

Методика дослідження електричних властивостей нервових і м'язових волокон за допомогою поверхневих позаклітинних електродів

Д. П. Артеменко, М. Ф. Шуба

Лабораторія електрофізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця
Академії наук УРСР, Київ

Виявити дуже малі зміни мембранного потенціалу нервових або м'язових волокон за допомогою поверхневих позаклітинних електродів майже не вдається у зв'язку з шунтуючим впливом тоненького шару розчину, що вкриває волокна. Цією обставиною зумовлюється також значне зменшення, наприклад, струму пошкодження і струму спокою нерва або м'яза порівняно із справжньою величиною мембранного потенціалу спокою волокон, що вимірюється за допомогою внутріклітинних мікроелектродів. Але на шляху застосування цих електродів щодо нервових (головним чином хребетних тварин) і особливо гладком'язових волокон ми натрапляємо на значну перешкоду, пов'язану з дуже малим діаметром цих волокон. Введення всередину таких волокон мікроелектрода спричиняє значне їх пошкодження, що часто веде до швидкого зменшення вимірюваних електричних потенціалів до нуля. У гладком'язових волокнах справа ускладнюється ще й тим, що більшість з цих волокон спонтанно скорочуються і це тільки посилює пошкоджуючу дію мікроелектрода. Такі волокна часто гинуть.

Всі ці перешкоди можна усунути застосуванням методики «сахарозного містка», яку запропонував Стемплі (1954) для вимірювання мембранного потенціалу пучка нервових волокон.

Коротко суть цієї методики полягає ось у чому. Ділянку нерва між відповідними електродами безперервно промивали проточним ізотонічним розчином сахарози, що має досить високий питомий опір (10^6 ом·см). Внаслідок цього шунтуюча дія поверхневого шару рідини, що вкриває нерв і нервові волокна між відповідними електродами, зменшується настільки, що вдається відводити і реєструвати близько 80—90% справжньої величини мембранного потенціалу волокон. Вимірювана цим способом величина електричних потенціалів дорівнює справжній їх величині, помноженій на так званий фактор короткого замикання (K), що обчислюється за формулою

$$\frac{R_p}{R_p + R_n},$$

де R_p означає опір зовнішнього розчину на одиницю довжини, R_n — опір плазми на одиницю довжини. Згодом ця методика була застосована для дослідження електричних потенціалів нервових волокон групи С теплокровних тварин [9], гігантського аксона кальмара [6] і гладком'язових волокон таenia coli морської свинки [4].

В останні роки ця методика була вдосконалена і набула ще більш широкого застосування [2, 3, 8, 10].

З деякими видозмінами ми пристосували цю методику для одночасного вимірювання і реєстрації зміни мембранного потенціалу спокою, потенціалів дії і фізичного електротону пучка нервових і м'язових волокон. Переконавшись у значній простоті і зручності цієї методики, ми вважаємо, що вона може бути з успіхом застосована для дослідження зміни електричних властивостей нервових або м'язових волокон під впливом найрізноманітніших зовнішніх факторів.

Об'єктом дослідження може бути кожна тканина, що складається з: 1) видовжених паралельних волокон або клітин (нервові, поперечносмугасті м'язові волокна); 2) клітин, з'єднаних у довжину суцільним морфологічним утворенням (синцитій), або таких, які мають дуже малий перехідний опір у місці контакту двох клітин. Бажано, щоб діаметр пучка волокон (або клітин) не перевищував 1 мм, довжина 15—20 мм. Дуже зручним об'єктом для дослідження електричних властивостей поперечносмугастих

тих м'язових волокон може бути м'яз жаби — *m. extensor longus digiti IV*. Цей м'яз містить лише 20—60 паралельних волокон, завдяки чому діаметр його досить малий (0,4—0,8 мм). Довжина м'яза — 12—20 мм. Невибачливим і зручним об'єктом для дослідження електричних властивостей гладком'язових волокон може бути пучок цих волокон з кільцевих м'язів шлунка жаби.

