

Boxoft Image To PDF Demo. Purchase from  
www.Boxoft.com to remove the watermark

# МИКРОЭЛЕКТРОДНАЯ ТЕХНИКА

ИЗДАТЕЛЬСТВО  
АКАДЕМИИ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР  
*Киев · 1960*

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР  
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. А. А. БОГОМОЛЬЦА

---

П. Г. КОСТЮК

# МИКРОЭЛЕКТРОДНАЯ ТЕХНИКА

---

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК УКРАИНСКОЙ ССР  
КИЕВ — 1960

Монография представляет собой первое систематическое изложение техники применения микроэлектродов для изучения основных физиологических процессов. Она состоит из двух основных разделов: 1) применение внеклеточных микроэлектродов и 2) применение внутриклеточных микроэлектродов. В каждом разделе подробно описаны способы изготовления микроэлектродов, усилительные системы, которые могут быть использованы при работе с такими микроэлектродами, и методы анализа получаемых результатов. Дается обзор литературы по использованию микроэлектродов в физиологическом эксперименте, в частности подробно освещены последние технические достижения зарубежных нейрофизиологов. Подробно излагаются также способы применения микроэлектродов для других целей, кроме отведения биоэлектрических потенциалов (способы использования микроэлектродов как микроинъекторов для введения в клетки различных веществ, поляризации отдельных клеток через внутриклеточные микроэлектроды и т. д.).

Монография рассчитана на научных работников физиологов, цитологов и клиницистов-нейрофизиологов.

Ответственный редактор  
академик АН УССР Д. С. Воронцов

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Обычно под микроэлектродной техникой понимают отведение электрических потенциалов, а также электрическое раздражение при помощи достаточно тонких и острых электродов, которые могут быть погружены вглубь ткани без существенного повреждения последней. В зависимости от размера микроэлектрода результаты его применения оказываются весьма различными; следует отличать, по крайней мере, три основных случая: 1) отведение от целой группы или области клеток (фокальное отведение), 2) отведение от отдельной клетки при расположении кончика электрода возле нее (внеклеточное отведение) и 3) отведение от отдельной клетки при положении кончика электрода внутри последней (внутриклеточное отведение). Тем не менее, для всех этих случаев есть объединяющие моменты, в первую очередь расположение объекта, от которого отводятся потенциалы или который раздражается электрическим током, в толще ткани, представляющей собой объемный проводник. Тем самым создаются особые условия, отсутствующие при обычной регистрации потенциалов или раздражении нерва и мышцы. Поэтому можно считать оправданным объединение всех довольно разнообразных микроэлектродных методик в отдельную область.

В настоящей книге излагается лишь методическая сторона применения микроэлектродов и возможности, которые оно открывает; она не преследует цель освещения всего того огромного фактического материала, который накоплен при помощи микроэлектродной техники за 10—15 лет бурного ее развития. Отдельные фактические данные приводятся только для освещения способа применения того или иного методического приема.

---





## I. ИЗГОТОВЛЕНИЕ МИКРОЭЛЕКТРОДОВ

**а. Металлические микроэлектроды.** Металлические микроэлектроды являются наиболее простыми в изготовлении и наиболее давно применяемыми. Использование изолированных на значительном протяжении иглоочек для целого ряда исследований, связанных первоначально с локальным раздражением, а затем и отведением потенциалов различных участков мозга, в широких масштабах было начато Лоренте де Но (1935, 1939) и использовано Беритовым с сотрудниками (1943, 1948), Коганом (1949), Моцным (1951) и многими другими.

В таких исследованиях нередко применяются обычные тонкие иглы, а также тонкие проволоочки из упругого металла (сталь, платина, нихром, константан и др.) в готовой фабричной изоляции. Желание сделать кончик электрода как можно тоньше для того, чтобы он отводил или раздражал меньшую область и одновременно причинял меньшие механические повреждения, привело к разработке различных методов его обточки. Механическая обточка является малоэффективной, значительно лучше электролитическая. Стальные микроэлектроды (лучше из нержавеющей стали) обтачиваются в растворах кислот, например в смеси концентрированной серной и ортофосфорной (Грундфест и сотр., 1950). Эти авторы предлагают следующий состав смеси: 34 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты (уд. вес 1,84), 42 см<sup>3</sup> ортофосфорной кислоты (уд. вес 1,69) и 24 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Обтачиваемая проволоочка опускается в чашечку с раствором и соединяется с анодом источника постоянного тока (6 в), в раствор опускается также относительный электрод, соединенный с катодом. Лучше проволоочку укрепить на устройстве, позволяющем плавно опускать и поднимать ее; погруженную часть необходимо постоянно контролировать под длиннофокусным микроскопом, так как процесс обточки идет очень быстро. Регулируя погружение проволоочки, а также силу пропускаемого тока, можно в широких пределах варьировать форму кончика микроэлектрода и его диаметр. После окончания обточки электрод споласкивается в растворе соляной кислоты и

дистиллированной воде и высушивается. Противоположный конец полученной иглолочки можно электролитическим путем покрыть медью, что облегчает припаивание к нему соединительного проводничка.

Возможна такая же обточка и в более простых растворах, например в молярном растворе соляной кислоты (Бишоп и Коллин, 1951; Грин, 1958); технически способ остается таким же. Обычно качество получаемого электрода очень зависит от сорта применяемой стали. Хорошие результаты, кроме нержавеющей стали, дает сталь, используемая для струн. Все же основная масса металлических электродов имеет диаметр порядка 10—20  $\mu$ . Изготовление электродов с кончиком 1—2  $\mu$  требует длительного кропотливого труда, а получение десятых долей микрона, как это указывает, например, Грин, относится, по-видимому, к исключительным случаям. Легче получить микроэлектроды с такими диаметрами при обтачивании вольфрамовой проволоочки (Хюбел, 1957). Обтачивание производится в насыщенном растворе  $KNO_3$  при пропускании через него переменного тока напряжением 2—6 в.

Даже при успешной обточке кончика использование металлических электродов с диаметром его в 1  $\mu$  и менее оказывается очень затруднительным, так как они становятся мягкими. Это затруднение преодолевается до некоторой степени изоляцией электрода, которая придает ему механическую прочность. Однако покрытие микроэлектрода изоляцией само по себе представляет сложную проблему. Наиболее удобными для покрытия являются специальные эмали, применяемые в промышленности для изготовления эмалированных проводов. Из других материалов могут быть рекомендованы бакелитовый лак, полистерол, а также клей БФ. Важным условием успешности изоляции является идеальное обезжиривание покрываемой части спиртом или эфиром. Создание свободного от покрытия кончика достигается сушкой электрода острием вверх, однако величина свободной его части очень варьирует, и необходим последующий отбор электродов под микроскопом с большим увеличением. Нередко дефекты покрытия и трещины оказываются на протяжении самого электрода, а поскольку их не всегда можно обнаружить глазом, то наиболее удобным способом контроля является электрический. Он состоит в том, что электрод погружается в стаканчик с солевым раствором, а раствор и электрод соединяются с источником тока цепью, в которую включен миллиамперметр. При хорошем покрытии ток возникает, как только кончик электрода касается жидкости, и в дальнейшем не изменяется. Наличие новых скачков тока при дальнейшем погружении указывает на дефекты покрытия.

Большую механическую прочность дает покрытие бакелитовым лаком. Недостатком этого метода является необходимость помещения электрода для полимеризации лака в сушильный

шкаф при температуре  $150^{\circ}\text{C}$  (на полчаса). Нередко после этой процедуры кончики оказываются изогнутыми; чем последние тоньше, тем больше вероятность, что они будут деформированы. В последнее время нередко рекомендуется покрытие особенно тонких металлических электродов стеклом (Хоулэнд и сотр., 1953; Мощный, 1955; Ямамото и сотр., 1956; Баумгартен, 1956). Обточенный микроэлектрод помещается в стеклянную трубочку (диаметром около 2 мм), которая затем вытягивается либо от руки, либо в аппарате для изготовления стеклянных микроэлектродов (см. раздел I, б). При удачном вытягивании микроэлектрод оказывается покрытым до самого кончика тонким слоем стекла, которое создает ему необходимую прочность и надежную изоляцию. Толщина изоляции может играть определенную роль в успешности отведения (Бызов, 1957) и должна быть оптимальной.

Иногда применяется вытягивание стеклянной трубочки вместе с помещенным в нее легкоплавким припоем (Светихин, 1951; Бернс, 1954), что сразу создает и микроэлектрод, и его изоляцию. В качестве хорошего заполнителя рекомендуется индий (Маунткасл и сотр., 1957).

В ряде случаев металлические погружные микроэлектроды изготавливаются двойными или даже множественными; отдельные проволочки располагаются либо рядом, либо одна в другой (коаксиальный электрод). Такие электроды особенно удобны для локального раздражения различных структур мозга, но размеры их обычно настолько велики, что они с большим трудом подходят под название «микроэлектроды».

Существенным достоинством металлических электродов является их небольшое сопротивление по сравнению со стеклянными микроэлектродами, заполненными электролитом. Но если кончик микроэлектрода значительно уменьшать, то нередко это сопротивление возрастает настолько, что затрудняет использование электрода с обычным усилителем и требует применения особых входных каскадов (см. раздел III, а). Локализуется это высокое сопротивление в пограничном слое между металлом и жидкостью, с которой он соприкасается, и наличие очень чистой поверхности способствует его уменьшению. Поэтому для очень тонких металлических микроэлектродов приходится постоянно прибегать к очистке их кончиков хромовой смесью или покрытию их электролитическим путем платиновой чернью, родием и т. д. (Светихин, 1951). Предлагается также погружать кончик микроэлектрода в стеклянную микропипетку, носик которой заполнен раствором  $\text{NaCl}$  на агаре. Большая поверхность контакта металла с раствором заметно уменьшает сопротивление электрода (Бызов, 1957).

Все же металлические микроэлектроды оказываются мало подходящими в том случае, когда необходим особенно незначительный диаметр кончика —  $1\ \mu$  и менее. Изготовление таких



микроэлектродов оказывается чрезвычайно трудоемким процессом, а сами по себе они мало прочны, легко ломаются. Поэтому металлические электроды нашли широкое применение главным образом для фокального отведения и раздражения, а также в ряде случаев для внеклеточного отведения потенциалов отдельных нейронов, т. е. тогда, когда можно удовлетвориться диаметром в несколько микрон или даже в несколько десятков микрон. При использовании микроэлектродов с диаметром менее  $1 \mu$  (что является основным условием внутриклеточного отведения) наиболее удобными оказались стеклянные микроэлектроды.

**б. Стеклянные микроэлектроды.** Систематическое применение стеклянных микроэлектродов для отведения потенциалов изнутри отдельных клеток было начато Грейм и Джерард (1946) и Линг и Джерард (1949). Такого типа микроэлектрод представляет собой микропипетку, заполненную каким-либо электролитом. Стенки пипетки дают надежную изоляцию электрода вплоть до самого кончика, отверстие которого и является отводящей частью. В широкую часть пипетки в электролит погружается проволочка, соединяющая микроэлектрод с входным устройством. Вначале были испробованы пипетки с диаметром кончика  $2-5 \mu$ , но оказалось, что они сразу же повреждают даже такие большие клетки, как поперечнополосатые мышечные волокна. Поэтому методика вытягивания микропипетки была усовершенствована, так что по желанию легко можно было получать диаметры кончика вплоть до  $0,1-0,2 \mu$  и даже ниже — до  $0,05 \mu$  (Светихин, 1953).

