

УДК 577.37:576.314

В. И. Пидопличко

ТЕХНИКА «СТУПЕНЧАТОЙ» И «ПРЯМОУГОЛЬНОЙ» ГИДРОДИНАМИЧЕСКОЙ АППЛИКАЦИИ ВЕЩЕСТВ НА МЕМБРАНУ ПЕРФУЗИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ

Современная техника внутриклеточной перфузии [1] чрезвычайно расширила возможности исследования механизмов возбудимости мембраны сомы нервной клетки, однако только в последнее время этот метод был использован для эффективного изучения хемовозбудимых каналов [2]. Такое изучение сталкивается с рядом дополнительных трудностей. Так, в большинстве случаев рецепторы к медиаторам и другим веществам, активирующим хемочувствительные ионные каналы, обладают свойством десенситизации. Если изменение концентрации апплицируемого к поверхности клетки вещества происходит с недостаточной скоростью, а постоянная времени десенситизации мала, наблюдается искаженный ответ с уменьшенной амплитудой. Для преодоления этого (при малых постоянных времени десенситизации) необходимо обеспечить максимально быстрый сдвиг в величине концентрации тестируемого вещества у мембраны.

Эту трудность удалось частично преодолеть в ранее разработанном методе быстрой гидродинамической аппликации раствора к изолированной клетке [3]. Полная смена раствора, омывающего поверхность клетки, достигалась за время порядка 100 мс. При разработке данного метода был использован тот факт, что перфузируемая клетка хорошо выдерживает механические вибрации при быстрой смене внеклеточного раствора — эти воздействия не вносят возмущения в отводимый от мембраны клетки электрический сигнал, не отражаются на величине сопротивления утечки, достигающего в таких экспериментах величин порядка нескольких гигаом [1]. Вместе с тем первоначальная модификация метода быстрой гидродинамической аппликации раствора к клетке была несвободна от недостатков. Основным из них — большой расход апплицируемых растворов за время эксперимента (более 50 мл для каждого из апплицируемых растворов). Процедура эксперимента была излишне усложнена. Для устранения недостатков автором совместно с С. М. Марченко была разработана новая схема аппликации растворов, использующая принцип их револьверной смены. Такая система облегчает и ускоряет процесс тестирования биологически активных веществ и обеспечивает их минимальный расход.

Дисковая кассета из оргстекла содержит 12 ячеек объемом 1 мл. Каждая ячейка имеет прозрачное дно из тонкого оргстекла, что облегчает оптический контроль с помощью инвертированного микроскопа. Кассета смонтирована на столике микроскопа. Ее можно вращать как по, так и против часовой стрелки с помощью отдельного привода, а также передвигать вверх или вниз с помощью привода столика микроскопа. Таких кассет может быть несколько, они легко сменяются в процессе эксперимента. Ячейки заполняют растворами с тестируемыми веществами через одну, промежуточные ячейки заполняют раствором Рингера, что облегчает отмывку. Нормальным раствором можно заполнять только две ячейки кассеты (например первую и седьмую), тогда для тестируемых растворов остается по 10 ячеек на каждой кассете.

Для аппликации используется хоботок, сделанный из прозрачной пластмассовой трубки с внутренним диаметром, равным приблизительно 1,1 мм. В стенке трубки на расстоянии порядка 4 мм от конца хоботка продельвается отверстие. Выход хоботка присоединяется к переходной герметичной муфте, содержащей электрод сравнения ($\text{AgCl}:\text{KCl}$). Муфта в свою очередь присоединяется к трубопроводу, конец которого через электромагнитный клапан соединяется с резервуаром, в котором создается разрежение. В начале эксперимента хоботок, расположенный вертикально окунается в ячейку с раствором Рингера, клапан открывается и трубопровод заполняется исходным раствором. Затем в боковое отверстие плотно вставляется кончик полиэтиленовой микропипетки с перфузированной клеткой. (Диаметр отверстия

подбирается таким образом, перпендикулярного сечения хоботка — аппликации). После этого хоботок с перфузированной клеткой помещается в ячейку с аппликацией, производится ступенчатая и производится ступенчатая электромагнитный клапан проточимого раствора определ