Плексигласова камера, в якій знаходиться препарат (а), складається з п'яти секцій (рис. 1, б), виготовлених з окремих плексигласових пластинок (рис. 1, А, Б, В). Секції камери (б) відокремлені тоненькими гумовими перегородками (г); відстань між якими становить 4 мм. В тестуючій середній секції (рп) відстань між гумовими перегородками менше 2 мм. В кожній перегородці проштамповано маленький отвір (д), через який проходить препарат в камері. Щоб запобігти змішуванню розчинів,

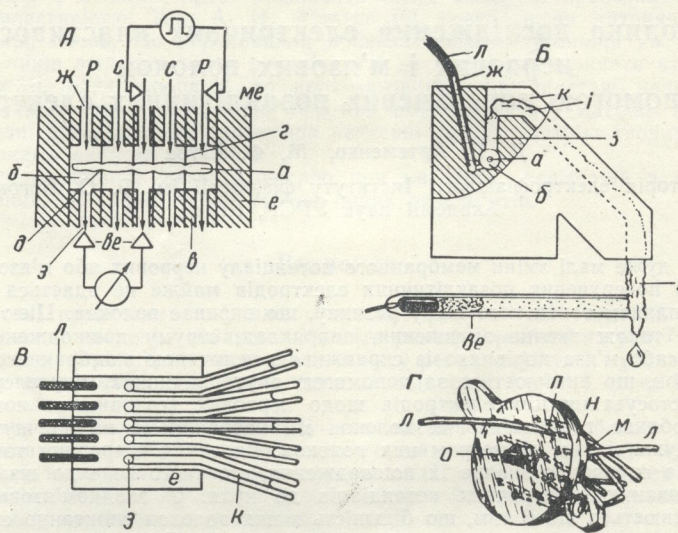


Рис. 1.

А — принципальна схема будови камери та розміщення в ній препарату. Б — будова секції камери (вид збоку); В — вигляд камери зверху в зібраному стані; Г — зовнішній вигляд багатоголового крану.

які омивають частини препарату в секціях, діаметр отворів гумових перегородок повинен бути трохи менший від товщини препарату. Зовні бокові секції камери закриваються плексигласовими пластинками (е). Стрілками (рис. 1, А) позначено надходження розчинів у секції камери і вихід їх назовні. В другій і четвертій секціях (рис. 1, А, зліва направо) частини препарату омиваються ізотонічним розчином сахарози (с), в першій, третій і п'ятій — нормальним розчином Рінгера (Р). В третій секції розчин Рінгера можна замінювати тестуючим розчином (рп). Частини препарату, що знаходяться в першій і третій секціях камери, через розчини, що витікають з цих секцій, з'єднуються з відповідними каломельними електродами (ве). Частини ж препарату, в третій і п'ятій секціях через розчини, що притікають, з'єднуються з полярніючими електродами (ме) — $\text{Ag} - \text{AgCl}$.

На рис. 1, Б наводимо схему будови однієї з секцій камери. Всі секції мають однакову будову. Через отвір ж, діаметр якого становить 2,5 мм, розчин надходить до секції камери (б), в якій знаходиться частина препарату (а). Звідси розчин по вивідному отвору (з) і ватному гнотику (і), що знаходиться в жолобку (к), витікає назовні. Ватний гнотик з'єднується з відповідним електродом (ве).

На рис. 1, В показана камера зверху в зібраному вигляді.

«Зарядка» камери препаратом відбувається в такій послідовності. Спочатку навколо кожної секції бокові стінки плексигласових пластинок змазують вазеліном, а потім другу і четверту секції закривають з боків цих пластинок гумовими перегородками, в яких заздалегідь проштамповують отвори. Потім усі секції збирають в єдине ціле, як це показано на рис. 1, В. Але бокові секції ще не закривають плексигласовими пластинками (е). Вазеліном добре приклеюють гумові перегородки до пластинок між секціями і цим запобігають витіканню розчинів між ними, яке могло б шунтувати препарат. Після цього препарат, що знаходиться у ванночці з розчином Рінгера, за допомогою гумової грушки всмоктуємо в скляну трубочку, внутрішній діаметр якої

тільки трохи менше діаметру препарату, а секції камери закривають плексигласовими пластинками (е). Після цього препарат затримують в камері, а трубочку виймають з камери, розділений пере

Для того, щоб препарат не вийшов з камери, її закривають гумовими перегородками, а секції камери закривають плексигласовими пластинками (рис. 1, В). Відповідно до ш