Для успешности применения стеклянного микроэлектрода существенным оказался не только диаметр кончика, но и форма его тонкой части. Тонкая часть не должна быть слишком длинной, так как в этом случае электрод получается слишком гибким и не прокалывает ткань и поверхность клеток. Вместе с тем она не должна быть и слишком короткой, так как тогда электрод начинает давить на клетки и повреждать их. Наиболее удобной оказалась форма, показанная на рис. 1, а и состоящая из двух ступенек. В некоторых случаях изготавливаются электроды, состоящие и из большего количества постепенно уменьшающихся по диаметру ступеней.

Стеклянные микропипетки можно вытягивать вручную из тонких стеклянных трубочек в пламени миниатюрной горелочки (Линг и Джерард, 1949). Однако такой способ требует длительной тренировки и малоэффективен: он дает очень большой отход стекла. Несколько более совершенным способом является растяжение вертикально подвешенных стеклянных трубочек грузом (Уил, 1951, и др.). Трубочки-заготовки с диаметром от нескольких десятых до  $1,5-2,0 \text{ мм}$  из тугоплавкого стекла подвешиваются строго вертикально. Вокруг средней части трубочки укрепляется спираль, разогреваемая постоянным или переменным током (например, от понижающего трансформатора на  $6 \text{ в}$ ).



Для более эффективного разогревания стекла спираль должна лишь немного превышать диаметр трубочки; в то же время она не должна касаться последней, так как иначе трубочка спаяется со спиралью. К концу трубочки при помощи зажима прикрепляется груз, величина которого зависит от диаметра трубки, ее тугоплавкости, нагрева спирали и проч. При изготовлении двухступенчатого микроэлектрода груз должен быть сменным: когда более тяжелый груз вытягивает капилляр желаемой толщины, ток выключается, чтобы не допустить разрыва, затем груз ос-

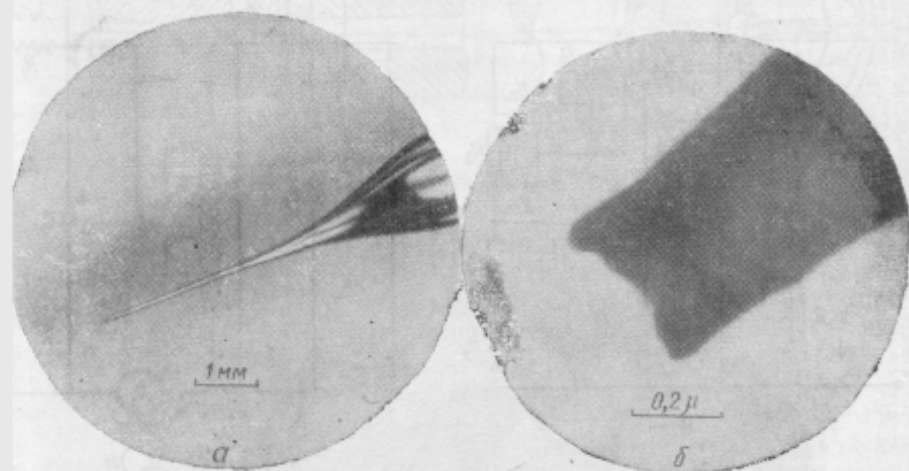


Рис. 1. Стеклнные микропипетки, используемые для изготовления стеклнных микроэлектродов:  
 а — увеличение в 10 раз, б — увеличение в 60 000 раз (электронный микроскоп).

торожно меняется на более легкий, и на этот раз нагрев поддерживается до разрыва. Если изготовить какой-либо улавливатель, который не дает грузу с нижним концом трубочки падать, то из одной трубочки можно получить два электрода.

Изготавливать ступенчатые микроэлектроды при таком методе можно и без смены груза — путем подведения к трубочке последовательно раскаленных нагревателей из проволоки разного диаметра и с разным количеством витков. Каждый последующий нагреватель разогревает все более узкий участок трубочки, чем и можно создать необходимые ступеньки. Вытягивание ведется под контролем микроскопа (Курелла, 1958а).

Основным недостатком всех этих способов является малая их производительность. Поскольку стеклнные электроды очень хрупки и легко ломаются при введении, а кроме того значительная часть их портится при заполнении электролитом, то фактически подавляющая часть времени экспериментатора уходит на их изготовление. Поэтому естественно стремление автоматизировать этот процесс. Разработан ряд аппаратов для автоматизи-

ческого изготовления стеклянных микроэлектродов; принцип их действия один и тот же, и отличаются они только деталями. Вытяжение трубочки-заготовки производится электромагнитом, сила которого изменяется по ходу вытяжения системой реле, чем достигается образование необходимой формы электрода и тонкого кончика. Весьма удачна схема, предложенная Александре-

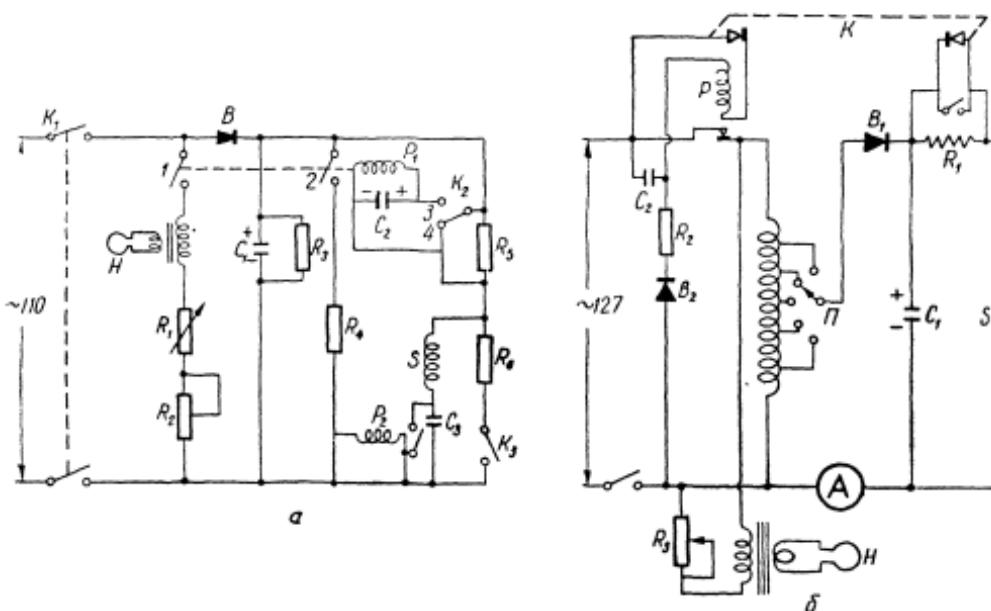


Рис. 2. Схемы аппаратов для вытягивания стеклянных микроэлектродов:  
а — схема Александр и Настук.

Сопротивления:  $R_1$  — 50 ом, 25 вт,  $R_2$  — 200 ом, 25 вт,  $R_3$  — 400 ком, 0,5 вт.  $R_4$  — подбирается,  $R_5$  — 500 ом, 25 вт,  $R_6$  — 500 ом, 10 вт; емкости:  $C_1$  — 300 мкф, 150 в,  $C_2$  — 40 мкф, 150 в,  $C_3$  — 1 мкф, 1000 в; реле  $P_1$  — 3000 ом;  $B$  — селеновый выпрямитель, 130 в, 500 ма; сопротивление соленоида 100 ом;

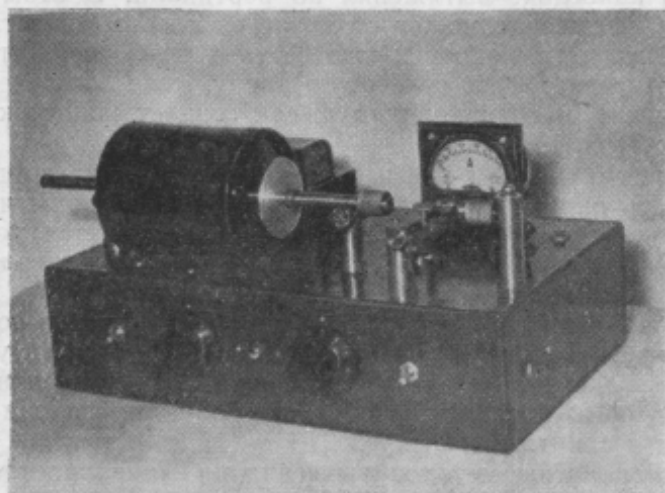
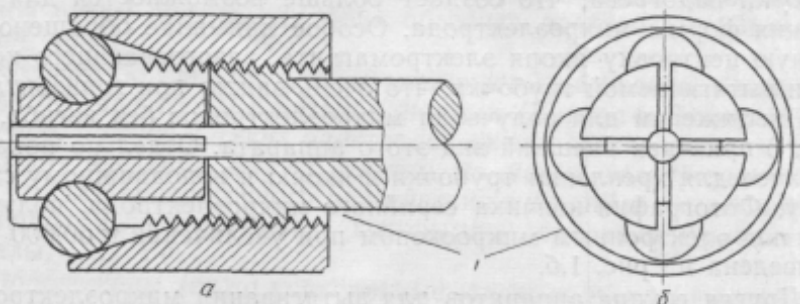
б — схема Кравцова.

Выпрямитель  $B_1$  — диоды ДГЦ-24 (10 штук параллельно);  $C_1$  — 300 мкф; 200 в,  $C_2$  — 150 мкф, 200 в,  $R_1$  подбирается,  $R_2$  — 200 ом, 25 вт,  $B_2$  — ДГЦ-24 (1 шт.).

ром и Настуком (1953), рис. 2,а. Вытяжение трубочек, подогреваемых кольцом  $H$ , производится соленоидом, последовательно с которым включено сопротивление  $R_5$ . В исходном положении (при вставленной трубочке) контакт  $K_2$  находится в положении 3. При нажатии кнопки  $K_3$  подается напряжение на реле  $P_1$ , которое включает подогрев и реле  $P_2$ . Последнее включает соленоид  $S$ . При вытяжении трубочки на определенную длину контакт  $K_2$  переключается из положения 3 в положение 4, тем самым закорачивая это сопротивление и увеличивая силу тока в цепи соленоида с 0,19 до 1,2 а, что соответствует увеличению силы растяжения со 100 до 1700 г. С небольшой задержкой после этого (вызванной емкостью  $C_2$ ) выключается двойное реле  $P_1$  и выключает как цепь подогрева, так и реле  $P_2$ . На изготов-

ление двух микроэлектродов в таком аппарате достаточно 30 секунд.

В нашей лаборатории аналогичный аппарат (с заменой селенового выпрямителя более стабильно работающим кенотронным) работает в течение ряда лет. При условии стандартных



2

Рис. 3. Аппарат Кравцова для вытягивания стеклянных микроэлектродов:

1 — конструкция кулачка для крепления стеклянной трубочки  
(а — продольное сечение, б — поперечное сечение);  
2 — внешний вид.

