

А. В. БУШ, Л. Н. КОЩЕЕВ

(Новосибирск)

БЛОК ФИКСАЦИИ ПОТЕНЦИАЛА НА МЕМБРАНЕ КЛЕТКИ

Метод фиксации потенциала (ФП), как известно [1], является одним из основных приемов исследования электровозбудимых мембран, который позволяет определять количественные характеристики их ионных каналов. Исследования по этому методу проводятся с применением электронной аппаратуры, осуществляющей удержание мембранного потенциала на заданном уровне и измерение тока, протекающего в этом случае через мембрану клетки.

В данной статье рассматривается блок ФП, используемый нами в системе, описанной ранее [2]. Схема блока ФП реализована на интегральных микросхемах и позволяет осуществлять режимы ФП и фиксации тока, измерение сопротивления используемых микроэлектродов непосредственно в экспериментальной установке, контроль их введения в клетку, автоматическое (от системы) включение режимов ФП и фиксации тока, калибровку измерительных цепей блока.

Функциональная схема блока фиксации (рис. 1) состоит из следующих узлов: двух идентичных микроэлектродных усилителей У1 и У4, преобразователя тока У2, схемы сравнения и формирования сигнала ошибки У3, инвертирующего каскада У5, схемы определения сопротивления микроэлектродов и калибратора У6.

Основной принцип работы блока фиксации (в режиме ФП) заключается в следующем: на У3 через У5 подается командный потенциал V , который сравнивается с внутриклеточным потенциалом, регистрируемым микроэлектродным усилителем У1. Разность потенциалов между этими сигналами усиливается, инвертируется, и через микроэлектрод Э2 на клетку подается ток, который удерживает внутриклеточный потенциал равным V . Ток, необходимый для удержания мембранного потенциала на заданном уровне, протекает через мембрану и последовательно включенные с ней индифферентный электрод Э_н и измеритель тока У2. Поскольку $U(t)$ пропорционально току, протекающему через мембрану, то этим обеспечивается управление фиксируемым током.

Усилитель У4 служит для контроля введения в клетку микроэлектрода Э2 и для измерения сопротивления микроэлектродов. Каскад У5 инвертирует командный потенциал V , поступающий с выхода ЦАП.

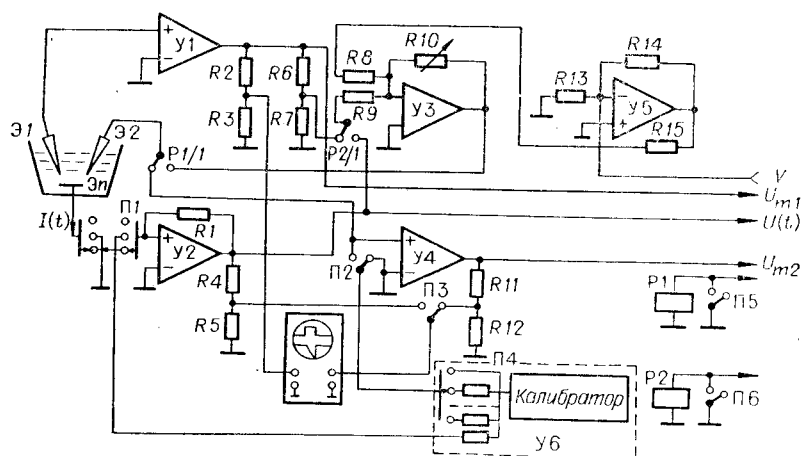
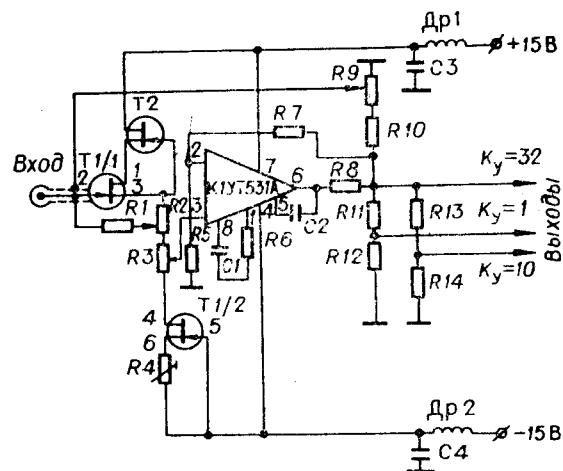


Рис. 1. Функциональная схема.