Ізотонічний

розчин. Для проведення хімічного аналізу розчину, який вимірюють, використовують водний розчин, який очищають від електричних смоланих речовин. Для цього розчин розчиняють в 10⁵ ом·см. Пит

на вимірювати розчин, який вимірюють, використовують водний розчин, який очищають від електричних смоланих речовин. Для цього розчин розчиняють в 10⁵ ом·см. Пит

Склад розчину. Для проведення хімічного аналізу розчину, який вимірюють, використовують водний розчин, який очищають від електричних смоланих речовин. Для цього розчин розчиняють в 10⁵ ом·см. Пит

Всі розчини повинні бути стерильними. Для проведення хімічного аналізу розчину, який вимірюють, використовують водний розчин, який очищають від електричних смоланих речовин. Для цього розчин розчиняють в 10⁵ ом·см. Пит

За допомогою крану (рис. 1, Г) розчин надходить до секцій камери (б), в якій знаходиться частина препарату (а). Звідси розчин по вивідному отвору (з) і ватному гнотику (і), що знаходиться в жолобку (к), витікає назовні. Ватний гнотик з'єднується з відповідним електродом (ве).

Щоб запобігти витіканню розчину з камери, її закривають гумовими перегородками, а секції камери закривають плексигласовими пластинками (е).

Апаратура. Вона складається з наступних частин: (Голов і Костюк, 1964) приладом для підключення до електродів кон може бути елемент.

Швидкі зміни потенціалу підсилювачем сигналів.

На рис. 2 наведено схему будови м'язу жаби (*m. extensor digiti IV*). Ця деполяризація підтримується за цих умов одержується з цих ступня дія на волокнах. Як бачимо, вел

IV. Цей м'яз досить малий об'єктом для пучок цих

ється з п'яти (с. 1, А, Б, В). Відстань між гумовими пелюстками (д), кінню розчинів,

тільки трохи більший від товщини препарату. Протилежний кінець трубочки робиться тоненьким, і трубочка разом з препаратом проводиться крізь отвори в гумових перегородках (д). Коли трубочка пройде крізь отвір першої перегородки, вільний кінець препарату, що виступає з трубочки (2 мм), злегка стискується цим отвором і препарат затримується в ньому. Проводячи далі скляну трубку крізь наступні перегородки, частини препарату в їх отворах також трохи стискуватимуться. Нарешті трубку виймають з останньої перегородки, тоді як весь препарат залишається в камері, розділеній перегородками.

Для того, щоб скляна трубка досить легко проходила крізь отвори гумових перегородок, поверхню її заздалегідь змазують вазеліном, а секції камери заповнюють розчином Рінгера. Після цього зовнішні стінки бокових секцій камери закривають плексигласовими пластинками (рис. 1, е) і всю камеру закріплюють у відповідному штативі.

Ізотонічний розчин сахарози готують розчиненням хімічно чистої сахарози у двічі-тричі дистильованій воді. Розчин сахарози можна також очищати від електролітів відповідними іонообмінними смолами. Взагалі питомий опір ізотонічного розчину сахарози повинен бути не менше 10^5 ом·см. Питомий опір розчину сахарози можна вимірювати методом Кольрауша за допомогою містка Уінстона. Живлення містка здійснюється змінним електричним струмом (50 гц). Нуль-приладом служить амперметр для змінного струму. В дослідах слід користуватись тільки свіжим розчином сахарози.

Склад нормального розчину Рінгера залежить від об'єкту, на якому проводиться дослідження. Для вимірювання величин деполяризації мембранного потенціалу спокою волокон готується ізотонічний розчин KCl.

Всі розчини зберігають в окремих скляних маріотівських посудинах, з яких вони по поліхлорвінілових трубках (л) надходять до відповідних секцій камери. Внутрішній діаметр трубок 1 мм. Швидкість течії кожного розчину зберігається постійною протягом досліду і вона становить 20—25 мл/хв. Розчин сахарози, що обмиває препарат в другій та четвертій секціях (с), можна зберігати в одній маріотівській посудині.

