



УДК 576.8.093.6

Д. Ю. БУДЬКО, Л. Л. МОРОЗ, В. Т. ШАЛАТОНИН

УСТРОЙСТВО ДЛЯ МИКРОЭЛЕКТРОДНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ОСНОВНЫХ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК

Микроэлектродный метод в обозримом будущем останется одним из основных в фундаментальных и прикладных физиологических исследованиях [1, 2]. Характерной особенностью этого метода становится комплексное, полифункциональное применение микроэлектродов (МЭ) в одном эксперименте: регистрация спонтанной электрической активности клетки, ее раздражение, регистрация трансмембранных ионных токов и определение пассивных характеристик мембраны, исследование межклеточных связей и синаптических потенциалов, инъекция и аппликация физиологически активных веществ и красителей, маркирование и инактивация клетки, определение активности ионов и ферментов [3, 4]. Современное электрофизиологическое устройство для микроэлектродных исследований должно отличаться значительной универсальностью, что позволит решать задачи на различных объектах.

Предлагаемое устройство состоит из двух блоков (рис. 1): питания (БП) и трехмикроэлектродного анализатора (ТА). БП представляет собой два компенсационных стабилизатора напряжения, соединенных по схеме с двухполярным выходом. ТА состоит из трех функционально независимых модулей регистрации (МР), которые могут использоваться как в автономном режиме по одноэлектродной методике, так и в комплексе при анализе нейронных сетей. Каждый МР позволяет экспериментатору производить регистрацию внутриклеточного потенциала, используя МЭ с сопротивлением до 100 МОм, раздражать клетку постоянным поляризующим током и толчками поляризующего тока, задаваемыми внешним генератором, фиксировать ток через микроэлектрод в режимах ионофоретической аппликации, инъекции веществ, компенсировать емкость входных цепей, работать в режиме импульсной перекompенсации входной емкости, облегчающей прокол мембраны клетки, редактировать регистрируемый сигнал (усиление с одно-

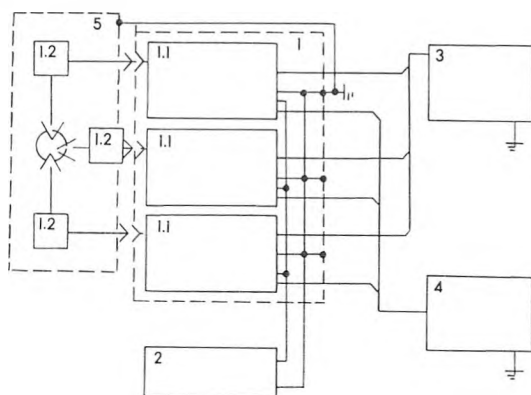


Рис. 1. Схема установки для микроэлектродных исследований клеток:

1 — трехмикроэлектродный анализатор; 1.1 — модуль регистрации; 1.2 — выносной предусилитель; 2 — блок питания; 3 — блок регистрирующего оборудования; 4 — трехканальный генератор импульсов; 5 — экранированная камера

временным, регулируемым ограничением сверху при регистрации синаптических потенциалов). Принципиальная схема одного МР изображена на рис. 2. МР имеет выносную головку-пробник с магнитным держателем для установки на позиционере манипулятора. Пробник соединен с основным блоком МР семижильным плоским кабелем 1,5 м. В корпусе пробника находится операционный усилитель DA1, включенный по схеме повторителя напряжения. Усилитель DA2 формирует сигнал положительной обратной связи и выполняет функцию компенсации входной емкости. Настройка цепи компенсации осуществляется R17. МР постоянно находится в режиме фиксации тока через МЭ. Дифференциальным усилителем DA4 измеряется падение напряжения на R1, и сигнал на его выходе пропорционален току через R1.