Рис. 2. Микроэлектродный усилитель:

R_1 — 1 ГОм, R_2, R_4 — 1 кОм, R_3 — 330 Ом, R_5 — 3 кОм, R_6 — 1,5 кОм, R_7 — 93 кОм, R_8 — 51 Ом, R_9 — 3,3 кОм, R_{10} — 30 кОм, R_{11} — 6,8 кОм, R_{12} — 220 Ом, R_{13} — 6,8 кОм, R_{14} — 3,1 кОм; C_1 — 1000 пФ, C_2 — 56 пФ, C_3, C_4 — 0,15 мкФ; Др1, Др2 — 200 мкГн; Т1 — КПС104Б, Т2 — КП302В.



С помощью реле Р1 и Р2 осуществляется включение режимов ФП или фиксации тока, причем Р2 задает схеме необходимый режим, а через Р1 производится включение этого режима на клетку. На рис. 1 оба режима показаны выключенными. Автоматическое управление от системы этими реле обеспечивается через модуль «Выходной регистр». Через переключатели П5 и П6 экспериментатор получает возможность ручного управления режимами, которое имеет приоритет перед автоматическим.

Рассмотрим более подробно отдельные узлы блока фиксации и в ходе этого проведем анализ его функционирования при работе с первыми клетками.

Микроэлектродный усилитель (рис. 2) предназначен для работы с высокоомными (1—50 МОм) электродами. Для увеличения входного сопротивления, уменьшения входных токов и шумов, а также компенсации входной емкости усилителя применена схема истокового повторителя на сдвоенном полевом транзисторе Т1 типа КПС-104А со стабилизатором тока [3]. Такая схема, кроме того, значительно уменьшает температурные и временные дрейфы входного каскада усилителя. Во втором каскаде использовалась микросхема К1УТ531А, осуществляющая усиление регистрируемого сигнала по напряжению ($K_v = 32$). С помощью R_3 регулируется «нуль» на выходе усилителя, а R_{13} и R_{14} обеспечивают получение $K_v = 10$ для подключения осциллографа. С выхода усилителя через R_9 подается сигнал положительной обратной связи для компенсации суммарной входной емкости усилителя, микроэлектрода с держателем и подводящего кабеля. Было изготовлено более десятка таких усилителей, которые имели следующие характеристики: входное сопротивление 10^{10} — 10^{11} Ом, входной ток 10^{-11} — 10^{-12} А (зависит от параметров микросхемы КПС 104А), температурный дрейф 40 мкВ/°С, уровень шумов 5 мкВ (эффект), коэффициент усиления (основной) 32, полоса пропускания 0—20 кГц, выходное сопротивление 100 Ом. Конструктивно микроэлектродный усилитель выполнен в корпусе, обеспечивающем надежную экранировку.

Схема сравнения и формирования сигнала ошибки (рис. 3) обеспечивает сравнение регистрируемого на клетке и задаваемого потенциалов и усиление полученного сигнала их разности. Для сравнения потенциалов используется операционный усилитель в режиме сумматора, выполненный на микросхеме типа К1УТ531. Во втором каскаде осуществляется усиление пайденной разности по напряжению.

Для получения в установившемся режиме погрешности фиксации потенциала и тока, не превышающей заданного значения, необходимо обеспечить соответствующий коэффициент усиления данной схемы. Относительная погрешность фиксации