внешних диаметров и толщины стенки трубочек он дает совершенно одинаковые результаты. Нужно отметить, что в аппарате может быть сделан ряд упрощений, не ухудшающих его работу. На том же рисунке (б) показана схема аппарата, разработанного в нашей лаборатории Кравцовым. В ней для выпрямления использованы полупроводниковые диоды.

В этой схеме сила тока в соленоиде увеличивается с 200 ма до 2 а закорачиванием сопротивления  $R_1$  (260 ом), что осуществляется двойным контактором К. Вторая пара контактов од-



новременно размыкает цепь реле  $P$ , включающего питание автотрансформатора и трансформатора подогрева. Регулировкой времени срабатывания этого реле создается необходимое запаздывание выключения цепи подогрева и соленоида. Ток в цепи соленоида регулируется переключателем  $\Pi$  независимо от регулировки подогрева, что создает больше возможностей для вариации формы микроэлектрода. Особое внимание обращено на точную центровку якоря электромагнита, разогревающего кольца и вытягиваемой трубочки, что очень важно при горизонтальном вытяжении для получения микроэлектродов без изгиба. На рис. 3 приведен внешний вид этого аппарата. Отдельно показан кулачок для крепления трубочки к якорю и неподвижному столбику. Фотография кончика серийного микроэлектрода, полученная под электронным микроскопом при увеличении в 60 000 раз, приведена на рис. 1,б.

Другая группа аппаратов для вытягивания микроэлектродов построена на основе вытяжения по вертикали. В этом случае начальное вытяжение может создаваться просто тяжестью якоря электромагнита, подвешенного снизу к трубочке. Когда трубочка растягивается на некоторую длину, реле включает ток в электромагнит, и возникающий рывок создает конический кончик (Уинсбюри, 1956).

Наилучшим стеклом для изготовления микроэлектродов следует считать пирекс, однако могут быть использованы и другие тугоплавкие сорта стекла. Нежелательным является использование молибденового стекла, поскольку при заполнении электролитом изготовленных из него микроэлектродов в кончике быстро образуются кристаллы, резко увеличивающие сопротивление микроэлектрода и делающие его непригодным к употреблению. Стекланные трубки перед употреблением должны быть тщательно обезжирены кипячением в растворе щелочи и промыванием в спирте или эфире.

На основе этих методов вытягивания микропипеток могут быть созданы и более сложные типы стекланных микроэлектродов, употребляемые для специальных целей. Так, могут быть изготовлены двухканальные микроэлектроды, имеющие два отдельных канала и два отверстия на кончике (Кумс, Экклс и Фатт, 1955а; Костюк и Шаповалов, 1960а). Двухканальные электроды изготавливаются путем растяжения двойных трубочек-заготовок; последние могут быть получены либо путем помещения стеклнной перегородки внутрь обычной трубки, либо путем спаивания по всей длине обычных трубок. Первый способ очень сложен. Он требует также дополнительного заклеивания щелей между перегородкой и внутренней стенкой трубки жидким стеклом. Второй способ более эффективен. Поскольку кончики у двухканальных электродов оказываются особенно хрупкими и легко ломаются при их заполнении или при введении, важным моментом при изготовлении таких микроэлектродов является

тщательный подбор стекла. Двухканальные микроэлектроды являются очень удобными для одновременного раздражения и отведения потенциалов одной и той же клетки через внутриклеточный микроэлектрод.

Возможно также изготовление двухканальных микроэлектродов путем склеивания двух обычных электродов (Бызов и Утина, 1959).

Количество каналов можно увеличить еще больше. Описаны, например, электроды с пятью каналами (Кертис и Эклс, 1958). Конечно, кончик у таких электродов оказывается слишком толстым для введения внутрь клетки, но такие электроды очень удобны для внеклеточного воздействия на одну и ту же клетку различными веществами, которыми заполнены различные каналы.

Предложены также коаксиальные двойные стеклянные микроэлектроды (Томота и Торишама, 1956; Томота, 1956; Фрейганг и Франк, 1959). Внутри микропипетки с большим диаметром отверстия на кончике вкладывается более тонкая пипетка с очень тонким кончиком. Благодаря специальному устройству кончик внутренней пипетки может находиться либо на уровне края отверстия наружной, либо выдвигаться из нее на несколько микрон. Тем самым оказывается возможным, например, одновременно отводить потенциалы изнутри и снаружи одной клетки.

Готовые микропипетки заполняются электролитом. Первоначально было предложено заполнять их изотоническим раствором  $KCl$  (Линг и Джерард, 1949), однако при таком заполнении электроды приобретают очень высокое сопротивление (50—150 *Мом*). Проблема сопротивления стеклянного микроэлектрода очень важна; высокое его сопротивление вынуждает применять специальные входные устройства для уменьшения искажений отводимых потенциалов. Поэтому вскоре было рекомендовано пользоваться раствором  $KCl$ , близким к насыщенному. Обычно принят 3-*М* раствор (Настук и Годжкин, 1950), при котором сопротивление электрода с диаметром кончика около 0,5  $\mu$  составляет 10—30 *Мом*. Применение  $KCl$  диктуется необходимостью уменьшить собственный диффузионный потенциал электрода, что особенно важно при отведении постоянной разности потенциалов (например, потенциала покоя клетки). В нашей лаборатории предпочитается заполнение не 3-*М*, а 2,5-*М* раствором, уменьшающим вероятность кристаллизации в электродах при незначительном подсыхании раствора, в котором они хранятся, и в то же время не увеличивающим существенно их сопротивление. Для некоторых специальных целей, однако, применяются и другие заполнители, которые могут быть использованы одновременно как для отведения потенциалов из клетки, так и для введения их внутрь ее с помощью диффузии или ионофореза (см. раздел VII, а). Использование раствора  $KCl$  удобно еще и в том отношении, что благодаря высокой кон-



центрации ионов  $K^+$  внутри клетки (около  $0,12 M$ ) некоторая диффузия электролита из кончика наружу не изменяет существенно внутриклеточную концентрацию этих ионов и тем самым не оказывает на клетку постороннего действия. Правда, ионы  $Cl^-$  содержатся в клетках в ничтожном количестве, и проникновение их из электрода может оказывать специфическое действие на клетку. В тех случаях, когда следует опасаться такого действия (например, при изучении процессов торможения в центральных нейронах, связанных в значительной мере именно с градиентами ионов  $Cl^-$ ), применяется заполнение микроэлектродов раствором  $K_2SO_4$  в концентрации  $0,6 M$  (Кумс, Экклс и Фатт, 1955б).

Сама по себе диффузия электролита из микроэлектрода незначительна и может, по-видимому, приводить к существенно изменению деятельности клетки лишь при длительном расположении в ней микроэлектрода. По подсчетам Настука и Годжкина, вскоре после погружения кончика электрода в раствор из него должен установиться постоянный ток электролита порядка всего  $6 \times 10^{-14}$  мол/сек. Учет диффузии усложняется тем, что она может изменяться во время погружения микроэлектрода в ткань (например, при механическом блокировании отверстия каким-нибудь образованием). В качестве меры, уменьшающей влияние диффузии, рекомендуется заполнение микроэлектрода раствором электролита с 1% агар-агара (Кертис, Крневич и Миледи, 1958).

Простейшим способом заполнения микроэлектрода является кипячение его в растворе электролита на протяжении примерно 30 минут. Поскольку обычно готовится целая партия электродов, то они все вместе укрепляются остриями вниз либо на предметном стекле (при помощи резинового ободка), либо на специальных штативах. В таком смонтированном виде они затем и хранятся до употребления. Прямое кипячение в  $KCl$ , однако, связано с поломкой значительного количества кончиков. Поэтому предпочитают применение промежуточного заполнителя, который потом замещается окончательным. Таким удобным промежуточным заполнителем является метиловый спирт (Тасаки, Полли и Оррего, 1954). Штативы с микроэлектродами погружаются в абсолютный метиловый спирт под сниженным давлением; последний начинает кипеть уже при комнатной температуре. Регулируя давление, можно добиться образования очень мелких пузырьков, которые совершенно не повреждают кончиков. Если кипение при комнатной температуре не происходит, достаточно поставить эксикатор, в котором находится стакан с электродами, в теплую воду, что сразу вызывает кипение. После 10 — 15 минут кипячения электроды оставляются на такое же время при атмосферном давлении; возникшие в них пузырьки быстро исчезают. Штатив затем споласкивается дистиллированной водой и переносится в раствор  $KCl$ , в котором оставляет-

ся до следующего дня. За это время происходит полное замещение метилового спирта электролитом. В нашей лаборатории обычно практикуется кипячение в метиловом спирте при атмосферном давлении. При этом стакан с электродами помещается в водяную баню, которая осторожно подогревается. Таким путем можно также очень тонко регулировать кипение и сохранять все кончики электродов в целости.

Аналогичным образом можно заполнять электроды и любыми другими электролитами, которые не боятся кипячения и метилового спирта. Если же необходимо заполнение микроэлектрода легко разрушающимися веществами (например, ацетилаголином), то кипячение электрода производится в воде или метиловый спирт замещается сначала дистиллированной водой. Затем основная часть жидкости из широкой части электрода отсасывается при помощи тонкой пипетки и замещается необходимым раствором. Через некоторое время этот раствор замещает воду и в кончике электрода.

Возможно предварительное заполнение трубки, из которой изготавливается микроэлектрод, электролитом (Као, 1954). Трубки затем вытягиваются в горизонтальном направлении. Однако при таком методе нередко в кончике образуются пузырьки газа, которые с трудом удаляются.

Описаны и другие способы заполнения микроэлектродов. Предлагается, например, погружение кончика микропипетки в раствор, который всасывается туда капиллярными силами. Однако в широкую часть раствор таким образом не проходит, поэтому пипеткой туда наливается дистиллированная вода. Образовавшийся пузырек постепенно поднимается вверх и, в конце концов, выходит из трубки. Затем весь электрод погружается в электролит для замещения воды (Курелла, 1958а). Способ этот кропотливый и мало производительный.

Недостатком стеклянных микроэлектродов является невозможность длительного их хранения после заполнения. Даже в том случае, когда электроды сохраняются в герметически закрытом сосуде, так что испарение воды и повышение концентрации соли исключается, в кончиках их наблюдается постепенное образование кристаллов. Это приводит к изменению их сопротивления и, в конце концов, к разрушению — электроды становятся непригодными к употреблению. Мы обычно пользуемся микроэлектродами в течение недели после их заполнения.

При использовании микроэлектродов важно знать диаметр их кончика. Однако для стеклянных микроэлектродов такое измерение является довольно затруднительным. Кончики до 0,5μ еще можно измерить под большим увеличением микроскопа (в частности под водяной иммерсией). Меньшие кончики измеримы под электронным микроскопом, но такое измерение связано с необходимостью облома маленького кусочка кончика, который нужно укрепить на металлическую сеточку; ясно,

что оно может быть применено лишь выборочно, например, для контроля того, как работает автоматический аппарат. Измерение кончиков с диаметром  $0,2 - 0,5\mu$  возможно под ультрафиолетовым микроскопом, но это также является весьма сложной процедурой, неприменимой к серийному изготовлению микроэлектродов. Поэтому обычно производится лишь примерный отбор под оптической системой изготовленных пипеток до их заполнения и заполненных — перед погружением. Если кончик плавно сходит на нет, а края его размыты дифракционными линиями, то его диаметр составляет доли микрона. Кроме того, широко практикуется отбор микроэлектродов по сопротивлению, которое измеряется либо непосредственно в опыте при помощи несложной схемы, включаемой на входе усилителя (см. раздел III, а), либо предварительно при помощи мегометра (например, типа МОМ-3). Сопротивление микроэлектродов с диаметром кончика около  $0,5\mu$  колеблется в пределах  $10 - 30$  Мом.

