

СПОСОБ МИНИМИЗАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПРИ ВВЕДЕНИИ МИКРОЭЛЕКТРОДА В НЕЙРОН

© 2020 г. В.И. Орлов*, С.А. Ивлев**, Г.Г. Бондарь**

*Академия биологии и биотехнологии Южного Федерального университета,
344091, Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/1

**Научно-исследовательский технологический центр нейротехнологий Южного Федерального университета,
344091, Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/1

E-mail: ins270386@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.01.2020 г.

После доработки 03.05.2020 г.

Принята к публикации 25.05.2020 г.

Погружение микроэлектрода в сому клетки является одним из самых уязвимых мест в методике регистрации внутриклеточной активности. Показателем повреждения нейрона при прокалывании мембраны может служить посттравматическая активность. В работе представлены результаты апробации разработанного авторами импульсного электромагнитного микроманипулятора, предназначенного для менее травматичного и более контролируемого введения микроэлектрода. Эксперименты с регистрацией внутриклеточной активности проводились на нейронах препарата изолированной центральной нервной системы виноградной улитки (*Helix pomatia*). Результаты, полученные при использовании сконструированного устройства, демонстрируют отсутствие выраженной реакции нейрона на вторжение микроэлектрода, быстрое восстановление стабильного состояния клетки и возможность длительной (многочасовой) регистрации активности нейрона. Все это указывает на целесообразность использования предлагаемого устройства в экспериментах с регистрацией внутриклеточной активности элементов нервной системы и других возбудимых тканей.

Ключевые слова: нейрон, внутриклеточная регистрация активности, импульсный электромагнитный микроманипулятор, потенциал действия, мембранный потенциал.

DOI: 10.31857/S0006302920040158

Метод внутриклеточной регистрации биоэлектрической активности в возбудимых тканях живых организмов [1–7], имеющий почти столетнюю историю применения, переживает в настоящее время свое «второе дыхание». Помимо традиционно применения (микроионофорез, поляризация мембран и пр.), его часто используют в комплексных мультидисциплинарных исследованиях в сочетании с новейшими биофизическими, нейрохимическими, оптофизиологическими, ультраструктурными, нейроморфологическими методами [2, 3]. Например, оптическая регистрация активности нейронов может сочетаться с внутриклеточной регистрацией их электрической активности для сопоставления и последующего анализа информации, получаемой с помощью этих методов [2].

Вместе с тем, несмотря на многолетние усилия исследователей по усовершенствованию метода, регистрация внутриклеточной активности по-прежнему сопряжена с рядом технических трудно-

стей, связанных, прежде всего, с риском повреждения клетки. Механические свойства мембраны, в частности ее прочность и эластичность, существенно затрудняют управляемое погружение микроэлектрода вглубь клетки и увеличивают вероятность повреждения нейрона при прокалывании мембраны, либо значительно увеличивают время восстановления его исходного функционального состояния после прокола [4–7].

Обычно для проникновения в клетку используется аккуратное микронажатие (мягкое или, наоборот, резкое) на микроманипулятор. Применяются также электронные методы, заключающиеся в пропускании через микропипетку переменного тока высокой частоты или в прикладывании большого положительного (или отрицательного) потенциала. Тем не менее все эти приемы чреваты повреждением клетки [4, 7].

Стремление усовершенствовать приемы введения микроэлектрода в нейрон привело авторов к идее создания импульсного электромагнитного микроманипулятора (ИЭММ).

Сокращение: ИЭММ – импульсный электромагнитный микроманипулятор.

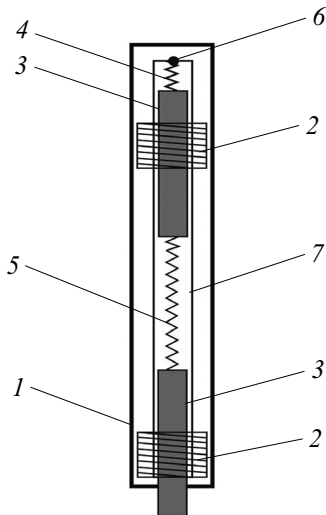


Рис. 1. Схема устройства импульсного электромагнитного микроманипулятора: 1 – внешний экранирующий корпус; 2 – управляющая (нижняя) и компенсирующая (верхняя) электромагнитные катушки; 3 – ударный (нижний) и компенсирующий (верхний) стержни; 4 – пружина подвески стержней; 5 – пружина, связывающая стержни; 6 – точка подвески подвижных элементов устройства; 7 – внутренний корпус устройства.