Рис. 2. Упрощенная схема аппликации растворов с изменяемым

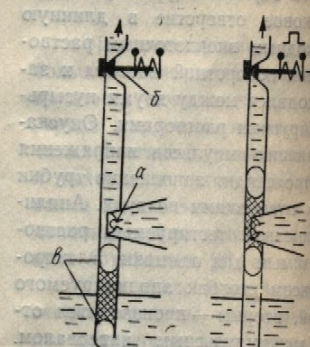


Рис. 3. Стадии изготовления хоботка

а — исходная форма кончика (пока микропипетки при помощи тупой иглы с

вид кончика после деформации, б — вид кончика пластмассовой микропипетки, в — схематическое изображение

хоботка. Отмывка производится аппликацией достаточно 20 мкл стандартную ячейку объемом в

Эффективность смены раствора в условиях фиксации смещений потенциала частотой 1. Затем, используя быструю гидродинамическую аппликацию, был получен безнатриевый (ионы нат

УГОЛЬНОЙ» И ВЕЩЕСТВ НЕЙРОНОВ

чрезвычайно расширила
аны сомы нервной клетки,
зован для эффективного
лживается с рядом допол-
ы к медиаторам и другим
аллы, обладают свойством
ого к поверхности клетки
янная времени десенси-
амплитудой. Для преодо-
и) необходимо обеспечить
тестируемого вещества у

разработанном методе бы-
анной клетке [3]. Полная
алась за время порядка
тот факт, что перфузиро-
и при быстрой смене вне-
ния в отводимый от мем-
личине сопротивления утеч-
а нескольких гигаом [1].
рой гидродинамической ап-
тков. Основной из них —
римента (более 50 мл для
римента была излишне ус-
С. М. Марченко была разра-
принцип их револьверной
гирования биологически ак-

ъемом 1 мл. Каждая ячей-
часть оптический контроль с
ована на столике микроско-
елки с помощью отдельного
ью привода столика микро-
няются в процессе экспери-
ментами через одну, проме-
гчает отмычку. Нормальным
апример первую и седьмую),
а каждой кассете.

з прозрачной пластмассовой
о 1,1 мм. В стенке трубки
вается отверстие. Выход хо-
держат электрод сравне-
к трубопроводу, конец ко-
зервуаром, в котором созда-
расположенный вертикально
открывается и трубопровод
стие плотно вставляется кон-
леткой. (Диаметр отверстия

подбирается таким образом, чтобы кончик пипетки с клеткой находился в центре поперечного сечения хоботка — т. е. в месте наибольшей скорости потока раствора при аппликации). После этого хоботок, заполненный исходным раствором, и микропипетка с перфузированной клеткой подвешиваются в воздухе (опусканием кассеты), затем помещаются в ячейку с апплицируемым раствором (поворотом и подъемом кассеты) и производится ступенчатая смена омывающего клетку раствора путем подачи на электромагнитный клапан прямоугольного импульса напряжения. Количество апплицируемого раствора определяется длительностью импульса и внутренним диаметром

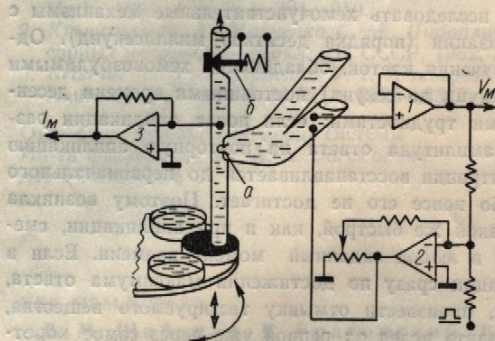


Рис. 1. Упрощенная схема установки для быстрой «ступенчатой» гидродинамической аппликации растворов к клетке в условиях перфузии и фиксации потенциала на мембране.

Показана часть дисковой кассеты с 12 ячейками. Стрелки указывают направления возможных перемещений кассеты: вверх — вниз, вращение по и против часовой стрелки. Раствор, подготовленный к аппликации, выделен сплошным черным цветом. Трубопровод заполнен нормальным раствором. Выход трубопровода, отмеченный стрелкой, соединяется через электромагнитный клапан с резервуаром, в котором создано разрежение. U-образная пластмас-

совая микропипетка с перфузированной клеткой вставлена в боковое отверстие хоботка трубопровода, а — перфузируемая клетка, б — электромагнитный клапан. Электрическая часть: 1 — входной усилитель с единичным коэффициентом повторения; 2 — усилитель фиксации потенциала; 3 — измеритель тока

