

MŰSZER ÉS MÉRÉSTECHNIKAI FEJLESZTÉSEK

VÉRÓ MIHÁLY

A korszerű elektrofiziológiai kutatások követelményeit figyelembe véve, intézetünkben az elmúlt években intenzíven fejlesztettük a kutatásokhoz szükséges műszereket és eszközöket. A technikai fejlesztés alapján lehetőség nyílt új mérőmódszerek és adatfeldolgozási eljárások bevezetésére. Elvi és gyakorlati kivitelezési munkánk a következő műszerekre, mérőmódszerekre és adatfeldolgozási eljárásokra terjedt ki:

1. Üvegkapilláris húzó-berendezés.
2. Mikroelektróda húzó-készülék.
3. FET bemenetű (negatív kapacitású) erősítő.
4. Mágnesszalagos analóg jeltároló.
5. Négyyszög hullámú ingerlő.
6. Hőmérséklet szabályozó berendezés.
7. FET bemenetű differenciál erősítő.
8. Mozcás indikátor.
9. Mérési összeállítás többcsatornás intra- és extracelluláris elvezetéshez, valamint mozgás regisztráláshoz.
10. „Voltage-clamp” mérési összeállítás.
11. Adatfeldolgozási eljárás sokcsatornás analízátorhoz.

1. Üvegkapilláris húzó-berendezés

Az Intézetben folyó elektrofiziológiai kutatások mikroelektróda igényeinek ellátására készült az 1. ábrán látható vertikális elrendezésű kapilláris húzó berendezés. Segítségével olyan kapilláris is húzható, amelyben másik kapilláris helyezkedik el, ami az elektróda folyadékkal való töltését megkönnyíti. Az 1. ábra szemlélteti a készülék fontosabb méreteit, és a működés szempontjából lényeges szerkezeti részek közül a húzó (1) és leeresztő (2) mechanizmust, az üvegcső (3) olvasztását ellátó elektromos fűtésű kemencét (4), valamint a fűtést és húzást szabályozó áramköri egységet (5).

- Húzáshoz ajánlott üvegcső, Pyrex, Corning 7740 (vagy egyéb 1300 °C alatti olvadáspontú üvegcső).
- Üvegcső átmérő, maximum 25 mm.

- Üvegcső hosszúság, maximum 900 mm.
- Húzási arányok (különböző húzó/leeresztő görgőknél).
- Hossz növekedés $50 \times$ — $80 \times$ — $100 \times$ — $150 \times$ — $250 \times$.
Átmérő csökkenés $0,23 \times$ — $0,18 \times$ — $0,13 \times$ — $0,09 \times$ — $0,05 \times$.
- Húzási sebesség 48 cm/perc — 200 cm/perc.
- Leeresztési sebesség 4 mm/perc — 19 mm/perc.
- A kályha maximális hőmérséklete 1300 °C.

2. Mikroelektróda húzó-készülék

Üveg mikroelektródák készítéséhez terveztük a 2. ábrán látható horizontális elrendezésű húzó-berendezést. A készülékkel maximum 2 mm átmérőjű üvegapillárisokból olyan mikroelektródák készíthetők, amelyeknek geometriai méretei és elektromos paraméterei alkalmasak intracelluláris elvezetés mellett az elektromos tulajdonságok vizsgálatára.

A készülék fontosabb szerkezeti részei a húzóerőt biztosító szolenoid (1), a kapilláris rögzítésére szolgáló mozgó (2) és álló befogó (3), valamint az üveg olvasztását ellátó fűtőszál (4). A húzási és fűtési paraméterek az előlapon elhelyezett kezelőszervekkel (5) (6) széles határok között szabályozhatók, így a kísérleti feltételeknek megfelelő optimális elektród forma és hegyátmérő könnyen előállítható.

Az elektróda húzó-berendezés áramköreinek stabilitása nagyfokú reprodukálhatóságot biztosít.

3. FET bemenetű (negatív kapacitású) erősítő

A sejtaktivitás intracelluláris regisztrálásához készült FET bemenetű erősítő blokkdiagramja látható a 3. ábrán, amely a bemenetet terhelő kapacitás neutralizálásához kompenzáló áramkört is tartalmaz. Az erősítő (A) kialakításánál figyelembe vettük a vizsgálatoknál szükséges egyéb mérési követelményeket is, így az összeállítás a következő feladatok ellátására alkalmas. Az elektróda tip-potenciáljának kompenzálása után (1) az ellenállásmérő áramkör (2) segítségével digitális műszeren (5) mérhető az elektród ellenállása. A beépített polarizátorral (3) elvezetés közben a vizsgált objektum hiperpolarizálható vagy depolarizálható, illetve külső generátor jelével ingerelhető. Az erősítőhöz kapcsolódó kiegyenlítő áramkörrel (4) ingerlésnél minimumra csökkenthető az ingerbetörés zavaró jele. Az elvezetett akcióspotenciálok vizuálisan értékelhetők az erősítő kimenetére csatlakozó oszcilloszkópon (6).

Az erősítő legfontosabb technikai adatai:

- Bemenő ellenállás $>10^{11}$ ohm.
- Bemenő áram <1 pA.
- Bemenetre vonatkoztatott kapacitás kompenzáció 100 pF-ig.
- Erősítés egységnyi.
- Kimenő ellenállás 100 ohm.
- Nullszint szabályozás ± 20 mV.

4. Mágnesszalagos analóg jeltároló

A sejtekből elvezetett jelek tárolására kétsatornás, FM rendszerű analóg mágnesszalagos jeltárolót konstruáltunk. A készülék 2×2 sávós sztereo-magnetofonból és az Intézetünkben készült FM modulátorból és demodulátorból áll. A magnetofonhoz kapcsolódó FM Modem-nél korszerű PLL (Phase Locked Loop) áramköröket alkalmaztunk. A megfelelő jelátvitel érdekében a demodulátor átlagoló szűrője Bessel típusú lineár fázisú aktív szűrővel van megoldva.

A jeltároló specifikus adatai:

- Felvételi/lejátszó rendszer, kétsatornás FM.
- Frekvencia átvitel, DC – 1250 Hz.
- Jel/zaj viszony >40 dB.
- Bemenő jelszint ± 100 mV
- Kimenő jelszint ± 100 mV.
- Bemenő ellenállás 100 Kohm
- Kimenő ellenállás 500 ohm.
- Linearitás $\pm 1\%$.
- Szalag sebesség 19 cm/sec.
- Szalag szélesség $\frac{1}{4}$ inch.

5. Négyszöghullámú ingerlő

A vizsgált preparátumok ingerléséhez lebegő-kimenetű négyszöghullámú generátort alkalmaztunk, amely korszerű félvezetőkkal és integrált áramkörökkel van megoldva. A generátor, amelynek konstrukciós megoldása a 4. ábrán látható, sorozat, illetve egyes működésű és az oszcilloszkóp indításához trigger jelet ad ki. Az indító (trigger) jelhez képest megfelelő késleltetés állítható be, és az előlapon elhelyezett kezelőszervekkel szabályozható a kívánt ismétlődési frekvencia, impulzusszélesség és amplitúdó, valamint a kimenő jel polaritása.

A generátor adatai:

- Ismétlődési frekvencia 0,1 Hz – 200 Hz sorozat, illetve egyes indítás vagy külső indítójel.
- Késleltetés: 0,7 ms – 600 ms.
- Impulzusszélesség: 0,1 ms – 200 ms
- Kimenő impulzus amplitúdója: 0–20 V (lebegő kimenet).
- Kimenő ellenállás: 500 ohm.
- Kimenő polaritás: pozitív vagy negatív.