Серьезной проблемой для стеклянных микроэлектродов является их собственный потенциал. Наличие собственного потенциала той или иной величины характерно для всех микроэлектродов, но на него обычно не обращают внимания при использовании металлических микроэлектродов для фокального отведения и внеклеточного отведения одиночных клеток. Такой потенциал несколько не искажает относительно быстрых колебаний потенциалов в живых тканях. Иное дело представляет собой использование стеклянных микроэлектродов для внутриклеточного отведения. Поскольку основным критерием положения микроэлектрода внутри клетки является отведение именно постоянной разности потенциалов (потенциала покоя), то здесь наличие у электрода собственной постоянной разности потенциалов, которая либо складывается, либо вычитается из отводимой, может приводить к существенным искажениям результатов. Необходимо отметить, что сверхтонкие микроэлектроды из металла (например, из вольфрама) в этом отношении еще хуже, так как возникающие у них собственные потенциалы особенно велики и очень изменчивы.

Если бы потенциал электрода был строго постоянным, то им можно было бы, как правило, пренебречь. Однако поскольку он обусловлен рядом меняющихся факторов, в частности контактом поверхностей двух жидкостей и диффузией электролита из кончика электрода и обратно, то он, несомненно, изменяется при погружении в различные солевые растворы и, в частности, при проникновении кончика в клетку, ионный состав которой, как известно, резко отличен от состава межклеточной жидкости. К сожалению, точное измерение величины этого изменения невозможно.

Обычно предполагается, что величина собственного потенциала микроэлектрода, заполненного изотоническим раствором



KCl и погруженного в солевой раствор, аналогичный протоплазме, должна составлять около 10 мВ (Настук и Годжкин, 1950). При увеличении концентрации KCl внутри электрода до 3 M этот потенциал должен стать незначительным. Такие выводы делались на основании теоретических расчетов, а также на основании косвенных данных, полученных при отведении потенциалов покоя одних и тех же клеток микроэлектродами с раствором KCl в различных концентрациях. Однако более тщательное рассмотрение этого вопроса показывает, что дело обстоит сложнее (Эдриан, 1956; Костюк, 1957б; Сорокина, 1959а). Измерение собственного потенциала электрода, погруженного в различные растворы электролитов (рис. 4), показывает, что этот потенциал может быть очень изменчивым и значительно превышать величину, рассчитываемую теоретически для жидкостных контактных потенциалов по формулам Планка или Гендерсона. В большинстве случаев кончик микроэлектрода оказывается отрицательным по отношению к окружающей жидкости, но в некоторых случаях может быть положительным; решающим моментом здесь является сорт стекла, из которого он изготовлен (см. таблицу). При обломе кончика эта разность потенциалов сразу же исчезает (конечно, при условии, что в соединительных цепях не возникают собственные разности потенциалов); следовательно, причина собственного потенциала электрода заложена именно в кончике. Если кончик электрода погружен в раствор KCl, аналогичный по концентрации ионов  $K^+$  протоплазме клетки, то отводимая разность потенциалов уменьшается. Дальнейшее уменьшение разности концентраций внутри и снаружи электрода еще больше уменьшает электродный потенциал, но он не исчезает полностью даже при полном уравнивании растворов (см. таблицу). Эдриан высказал предположение, что в кончике микроэлектрода происходит изменение обычной подвижности ионов, а именно: ион  $Cl^-$  оказывается фиксированным зарядами стекла, что и создает возможность возникновения отрицательного заряда кончика микроэлектрода по отношению к раствору при диффузии подвижного иона  $K^+$ . Возможно, что в кончике микроэлектрода, стенки которого представляют собой фактически пористую мембрану, изменяется и

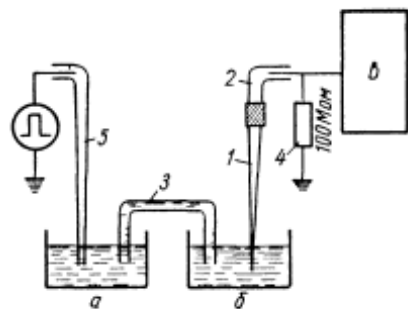


Рис 4 Схема установки для сравнения величин собственных потенциалов стеклянных микроэлектродов в различных растворах: а — физиол. раствор б — исслед. раствор, в — усилитель, 1 — микроэлектрод, 2 и 3 — агаровые мостики с KCl, 4 — шунтирующее сопротивление 100 Мом, 5 — относительный электрод, заполненный агаром с KCl (относительный электрод постоянно находится в чашечке с физиологическим раствором)

При обломе кончика эта разность потенциалов сразу же исчезает (конечно, при условии, что в соединительных цепях не возникают собственные разности потенциалов); следовательно, причина собственного потенциала электрода заложена именно в кончике. Если кончик электрода погружен в раствор KCl, аналогичный по концентрации ионов  $K^+$  протоплазме клетки, то отводимая разность потенциалов уменьшается. Дальнейшее уменьшение разности концентраций внутри и снаружи электрода еще больше уменьшает электродный потенциал, но он не исчезает полностью даже при полном уравнивании растворов (см. таблицу). Эдриан высказал предположение, что в кончике микроэлектрода происходит изменение обычной подвижности ионов, а именно: ион  $Cl^-$  оказывается фиксированным зарядами стекла, что и создает возможность возникновения отрицательного заряда кончика микроэлектрода по отношению к раствору при диффузии подвижного иона  $K^+$ . Возможно, что в кончике микроэлектрода, стенки которого представляют собой фактически пористую мембрану, изменяется и

подвижность более гидратированных ионов ( $\text{Na}^+$ ) по сравнению с менее гидратированными ( $\text{K}^+$ ).

Во всяком случае, если электроды используются для целей точного измерения постоянных разностей потенциалов, то реко-

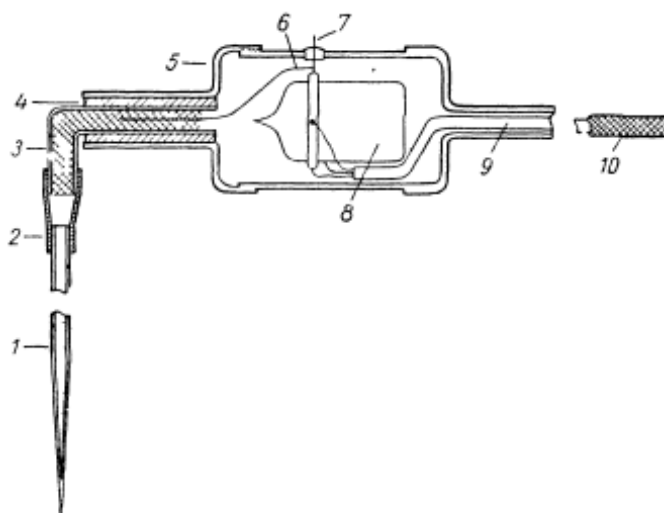


Рис. 5. Схема присоединения стеклянного микроэлектрода к входному каскаду при помощи агарового мостика:

1 — микроэлектрод, заполненный раствором  $\text{KCl}$ ; 2 — соединительная резинка, 3 — стеклянная соединительная трубочка, заполненная агар-агаром с  $\text{KCl}$ ; 4 — изолятор (полистирол), 5 — катодный экран; 6 — сеточный вывод (хлорированная серебряная проволока); 7 — контакт для присоединения шунтирующего сопротивления, 8 — лампа катодного повторителя, 9 — соединительный кабель, 10 — заземленный экран

мендуется отбирать их также по величине собственного потенциала, выбирая электроды, имеющие при указанном способе измерения потенциал не выше  $-5$  в; электроды с положитель-

**Величины контактных потенциалов  
между искусственной плазмой и тестовыми  
растворами**

Сорт стекла	Тестовые растворы	Контактные потенциалы
Пирекс	3-М раствор $\text{KCl}$	$0,55 \pm 0,4$
	1,5-М раствор $\text{KCl}$	$0,7 \pm 0,2$
	0,1-М раствор $\text{KCl}$	$0,75 \pm 0,6$
	Фосфатный раствор Рингера	$0,9 \pm 0,7$
№ 23	3-М раствор $\text{KCl}$	$2,5 \pm 0,7$
	1,5-М раствор $\text{KCl}$	$2,9 \pm 0,5$
	0,1-М раствор $\text{KCl}$	$3,0 \pm 0,6$
	Фосфатный раствор Рингера	$3,2 \pm 0,6$



ным потенциалом не следует вообще употреблять. В таком случае можно ожидать, что если собственный потенциал и изменяется при переходе из одного солевого раствора в другой, то на такую небольшую величину, которая не сказывается на результатах измерения. Наиболее подходящими для этой цели являются электроды из стекла пирекс, у которых собственные потенциалы всегда отрицательны и, как правило, невелики (Сорокина, 1959а)

Применение стеклянных микроэлектродов требует разработки метода присоединения их к входному устройству. Если не требуется точных измерений величины отводимых потенциалов, то такое соединение может осуществляться просто путем погружения в широкую часть пипетки тонкой платиновой или серебряной проволоочки, соединенной с входным каскадом. Если же требуются более точные измерения, особенно постоянных разностей потенциалов, то микроэлектрод предварительно соединяется с агаровым мостиком, содержащим изотонический KCl или NaCl, при помощи кусочка резиновой трубочки, наполненной раствором KCl. Во второй конец мостика погружается хлорированная серебряная проволоочка, соединенная далее с входом усилителя. При таком соединении можно ожидать, что поскольку концентрация ионов  $Cl^-$  возле хлорированной проволоочки, соединенной с сеткой входного каскада, и возле хлорированного относительного электрода, соединенного с массой ткани, одинакова, то и возникающие здесь электродные потенциалы будут равны и будут взаимно компенсировать друг друга. Искажения могут вноситься только неравенством жидкостных контактных потенциалов в кончике микроэлектрода и в его широкой части, контактирующей с мостиком. На рис. 5 показана схема такого присоединения микроэлектрода, применяемая в нашей лаборатории.

## II. ПОГРУЖЕНИЕ МИКРОЭЛЕКТРОДОВ

**а. Аппаратура для погружения.** Погружение микроэлектродов в ткань может производиться при помощи различных приспособлений — как фабричных, так и самодельных. Сложность установки для погружения определяется его целью и в первую очередь, необходимой точностью отведения. Если речь идет о фокальном отведении или раздражении, то погружение микроэлектрода может быть осуществлено при помощи любого стереотаксического аппарата или микроманипулятора, пристроенного к обычному станку для крепления животного или изолированного органа. Если при этом и будет иметь место некоторое смещение кончика микроэлектрода благодаря движению животного или вибрациям станка, то это не скажется на результатах. Однако уже внеклеточное отведение от отдельных клеток предъявляет значительно более жесткие требования к фикса-

ции животного и погружающего устройства; для внутриклеточного же отведения проблема фиксации является основной трудностью.