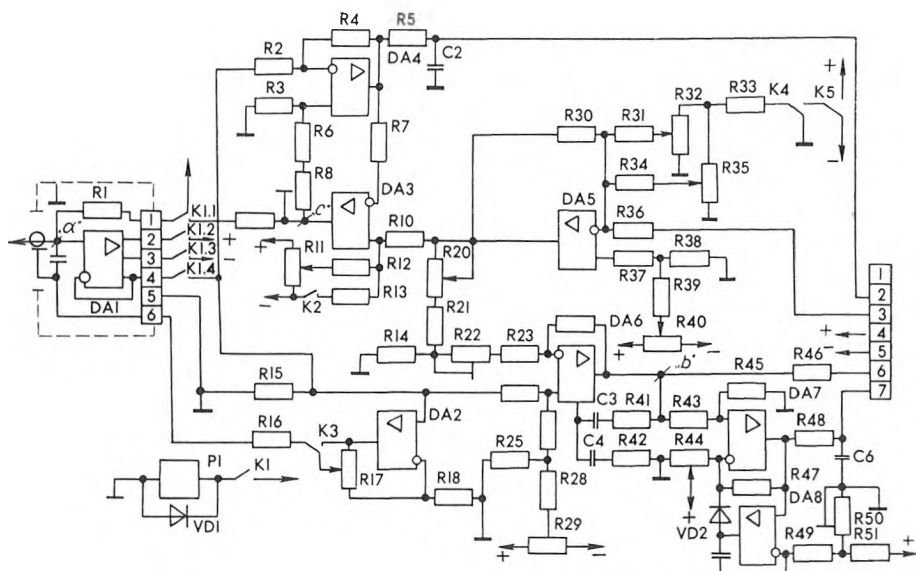


Рис. 2. Принципиальная схема модуля регистрации с выносным предусилителем

Спецификация: D1 — Д311; C1 — 1нФ; C2 — 2200пФ; C3 — 1500пФ; C4 — 47000пФ; C5 — 300пФ; C6 — 2200пФ; R1 — 100 МОм; R2 — 10 кОм; R3, R4 — 10 кОм 0,5%; R5, R48 — 1 кОм; R6 — 9,1 кОм; R7, R10, R18, R40, R49 — 10 кОм; R8 — 15 кОм; R9, R14, R16, R21 — 200 Ом; R11 — 36 кОм; R12 — 5,1 МОм; R13 — 1,5 МОм; R15 — 2 кОм; R17, R30, R39, R51 — 100 кОм; R20, R29 — 10 кОм 5%; CП5-356; R22 — 42 кОм; R23 — 5,6 кОм; R24, R43, R47 — 47 кОм; R25 — 300 кОм; R26, R27, R45 — 470 кОм; R28 — 390 кОм; R31 — 1 МОм; R32 — 47 кОм; R35 — 68 кОм; R33 — 4,7 кОм; R37 — 33 кОм; R38 — 100 Ом; R41 — 270 Ом; R42 — 27 Ом; DA1 — КР544УД2А; DA2 — КР140УД8; DA3, DA4, DA5, DA7, DA8 — КР140УД708; DA6 — К153УД5

DA1, DA3, DA4 формируют цепь фиксации тока с большим выходным сопротивлением. Сигнал на выходе DA3 создает на R1 падение напряжения, равное разности сигналов на его инвертирующем и неинвертирующем входах. Таким образом, если цепь фиксации тока не возбуждается по неинвертирующему входу DA3, она выполняет функцию компенсации пассивной утечки через МЭ, которая может быть вызвана диффузией электролита и другими явлениями [3], а также функцию компенсации утечки при изменениях внутриклеточного потенциала. Последнее достигается поддержанием на выходе D3 сигнала, равного внутриклеточному потенциалу. Ток в таких условиях через R1 отсутствует. При замыкании кнопки K2 через МЭ течет ток I_{nA} , и падение напряжения на МЭ в мВ равняется его сопротивлению в МОм. При протекании тока через МЭ на нем возникает падение напряжения, которое суммируется с внутриклеточным потенциалом. DA6 — дифференциальный усилитель с коэффициентом усиления 10, выполняющий функции выделения внутриклеточного потенциала из его суммы с падением напряжения на МЭ и компенсации собственного потенциала МЭ.