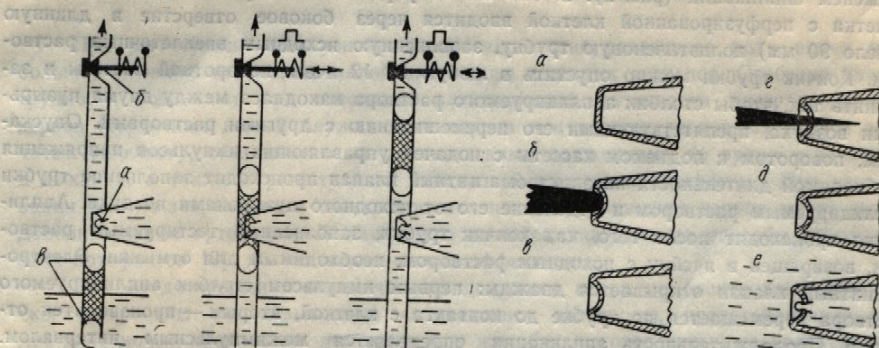


Рис. 2. Упрощенная схема устройства для «прямоугольной» гидродинамической аппликации растворов с изменяемым временем аппликации в условиях перфузии и фиксации потенциала на мембране.

а — перфузируемая клетка, б — электромагнитный клапан, в — пузырьки воздуха. Раствор, подготовленный к аппликации, выделен штриховкой. Слева — направо: подготовка к аппликации, аппликация, отмычка. В реальном исполнении 90 мм апплицирующая трубка свернута петлей.

Рис. 3. Стадии изготовления охранной выемки в кончике пластмассовой перфузирующей микропипетки.

а — исходная форма кончика (показано в разрезе), б — пластическая деформация кончика микропипетки при помощи тупой иглы с радиусом закругления конца иглы порядка 40 мкм, в — общий вид кончика после деформации, г — прокол острой иглой перфузирующей поры, д — окончательный вид кончика пластмассовой микропипетки с полусферической выемкой и перфузирующей порой, е — схематическое изображение перфузированной клетки в охранном углублении.

хоботка. Отмычка производится после очередного поворота кассеты. Для однократной аппликации достаточно 20 мкл раствора. С целью экономии особо ценных реактивов в стандартную ячейку объемом в 1 мл вставляется микрокамера объемом 100 мкл (достаточного для проведения пяти аппликаций). Длительность смены раствора регулируется величиной разрежения создаваемого и поддерживаемого в резервуаре.

Эффективность смены раствора оценивали следующим образом. В нормальном растворе в условиях фиксации напряжения подачи на мембрану деполяризующих смещений потенциала частотой 100 или 200 гц вызывался входящий натриевый ток. Затем, используя быструю гидродинамическую аппликацию, исходный раствор сменялся безнатриевым (ионы натрия в растворе замещали ионами трис). Время, на

протяжении которого входящий ток исчезал, характеризовало длительность фронта смены раствора и составляло менее 50 мс. Продолжительность смены раствора могла быть уменьшена до 10 мс без повреждения клетки потоком апплицируемого раствора. На рис. 1 изображена упрощенная схема установки для быстрой ступенчатой гидродинамической аппликации растворов к нейрону в условиях перфузии и фиксации напряжения на мембране. В целях упрощения на рисунке показана только часть вращающейся дисковой кассеты с 12 ячейками.