Для погружения микроэлектродов в изолированные органы и спинной мозг, при котором достаточно вертикального хода микроэлектрода, особенно удобны микроманипуляторы со скользящими столиками. Такой манипулятор выпускается нашей промышленностью под маркой ММ-1. Скользящий столик позволяет легко и быстро устанавливать микроэлектрод над желаемой точкой погружения, а микрометрический винт дает возможность погружать микроэлектрод с точностью до нескольких микрон. Недостатком такого микроманипулятора является отсутствие микрометра, однако он может быть легко сделан дополнительно. Микроэлектрод должен крепиться вертикально по отношению к держателям, имеющимся в каретках микроманипулятора.

При погружении микроэлектрода в образования головного мозга очень важно иметь возможность погружать микроэлектрод под различным углом к вертикальной оси, что наиболее точно достигается при применении стереотаксических приборов. Ряд описаний последних опубликован как в зарубежной, так и в нашей печати (Мещерский, 1959; Могилевский, 1959). В лабораторных условиях легко может быть изготовлен простой масляный микроманипулятор по принципу, предложенному Кокетсу (1956), также позволяющий погружение микроэлектрода под любым углом. Манипулятор состоит из трех хорошо притертых шприцов, соединенных между собой через тройник полиэтиленовыми трубками. Вся система тщательно заполняется вазелиновым маслом — необходимо полностью устранить пузырьки воздуха. Один из шприцов, к штоку которого прикрепляется держатель для микроэлектрода, служит для погружения. Он устанавливается на держателе, позволяющем изменять его положение во всех трех плоскостях (такой держатель может быть изготовлен из крестообразного столика для микроскопа). К двум другим шприцам, которые подбираются различного размера, крепятся микрометры, при помощи которых можно плавно двигать штоки и тем самым перекачивать масло в шприц погружения. Вставленные внутрь шприцов пружины обеспечивают возврат штоков в исходное положение при вывинчивании микрометров. Шприц большего диаметра служит для грубого погружения, шприц меньшего диаметра — для тонкого. Подбором соотношений объемов шприцов можно получить любое замедление погружения. Система работает безынерционно (в чем ее преимущество над воздушной) и позволяет погружение с микронной точностью. В нашей лаборатории такой микроманипулятор разработал Лимацкий; схема его показана на рис. 6.

В некоторых случаях и при работе со спинным мозгом желательна возможность погружения микроэлектрода под любым

углом (например, при составлении подробных карт распределения потенциалов по сечению мозга). Разработаны специальные микроманипуляторы, позволяющие проводить такую работу (Экклс, Фатт, Лендген и Уинсбюри, 1954).

При применении металлических микроэлектродов для отведения потенциалов из мозга обычно достаточно вскрыть твердую мозговую оболочку, дальше микроэлектрод проходит сво-

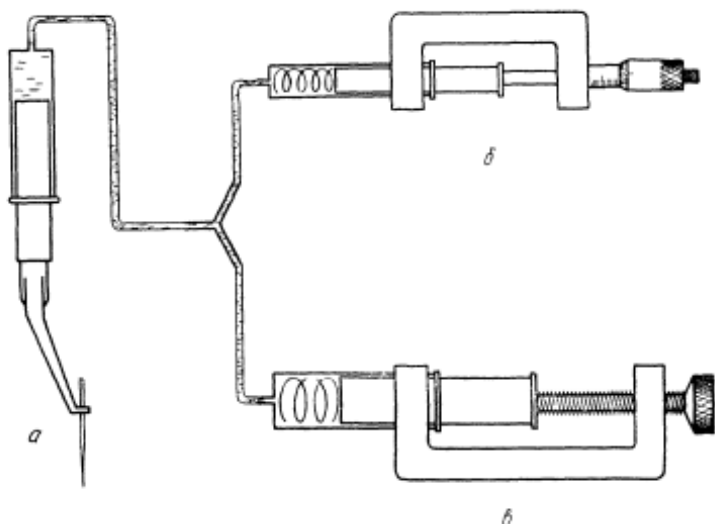


Рис 6 Схема масляного микроманипулятора  
а — держатель для микроэлектрода, б — микроцилиндр, в — макровинт

бдно. Для стеклянных же микроэлектродов мягкая и паутинная мозговые оболочки могут быть непреодолимым препятствием. Поэтому перед их погружением необходимо в избранной точке мозговой поверхности под стереоскопическим микроскопом (очень удобен для этой цели микроскоп МБС-2) сделать незначительный надрез этих оболочек в области между сосудами. При наличии очень остро отточенных и загнутых на самом конце стальных иголок такой надрез можно сделать без всякого кровотечения. Дальше в ткань мозга стеклянный микроэлектрод идет без затруднений. На головном мозге погружение стеклянных микроэлектродов возможно путем прямого прокола мягкой мозговой оболочки в том случае, если острая концевая часть микроэлектрода очень тонка — 10—20 м (Гранит и Филлипс, 1957).

В некоторых объектах поверхность самих клеток оказывается препятствием для введения в них точных стеклянных микроэлектродов. Так, безуспешными были попытки введения микроэлектродов в такой важный для нейрофизиологии объект, как периферический симпатический ганглий; электроды не прои-



кали через поверхность клеток. Оказалось, что в ганглии каждая клетка окружена довольно плотной соединительнотканной капсулой. Для проникновения через нее предлагалось вводить микроэлектрод не плавно, а быстрыми толчками по несколько десятков микрон (Паское, 1955). Электрод проникал в клетки, но деятельность последних оказывалась явно нарушенной. Был предложен также метод частичного растворения капсулы трипсином и гиалуронидазой (Малколм и Пери, 1955), но с таким же повреждающим результатом. Правда, на других объектах такое ферментное размягчение покровов вокруг клетки оказалось вполне успешным, например при введении микроэлектрода в периферические нервные клетки ракообразных (Эйзагвирре и Куфлер, 1955). В конце концов оказалось, что эффективное введение микроэлектродов в клетки симпатического ганглия возможно лишь на очень молодых животных, у которых капсула еще нежная (на новорожденных кроликах — Р. Экклс, 1955).

Ясно, что указанные методы погружения микроэлектродов применимы лишь в условиях острого опыта. Применение микроэлектродов для хронического вживления возможно пока только с целью фокального раздражения или отведения. В таких случаях всегда применяются металлические электроды. Подробное описание методов их погружения и укрепления было сделано Коганом (1949, 1952) и другими авторами и не входит в нашу задачу. Лишь в последнее время удалось разработать методы внеклеточного отведения потенциалов отдельных нейронов у бодрствующего животного в хроническом эксперименте. Но и в этом случае регистрация деятельности одной клетки может продолжаться сравнительно недолго (до нескольких часов), затем микроэлектрод нужно опять погружать для нахождения новой клетки и т. д. В таких случаях используются описанные выше стеклянные микроэлектроды, а маленький микрометр для их погружения укрепляется прямо на голове животного, прикрепляясь к костям черепа (Риччи, Дон и Джаспер, 1957).

**б. Борьба с движениями препарата.** Успешность отведения потенциалов от отдельной клетки как при внеклеточном, так и особенно при внутриклеточном расположении кончика электрода определяется отсутствием смещений кончика по отношению к клетке. Лишь при отведении потенциалов от некоторых изолированных органов, которые не сокращаются при возбуждении, эта проблема отпадает (изолированные ганглии, железы, покровные ткани и т. д.). При отведении от мышцы возникает при возбуждении сокращение приводит к тому, что электрод вскоре либо ломается, либо выскакивает из волочка, либо его повреждает. При погружении микроэлектродов в мозг очень мешают пульсовые и дыхательные колебания его поверхности, кроме того, возникает необходимость полной иммобилизации животного. Движения поверхности мозга довольно силь-

но затрудняют работу уже на спинном мозге; особенно они вредят при исследованиях на головном мозге.

Устранение этих трудностей возможно в следующих направлениях:

1. Необходимо тщательное устранение возможных вибраций стола и станка, к которому крепится животное или препарат. Экспериментальный стол лучше крепить на кронштейнах в капитальной стене или изолировать его ножки от пола глушителями вибраций (несколькими слоями губчатой резины или ящиками с песком). Станок для фиксации животного должен быть из массивного металла, а микроманипулятор или стереотаксический прибор — надежно фиксирован к этому же станку.

2. Для уменьшения влияний сокращений при отведении потенциалов из мышцы практикуется помещение ее в изометрический режим; перерезка части нервных волокон так, чтобы сокращался лишь небольшой участок мышцы; помещение той части мышцы, где погружается микроэлектрод, на выпуклую поверхность; придавливание мышцы при помощи кольца или пластинки и т. д.

3. Если опыт ведется на целом животном, то наилучшим условием является полная иммобилизация кураре или курареподобными веществами. За рубежом широко применяется *d*-тубокурарин и флакседил. В нашей лаборатории успешно используется чешский препарат прокуран (1,10-бистриметилдекаметоний). Поскольку прокуран является блокатором нервно-мышечной передачи деполаризующего типа действия, то после внутривенного введения он дает кратковременные разлитые фибрилляции мышц, которые, однако, быстро проходят. Может быть использован дитилин (дихолиновый эфир янтарной кислоты). Естественно, что в таком случае животное должно быть на искусственном дыхании. Поскольку же искусственное дыхание само по себе вызывает дыхательные колебания поверхности мозга, то при необходимости полного их устранения рекомендуется производить двусторонний пневмоторакс и регулировать степень раздувания легких таким образом, чтобы грудная клетка не двигалась (Фрэнк и Фюртс, 1955; Фрейганг, 1956). Но так как при этом может возникать аноксемия, то дыхание производится с высокой частотой смесью 98% кислорода и 2% углекислого газа. В ряде случаев такое вмешательство не является необходимым, и простой регулировкой глубины искусственного дыхания можно практически полностью устранить дыхательные колебания. Возможно использование особо тонких микроэлектродов и без кураризации — под наркозом. В большинстве работ по спинному мозгу, в частности во всех работах в лаборатории Экклса, применяется барбитуратный наркоз. По нашему опыту, для исследований на спинном мозге весьма удобен тчетотал (40 — 60 мг на 1 кг веса внутривенно или внутрибрюшинно для кошки). Барбитуратный наркоз непригоден для исследо-



ваний на стволовой части головного мозга, поскольку эти структуры обнаруживают особенно высокую чувствительность к нему и сразу же угнетаются. Поэтому такие опыты обычно проводятся либо при кураризации, либо под хлоралозным наркозом.

4. Независимо от кураризации или наркотизации при исследованиях на мозге и применении очень тонких электродов необходима особо прочная фиксация позвоночника и черепа к станку. Фиксация позвоночника может производиться при помощи зажимов, захватывающих остистые или поперечные отростки,

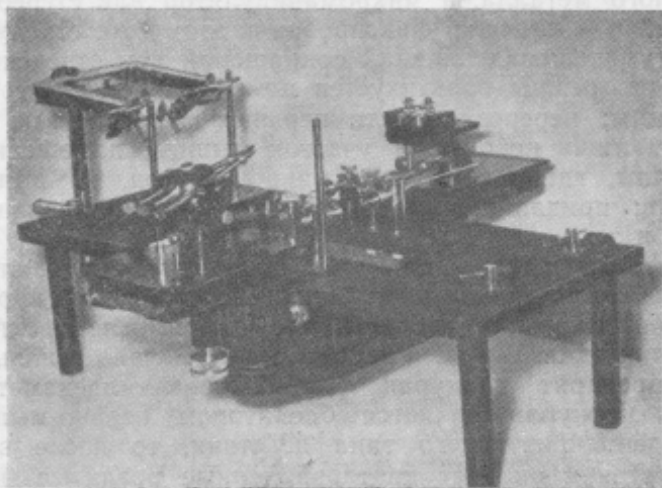


Рис. 7. Внешний вид станка для фиксации животного при введении внутриклеточных микроэлектродов в спинной мозг.