За допомогою багатоходового крана, а також завдяки дуже малому об'єму секцій камери нормальний розчин Рінгера можна швидко замінювати на тестуючий розчин (рис. 1, А—Г). Зовнішній вигляд багатоходового крана зображено на рис. 1, Г. Кран складається з двох плексигласових пластинок. На пластинці (м) зроблено по колу декілька отворів, які за допомогою поліхлорвінілових трубок (л) з'єднуються з відповідними розчинами в маріотівських посудинах. Ця пластинка кріпиться до штатива нерухомо і якомога ближче до камери. Пластинка н кріпиться до першої рухомо і вона може повертатись навколо осі (о). В цій пластинці зроблено один отвір (п), який також через поліхлорвінілову трубку з'єднується з третьою секцією камери. Кран відкривається поворотом пластинки н щодо м так, щоб отвори їх збігалися.

Щоб запобігти витіканню розчинів між пластинками крана, вони повинні щільно прилягати одні до одних, а внутрішні їх стінки необхідно змащувати вазеліном.

Апаратура. Відвідні електроди з'єднуються з входом катодного повторювача (Голов і Костюк, 1956), з якого сигнал надходить до підсилювача. Дуже зручним приладом для підсилення і реєстрації повільних змін мембранного потенціалу волокон може бути електронний автоматичний потенціометр типу ЕПП-09.

Швидкі зміни мембранного потенціалу, наприклад потенціалу дії, можна посилювати підсилювачем змінного струму, але реєструючий прилад повинен бути малоінертним.

На рис. 2 наведена величина деполяризації поперечносмугастих м'язових волокон жаби (*m. extensor longus digiti IV*), викликана впливом на них ізотонічного розчину KCl. Ця деполяризація становить 64 мв. Така ж приблизно величина деполяризації одержується за цих самих умов і на пучку мієлінових нервових волокон жаби. Наступна дія на волокна нормального розчину Рінгера веде до відновлення поляризації їх. Як бачимо, величина деполяризації, вимірювана методом «сахарозного містка»,

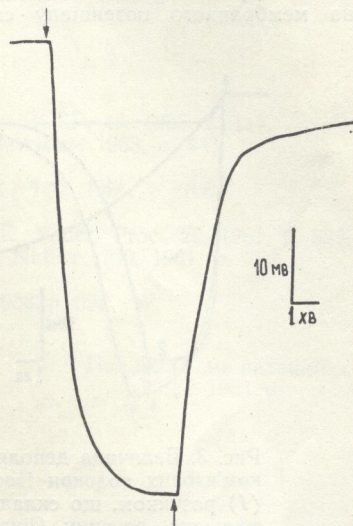


Рис. 2. Величина деполяризації поперечносмугастих м'язових волокон ізотонічним розчином KCl.

Стрілками позначено початок впливу KCl і наступне відновлення поляризації нормальним розчином Рінгера (Р).

перегородок камери закріплено надхотерті секціях розчином сахарозою. В третій секції препарату витікають. Частини ж витікають з по-

секції мають надходить до них по вивідній трубці назов-

ті. Спочатку вазеліном, а потім перегородки в єдине плексигласово-пластинок б'ють шунтувати Рінгера, за допомогою діаметр якої

лише трохи менша деполяризації, вимірюваної за допомогою мікроелектродів, і величина фактора короткого замикання перебуває в межах 0,7–0,8.

На рис. 3 наведена величина деполяризації гладком'язових волокон кільцевих м'язів шлунка жаби, викликана впливом на них ізотонічного розчину KCl (крива 1), а також розчину Рінгера, до якого додавали 117 мМ сухої солі KCl (крива 2). Величина цієї деполяризації відповідно становить 40 і 35 мВ. В літературі нема даних щодо вимірювання величини деполяризації гладком'язових волокон жаби за допомогою мікроелектродів. Тому важко судити, наскільки величина деполяризації, вимірювана методом «сахарозного містка», відрізняється від величини деполяризації, вимірюваної мікроелектродом. Слід відзначити, що в дослідях, наприклад Гревена [5], величина мембранного потенціалу спокою гладком'язових волокон шлунка плямистої

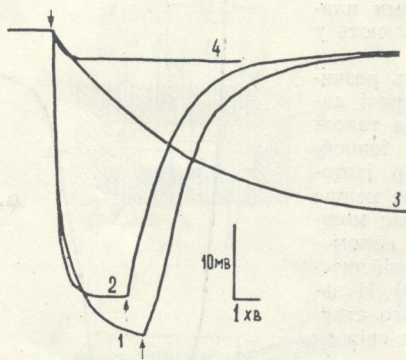


Рис. 3. Величина деполяризації гладком'язових волокон ізотонічним KCl (1) розчином, що складається з нормального розчину Рінгера + 117 мМ сухої солі KCl (2), а також величина дифузійного потенціалу, що виявляється на убитому м'язі при заміні нормального розчину Рінгера на ізотонічний KCl (3) або на нормальний розчин Рінгера + 117 мМ сухої солі KCl.