6. Hőmérséklet szabályozó berendezés

A gyors működésű, szabályozható hőmérsékletű preparátumtartó elrendezés az 5. ábrán látható. Hűtőblokkal (1) ellátott Peltier-elemmel (2) és termisztorral (3) vezérelt tirisztoros kapcsolóáramkörrel (4) működik. A szabályozott hőmérsékletű fémlemez (5) közvetlenül a preparátum (6) alatt van elhelyezve, így gyors működésű hőmérséklet szabályozás érhető el. A vizsgált sejt aktivitása mikroelektródás módszerrel (7) minimum 50 dB-es jel/zaj viszonyal regisztrálható az oszcilloszkópon (8).

7. FET bemenetű differenciál erősítő

A komplex elektrofiziológiai mérések egyik fontos részét képezi az ideg-aktivitás regisztrálása. Az ilyen mérésekhez kifejlesztett FET bemenetű differenciál erősítő blokkdiagramja látható a 6. ábrán. Az erősítő egyaránt használható bipoláris elektróddal történő regisztráláshoz mint differenciál bemenetű erősítő, és szívó elektróddal történő regisztráláshoz, mint aszimmetrikus bemenetű erősítő. Az átviteli sáv szélesség változtatható, egyrészt a FET bemenetű erősítő (1) kimenetére kapcsolódó felüláteresztő szűrőkkel, másrészt a követő típusú erősítő kimenetére (2) csatlakozó aluláteresztő szűrőkkel. A szükséges kimenő jelszintet a végerősítő fokozat (3) állítja elő.

Az erősítő adatai:

- Bemenő ellenállás: 2×10 Mohm.
- Kimenő ellenállás: 100 ohm.
- Erősítés: 60 dB.
- Alsó sávhatárok: 1–40–80 Hz (–3 dB-es pont).
- Felső sávhatárok: 100–500–1000 Hz (–3 dB-es pont).
- Bemenetre vonatkoztatott zajértékek, különböző sáv szélességnél:
 $3,3 \mu\text{V}/20 \text{ Hz}$ – $5 \mu\text{V}/60 \text{ Hz}$ – $6,66 \mu\text{V}/100 \text{ Hz}$ – $10 \mu\text{V}/500 \text{ Hz}$ –
 $16 \mu\text{V}/1000 \text{ Hz}$.

8. Mozgás indikátor

Biológiai preparátumok kismértékű mozgásainak regisztrálásához reflexiós elven működő mozgásindikátort fejlesztettünk ki, amelynek blokkdiagramja a 7. ábrán látható. Az indikátor egyenárammal (1) táplált primer-sugárzója infravörös tartományban ($\lambda = 940 \text{ nm}$) működő fényemittáló dióda (2). A detektor, amely a preparátumról (3) reflektált jelet érzékeli, ugyancsak infravörös tartományban érzékeny fototranzisztor (4). A detektált jel egy null-szint beállítására alkalmas mérőhídra (5) és erősítőre (A) kerül. A zavarójelek elnyomását aktív sávkivágó szűrő látja el. A mozgás indikátor előnye, hogy a vizsgált objektummal nincs direkt kapcsolatban, így azt mechanikusan nem terheli. Az indikátor érzékenységi görbéje a 8. ábrán látható fekete (1) és fehér (2) papírt használja reflektáló felületnek. Az ordinátán az indikátor kimenő feszültségét tüntettük fel 0-tól 5 V-ig fehér papír esetében, és 0-tól 0,5 V-ig fekete papírra vonatkozóan. Az abszcisszán az érzékelőfej és a tárgy közötti távolság van megadva mm-ben.

9. Mérési összeállítás többcsatornás intra- és extracelluláris elvezetéshez valamint mozgás regisztráláshoz

Neuronkapcsolatok vizsgálatához készült többcsatornás mérési összeállítás látható a 9. ábrán. A mérési elrendezésben a 3. pontban ismertetett differenciál erősítőt, a 8. pontban ismertetett mozgás indikátort és az 5. pontban ismertetett négyzetáramú ingerlőt használtuk fel. Az indikátor egység négycsatornás oszcilloszkóp. Az összeállítással neuronkapcsolatok vizsgálata mellett idegaktivitás és izomkontrakció kapcsolata tanulmányozható egyidejűleg. A mérési módszer lényege, hogy egy kiválasztott sejtet polarizálva, a

kiválasztott sejttel kapcsolatban levő sejtek aktivitásmintázata megváltozik. Így lehetőség van többcsatornás szimultán intracelluláris elvezetés alapján neuronhálózatok egyszerű vizsgálatára. A neuronális működés és kontrakció kapcsolata az idegaktivitással, a bipoláris elvezetés és a mozgás indikátor jele alapján határozható meg.

10. „Voltage clamp” mérési összeállítás

A mérési összeállítással meghatározhatók azok az ion-áram komponensek, amelyek a neuronok potenciálváltozásának ideje alatt áthaladnak a sejtmembránon, és így részt vesznek a potenciálképzésben.

A mérési összeállítás (10. ábra) a 3. pontban ismertetett FET erősítőket (1), (2), kétfokozatú kontroll erősítőt (3), (4) és az 5. pontban ismertetett négyszög hullámú ingerlőt (5) és a 6. pontban ismertetett hőmérséklet szabályozót (6) tartalmazza. A membránon átfolyó ion-áramok nagyságának és időviszonyának mérése áram-feszültség konverterrel történik (7), így a különböző membránfeszültséghez tartozó áramértékek az oszcilloszkóp (8) kalibrációja alapján egyszerűen meghatározhatók.

11. Adatfeldolgozási eljárás sokcsatornás analízátorhoz

Nagymennyiségű adat gyors és pontos értékeléséhez készült adatfeldolgozó áramkör blokkdiagramja látható a 11. ábrán, amelynek segítségével „ON-line” (vagy FM jeltároló alkalmazásával „OFF-line”) üzemben, 1024 csatornás analízátoron (KFKI, NTA 512 B) értékelhetők az idegsejtekből elvezetett jelek megfelelően kiválasztott adatai. Az analóg jeltől erősítés (1) után null-komparátor (2) és monostabil multivibrátor (3) képez feldolgozásra alkalmas jelet, amely az illesztő áramkörből (4) megfelelő logikai szinten kerül az analízátor (5) bemenetére.

Az áramkör az akcióspotenciálok közötti időintervallumok függvényét, illetve az akcióspotenciálok időtartamának függvényét képezi. Az identifikált Helix neuron mintázatát és hőmérséklet-növelés esetén bekövetkező változást reprezentáló függvény az analízátor katódsugárcsővé jelenik meg (az ordinátán az akcióspotenciálok közötti idők, illetve az akcióspotenciálok időtartamának értékei vannak ábrázolva, az abszcisszán az intervallumok sorszámai olvashatók le). A függvény részletei a ferrit memóriából kiírhatók, nagymértékben egyszerűsítve így a számszerű értékelést.