В нашей лаборатории применяется фиксация при помощи стальных игл, проводимых через межпозвоночные диски (обычно трех) и затем укрепляемых специальными зажимами в массивных столбиках, имеющихся на станке. Такая фиксация дает особенно надежное устранение случайных смещений позвоночника и мозга. Грудная клетка должна висеть свободно, не касаясь поверхности станка. Фиксация черепа лучше всего производится при помощи держателя стереотаксического аппарата за края глазницы и наружные слуховые проходы. На рис. 7 показан разработанный в нашей лаборатории станок для крепления животного (кошки или кролика) и введения сверхтонких микроэлектродов.

5. На головном мозге все эти мероприятия оказываются недостаточными, поскольку они не устраняют основного вида колебаний в этой части мозга — пульсовых колебаний. Приходится применять специальные меры для их уменьшения. Это мо-

жет быть достигнуто приложением к исследуемому участку мозговой поверхности пластинки под небольшим давлением. В ее центре просверливается небольшое отверстие, через которое и погружается микроэлектрод. Этот метод был применен с успехом для борьбы с пульсациями поверхности мозжечка (Гранит и Филлипс, 1956), поверхности коры больших полушарий (Филлипс, 1956). В нашей лаборатории он оказался весьма эффективным в устранении пульсаций поверхности продолговатого мозга при отведении от отдельных нейронов области ретикулярной формации. Очень важно при этом точно градуировать давление пластинки. Недостаточное давление не устраняет пульсаций, чрезмерное же сразу прекращает кровообращение на поверхности мозга и нарушает деятельность клеток. Поэтому лучше крепить держатель пластинки так, чтобы его можно было подавать вперед при помощи микрометрического винта и постоянно контролировать состояние поверхности мозга под микроскопом.

Другой возможностью (более сложной технически) является применение различных камер, которые герметически закрывают отверстие в черепе, не оставляя между своей нижней поверхностью и поверхностью мозга воздуха. Описание такой камеры дают Маунткэсл, Дэвис и Берман (1957). Камера герметически прикрепляется при помощи зубного цемента над отверстием в кости и твердой мозговой оболочке и заполняется 0,9%-ным раствором NaCl. К прозрачной крышке камеры крепится миниатюрный микрометр, который позволяет погружать микроэлектрод без нарушения герметичности камеры. Благодаря отсутствию воздуха камера в основном восстанавливает те гидравлические отношения, которые имеются в закрытой черепной коробке.

Наконец, как самая решительная мера по борьбе с пульсовыми колебаниями была предложена перфузия головы током крови под постоянным давлением (Крневич, 1956), однако данных о целесообразности применения такого метода пока нет.

6. Наряду с максимальной иммобилизацией ткани нередко применяется и другой подход к устранению смещения кончика микроэлектрода — создание легких микроэлектродов, пульсирующих вместе с мозгом и соединенных с входным устройством гибкими соединениями («плавающие микроэлектроды»). Такой метод часто используется для отведения потенциалов из сокращающихся поперечнополосатых и сердечных мышечных волокон. Уже само по себе гибкое соединение микроэлектрода с агаровым мостиком при помощи резиновой трубочки (рис. 5) уменьшает в таких случаях возможность выскакивания микроэлектрода из волокна и его повреждения. Соединение может быть сделано еще более подвижным, если использовать последовательно два стеклянных микроэлектрода, вставив кончик одного в широкую часть другого и закрепив его там цемен-

том. Можно использовать также соединение микроэлектрода очень тонкой, непружинящей серебряной или платиновой проволочкой (до 25 — 50  $\mu$ ). Последний метод очень часто применяется при внеклеточном отведении от пульсирующего мозга как с металлическими, так и со стеклянными микроэлектродами. Основным недостатком такой методики является трудность точного погружения микроэлектрода, поскольку погружающее устройство является неподвижным. Поэтому используется даже ручное погружение микроэлектрода, который отпускается, как только на основании отводимых потенциалов (см. раздел V, а) видно, что его кончик находится возле клетки (Шейбель и др., 1955). Предлагается очень легкое крепление корпуса микроэлектрода к держателю (например, капелькой воска), которое в случае необходимости снимается раскаленной петелькой, и микроэлектрод остается соединенным лишь тонкой проволочкой (Баумгартен, 1957). В нашей лаборатории Лиманским был сконструирован держатель в виде миниатюрного пинцета, бранши которого в любой момент могли быть раздвинуты гидравлической передачей, так что электрод освобождался от фиксации и мог следовать за пульсациями мозга. Однако во всех этих случаях добиться такого моментального освобождения микроэлектрода, чтобы он, попав внутрь клетки, там остался, не удастся. Самое большее, на что можно рассчитывать, — это внеклеточное отведение от избранного нейрона.

Естественно, что изолированный орган или открытая часть мозга должны быть помещены в условия, сохраняющие их нормальную жизнедеятельность. Условия эти общие и для любых других методик, и в специальном их освещении нет необходимости. Следует только указать, что для открытой части мозга *очень удобным способом является устройство ванночки из парафинового (вазелинового) масла, краями которой могут быть кожные лоскуты вокруг операционного отверстия. Под масло может быть налит слой рингеровского раствора. Масло создает хорошие оптические условия для наблюдения поверхности и устраняет подсыхание. Температура его может поддерживаться на необходимом уровне радиационным теплом; нередко применяется также насыщение его смесью 95% кислорода и 5% углекислого газа (путем пропускания пузырьков).*

**в. Определение положения кончика микроэлектрода.** Лишь на немногих объектах можно прямо под микроскопом видеть положение кончика микроэлектрода и даже проникновение его в отдельную клетку (поперечнополосатая и сердечная мышцы, нервные клетки узлов беспозвоночных и спинальных ганглиев позвоночных и некоторые другие объекты). В большинстве же случаев положение приходится определять после эксперимента путем изготовления серийных срезов того участка ткани, в который погружался микроэлектрод. Если нужно установить лишь локализацию какой-то одной точки, от которой отводились



потенциалы, то маркируется лишь данное положение кончика. Если же регистрация велась от ряда точек по ходу погружения микроэлектрода, то необходимо маркировать весь ход микроэлектрода. В последнем случае во время опыта для каждого отведения отмечается глубина от поверхности, на которой оно производилось (по микрометру микроманипулятора или стереотаксического прибора). После фиксации ткани и изготовления срезов производят перерасчет на сморщивание и уже после этого находят соответствующие точки на препарате. При таком методе трудно получить точность локализации больше  $\pm 0,1$  мм; при расчете исходят из равномерности сморщивания всей толщи ткани при фиксации, чего на самом деле не происходит.

Предложен ряд способов маркировки положения кончика как для металлических, так и для стеклянных микроэлектродов. Самым простым является оставление введенного микроэлектрода до конца опыта, вырезывание ткани вместе с ним, последующая фиксация и изготовление срезов (Мощный, 1955). Способ этот не очень точный потому, что большой металлический электрод при всех этих манипуляциях легко может сместиться по сравнению со своим первоначальным положением. Более точные результаты дает пропускание после окончания отведения через электрод электрического тока в течение нескольких секунд: по Бернгард и Рексед (1945) — 0,5 — 1,0 ма, по Бернс, Графштайн и Ольшевски (1947) — 0,1 — 0,5 ма. Это вызывает коагуляцию ткани вокруг кончика электрода, а также отложение здесь некоторого количества железа. Последнее обстоятельство может быть использовано для специфической окраски путем витальной инъекции в артериальное русло 20%-ного раствора  $K_4FeCN_6$  с соляной кислотой. Далее мозг промывается от избытка ферроцианида физиологическим раствором и фиксируется обычным способом в формалине. Изготовленные срезы подкрашиваются крезилвиолетом или другим способом. Область расположения кончика электрода оказывается окрашенной в синий цвет. Возможна маркировка положения кончика также путем импрегнации среза серебром (Андерсен, 1956).

Конечно, при всех этих методах доступна маркировка лишь области, в которой находился микроэлектрод, но не отдельных нейронов. При применении стеклянных микроэлектродов для отведения потенциалов от отдельных нейронов были сделаны попытки более локальной маркировки, позволяющей отмечать нейроны, от которых они отводились. Для этого микроэлектроды заполнялись не  $KCl$ , а 3-М раствором ферроаммониевого цитрата; такой раствор как будто не вызывал побочных физиологических эффектов. После окончания отведения через электрод пропускался ток (0,05 ма 45 — 65 минут, микроэлектрод положителен). В конце опыта весь мозг перфузировался  $K_4FeCN_6$  и фиксировался формалином. Изготовленные срезы докрашивались кернехротом, окрашивающим обычные нейроны в красный



оттенков. При такой методике на срезах можно было отыскивать отдельные нейроны, возле которых или в которых находился кончик микроэлектрода (Райпорт, 1957). Оикава, Огава и Мотокава (1959) при исследованиях на сетчатке предложили для маркировки заполнять микроэлектрод насыщенным  $\text{AgNO}_3$  и

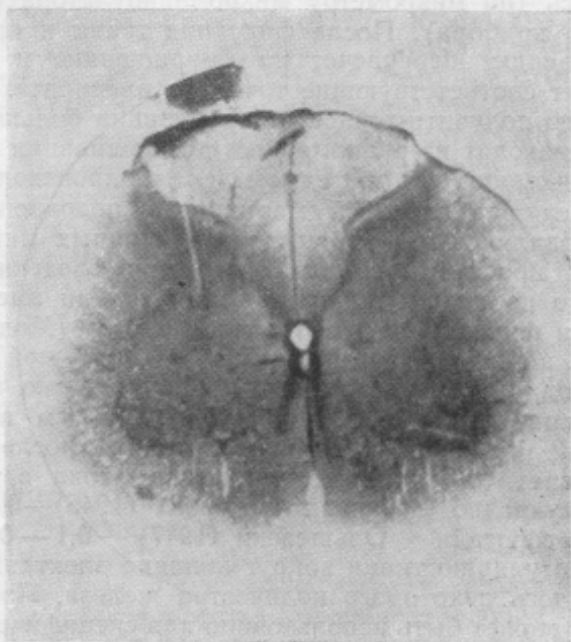


Рис. 8. Пример среза поясничного отдела спинного мозга кошки с фиксированным в нем стеклянным микроэлектродом.

также откладывать его возле отводимых элементов при помощи пропускания через электрод тока.