саламандри була приблизно такою ж (30–50 мВ), як і в наших даних, тоді як величина цього ж потенціалу гладком'язових волокон шлунка жаби становила від 20 до 70 мВ. Звичайно, на основі такого значного розходження у величинах дуже важко судити про справжню величину мембранного потенціалу спокою, і ці розходження безперечно пов'язані з пошкодженням волокон мікроелектродом.

На рис. 4 наведена величина спонтанної електричної активності гладком'язових волокон шлунка жаби та вплив на цю активність фізичного кателектротона (К) і анелектротона (А). Знаючи величину електротонічного потенціалу, постійну часу його наростання, а також силу струму, можна обчислити опір та ємність протоплазматичної мембрани. Такі ж розрахунки можна провадити за допомогою цього метода і на нервових та поперечносмугастих м'язових волокнах, вносячи поправку на величину фактора короткого замикання.

На рис. 3 крива 1 в кінці деполяризації повільно відхиляється вниз. Це відхилення пов'язано з дифузійним потенціалом, що створюється на межі сахароза — розчин Рінгера. Цей потенціал досить легко відрізнити від справжньої деполяризації волокон, бо він дуже повільно наростає.

На рис. 3 показано розвиток цього потенціалу (крива 3) під впливом ізотонічного розчину KCl на убитому м'язі. Коли ж на цей м'яз діяти нормальним розчином Рінгера, до якого додавали 117 мМ сухої солі KCl, то дифузійний потенціал зменшується і становить 4–5 мВ. Дифузійний потенціал на межі сахароза — розчин Рінгера створюється переважно хлористим натрієм, якого найбільше в розчині Рінгера, і швидкість руху іонів якого різна. Тому, замінюючи в розчині Рінгера NaCl на іншу сіль, або тільки іони Na^+ чи Cl^- на інші іони, треба завжди мати на увазі те, як зміниться в цих умовах дифузійний потенціал.

Водночас вплив на препарат різних фармакологічних речовин, концентрація яких, як правило, дуже мала, не викликає дифузійних потенціалів. Взагалі слід відзначити, що описана методика може бути застосована не лише для дослі-

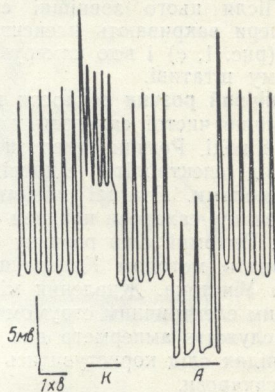


Рис. 4. Спонтанна електрична активність пучка гладком'язових волокон та кателектротонічний (К) і анелектротонічний (А) потенціали. Сила поляризуючого струму 0,3 мка.

дження електричних властивостей судять про фактори, наприклад, ефекти зміни електричних властивостей більш глибоко, ніж тим більше, що закликають специфічно ні потенціали цих клітин зазнати значних змін.

1. Голов Д. А.
2. Шуба М. Ф.
3. Berger W., Pflü
4. Burnstock C
5. Greven K., Z.
6. Julian H. J.,
7. Kolodny R.
8. König K., Pflü
9. Ritchie J. M.
10. Schmidt H., P

при застосу

В. Ф.

Лабораторія заг

Дослідження пр
ності різних іонів вс
лені спеціальні мік
вадити прямі вимір
[3, 7, 8, 10, 11].