$$\delta = (V - U_M) / U_M, \quad (1)$$

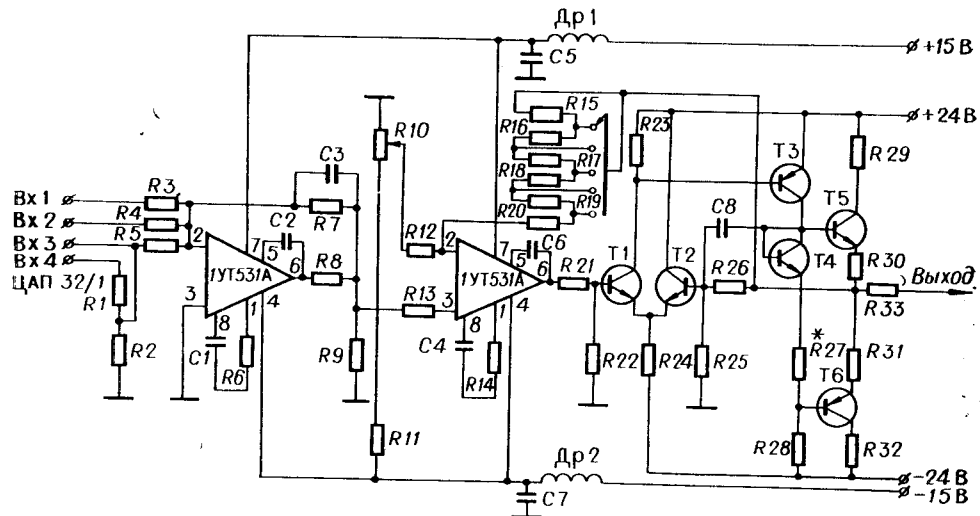


Рис. 3. Схема сравнения и формирования сигнала ошибки:
 $R_1 - 1,1 \text{ кОм}$, $R_2 - 360 \text{ м}$, $R_3 - R_5 - 10 \text{ кОм}$, $R_6, R_{14} - 1,5 \text{ кОм}$, $R_7 - 1 \text{ кОм}$, $R_8, R_{21} - 51 \text{ Ом}$, $R_9 - 2 \text{ кОм}$, $R_{10} - 330 \text{ Ом}$, $R_{11} - 8 \text{ кОм}$, $R_{12} - R_{13} - 10 \text{ кОм}$, $R_{15} - R_{20} - 200 \text{ кОм}$, $R_{22} - R_{25} - 5,1 \text{ кОм}$, $R_{23} - 620 \text{ Ом}$, $R_{24} - 1,1 \text{ кОм}$, $R_{26} - 30 \text{ кОм}$, $R_{27} - 260 \text{ Ом}$, $R_{28} - 11 \text{ кОм}$, $R_{29}, R_{32} - 430 \text{ Ом}$, $R_{30} - R_{31} - 30 \text{ Ом}$; $C_1 - C_4 - 1000 \text{ пФ}$, $C_2, C_8 - 47 \text{ пФ}$, $C_3 - 10 \text{ пФ}$, $C_5, C_7 - 0,15 \text{ мкФ}$, $C_8 - 51 \text{ пФ}$; Др1, Др2 - 200 мкГн; Т1, Т2, Т4, Т5 - КТ315И, Т3, Т6 - КТ361В.

где U_m — мембранный потенциал, V — задаваемый потенциал (командный).
 Уравнение, описывающее режим фиксации [3]:

$$K(V - U_m) = R_s I + R_m I. \quad (2)$$

Здесь K — коэффициент усиления; R_s — сопротивление микроэлектрода; I — ток, протекающий через микроэлектрод и мембрану; R_m — сопротивление мембраны.

На основании (1) и (2)

$$K = ((R_s/R_m) + 1)/\delta. \quad (3)$$

При $\delta = 1\%$, $R_s = 10^7 \text{ Ом}$, $R_m = 10^5 \div 10^8 \text{ Ом}$ K должен быть $100 \div 10\,000$ соответственно.

В петле обратной связи устройства ФП, имеющей значительный K , могут возникнуть автоколебания. Для их подавления требуется, чтобы постоянная времени τ_n «нагрузки» (мембрана — микроэлектрод) была много больше, чем постоянная времени усилителя τ_y . В работе [4] для устранения автоколебаний рекомендуется выполнять соотношение

$$\tau_n/\tau_y \approx 4K, \quad (4)$$

где

$$\tau_n = (R_m + R_s)C_m. \quad (5)$$

Реально τ_y имеет величину значительно меньше, чем τ_n .

На основании (4) и (5) для устранения возбуждения существенную роль играют K и R_s . Поэтому при работе с клетками, имеющими различные сопротивления мембраны во втором каскаде схемы, предусмотрена ступенчатая регулировка $K(4, 8, 16, 32, 64, 128)$.