Вычитание падения напряжения на МЭ осуществляется двухоборотным потенциометром R20, компенсация собственного потенциала МЭ — R29. А5 — дифференциальный усилитель, суммирующий сигналы постоянного смещения «грубо» и «плавно», устанавливаемые резисторами R32, R35, импульсного смещения и компенсации утечки — R40.

DA7, DA8 — цепь, представляющая собой усилитель-ограничитель с коэффициентом усиления 10 и независимой регулировкой смещения постоянной составляющей потенциометром R44. Потенциометром R50 устанавливается уровень ограничения сверху. К1 — переключатель функции МЭ, в показанном положении через МЭ можно пропускать высоковольтные сигналы до 100 В, например, для пробы катионной пробки или фиксации потенциала по двухмикроэлектродной методике (МЭ выполняет функцию фиксирующего). К3 — кнопка перекомпенсации входной емкости, К4 — включается постоянное смещение, К5 — выбирается полярность постоянного смещения, R8 — устанавливается максимальное значение входного сопротивления.

Функциональная спецификация МР: входное сопротивление не менее 10 ГОм; ток утечки компенсируется в диапазоне 0 ÷ 10 мА; рабочая область входных напряжений ± 20 В от источника с низким импедансом; емкость входных цепей компенсируется до 15 пФ, потенциал микроэлектрода — ± 60 мВ; выходные сопротивления цепи подведения тока не менее 10 ГОм; ток поляризации регистрируется в пределах ± 130 нА для сопротивления нагрузки 0 Ом и ± 65 нА для сопротивления нагрузки 100 МОм; усиление сигнала 10 для регистрации внутриклеточного потенциала и 100 для регистрации синаптических потенциалов; мостовая схема балансируется для сопротивления МЭ 5 ÷ 150 МОм; время нарастания 100 мкс для сопротивления МЭ 50 МОм, полоса пропускания 10 кГц для канала внутриклеточного потенциала и 3 кГц для канала постсинаптических потенциалов; уровень шумов не превышает 100 мкВ в среднеквадратичном значении для источника сигнала с сопротивлением до 30 МОм в полосе до 10 кГц; температурный дрейф не более 100 мкВ/к.

Настройка МР осуществляется в следующем порядке. Подается прямоугольный импульсный сигнал на точку «а». Потенциометром R8 в точке «с» устанавливается сигнал, равный сигналу в «а» с точностью не хуже 1 %. Поочередно соединяя «а» с землей непосредственно и через сопротивление 20 ÷ 50 МОм, регулировкой R11 добиваются отсутствия смещения в «b». Потенциометром R22 в «b» устанавливается сигнал в 10 раз больше, чем в «а». Точка «а» соединяется с землей, и потенциометром R40 в «с» устанавливается «0».

Список литературы

1. Пёрвис Р. // Микроэлектродные методы внутриклеточной регистрации. М., 1983.
2. Кэндел Э. // Клеточные основы поведения. М., 1980.
3. Александров А. А. // Метод электрофореза в физиологии. Л., 1983.
4. Neurobiology of the leech Ed M. Kenneth Y. e. q. New York; London, 1981. P. 320.

УДК 599.0-15

В. Ф. ТЕРЕХОВИЧ, Н. Е. БУРКО

ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И ЧИСЛЕННОСТЬ МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПОЛЕСЬЯ

В Припятском Полесье БССР ведется большой объем осушительной мелiorации, обвалование ряда рек, а также трансформация естественных пойменных систем и прилегающих территорий в агроценозы и культурные сенокосы с созданием обширных полейдерных систем. Все это,