NEW INSTRUMENTS AND MEASUREMENTS METHODS

MIHÁLY VÉRO

In the Biological Research Institute, instruments and devices needed for modern electrophysiological research work are being intensively developed. This theoretical and practical work paved the way to the introduction of new measurement and data processing methods in the following fields:

1. Glass capillar drawing machine.
 2. Puller for microelectrodes.
 3. FET input negative capacitance amplifier.
 4. Analóg FM tape recorder.
 5. Square wave stimulator.
 6. Equipment for temperature control.
 7. FET input differential amplifier.
 8. Movement indicator.
 9. Measurement set-up for multichannel intra- and extracellular recording and movement indication.
 10. Voltage-clamp measurement set-up.
 11. Data acquisition method for multichannel analyzer.
- In the following, short surveys of this development will be presented.

1. Glass capillar drawing machine

The glass capillar drawing machine shown in *Fig. 1* has vertical arrangement, and satisfies the microelectrode requirements of our electrophysiological research work. It is suitable for drawing double capillars, thus facilitating the filling of the electrode by fluids. In Figure 1 principal dimensions of the machine are shown, together with the more important functional parts such as the drawing (1) and lowering (2) mechanism, the electrically heated oven (4) in which the melting of the glass tube (3) takes place, further the circuit assemblies (5) controlling the heating and drawing process. Principal technical data:

Preferred glass tube for drawing	Pyrex, Corning 7740
Glass tube diameter	25 mm max.
Glass tube length	900 mm max.
Drawing dimensions with application of different drawing/lowering rollers:	
Length increase	50 × — 80 × — 100 × — 150 × — 250 ×
Diameter decrease	0.23 × — 0.18 × — 0.13 × — 0.09 × — 0.05 ×
Drawing speed	48 cm/min to 19 mm/min
Lowering speed	4 mm/sec — 19 mm/sec
Maximum oven temperature	1300 °C

2. Puller for microelectrodes

The drawing machine shown in *Fig. 2* has horizontal arrangement and is intended for producing glass microelectrodes. The machine utilizes glass capillars of max. 2 mm diameter, and the microelectrodes produced by the machine have geometrical dimensions and electrical parameters suitable for investigation of electrical properties by using intracellular recording.

The machine has the following functional parts: the solenoid providing the drawing force (1), the moving (2) and standing (3) clamp for holding the capillar, and the heater (4) for melting the glass. The drawing and heating parameters are adjustable within wide ranges by front panel controls (5) and

(6), thus realizing optimum shapes and tip diameters required by the experimental conditions. A high degree of reproducibility is assured by utilizing stable circuits.

3. FET input negativ capacitance amplifier

The block diagram of the FET input amplifier designed for intracellular recording of cell activities is shown in *Fig. 3*. A compensation circuit is included for neutralization of the input load capacity. Additional measurement requirements have also been met by the design of the amplifier (A), thus the measurement set-up is suitable for the following tasks. After tip-potential compensation of the electrode (1), the electrode resistance is shown by a digital display (5), utilizing a resistance measuring circuit (2). By utilizing the built-in polarizer, the object under test may be hyper-polarized or depolarized and also stimulated by an external generator signal during recording. During stimulation, a compensation circuit is used to minimize the interfering signal originating from direct feedthrough of the stimulation. The recorded action potentials can be evaluated by viewing an oscilloscope display connected to the amplifier output (6). Principle technical data of the amplifier:

Input resistance	more than 10^{11} ohm
Input current	less than 1 pA
Capacitance compensation referred to the input	up to 100 pF
Amplification	unity
Output resistance	100 ohm
Zero level control	± 20 mV

4. Analog FM tape recorder

An analog FM tape recorder has been designed for recording cell activity signals. The recorder is made up of a 2×2 track commercial stereo tape desk and of an FM modulator and demodulator produced in our Institute. Modern PLL circuits have been utilized in the FM modem. To provide suitable signal transmission, the averaging filter of the demodulator has been realized by a Bessel-type linear-phase active filter. Principle technical data of the recorder:

Recording/playback system	2 channel FM
Frequency range	DC to 1250 Hz
Signal-to-noise ratio	more than 40 dB
Input signal level	± 100 mV
Output signal level	± 100 mV
Input resistance	100 kOhm
Output resistance	500 Ohm
Linearity	$\pm 1\%$
Tape speed	19 cm/sec
Tape width	$\frac{1}{4}$ inch

5. Square-wave stimulator

A floating output square-wave generator utilizing modern solid-state devices and integrated circuits has been applied for stimulation of the test preparations. The generator is suitable for generating periodical or single signals, and provides also a trigger for oscilloscope synchronization (see *Fig. 4*). A suitable delay may be adjusted with respect to this trigger signal, and front panel controls are provided to adjust the repetition rate, pulse width, pulse amplitude and polarity of the output signal. Principle technical data of the generator:

Repetition rate	0.1 to 200 Hz, or single pulse by internal or external trigger
Delay	0.7 to 600 msec
Pulse width	0.1 to 200 msec
Output pulse amplitude	floating, 0 to 20 V
Output resistance	500 ohm
Output signal polarity	positive or negative

6. Equipment for temperature control

The arrangement of the preparation chamber which has a rapidly adjustable temperature is shown in *Fig. 5*. It comprises a Peltier-element (2) with cooling block (1) and a thyristor switching circuit (4) controlled by a thermistor (3). The metal plate of controlled temperature (5) is placed directly under the preparation (6), thus providing rapid temperature change. The cell activity may be recorded by using micro-electrodes (7) on an oscilloscope display (8), with a signal-to-noise ration of at least 50 dB.

7. FET input differential amplifier

The recording of nerve activities is an important part of complex electrophysiological measurements. *Fig. 6* shows the block-diagram of a FET input differential amplifier developed for these measurements. This amplifier may be used both as a differential input amplifier for recordings with bipolar electrodes and as an asymmetrical input amplifier with suction electrodes. Transmission bandwidth is adjustable by high-pass filters connected to the output of the FET input amplifier (1) and by low-pass filters connected to the output of the follower type amplifier (2). The required output level is produced by the output stage (3).

Principle technical data of the amplifier:

Input resistance	2×10 Mohm
Output resistance	100 ohm
Amplification	60 dB
Lower band-limits	1 — 40 — 80 Hz (3-dB points)
Upper band-limits	100 — 500 — 1000 Hz (3 dB points)
Noise levels referred to the input	$3.3 \mu\text{V}/20 \text{ Hz}$ — $5 \mu\text{V}/60 \text{ Hz}$ — $6.66 \mu\text{V}/100 \text{ Hz}$ — $10 \mu\text{V}/500 \text{ Hz}$ — $16 \mu\text{V}/1000 \text{ Hz}$

8. Movement indicator

A reflection-type movement indicator has been developed for registering small movements of biological preparations. The block diagrams of the movement indicator is shown in *Fig. 7*. The primary radiator, fed by DC (1), is a light emitting diode (2) operating in the infrared region ($\lambda = 940$ nm). A photo transistor (4), sensitive in the infrared region, is operated as a detector sensing the light reflected by the preparation (3). The detected signal drives a balanced measurement bridge (5) and an amplifier (A). The interfering signals are suppressed by an active band-stop filter. The movement indicator has no direct contact with the test object which is thus not loaded mechanically. The sensitivity curve of the movement indicator is plotted in *Fig. 8*, using both black paper (1) and white paper (2) as reflecting surfaces. The ordinate scale covers the output voltage of the indicator, in the range of 0 to 5 V for white paper, and 0 to 0.5 V for black paper. The distance between the sensing head and the object in mm units is plotted on the abscissa scale.