В экспериментальных измерениях характеристик методом ФП на мембрану подаются прямоугольные импульсы; и в этом случае важным параметром блока ФП является время установления потенциала на мембране (t), которое определяется величиной емкости мембраны (C_m) и допустимой величиной тока через микроэлектрод I_m :

$$t = U_m C_m / I_m. \quad (6)$$

Максимальные значения параметров в формуле (6) могут быть следую-

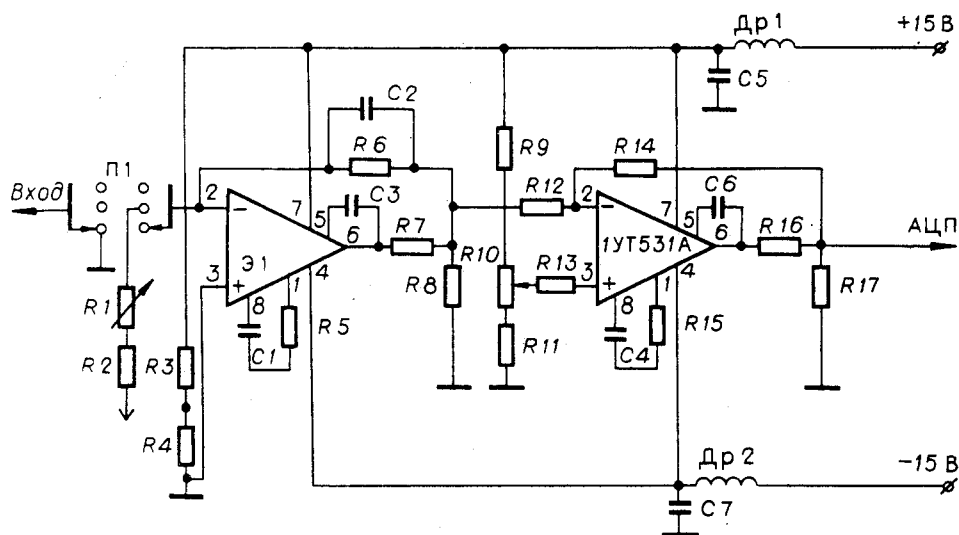


Рис. 4. Преобразователь тока:

$R_{12} - 470 \text{ кОм}$, $R_2 - 1,8 \text{ кОм}$, $R_3 - 15 \text{ кОм}$, $R_4 - 20 \text{ Ом}$, $R_5, R_{15} - 1,5 \text{ кОм}$, $R_6 - 1 \text{ МОм}$, $R_7, R_{16} - 51 \text{ Ом}$, $R_8, R_{17} - 2 \text{ кОм}$, $R_{12}, R_{13} - 20 \text{ кОм}$, $R_9 - 10 \text{ кОм}$, $R_{10} - 330 \text{ Ом}$, $R_{11} - 150 \text{ Ом}$, $R_{14} - 200 \text{ кОм}$; $C_1, C_4 - 1000 \text{ пФ}$, $C_2 - 20 \text{ пФ}$, $C_3, C_6 - 47 \text{ пФ}$, $C_5, C_7 - 0,15 \text{ мкФ}$; $\text{Др}_1, \text{Др}_2 - 200 \text{ мкГн}$, $\text{Э}_1 - \text{К1УД284А}$.

щами: амплитуда импульса (U_m), подаваемого на клетку, как правило, не превышает 100 мВ от потенциала покоя клетки; допустимое значение тока через микроэлектрод $I_m = 10^{-6} \text{ А}$ [3]; емкость мембраны 10 000 пФ. На основании этого максимальное время установления мембранного потенциала при указанных значениях не превышает 1 мс.

Выходное напряжение ($U_{\text{вых}}$) этой схемы, обеспечивающее необходимый ток (I_m) для удержания мембранного потенциала на заданном уровне, можно определить из соотношения

$$U_{\text{вых}} = I_m(R_o + R_m) \quad (7)$$

при $I_m = 10^{-6} \text{ А}$, $R_o = R_m = 10 \text{ МОм}$, выходное напряжение $U_{\text{вых}} = 20 \text{ В}$.

На выходе схемы сравнения и формирования сигнала ошибки применен балансный каскад с напряжением питания $\pm 24 \text{ В}$. Конструктивно узел выполнен в отдельном кожухе с разъемами для подключения микроэлектродного усилителя и управляющего сигнала.