Ці мікроелектро
бує створення вхід
В зв'язку з цим звич
ними мікроелектрода
чим пристроєм при т
намічним діапазоном,
[9]. Найбільш придат
метр типу ЕПП-09 з
вість. Враховуючи ви
стосуванні таких мік
достатньо високим (10
ром і коефіцієнтом пе

Як такий перетв
лювач, який відрізняє
експлуатаційними дан

Вхідною лампою
гсю порівняно з подві
висока крутість і вел
відношення сигнал—пе

При правильному
струм до значення 10-
були одержані при на

дження електричних властивостей збудливих волокон, але й для дослідження фармакологічних властивостей різних речовин. Адже досі фармакологи в більшості випадків судять про фармакологічні властивості тієї чи іншої речовини переважно на основі, наприклад, ефекту скорочення м'яза. Додавання до цього показника досліджень зміни електричних властивостей м'язових (а також нервових) волокон допоможе більш глибоко охарактеризувати фармакологічні властивості даної речовини. І це тим більше, що за певних умов дія деяких фармакологічних речовин може й не викликати специфічної реакції, наприклад, скорочення м'язових волокон, тоді як електричні потенціали цих волокон, дуже чутливі до зміни навколишнього середовища, можуть зазнати значних змін.

ЛІТЕРАТУРА

1. Голов Д. А. и Костюк П. Г., Физиол. журн. СССР, 42, 1956, с. 117.
2. Шуба М. Ф., в сб. «Электрофизиол. нервной системы», 1963, с. 443.
3. Berger W., Pflüg. Arch., 272, 1960, s. 37.
4. Burnstock G. a. Straub R. W., J. Physiol., 140, 1958, p. 156.
5. Greven K., Z. Biol., 106, 1953, S. 1.
6. Julian H. J., Moore J. W. a. Goldman D. E., Feder. Proc., 20, 1961, p. 338.
7. Kolodny R. L. a. Van der Kloot W. G., Nature, 190, 1961, p. 786.
8. König K., Pflüg. Arch., 275, 1961, S. 452.
9. Ritchie J. M., Straub R. W., J. Physiol., 134, 1956, p. 698.
10. Schmidt H., Pflüg. Arch., 274, 1962, S. 632.

Надійшла до редакції
22.XI 1963 р.

Електрометричний підсилювач при застосуванні високоомних скляних мікроелектродів

В. Ф. Нікитенко, Б. Я. П'ятигорський, З. О. Сорокіна

Лабораторія загальної фізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця
Академії наук УРСР, Київ

Дослідження природи біопотенціалів привели до необхідності вимірювання активності різних іонів всередині окремих м'язових і нервових клітин. Для цього виготовлені спеціальні мікроелектроди з катіон-селективного скла, які дозволяють проводити прямі вимірювання активності іонів водню, калію і натрію в клітинах [3, 7, 8, 10, 11].

Ці мікроелектроди мають дуже великий опір (близько 200—500 ом), що потребує створення вхідного каскаду підсилювача, струм якого не перевищує 10^{-13}а . В зв'язку з цим звичайні вхідні каскади, які застосовують для роботи з внутріклітинними мікроелектродами [1, 4, 5] не можуть бути використані. Оптимальним реєструючим пристроєм при таких дослідженнях є чорнилозаписуючий прилад з великим динамічним діапазоном, який дозволяє збільшити чутливість всієї установки в цілому [9]. Найбільш придатним з цієї точки зору є електронний самозаписуючий потенціометр типу ЕПП-09 з часом пробігу каретки 1 сек , який випускає наша промисловість. Враховуючи високу чутливість цього приладу, мета його використання при застосуванні таких мікроелектродів полягає у створенні додаткового перетворювача з достатньо високим (10^{11} — 10^{12}ом) вхідним і низьким (не більш 500 ом) вихідним опором і коефіцієнтом передачі, який приблизно дорівнює одиниці.

Як такий перетворювач в нашій лабораторії розроблений дволамповий підсилювач, який відрізняється від аналогічних приладів [2] своєю простотою і надійними експлуатаційними даними.

Вхідною лампою служить електрометричний тріод типу ЕМ-4 [6]. Його перевагою порівняно з подвійним електрометричним тетродом 2Е2П є велика економічність, висока крутість і великий коефіцієнт підсилення, що дозволяє одержувати краще відношення сигнал—перешкода.

При правильному добір режимів цього тріода досить легко вдається звести струм до значення 10^{-13}а . Як показав експеримент, такі показники сіткового струму були одержані при напрузі накалу 1,2 в , сітковому зміщенні 1,9 в і анодній напрузі