ա. Մ. ԴՈԼԱԲԺՅԱՆ

ԱՌԱՆՁԻՆ ՆԵՐՎԱԲՋԻՋՆԵՐԻ ԷԼԵԿՏՐԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՆԵՐՐՋՋԱՅԻՆ
ԳՐԱՆՅՄԱՆ ՏՆՆՆԻԿԱՅԻ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո մ

Հոգվածում քննարկվում է ներբջջային ուսումնասիրությունների կատարելու համար անհրաժեշտ կոմպլեքս-սարքավորման տարատեսակներից մեկը և նկարագրվում են մեզ մոտ մշակված մի քանի ինքնատիպ սխեմաներ:

Բերվում է հաստատուն հոսանքի նախնական ուժեղացուցչի էլեկտրական սխեման, որը հնարավորություն ունի նաև կոմպենսացնելու «մակարդության» ունակությունները: Նրա ցանցային հոսանքը հավասար է $2 \cdot 10^{-11}$ ամպ., իսկ մուտքային դիմադրությունը կազմում է 10^9 օհմ:

Քննարկվում են նաև օսցիլոսկոպից լուսանկարման դիստանցիոն ղեկավարման կիսաավտոմատի աշխատանքի, ինչպես նաև օսցիլոսկոպի ճառագայթի լուսավորության պայծառության ղեկավարման սկզբունքները, որոնք

թույլ են տալիս ճանապարհի տարբեր արագություններով անցման ժամանակ լուսաթափանչների վրա ստանալ միատիպ պատկերներ:

Ներկայացված հանգույցներն անցել են երկարատև փորձարկում, որը թույլ է տվել հայտնաբերել նրանց կայունությունն աշխատանքում և հարմարակետությունը օգտագործման ժամանակ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Долобджян А. М., Астабатьян К. А. Тезисы докладов I Всесоюзного семинара: развитие физиологического приборостроения для научных исследований в биологии и медицине. М., 1966, стр. 95.
2. Костюк П. Г. Микроэлектродная техника. Киев, 1960.
3. Мецкерский Р. М. Методика микроэлектродного исследования. М., 1960.
4. Шанне О., Лавалле М., Лапард Р., Ганье С. Труды Института инженеров по электротехнике и радиотехнике (США), т. 56, 1968, 6, стр. 197.
5. Nastuk W., Hodgkin A. J. Cell. Comp. Physiol., 1950, 35, 39.