Преобразователь тока. Для построения измерителей малых токов, имеющих небольшое входное сопротивление, широкое распространение находят устройства, использующие образцовый резистор, включенный в цепь отрицательной обратной связи операционного усилителя [5]. Схема разработанного преобразования тока, основанного на этом принципе, представлена на рис. 4, где в качестве резистора цепи обратной связи служит высокоомное композиционное сопротивление (типа КВМ или КЛМ), имеющее температурный коэффициент $0,25\% / ^\circ\text{C}$ [5].

Эквивалентное входное сопротивление преобразователя $R_{\text{вх}}$, при котором максимальный ток, протекающий через мембрану, создает падение напряжения, не превышающее заданного значения $U_{\text{доп}}$, определяется из соотношения

$$U_{\text{доп}} \leq R_{\text{вх}} I_m. \quad (8)$$

Отсюда при $I_m = 10^{-6} \text{ А}$ и $U_{\text{доп}} = 1 \text{ мВ}$ $R_{\text{вх}}$ не должно превышать 1 кОм. Входное сопротивление устройства зависит от сопротивления резистора обратной связи R_6 и коэффициента усиления схемы:

$$R_{\text{вх}} \geq R_6 / K. \quad (9)$$

Для микросхемы типа К284УД1А, имеющей коэффициент усиления $K_1 = (20-80)10^3$, R_6 должно быть меньше $20 \cdot 10^8 \text{ Ом}$.

Минимальная величина тока, которая может быть измерена преобразователем тока, определяется его собственными шумами ($i_{ш}$). Одна из компонент шума создается сопротивлением преобразующего резистора, и ее можно рассчитать по формуле Найквиста:

$$i_{ш} = \sqrt{(4kT\Delta f)/R}. \quad (10)$$

При $R = 1 \text{ МОм}$, $T = 290 \text{ К}$ $i_{ш} = 1,3 \cdot 10^{-11} \text{ А}$.

Для обеспечения необходимой полярности сигнала на выходе, калибровки преобразователя, коррекции его нуля введен второй каскад, работающий в режиме усиления по напряжению. Он выполнен на микросхеме К1УТ531А. Необходимое в этом случае значение коэффициента усиления второго каскада (K_2) вычислим исходя из условия согласования со шкалой АЦП. Цена младшего разряда по напряжению используемого АЦП $U_{MP} = 8 \text{ мВ}$, а по току желательно иметь $I_{MP} = 10^{-9} \text{ А}$. Тогда при $R_6 = 1 \text{ МОм}$

$$K_2 = U_{MP}/I_{MP}R_6 = 8. \quad (11)$$

При таком двухкаскадном построении преобразователя он может быть легко перестроен для измерения тока в другом диапазоне значений или при изменении значения младшего разряда АЦП.

Для учета шумового вклада всех элементов устройства было проведено экспериментальное измерение шумового тока (приведенного ко входу) схемы в целом. Измерения амплитуды шумовой полосы в области частот от 0,5 Гц до 50 кГц осуществлялись по осциллографу, подключенному к выходу преобразователя. Они проводились как при короткозамкнутом входе преобразователя, так и при подключении к нему синусоидального напряжения с генератора звукового диапазона через резистор, значение которого соответствовало сопротивлению мембраны клетки. В последнем случае подавался синусоидальный ток амплитуды 10^{-9} А . Измеренная по осциллографу амплитуда шумовой полосы пересчитывалась в величину соответствующего входного тока, и она оказалась равной $7 \cdot 10^{-11} \text{ А}$. Конструктивно преобразователь выполнен в отдельном кожухе с разъемами для подключения входного сигнала от клетки и двумя выходными разъемами: один для подключения осциллографа, другой для подключения к АЦП.

Калибратор и измеритель сопротивления микроэлектродов. При работе методом ФП важное значение имеет внутреннее сопротивление микроэлектродов. Проверку на пригодность микроэлектродов для работы целесообразно проводить непосредственно в экспериментальной установке после их закрепления. Кроме того, такая проверка устраняет возможность оставить незамеченной поломку кончиков микроэлектродов при переходе в процессе работы с одной клетки на другую. Для этих целей в блок ФП был введен специальный узел — измеритель сопротивления микроэлектродов (У6), имеющий в своем составе калибратор.