Оптимальным для обеспечения минимального травмирования представлялся способ, при котором микроэлектроду придается ударное ускорение, обеспечивающее очень короткий, дозированный по амплитуде шаг. При этом было желательно, чтобы ударное воздействие на микроэлектрод не сопровождалось последующими дополнительными вибрациями.

Принципиальная схема разработанного устройства представлена на рис. 1.

Движущимися элементами ИЭММ являются два одинаковых стержня 3: ударный и компенсирующий. Стержни подвешены к общей точке фиксации 6 с помощью двух пружин 4 и 5, выполненных из вольфрамовой проволоки диаметром 50 мкм.

Питание электромагнитов 2, приводящих в движение ударный и компенсирующий стержни, осуществляется короткими (0.5–1.0 мс) прямоугольными импульсами тока, подаваемыми от обычного лабораторного электростимулятора (ЭСЛ-2) на оба электромагнита одновременно. С подачей импульса на электромагниты ударный стержень осуществляет микроудар по торцу микропипетки (калибруется заранее); при этом компенсирующий стержень осуществляет движение в противоположную сторону, демпфируя вибрацию ИЭММ и предохраняя микроэлектрод от колебаний, способных травмировать клетку.

Регулировка демпфирования вибраций в представленном варианте ИЭММ производится за счет

смещения электромагнитов относительно ударного и/или компенсирующего стержней (в отличие от предыдущей версии устройства [8]). В результате отпадает необходимость в использовании специальной перемычки между внутренним корпусом устройства и серединой пружины, связывающей стержни, а также винта регулировки натяжения верхней пружины.

Изготовленный экземпляр представляемого здесь устройства имеет вес 20 г, диаметр 6 мм, длину 5 см. Оптимальный режим гашения вибраций подбирался в процессе изготовления (посредством смещения электромагнитов) под контролем фотоэлемента, затененного ИЭММ, по скачку напряжения на осциллографе. Сила тока, обеспечивающая бросок ударного стержня на 200 мкм, составляла около 300 мА. Внутренний корпус прибора выполнен из тefлоновой трубочки, позволяющей минимизировать трение между внутренним корпусом и подвижными частями устройства.

Устройство предназначено для вертикального погружения микроэлектрода.

Чтобы выяснить, насколько эффективным является применение ИЭММ, были проведены эксперименты в условиях, различающихся лишь способом проникновения микроэлектрода в клетку.

Апробацию устройства проводили на идентифицированных нейронах париетальных ганглиев изолированного подглоточного комплекса виноградной улитки [3].

Для внутриклеточной регистрации нейронной активности использовали стандартные стеклянные микроэлектроды, заполненные раствором 2.5 М KCl; диаметр кончиков микроэлектродов составлял 0.3–0.5 мкм, сопротивление – 10–15 МОм.

В четырех экспериментах погружение микроэлектрода осуществляли с помощью винта микроподача механического манипулятора ММ-1, в пяти экспериментах – с помощью ИЭММ.

В экспериментах с применением микровинта механического манипулятора были зарегистрированы мощные и продолжительные реакции нейронов. Сразу после прокола мембраны начиналась высокочастотная генерация травматических разрядов, которая продолжалась от нескольких минут до нескольких часов и сопровождалась выраженной (десятки мВ) деполяризацией мембранного потенциала. На рис. 2 представлена типичная осциллограмма внутриклеточной активности.

Осциллограмма демонстрирует продолжительную генерацию травматических потенциалов действия, сопровождающуюся изменением мембранного потенциала. Такие интенсивные реакции с затяжным периодом перехода к устойчивому уровню потенциала покоя мембраны – обычное явление при удачном проникновении микроэлектрода в клетку [6].