9. Measurement set-up for multichannel intra- and extracellular recording and movement indication

Fig. 9 shows a multi-channel measurement set-up intended for investigation of neuron networks, utilizing the differential amplifier treated in Sec. 3, the movement indicator treated in Sec. 8 and the square-wave stimulator treated in Sec. 5. A four-channel oscilloscope is used as a display device. Simultaneous investigations of neuron networks, nerve activities and muscle contraction is possible by utilizing the set-up. According to the measurement method, a selected cell is polarized, thus changing the activity pattern of the cells connected to the selected cell. A simple investigation of neuron networks by utilizing multi-channel simultaneous intracellular recordings is made possible by this method. The relation between neuron activity or contraction and nerve activity can be determined from the bipolar recording and the movement indicator signal.

10. Voltage clamp measurement set-up

The measurement set-up is used to determine ion-current components which traverse the cell membrane during the potential-change time-interval of neurons and thus take part in producing potential.

The device (*Fig. 10*) is made up of FET amplifiers (1) (2) treated in Sec. 3, a two-stage control amplifier (3) (4), the square-wave stimulator (5), treated in Sec. 5, and the temperature control equipment (6) treated in Sec. 6. Ion-currents flowing through the membrane are measured by a current-voltage converter (7); this facilitates the determination of current values pertaining to different membrane voltages by the calibration of the oscilloscope (8).

11. Data acquisition method for multichannel analyzer

Fig. 11 shows the block-diagram of a data acquisition circuit suitable for rapid and accurate evaluation of a large number of data. The circuit can be used for evaluating neuron cell signal data on a 1024 channel analyzer

(КФКИ type NTA-512 B), either with on-line operation, or with off-line operation, the latter in conjunction with an FM recorder. From the analog signal, a signal suitable for evaluations derived with an amplifier (1), null-comparator (2) and monostable flip-flop (3). This signal is routed through the matching circuit (4) at a suitable logic level to the analyzer input (5). The circuit is used to produce the function of time intervals between action potentials and the action potential time durations function. The function representing the identified Helix neuron pattern and its dependence on temperature is displayed on the analyzer cathode ray tube (the interspike time intervals or the action potential time duration intervals are plotted as a function of the time interval serial numbers). Selected parts of the response function may be read out from the ferrite memory for easy numerical evaluation.

ТЕХНИЧЕСКОЕ РАЗВИТИЕ УСТРОЙСТВ И ИЗМЕРИТЕЛЬНОЙ ТЕХНИКИ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

МИХАЙ ВЕРО

Учитывая необходимость применения современных методов в электрофизиологических исследованиях, в последние годы в нашем Институте проведено интенсивное усовершенствование приборов и устройств. В результате технического прогресса представилась возможность применения новых методов измерения и обработки данных. Наши теоретические и практические стремления были направлены на создание новых устройств измерительной техники и обработки данных:

1. Устройство автоматической вытяжки стеклянных капилляров.
2. Устройство вытяжки микроэлектродов.
3. Усилитель с отрицательным входным сопротивлением, построенный на полевом транзисторе.
4. Двухканальная система записи и воспроизведения с частотной модуляцией.
5. Генератор прямоугольных импульсов.
6. Терморегулирующее устройство.
7. Дифференциальный усилитель построен на полевом транзисторе.
8. Индикатор сдвига объекта исследования.
9. Многоканальная установка внутриклеточного и внеклеточного отведения и регистрации сдвига.
10. Устройство фиксации напряжения мембраны.
11. Согласующее устройство для обработки данных к многоканальному анализатору.

1. Устройство автоматической вытяжки стеклянных капилляров

Для удовлетворения запросов электрофизиологических исследований, проводимых в нашем Институте, было создано устройство с вертикально расположенным капилляром, который представлен на рис. 1. С помощью этого устройства можно вытягивать одновременно два капилляра, расположенных

концентрически, что облегчает наполнение электродов жидкостью. На *рис. 1* указаны основные размеры устройства и важнейших, с точки зрения работы, элементов конструкции, таких, как блок с механизмом вытягивания [1] и опускания [2], блок электрической печки [4], обеспечивающей расплавление стеклянной трубки [3], а также блок, регулирующий нагрев и вытягивание электрода [5].

Важнейшие технические данные:

- Рекомендуемая стеклянная трубка: типа «Пирекс», «Корнинг 7740» (или другие стеклянные трубки с температурой плавления ниже, 1300 °С)
- Максимальный диаметр стеклянной трубки — 25 мм
- Максимальная длина — 900 мм
- Параметры вытягивания (при различных втягивающих/опускающих роликах):
увеличение длины (50× — 80× — 100× — 150× — 250×)
уменьшение диаметра (0,23× — 0,18× — 0,13× — 0,09× — 0,05×)
Скорость вытягивания 48 см/мин — 200 см/мин
- Скорость опускания 4 мм/мин — 19 мм/мин
- Максимальная температура нагрева печки — 1300 °С.

2. Устройство вытяжки микроэлектродов

Для изготовления микроэлектродов была сконструирована установка с горизонтальной вытяжкой (*рис. 2*). С помощью этого прибора можно вытягивать микроэлектроды из заготовки с максимальным диаметром 2 мм, геометрические размеры которых при внутриклеточном отведении дают возможность исследовать электрические свойства мембран.

Важнейшими составными частями прибора являются следующие: соленоид [1], обеспечивающий силу подтягивания; движущийся [2] и неподвижный [3] зажимные приспособления для капилляров, а также спираль накаливания стекла [4]. Параметры нагрева и вытяжки регулируются потенциометрами [5, 6], расположенными на передней панели и дающими возможность регулировать их в широких пределах. В результате этого могут быть изготовлены микроэлектроды с оптимальной формой и диаметром кончика, необходимыми по потребностям разного типа экспериментов.

Стабильность электрической схемы прибора для вытяжки микроэлектродов обеспечивает высокую воспроизводимость.

3. Усилитель с отрицательным входным сопротивлением, построенный на полевом транзисторе

На *рис. 3* изображена блок-схема усилителя с полевым транзистором на входе, который был изготовлен для регистрации внутриклеточной активности. Схема усилителя снабжена компенсационной цепью для устранения входной ёмкости. При создании усилителя (А) принимались во внимание разные требования, предъявляемые к измерениям, и поэтому усилитель был создан для выполнения функций: после компенсации потенциала кончика микроэлектрода [1] с помощью цепи измерения сопротивления [2], по циф-

ровому вольтметру [5] можно следить за сопротивлением электрода; во время отведения можно поляризовать или раздражать исследуемый объект с помощью встроенного поляризатора [3] или внешнего стимулятора, включенного к усилителю; с помощью компенсационной цепи [4] присоединённой к усилителю возможно уменьшение до минимума артефакта раздражения. Отведенные потенциалы действия визуально анализируются на экране осциллографа [6], соединённого к выходному усилителю.

Основные технические данные усилителя

- входное сопротивление 10^{11} ом
- входной ток $1 \cdot 10^{-12}$ А
- компенсация входной ёмкости: до 100 пФ
- коэффициент усиления = 1
- выходное сопротивление: 100 ом
- диапазон регулирования нулевого уровня: ± 20 мв

4. Двухканальная система записи и воспроизведения с частотной модуляцией

Для накопления сигналов, отводимых из клеток, был сконструирован двухканальный аналоговый магнитный накопитель с частотной модуляцией. Установка состоит из стерео-магнитофона с 2×2 полосами, модулятора и демодулятора частоты, созданных в нашем Институте. У модулятора — демодулятора частоты были использованы современные электрические схемы. (Phase Locked Loop). Для обеспечения нужной полосы пропускания сигналов использовался усредняющий фильтр демодулятора, представляющий собой активный фильтр с линейностью по фазе типа Бесселя.