Однако такие работы пока относятся еще к поисковым; предложенные методы не апробировались в других лабораториях, и поэтому неизвестно, насколько они рациональны. Основным методом дифференциации отводимых элементов является определение их функциональных различий (см. раздел VI, б). При работах со стеклянными микроэлектродами принятым методом в настоящее время является маркировка всего хода микроэлектрода. После погружения до предельной глубины электрод срезается ножницами возле поверхности мозга. Таким образом, в один и тот же участок мозга может быть погружено несколько микроэлектродов — предыдущие не мешают введению последующих. В конце опытов мозг перфузируется *in situ* 10%-ным раствором формалина (внутривенно или лучше интрааортально через зонд, введенный в брюшную аорту со стороны бедренной артерии). Вырезанный кусочек мозга помещается на несколько

дней в формалин, а затем на замораживающем микротоме изготавливаются серийные срезы. При правильном подборе плоскости резания в соответствующем срезе прекрасно виден весь микроэлектрод. Дальше проводится указанный выше перерасчет на сморщивание мозга при фиксации и определение точек отведения, отмеченных ранее по микрометру. Такой метод применяется в нашей лаборатории (пример среза с микроэлектродом, рис. 8), в работах Колмодина (1957) и др.

### III. ВХОДНЫЕ КАСКАДЫ И УСИЛИТЕЛИ

**а. Входные каскады.** При работе с толстыми металлическими микроэлектродами, используемыми для фокального отведения потенциалов, нет необходимости в создании специальных усилительных устройств. В этом случае достаточно иметь обычные усилители, употребляемые при других способах отведения биоэлектрических потенциалов, которые должны иметь лишь достаточное усиление и соответствующую частотную характеристику. При использовании стеклянных микроэлектродов, равно как и металлических электродов с диаметром кончика порядка одного микрона и меньше, обычного усилителя недостаточно. Такие электроды, сопротивление которых измеряется десятками мегом, требуют особых входных каскадов. Это требование диктуется следующим рядом обстоятельств:

1. Если электрод с сопротивлением  $R_{эл}$  в несколько десятков мегом присоединить ко входу обычного усилителя, имеющего в лучшем случае сопротивление входа  $R_{вх}$  около 1 *Мом*, то делитель напряжения, образованный сопротивлениями  $R_{эл}$  и  $R_{вх}$ , резко снижает входной сигнал в  $\frac{R_{вх}}{R_{вх} + R_{эл}}$  раз. Следовательно, потребуется значительное усиление, что приведет к увеличению уровня шумов и дрейфа усилителя.

2. Сеточный ток входных каскадов обычных усилителей достигает значительных величин ( $10^{-7}$ — $10^{-8}$  *а*), которые не сказываются при фокальном отведении низкоомными микроэлектродами, но начинают давать нежелательные явления при переходе к отведению стеклянными микроэлектродами. Наличие в цепи сетки сопротивления в несколько десятков мегом приводит к возникновению на нем, при наличии сеточного тока, значительного падения напряжения, затрудняющего измерение отводимых постоянных разностей потенциалов (например, потенциала покоя) и еще больше усложняет вопрос о собственном потенциале электрода. Кроме того, сеточный ток при введении кончика электрода внутрь клетки начинает оказывать значительное поляризующее влияние на ее мембрану, вплоть до возбуждения клетки.

3. Высокое сопротивление микроэлектрода, сочетаясь со значительной входной емкостью обычных усилителей, резко изме-

няет частотную характеристику регистрирующей системы. Если  $R_{эл} = 20 \text{ Мом}$ , а входная емкость  $C_{вх} = 200 \text{ пф}$ , то постоянная времени входной цепи составит  $4 \text{ мсек}$ . Если учесть, что длительность пиковых потенциалов в нервных клетках около  $1 \text{ мсек}$ , то ясно, что величина отводимых потенциалов будет значительно уменьшена усилительным устройством.

Таким образом, высокое внутреннее сопротивление микроэлектрода предъявляет ряд серьезных требований к входному каскаду. Первым требованием ко входному каскаду является сведение до минимума величины сеточного тока. Это достигается, в большинстве случаев, выбором типа лампы, уменьшением анодного напряжения, снижением температуры катода, а иногда и использованием многосеточных ламп в электрометрическом режиме. Уже этими мероприятиями удастся уменьшить сеточный ток обычной (не электрометрической) лампы до величины порядка  $10^{-12} \text{ а}$ , что значительно ниже пороговой величины для возбуждения клетки ( $10^{-8} - 10^{-9} \text{ а}$ ) и не создает значительного падения напряжения на сопротивлении микроэлектрода. Для электрода в  $20 \text{ Мом}$  оно составит, например, всего  $20 \text{ мкв}$ . Индивидуальным подбором ламп нередко можно снизить сеточный ток еще больше; очевидно, в этом случае имеют значение качество изоляции сеточного вывода, степень откачки газа из лампы и т. д. Подробнее о причинах возникновения сеточных токов и мерах борьбы с ними можно прочитать у Бонч-Бруевича (1954), Шинтльмейстера (1949) и других авторов.

Каждая лампа для получения минимального сеточного тока требует индивидуального подбора режимов не только при настройке, но и в процессе эксплуатации. Поэтому при конструировании входного каскада необходимо предусмотреть возможность такой регулировки. Кроме того, перед настройкой каскада лампа должна быть подвергнута «старению», т. е. должна проработать не менее  $30 - 50$  часов, а в процессе эксплуатации до начала работы должна прогреваться в течение  $20 - 30$  минут.

Значительное снижение сеточного тока отчасти решает проблему обеспечения высокого входного сопротивления каскада, поскольку активное входное сопротивление  $R_{вх} = \frac{U_{вх}}{I_c}$ , где  $U_{вх}$  — величина напряжения, подаваемого на сетку, а  $I_c$  — сеточный ток. При снижении сеточного тока до  $10^{-12} \text{ а}$  это сопротивление, для случая отведения биоэлектрических потенциалов стеклянными электродами, возрастает до  $10^9 - 10^{11} \text{ ом}$ ; таким образом, отводимые постоянные потенциалы практически полностью падают на вход усилителя.

Значительно хуже обстоит дело при регистрации быстрых изменений потенциалов, например потенциалов действия. В этом случае наряду с активной составляющей входного сопротивления большую роль играет реактивная составляющая, связанная с емкостью входа. Как указывалось выше, при входной емкости



200 пф может происходить существенное уменьшение величины отводимых потенциалов действия. Наиболее эффективным методом борьбы с искажениями, вносимыми входной емкостью, является включение лампы по схеме катодного повторителя. На рис. 9 приведены принципиальные схемы каскадов с нагрузкой в цепи анода (а) и в цепи катода — катодного повторителя (б). Как известно, наибольшее распространение в усилителях получили каскады с анодной нагрузкой; это связано с тем, что такой каскад дает значительное усиление напряжения вход-

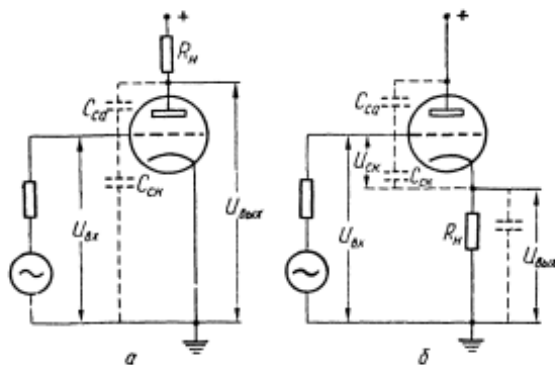


Рис 9 Принципиальные схемы обычного усилительного каскада

а — с нагрузкой в цепи анода, б — с нагрузкой в цепи катода (катодный повторитель).

ного сигнала. Однако такие каскады обладают, наряду с малым входным сопротивлением, большой входной емкостью  $C_{вх}$ , слагающейся из суммы емкостей  $C_{вх} = C_{ск} + C_{са}(1 + \kappa)$ , где  $C_{ск}$  — емкость сетка-катод, а  $C_{са}$  — емкость сетка-анод. Действие емкости  $C_{са}$  оказывается даже существенно увеличенным (на  $1 + \kappa$ ) по сравнению с ее статической величиной. Это объясняется тем, что эта емкость включена практически (через источник отводимого напряжения и источники анодного напряжения) параллельно анодной нагрузке. Поскольку напряжение на анодной нагрузке в  $\kappa$  раз больше входного напряжения, то и действие этой емкости оказывается примерно в  $\kappa$  раз значительнее емкости  $C_{ск}$ .

Каскад с нагрузочным сопротивлением в цепи катода обладает рядом специфических свойств. Коэффициент усиления такого каскада не может быть больше 1, поскольку в нем имеется 100%-ная отрицательная обратная связь. Выходное напряжение  $U_{вых}$  вычитается из напряжения входа  $U_{вх}$  и, таким образом, составляет лишь часть его (рис. 9, б). Поэтому для такого каскада правильнее говорить не о коэффициенте усиления, а о коэффициенте передачи напряжения. Во всех случаях желательно, конечно, чтобы коэффициент был как можно ближе к 1. Этого можно достичь увеличением сопротивления



катодной нагрузки и выбором лампы с большой крутизной характеристики. Но увеличение сопротивления в катоде лампы вызывает увеличение действия емкости катод — земля —  $C_{кз}$  (рис. 9,б), что также ухудшает частотную характеристику в области высоких частот, а лампы с большой крутизной, как правило, обладают сравнительно большим сеточным током. Поэтому обе величины должны быть выбраны оптимально.

Основным преимуществом катодного повторителя, компенсирующим отсутствие усиления, в нашем случае является уменьшение действия входной емкости. В этом случае входная емкость лампы также состоит из двух компонент — емкости  $C_{св}$  и  $C_{ск}$ . Но действие емкости  $C_{св}$  не увеличивается в  $(1 + \kappa)$  раз, как это имело место в каскаде с анодной нагрузкой, а действие емкости  $C_{ск}$  уменьшается в  $(1 - \kappa)$  раз. Последнее объясняется тем, что напряжение, приложенное между сеткой и катодом, составляет только часть входного напряжения ( $U_{ск} = U_{вх} - U_{вых}$ ), что вызывает уменьшение тока, проходящего через эту емкость. Уменьшение же тока можно трактовать как увеличение сопротивления, что, в свою очередь, равносильно уменьшению емкости (ведь реактивное сопротивление емкости обратно пропорционально величине емкости). Чем выше коэффициент передачи, тем меньше напряжение  $U_{ск}$  и тем меньше сказывается действие емкости  $C_{ск}$ . Таким образом, с этой точки зрения также выгодно добиваться максимального коэффициента передачи катодного повторителя\*.

Для работы с микроэлектродами предлагались различные схемы катодных повторителей, здесь мы рассмотрим лишь некоторые из них. Первоначально была предложена схема на пентоде (Настук и Годжкин, 1950). Пентод имеет те преимущества, что емкость  $C_{св}$  у него незначительна (сотые доли пикофарад), а крутизна велика. Но пентодам присуща большая величина сеточного тока, и необходим кропотливый подбор ламп из большого их количества для уменьшения этого тока. Сеточный ток в этом случае колебался от  $1,5 \cdot 10^{-11}$  до  $2 \cdot 10^{-10}$  а. Для уменьшения влияния емкости между сеточным выводом и землей авторы применили экранировку лампы и части сеточного вывода экраном, соединенным с катодом лампы, причем располагали входной каскад как можно ближе к микроэлектроду. Применение такого экрана (часто его называют «катодным экраном»), естественно, значительно увеличивает емкость  $C_{ск}$ , но, как указывалось выше, действие этой емкости в катодном повторителе уменьшается в  $(1 - \kappa)$  раз. Вместе с тем эта увеличенная емкость оказывается соединенной последовательно с емкостью  $C_{кз}$ , и поэтому суммарная емкость сетка — земля оказывается уменьшенной. Таким способом удалось добиться входной емкости (без микроэлектрода) около  $1,5$  пф, в то время как входная

\* Подробнее об особенностях катодных повторителей смотри специальную литературу, например: Уитфилд (1953); Каминер (1955).