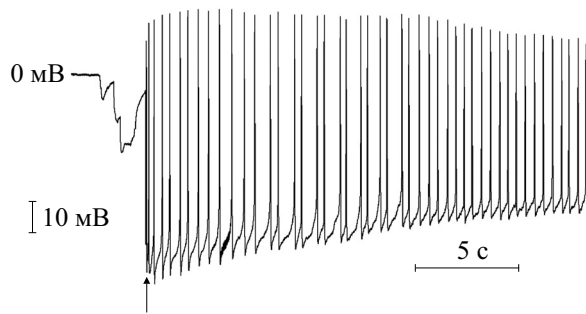


Рис. 2. Активность нейрона виноградной улитки во время погружения микроэлектрода и в первые секунды после прокола мембраны с помощью микровинта механического манипулятора. Момент прокола отмечен стрелкой.

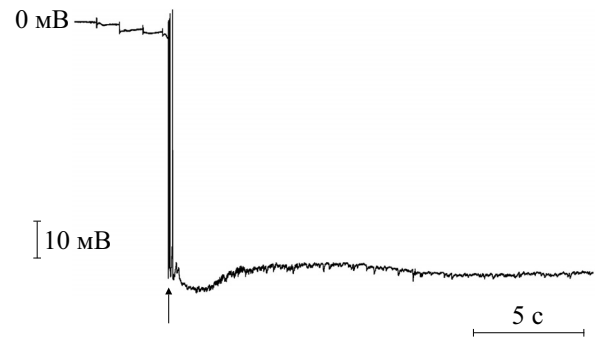


Рис. 3. Активность нейрона виноградной улитки во время погружения микроэлектрода и в первые секунды после прокола мембраны с помощью импульсного электромагнитного микроманипулятора. Момент прокола отмечен стрелкой.

В экспериментах с ИЭММ реакции нейронов разительно отличались от описанных выше.

При проколе мембраны с помощью ИЭММ генерация травматических разрядов была кратковременной (3–5 спайков в течение первых 5–10 мс) во всех экспериментах и не сопровождалась выраженными изменениями мембранного потенциала. Переход к устойчивому уровню потенциала покоя мембраны занимал 12–20 с. На рис. 3 представлена осциллограмма активности одного из зарегистрированных нейронов. Она свидетельствует об отсутствии интенсивной реакции нейрона на вторжение микроэлектрода с помощью ИЭММ и о быстром переходе к спокойному функциональному состоянию. Признаки ухудшения состояния не наблюдались в течение всего эксперимента ни у одной из пяти клеток. (В качестве признаков ухудшения состояния рассматривались резкое изменение амплитуды, формы и длительности спайков и частоты их генерации (по сравнению с наблюдавшимся до прокола характером фоновой активности), а также нестабильность уровня потенциала покоя мембраны.)

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значительно менее травматичном погружении микроэлектрода при использовании ИЭММ.

В чем же, на наш взгляд, кроются причины столь успешного проникновения в клетку с помощью разработанного устройства?

Обычно прикосновение кончика микроэлектрода к мембране нейрона и последующее его продвижение приводят к прогибу и натяжению эластичной мембраны клетки. В тот момент, когда нарушается целостность мембраны и кончик микроэлектрода проникает внутрь нейрона, происходит резкая механическая отдача, вызывающая вибрации мембраны и электрода, зачастую травмирующие клетку.

При использовании ИЭММ микроэлектрод, получив короткий и резкий (с большим ускорением) микроудар, прокалывает мембрану при меньшем ее натяжении, что уменьшает вибрации мембраны, которые «разбалтывают» отверстие, образующееся при проникновении микроэлектрода (имеющего неодинаковую толщину на разных расстояниях от кончика) в клетку. В результате мембрана быстрее сокращается вокруг микроэлектрода, плотно охватывая и удерживая его, и таким образом препятствуя возникающему после прокола свободному обмену ионами между внутренней средой нейрона и внешним, омывающим нейрон, раствором [3, 6].