Специфические данные накопителя сигналов:

- частотный диапазон входного сигнала: 0—1250 герц
- отношение сигнал/шум: 40 дБ
- уровень входного сигнала: ± 100 мв
- уровень выходного сигнала: ± 100 мв
- входное сопротивление: 100 Ком
- выходное сопротивление: 500 Ком
- погрешность по линейности: $\pm 1\%$
- скорость движения ленты: 19 см/сек
- ширина ленты: 1/4 дюйма

5. Генератор прямоугольных импульсов

Для стимуляции объектов исследования был использован генератор прямоугольных импульсов с незаземлённым выходом, который был построен на современных полупроводниках и интегральных схемах. Генератор, принципиальная схема которого представлена на *рис. 4*, способен генерировать одиночные и серийные импульсы, а также способен дать запускающий импульс. Задержка импульсов по сравнению с запускающим импульсом, необходимые частоты, длительность и амплитуда, а также полярность выходных сигналов регулируется потенциометрами, расположенными на передней панели.

Технические данные генератора:

- частота выходной серии импульсов: от 0,1 до 200 Гц
- временная задержка: от 0,7 до 600 мсек
- напряжение выходного сигнала: 0—20 в
- выходное сопротивление: 500 ом
- полярность выходного сигнала: положительная или отрицательная.

6. Терморегулирующее устройство

Камера препаратов, дающая возможность быстрого изменения температуры представлена на *рис. 5*. Камера состоит из блока охлаждения [1], снабженного элементом Пельтье [2] и тиристорной цепью [4], управляемой термистором [3]. Металлический лист с терморегулятором [5], находящийся непосредственно под препаратом [6], осуществляет быстродействующее регулирование температуры. Активность исследуемой клетки с помощью микроэлектродной установки [7] регистрируется на осциллографе [8]; с минимальным отношением шум/сигнал (50 децибел).

7. Дифференциальный усилитель построенный на полевом транзисторе

Регистрация активности нервной системы беспозвоночных представляет важную часть комплексных электрофизиологических измерений. Блок-схема дифференциального усилителя с полевым транзистором на входе, созданного для таких измерений, изображена на *рис. 6*. Усилитель в равной мере пригоден для отведения биполярными электродами, работая в этом случае дифференциальным усилителем, и для отведения всасывающими электродами, будучи в этом случае усилителем несимметричного входа. Ширина полосы пропускания усилителя регулируется: во первых, в результате использования присоединенных к выходу усилителя фильтров [1], пропускающих верхние частоты, во вторых, в результате применения фильтров, пропускающих низкие частоты к выходу усилителя типа повторителя [2]. Необходимый уровень выходного сигнала обеспечивается выходным каскадом.

Параметры усилителя:

- входное сопротивление: 2×10 Мом
- выходное сопротивление: 100 ом
- усиление: 60 дб ($1000 \times$)
- нижние частоты пропускания: 1—40—80 Гц (при —3 дб-а)
- верхние частоты пропускания: 100—500—1000 Гц (при —3 дб-а)
- значения уровня шума (по отношению к входу) при разных частотах: 3,3 мкв/20 Гц — 5 мкв/60 Гц — 6,66 мкв/100 Гц — 10 мкв/500 Гц — 16 мкв/1000 Гц.

8. Индикатор сдвига объекта исследования

Для регистрации малых движений биологических препаратов был создан индикатор сдвига, работающий на рефлекторном принципе (*рис. 7*). Первичный излучатель [1] индикатора, питаемый постоянным током, является светодиодом [2], работающим в диапазоне инфракрасного излучения ($\lambda = 940$ нм). Детектор, который воспринимает отраженный от

препарата луч [3], является чувствительным фототранзистором [4] в диапазоне инфракрасного излучения. Детекторный сигнал, поступая на измерительный мост [5], с помощью которого регулируется нулевой уровень, подаётся на вход усилителя (А). Для подавления сигнала помехи применяется активный помехоподавляющий фильтр. Преимуществом индикатору сдвига является то, что он не находится в прямой связи с объектом исследования, механически не нагружает его. Кривая чувствительности индикатора изображена на *рис. 8*. В качестве отражающей поверхности были использованы чёрная [1] и белая [2] бумага. На оси ординат изображено выходное напряжение от 0 до 5 вольт в случае белой бумаги, и от 0 до 0,5 в случае чёрной бумаги. По оси абсцисс изображено расстояние между объектом исследования и воспринимающей головкой.

9. Многоканальная установка внутриклеточного и внеклеточного отведения и регистрации сдвига

На *рис. 9* представлена многоканальная установка, созданная для исследования межнейронных связей. В измерительной системе были использованы усилители, описанные в разделе 3, индикатор движения, описанный в разделе 8, и генератор прямоугольных импульсов, описанный в разделе 5. Блоком визуального контроля является четырехканальный осциллограф. Помимо исследования межнейронных связей установка дает возможность изучения связей между активностью нерва и сокращением мышцы. Суть данного метода заключается в том, что поляризация некоторой выбранной клетки может вызывать изменение активности других клеток. Таким образом, представляется возможность изучения нейронных сетей с использованием многоканального внутриклеточного отведения. Связь между нервной активностью и сокращением мышцы определяется по сигналам, полученным с помощью биполярного отведения и индикатора сдвига.

10. Устройство фиксации напряжения

С помощью этой установки могут быть определены компоненты ионных токов проходящих через мембрану во время фиксации потенциала клетки.

Установка (*Рис. 10*) состоит из усилителей [1] [2] построенных на полевых транзисторах (глава 3), двухступенчатого контрольного усилителя [3, 4], генератора прямоугольных импульсов [5] (раздел 5) и регулятора температуры [6] (раздел 6). Измерение величины и временных отношений ионных токов, проходящих через мембрану, происходит с помощью преобразователя [7] ток-напряжения. Значения тока, относящиеся к различным значениям фиксированного напряжения мембраны, легко определяются на основании калибровки осциллографа [8].

11. Согласующее устройство для обработки данных к многоканальному анализатору

Быструю и точную оценки большого количества данных можно осуществлять с помощью электрической схемы, которая изображена на *рис. 11*. Используя данную схему и 1024 канальный анализатор типа KFKI NTA-512B

в режиме «ON-line» или с применением системы записи и воспроизведения с частотной модуляцией в режиме «OFF-line» возможно обрабатывать данные полученные при отведении от нейронов. Аналоговый сигнал проходя через усилитель [1], нулевой компаратор [2] и одновибратор [3] становится пригодным для подачи через согласующую цепь [4] на вход анализатора [5] на соответствующем логическом уровне [4].

Данная схема формирует функции межспайковых интервалов или длительности потенциалов действия. Функция, описывающая активности и изменение вследствие изменения температуры идентифицированного нейрона виноградной улитки изображается на экране катодной трубки анализатора (на оси ординат представлены межспайковые интервалы или длительность потенциалов действия, на оси абсцисс — порядковые номера интервалов). Составные функции могут быть записаны в ферритную-память, упрощая этим количественную обработку данных.