Калибратор (рис. 5) представляет собой генератор синусоидального напряжения частотой 10 Гц с амплитудой 100 мВ и предназначен, кроме того, для проверки микроэлектродных усилителей и преобразователя тока. Проверка преобразователя

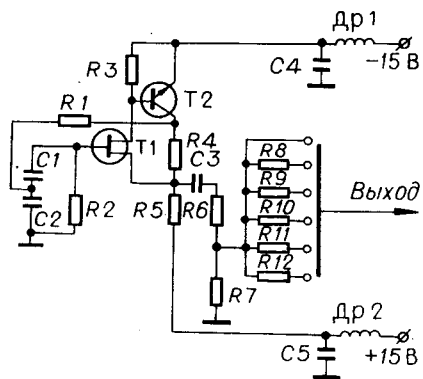


Рис. 5. Калибратор:

$R_1 - 510 \text{ кОм}$, $R_2, R_8 - 1 \text{ МОм}$, $R_3 - 570 \text{ Ом}$, $R_4 - 10 \text{ кОм}$, $R_5 - 11,3 \text{ кОм}$, $R_6 - 100 \text{ кОм}$, $R_7 - 1 \text{ кОм}$, $R_9 - 1 \text{ МОм}$, $R_{10} - 2 \text{ МОм}$, $R_{11} - 8 \text{ МОм}$, $R_{12} - 16 \text{ МОм}$; $C_1 - 0,2 \text{ мкФ}$, $C_2 - 0,1 \text{ мкФ}$, $C_3 - 5,0 \text{ мкФ}$, $C_4, C_5 - 0,15 \text{ мкФ}$; Др1, Др2 — 200 мкГн; Т1 — КП103, Т2 — КТ315Г.

проводится по осциллографу при подключении к его входу сигнала с калибратора через резистор сопротивлением 100 МОм. В этом случае на преобразователь подается синусоидальной формы сигнал тока с максимальной амплитудой 10^{-9} А.

Измерение сопротивления микроэлектрода на переменном токе осуществляется следующим образом. В цепь микроэлектрода, опущенного в раствор, от калибратора через одно из эталонных сопротивлений подается сигнал. По экрану осциллографа, подключенного к выходу этого микроэлектродного усилителя, оценивается амплитуда регистрируемого сигнала. Номинал того из переключаемых эталонных сопротивлений, которое уменьшает амплитуду сигнала вдвое по сравнению с соединением без сопротивления, укажет на величину сопротивления микроэлектрода. Ряд эталонных сопротивлений, подключаемых через переключатель, выбран соответствующим значениям сопротивлений микроэлектродов, обычно применяемых при работе с клетками нейронов (1, 2, 4, 8, 16 МОм). При таком способе измерения наличие некоторого потенциала и емкости у кончика микроэлектрода не сказывается на результатах измерения за счет того, что выбранные значения тока и частоты калибратора имеют малую величину [3].

Все описанные узлы блока фиксации объединены на одном шасси с общей передней панелью. Питание блока осуществляется от источника крейта КАМАК напряжением ± 24 В. Это напряжение в самом блоке фиксации дополнительно стабилизируется и фильтруется, а затем амплитудой ± 15 В подается для питания его узлов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ходоров Б. И. Общая физиология возбудимых мембран.— М.: Наука, 1975.
2. Буш А. В. и др. Система автоматизации исследований характеристик возбудимых мембран.— В кн.: Автоматизация эксперимента. Новосибирск: изд. ИГиЭ СО АН СССР, 1976, с. 184—189.
3. Приборы и методы для микроэлектродного исследования клеток/Под ред. Б. П. Вепринцева, И. В. Крастса.— Пушкино: изд. Ин-та биол. физики, 1975, с. 42—61; 103—114; 149—160.
4. Катц Г. М., Швартц Г. Л. Некоторые проблемы и критерии клампирования потенциала возбудимых клеток.— В кн.: Достижения медицинской и биологической техники. М.: Медицина, 1971, с. 185—186.
5. Гутников В. С. Применение операционных усилителей в измерительной технике.— Л.: Энергия, 1975.

Поступила в редакцию 9 апреля 1979 г.