Оптимальный подбор силы микроудара, стандартизируя воздействия в степени, невозможной даже при самом аккуратном ручном управлении, ограничивает шаг микроэлектрода и устанавливающуюся в итоге глубину его погружения в сому нейрона. Гашение тремора самого ИЭММ, а следовательно, и частей механического манипулятора, несущих микроэлектрод, защищает нейрон от дополнительных вибраций, представляющих серьезную угрозу для клетки. Миниатюрность ИЭММ позволяет закрепить его на обычном механическом манипуляторе непосредственно над микропипеткой таким образом, чтобы ударный стержень находился на оптимальном расстоянии от торца микроэлектрода.

Полученные результаты подтвердили исходное предположение о существенно более щадящем и контролируемом погружении микроэлектрода в клетку с помощью разработанного устройства. О высокой эффективности ИЭММ свидетельствует отсутствие выраженной реакции нейрона на вторжение микроэлектрода, сравнительно быстрое восстановление и длительное сохранение стабильного состояния клетки. Применение устройства упрощает процедуру погружения микроэлектрода,

требующую от экспериментатора специальных навыков.

Такие преимущества ИЭММ расширяют возможности использования метода внутриклеточной регистрации, особенно в экспериментах, предполагающих регистрацию биоэлектрической активности на протяженных временных интервалах, а также открывают обнадеживающую перспективу применения метода для внутриклеточной регистрации нейронной активности мозга высших позвоночных животных, чьи нейроны значительно мельче, чем у беспозвоночных (имеются предварительные неопубликованные данные).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Проведенные эксперименты полностью соответствуют действующим национальным и международным нормам в области этики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. Ling and R. W. Gerard, *J. Cell Comp. Physiol.* **34** (3), 383 (1949).
2. Е. С. Никитин, Дисс. ... д-ра биол. наук (ИВНД и НФ РАН, Москва, 2015).
3. В. Орлов, А. Сухов, О. Кит и др., *Cardiometry*, № 12, 40 (2018).
4. П. Г. Костюк, *Микроэлектродная техника* (Наук. думка, Киев, 1960).
5. Дж. Николлс, А. Р. Мартин, Б. Дж. Валлас и П. А. Фукс, *От нейрона к мозгу* (Едиториал УРСС, М., 2003).
6. Р. Пёрвис, *Микроэлектродные методы внутриклеточной регистрации и ионофореза* (Мир, М., 1983).
7. J. M. Bekkers, R. J. Bookman, M. J. Delay, et al., *The Axon CNS Guide* (Molecular Devices Corp., USA, 2006). http://www.octopus.huji.ac.il/course/Links/Axon_Guide.pdf.
8. С. А. Ивлев, А. Г. Сухов и Г. Г. Бондарь, *Биомед. радиоэлектроника*, № 4, 35 (2015).

Approach to Minimize Damage Resulting from Microelectrode Insertion into Neuron

V.I. Orlov*, S.A. Ivlev**, and G.G. Bondar**

*Academy of Biology and Biotechnology of the Southern Federal University,
prosp. Stachki 194/1, Rostov-on-Don, 344091 Russia

**Research Technology Center of Neurotechnology of the Southern Federal University,
prosp. Stachki 194/1, Rostov-on-Don, 344091 Russia

Penetration of a microelectrode into the cell soma is one of the essential vulnerable stages of the method intracellular recording. Traumatic neuronal activity after piercing the membrane with a microelectrode can be an indicator of neuronal damage. In this paper we report the results from tests of our pulse electromagnetic micromanipulator. This device is designed to reduce the neuronal damage from the insertion of a microelectrode and more controlled penetration into the cell. Intracellular recordings were employed in experiments carried out on neurons of the isolated central nervous system of the grape snail (*Helix pomatia*). The results obtained by using our micromanipulator show the absence of a pronounced neuronal reaction in response to the invasion of a microelectrode, the cell is able to rapidly return to a stable state, and registration of neuronal activity is possible for a long period of time (many hours). These findings indicate the relevance of using the proposed device in experiments that recording intracellular activity of the cells of the nervous system and other excitable tissues.

Keywords: neuron, intracellular activity recording, pulse electromagnetic micromanipulator, action potential, membrane potential