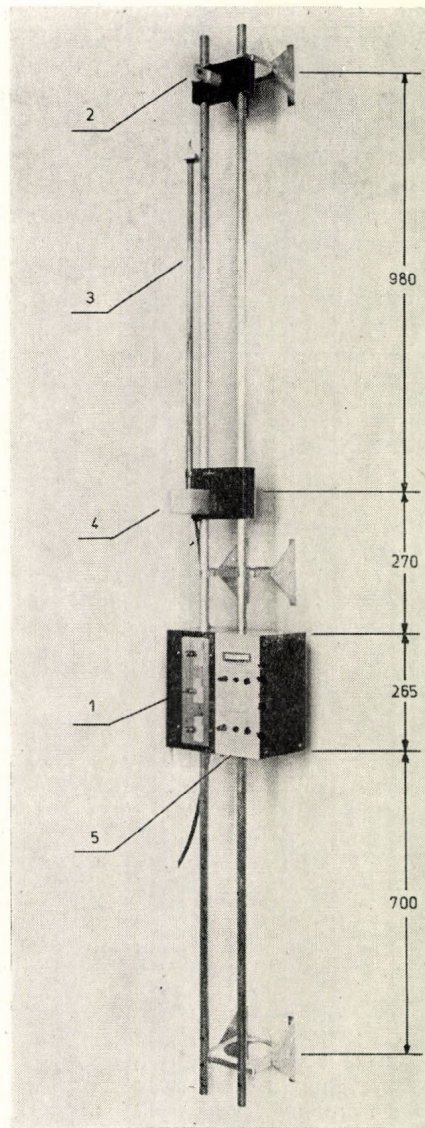
IRODALOM — REFERENCES — ЛИТЕРАТУРА

1. VÉRO, M. (1971): Negative capacitance amplifier for microelectrode investigations. — *Annal. Biol. Tihany* **38**, 107—115.
2. S.-RÓZSA, K., M. VÉRO (1971): Electrocardiograms in insecta and gastropoda and their changes under experimental conditions. — *Annal. Biol. Tihany* **38**, 79—86.
3. VÉRO, M. (1972): Transistorized square wave generator for biological investigations. — *Annal. Biol. Tihany* **39**, 75—80.
4. KISS, I., J. SALÁNKI, M. VÉRO (1972): Dependence of reaction to Ach on the membrane potential of neurones of *Lymnaea stagnalis*. — *Annal. Biol. Tihany* **39**, 21—27.
5. VÉRO, M. (1973): Horizontal puller for the preparation of gass microelectrodes. — *Annal. Biol. Tihany* **40**, 109—113.
6. VÉRO, M. (1973): Multichannel analyzer classifying circuit for the determination of action potential intervals and durations. — *Annal. Biol. Tihany* **40**, 115—120.
7. VÉRO, M. (1974): Voltage clamp measurement set-up for investigation of membrane parameters. — *Annal. Biol. Tihany* **41**, 111—117.
8. VÉRO, M. (1974): Temperature control network for the investigation of nerve cells. — *Annal. Biol. Tihany* **41**, 119—126.
9. VADÁSZ, I. M. VÉRO (1974): Effect of temperature transition on the activity parameters of Br-type neurone of *Helix pomatia* L. — *Annal. Biol. Tihany* **41**, 81—89.
10. SALÁNKI, J., I. VADÁSZ, M. VÉRO (1973): Temperature dependence of the activity pattern in the Br-type cell of the snail *Helix pomatia* L. — *Acta physiol. Acad. hung.* **43**, 115—124.
11. SALÁNKI, J., I. VADÁSZ, M. VÉRO (1975): *Helix pomatia* L. Br-típus-sejtje aktivitás mintázatának hőmérsékletfüggése. — *Biológia* **22**, 145—159.
12. VÉRO, M. (1975): Hőmérsékletszabályozó áramkör idegsejtek működésének vizsgálatához. — *Orvos és Technika* **4**, 105—110.
13. VÉRO, M. (1976): Voltage clamp mérési összeállítás membrán paraméterek vizsgálatához. — *Orvos és Technika* **1**, 7—11.
14. VADÁSZ, I., M. VÉRO (1975): Ion current temperature dependence of Br-type neuron of *Helix pomatia* L. — *Annal. Biol. Tihany* **42**, 129—137.
15. VÉRO, M. (1976): Glass capillar drawing machine for electrophysiological purposes. — *Annal. Biol. Tihany* **43**, 29—37.
16. VÉRO, M. (1976): Movement indicator for biological objects with electro-optical sensing device. — *Annal. Biol. Tihany* **43**, 37—42.

VÉRO MIHÁLY

H-8237 Tihany

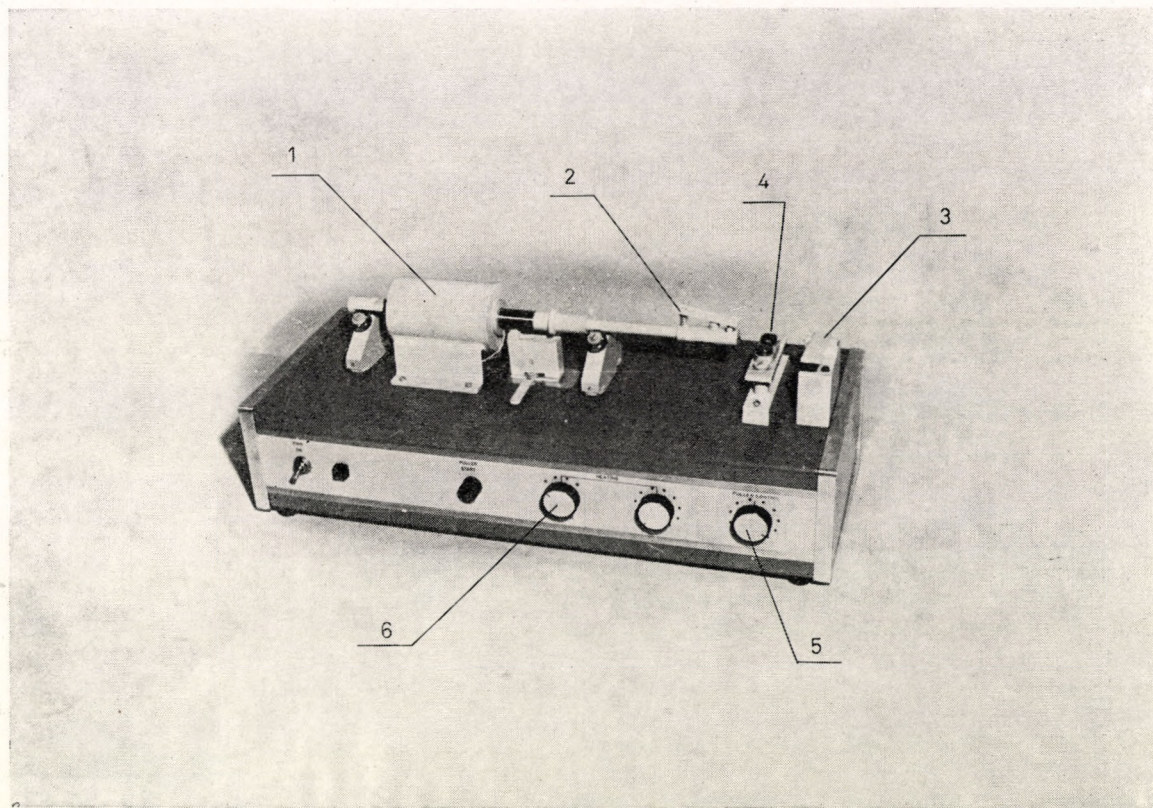
Biológia, Hungary



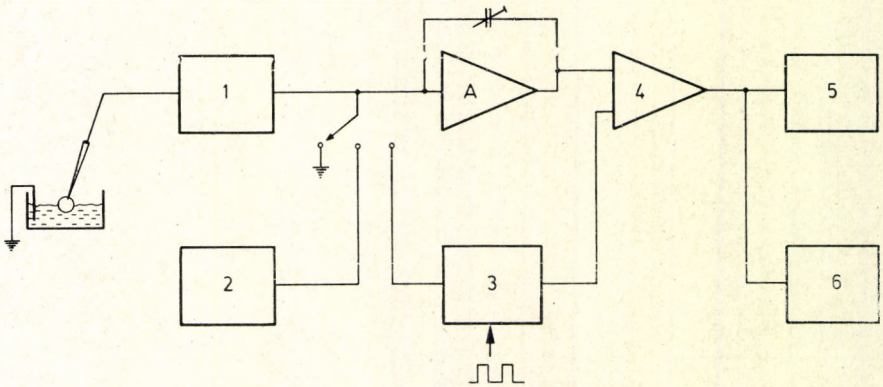
1. ábra. Üvegkapilláris húzó konstrukciós elrendezése