Решение проблемы быстрой ступенчатой гидродинамической аппликации растворов к клетке позволило без искажений исследовать хемочувствительные механизмы с малыми постоянными времени десенситизации (порядка десятков миллисекунд). Однако использование этой техники для изучения клеток, обладающих хемовозбудимыми ответами с большими (от сотен миллисекунд до секунд) постоянными времени десенситизации, сталкивается с определенными трудностями: если после аппликации тестируемого вещества в той же концентрации восстанавливается до первоначального уровня после 15–20 мин отмывки, либо вовсе его не достигает. Поэтому возникла необходимость получить возможность такой же быстрой, как и при аппликации, смены тестируемого раствора на исходный в любой заданный момент времени. Если в этом случае после проведенной аппликации сразу по достижении максимума ответа, не дожидаясь развития десенситизации, произвести отмывку тестируемого вещества, то повторную аппликацию можно проводить вслед за первой уже через самое короткое время. Для этой цели описанная установка (рис. 1) была дополнена устройством для быстрой гидродинамической аппликации внеклеточных растворов с изменяемым временем аппликации (рис. 2). В отличие от упрощенного варианта (рис. 1) микропипетка с перфузированной клеткой вводится через боковое отверстие в длинную (около 90 мм) полиэтиленовую трубку, заполненную исходным внеклеточным раствором. Кончик трубки можно опустить в любую из 12 ячеек поворотной кассеты и заполнить так, чтобы столбик апплицируемого раствора находился между двумя пузырьками воздуха, препятствующими его перемешиванию с другими растворами. Опусканием, поворотом и подъемом кассеты с подачей управляющих импульсов напряжения необходимой длительности на электромагнитный клапан происходит заполнение трубки апплицируемым раствором и отделение его от исходного пузырьками воздуха. Аппликация происходит после того, как кончик трубки, заполненный тестируемым раствором, возвращен в ячейку с исходным раствором, необходимым для отмывки. Электромагнитный клапан открывается дважды: первым импульсом столбик апплицируемого раствора перемещается по трубке до контакта с клеткой, вторым — производится отмывка. Продолжительность аппликации определяется межимпульсным интервалом. Пузырьки воздуха обеспечивают крутой фронт смены растворов: полная его длительность не превышает 50 мс и может быть доведена (как и в упрощенном варианте) до 10 мс. На одну аппликацию расходуется около 80 мкл тестируемого раствора (при внутреннем диаметре трубки 1,1 мм). Внутренняя поверхность стенок всего трубопровода гидрофильна, поэтому малые пузырьки воздуха не прерывают электрический контакт между клеткой и электродом потенциального заземления. Пузырьки воздуха не разрушают клетку благодаря особой форме кончика полиэтиленовой микропипетки с перфузирующей порой: в кончике делается полусферическая выемка, предохраняющая клетку. Использование этого устройства позволяет практически исключить десенситизацию мембранных рецепторов к тестируемым веществам.

На рис. 3 схематически изображены стадии изготовления пластмассовой микропипетки с охранным углублением, предохраняющим клетку от разрушения пузырьками воздуха. Выемка получается после пластической деформации кончика микропипетки при комнатной температуре. Тонкая игла для прокалывания перфузирующей поры и тупая игла с полусферическим кончиком (радиус полусферы порядка 40 мкм) для изготовления углубления монтируются на стандартном манипуляторе для сведения микроэлектродов и находятся в одной — горизонтальной — плоскости.

Описанный метод представляется достаточно простым (он требует использования только одного электромагнитного клапана и исключает разбавление или загрязнение тестируемых растворов) и, так же, как и упрощенный вариант со «ступенчатой» гидродинамической аппликацией, поддается автоматизации.

В результате проведения хемочувствительные свойства контроля состава внеклеточ-

1. Kostyuk P. G., Krishtal O. A., Meth., 1981, 4, N 3, p. 201
2. Крышталь О. А., Марченко В. В., Докл. АН УССР, 1980, 5, N 1
3. Krishtal O. A., Pidoplichko V. T., Neuroscience, 1980, 5, N 1

Отд. общ. физиологии нерв
Ин-та физиологии им. А. А.
АН УССР, Киев

УДК 612.81:57.086.2/3

В. М. Шабан, А. Б. Б.

УСТРОЙСТВО ПРИ РЕГИСТРАЦИИ

При регистрации электрических сигналов большое значение вследствие трудности возникают при регистрации нервных (сердечных ветвей блуждающих ганглиев), связанные с дыханием, а также с регистрацией жестко закрепленных дополнительных артефактов. Этих артефактов [2], но они

Для предотвращения мешающих факторов сконструированы так называемые две платиновые проволоочки, трубки диаметром 2 мм, и с (50–100 мкм) константановым вазелиновым маслом или жиром, что предотвращало контакт с нервом, что предотвращало

Для устранения записи предварительный усилитель, мых под отводящими электрическими сигналами, генерируемыми ее расчета использованы лит

Каждый канал усилителя представляющих собой двухканальный усилитель в высококачественном микрооске: к не менее 5×10^4 и не более 10 кГц при внутреннем сопротивлении 0,7 мВ; коэффициент нелинейности

Первый каскад усилителя состоит из несимметричной схемы. Раздельное усиление и их синфазную и противофазную составляющую усиления элемента А 1/2 с противофазной составляющейности электродов. Выходы пе