Fig. 1. Construction arrangement of the glass capillar drawing machine

Рис. 1. Конструктивное оформление устройства автоматической вытяжки капилляров



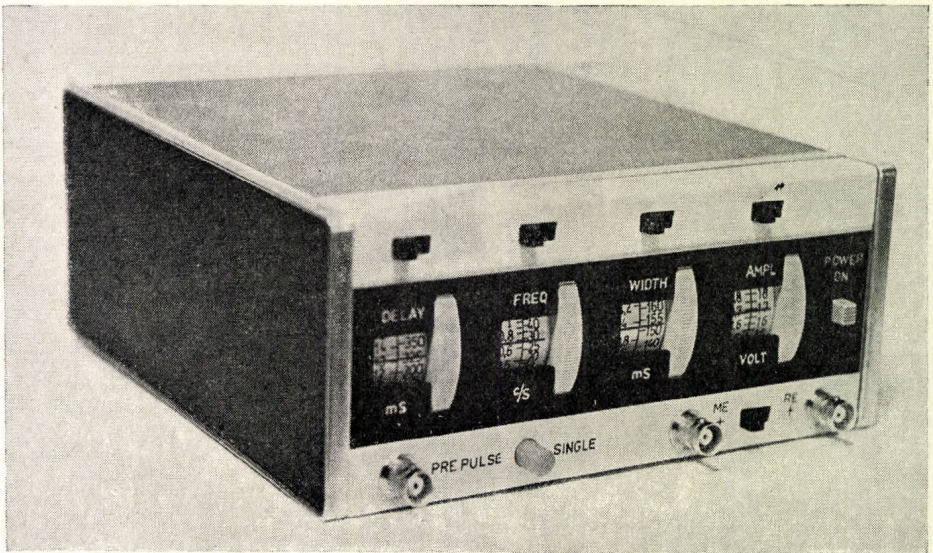
2. ábra. Mikroelektróda húzó konstrukciós elrendezése
Fig. 2. Construction arrangement of the microelectrode puller
Рис. 2. Конструктивное оформление устройства вытяжки микроэлектродов



3. ábra. FET bemenetű erősítő blokkdiagramja

Fig. 3. Block diagram of the FET-input amplifier

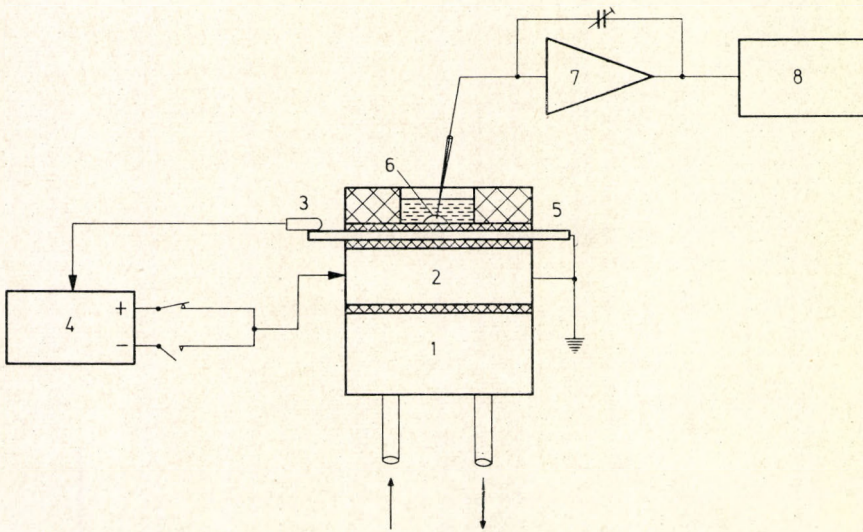
Рис. 3. Блок-схема усилителя с отрицательным входным сопротивлением, построенного на полевом транзисторе



4. ábra. Négyszöghullámú ingerlő konstrukciós elrendezése

Fig. 4. Construction arrangement of the square-wave stimulator

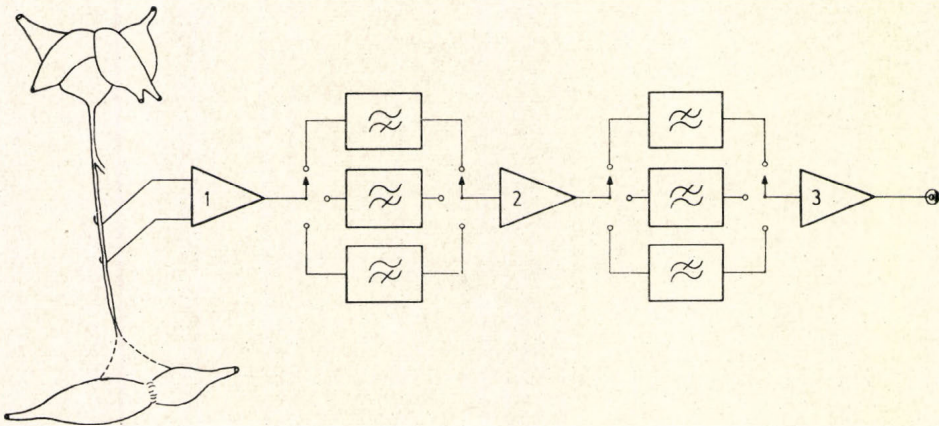
Рис. 4. Внешнее конструктивное оформление генератора прямоугольных импульсов



5. ábra. Hőmérsékletszabályozó blokkdiagramja

Fig. 5. Block diagram of the temperature control equipment

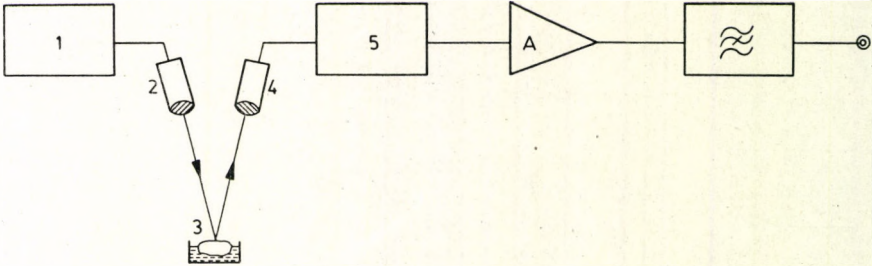
Рис. 5. Блок-схема терморегулирующего устройства



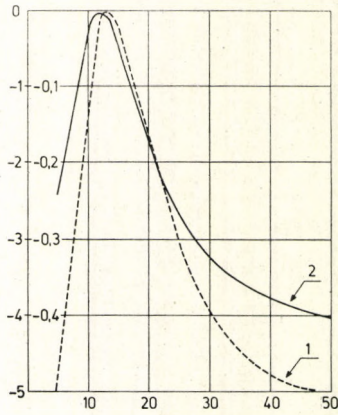
6. ábra. FET bemenetű differenciál erősítő blokkdiagramja

Fig. 6. Block diagram of the FET-input differential amplifier

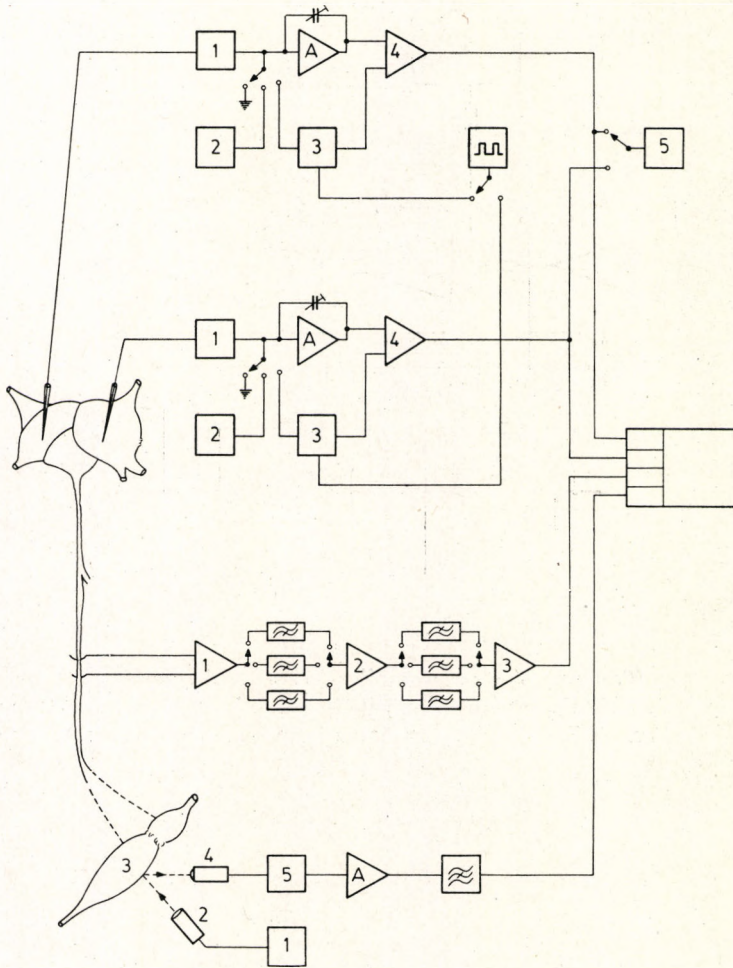
Рис. 6. Блок-схема дифференцирующего усилителя, построенного на полевом транзисторе



7. ábra. Mozgás indikátor blokkdiagramja
 Fig. 7. Block diagram of the movement indicator
 Рис. 7. Блок-схема индикатора сдвига объекта исследования



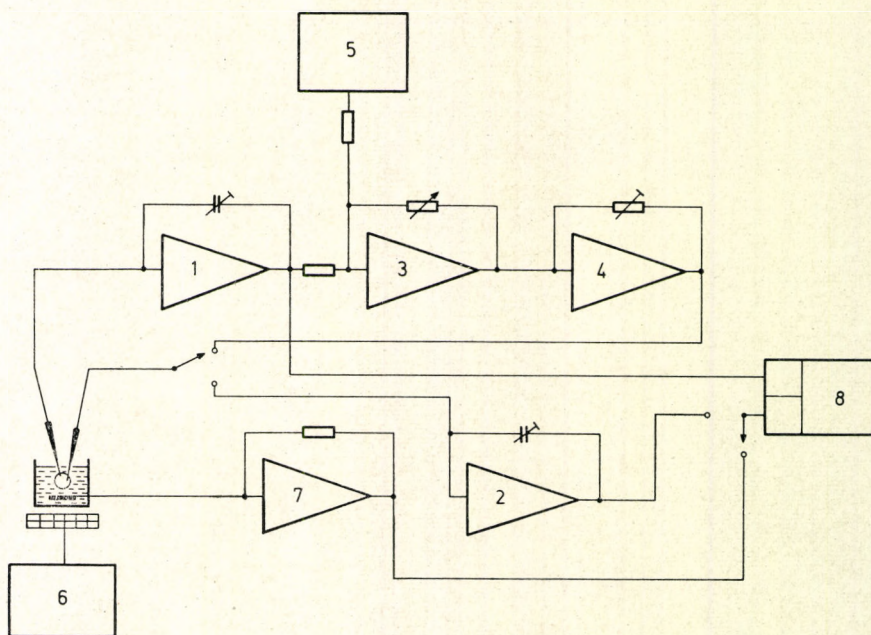
8. ábra. Mozgás indikátor érzékenységi görbéi
 Fig. 8. Sensitivity response of the movement indicator
 Рис. 8. Кривые чувствительности устройства сдвига объекта исследования



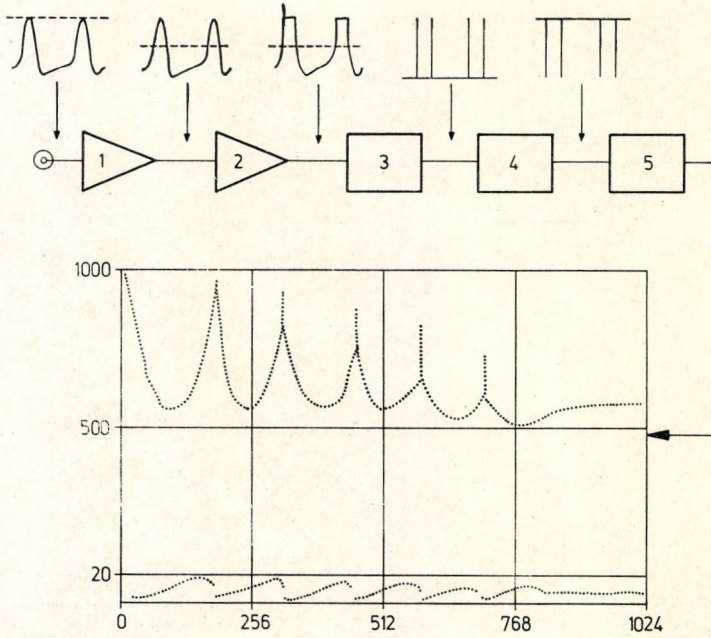
9. ábra. Többcsatornás intra- és extracelluláris elvezetés, valamint mozgás regisztrálás blokkdiagramja

Fig. 9. Block diagram of the multichannel intracellular and extracellular pick-up, even as movement recording

Рис. 9. Блок-схема многоканального внутриклеточного и внеклеточного отведения и индикатора сдвига объекта исследования



10. ábra. „Voltage clamp” mérés blokkdiagramja
 Fig. 10. Block diagram of the “Voltage clamp” measurement set-up
 Рис. 10. Блок-схема устройства фиксации напряжения



11. ábra. Analizátoros adatfeldolgozás blokkdiagramja

Fig. 11. Block diagram of the data evaluation method for multichannel analyzer

Рис. 11. Блок-схема обработки данных с помощью анализатора и согласующего устройства