емкость у примененного авторами пентода 6АК5 близка к  $10 \text{ пф}$ .

В качестве лампы для катодного повторителя может быть использован также триод типа 6С1Ж (Голов и Костюк, 1956).

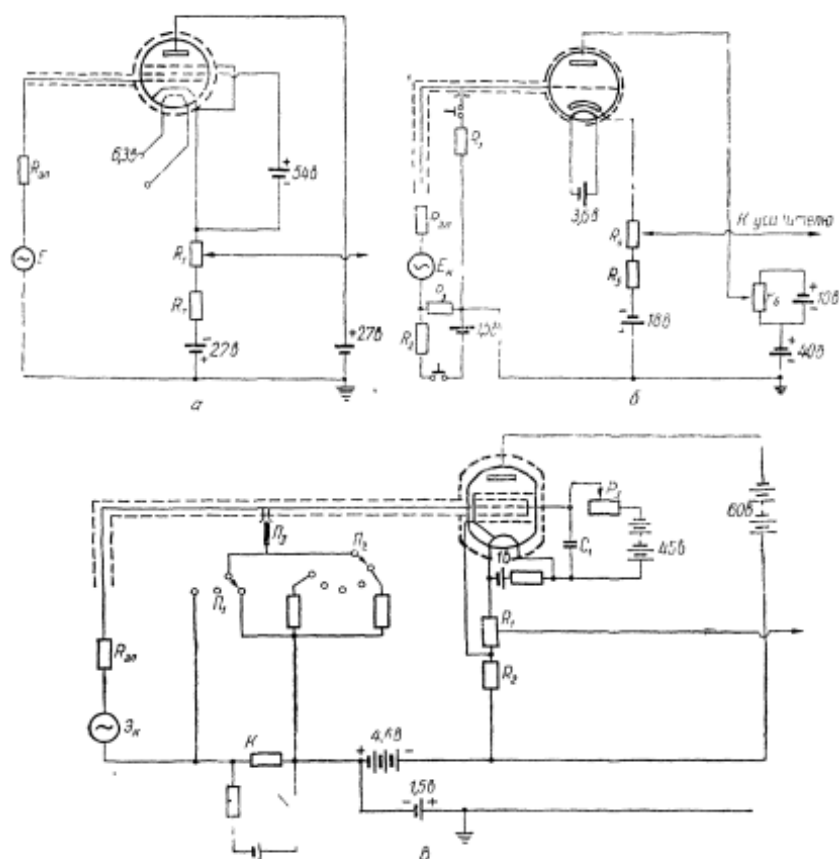


Рис. 10. Различные схемы катодных повторителей для работы с микроэлектродами:

*а*—схема Настук и Годжин (1950):  $R_1$ —24 ком,  $R_2$ —33 ком; *б*—схема Голова и Костюка (1956):  $R_1$ —50 Мом,  $R_2$ —30 ом,  $R_3$ —5 ом,  $R_4$ —22 ком,  $R_5$ —120 ком,  $R_6$ —1 ком; *в*—схема Бызова и Бонгарда (1959):  $R_1$ —10 ком,  $R_2$ —50 ком,  $R_3$ —50 ком,  $C_1$ —0,1 мкф,  $K$ —калибратор.

У этой лампы входная емкость очень мала ( $1 \text{ пф}$ ), но зато емкость  $C_{са}$  составляет  $1,4 \text{ пф}$ , и, следовательно, суммарная входная емкость не может быть ниже  $1,5$ — $2 \text{ пф}$ . В этой схеме регулировка величины сеточного тока производится путем изменения анодного напряжения. Следует отметить, что в этой схеме можно легко довести сеточный ток до  $10^{-12} \text{ а}$ ; коэффициент передачи близок к 0,9.

Бызов и Бонгард (1959) предложили схему катодного повторителя на пентагриде 1А1П. Эта лампа имеет довольно высокую входную емкость ( $7 \text{ пф}$ ), но малую емкость  $C_{ca}$  ( $0,7 \text{ пф}$ ). Сеточный ток в этой схеме  $3 \cdot 10^{-12} \text{ а}$  при использовании лампы в электрометрическом режиме. Регулировка величины сеточного тока производится изменением напряжения на экранной сетке. В этой схеме не было необходимости в индивидуальном под-

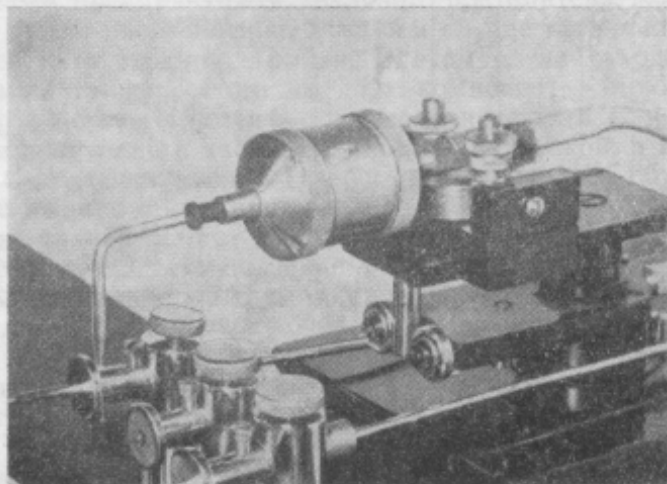


Рис. 11. Внешний вид катодного повторителя Голова и Костюка, смонтированного на микроманипуляторе ММ-1.

боре ламп. Однако использование электрометрического режима привело к тому, что коэффициент передачи, как показала проверка, несколько ниже, чем в предыдущих схемах. Указанные схемы приведены на рис. 10.

В некоторых случаях используются балансные катодные повторители. Такие каскады обладают всеми преимуществами балансных каскадов, в том числе возможностью использования для биполярного отведения. Однако сами по себе они не дают каких-либо улучшений частотной характеристики и значительно более сложны в настройке.

Конструктивно входные каскады выполняются в виде выносных блоков, располагаемых непосредственно у места отведения. На рис. 11 показан внешний вид применяемого в нашей лаборатории входного каскада. Лампа катодного повторителя смонтирована в экране, имеющем форму баллончика и соединенном с катодом. Баллончик укреплен непосредственно на микроманипуляторе или стереогаксическом приборе. Агаровый мостик, соединенный с микроэлектродом, крепится в баллончике и также покрывается катодным экраном. Другой возможностью является неподвижное крепление катодного повторителя как можно

ближе к месту отведения и соединение его входа через гибкий экранированный проводник с подвижным микроэлектродом.

Нужно отметить, что между расчетными характеристиками катодного повторителя и истинными характеристиками входного каскада при включенном микроэлектроде имеются существенные различия. Микроэлектрод имеет определенную собственную емкость, образованную его стенкой между внутренним наполнителем и той жидкостью, в которую он погружен и которая соеди-

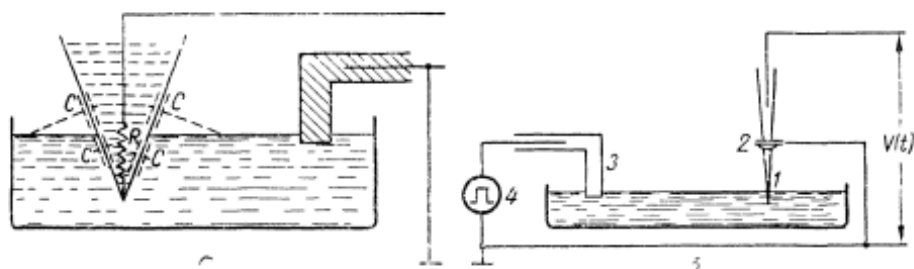


Рис. 12: а — схема возникновения паразитной емкости в микроэлектроде:  $R$  — основное сопротивление микроэлектрода, локализирующееся в его кончике;  $C$  — емкость, образуемая между наполнителем микроэлектрода и раствором, в который он погружен, и включенная фактически параллельно сопротивлению; б — схема для определения постоянной времени входного каскада с включенным микроэлектродом: 1 — микроэлектрод, 2 — заземленное кольцо с каплей физиологического раствора; 3 — относительный электрод; 4 — генератор прямоугольных импульсов.

нена с землей (рис. 12,а). Все достоинства катодного повторителя не могут ее изменить.

Определение истинной частотной характеристики входного каскада при включенном микроэлектроде может производиться несколькими методами. Обычно кончик микроэлектрода приводится в соприкосновение с поверхностью жидкости (физиологический раствор), которая в свою очередь через калибратор или генератор синусоидальных колебаний соединяется с землей. Для имитации емкости самого микроэлектрода кончик последнего предварительно пропускается через заземленную петельку, в которой помещена капля того же раствора. Размер капли должен соответствовать предполагаемой глубине погружения микроэлектрода (рис. 12,б). От калибратора посылается прямоугольный импульс, который после усиления регистрируется на осциллографе. По времени нарастания переднего фронта определяется постоянная времени входного каскада. Время нарастания импульса до 63% амплитуды численно равно постоянной времени (Кризе, 1951). Определяющим в данном случае является именно вход, так как последующие каскады усиления, как правило, имеют значительно более совершенные частотные характеристики. При применении генератора соответственно определяется область частот, которая пропускается входом без



существенного уменьшения амплитуды. Для удовлетворительной передачи быстрых биоэлектрических колебаний необходима постоянная времени входной цепи в 5—6 раз меньше времени нарастания импульса, что составляет в среднем 70 мксек. Это соответствует частотной характеристике, линейной до 3 кгц (Кризе, 1951).

Если микроэлектрод просто погружать в жидкость, соединенную с калибратором, и не применять заземленного кольца, то это приводит к существенному искажению в определении истинной частотной характеристики. В этом случае емкость электрода оказывается включенной не параллельно входу, а параллельно сопротивлению микроэлектрода и соответственно не ухудшает, а улучшает частотную характеристику (Бызов и Бонгард, 1959).

Наличие существенной емкости в микроэлектроде, а также необходимость применения максимально коротких соединений между микроэлектродом и сеткой входного каскада было причиной поисков более совершенных схем входных устройств, позволяющих полностью устранить влияние паразитных емкостей. Такие схемы описаны Солмс, Настук и Александер (1953), Вудбюри (1953); Хаапанен и Оттосон (1954), Бак (1958) и др. Мы остановимся лишь на основных особенностях этих схем.

В основу работы указанных схем положен принцип уменьшения постоянной времени входной цепи с помощью реактивной (емкостной) обратной связи; нередко этот принцип носит название «входной каскад с отрицательной емкостью». Сигнал с выхода входного повторителя подается на специальный усилитель и с выхода последнего возвращается на сетку входной лампы через емкость  $C$  (рис. 13,а). Подача обратной связи через емкость делает ее частотно-зависимой. В связи с тем, что положительная обратная связь увеличивает коэффициент усиления входного каскада, возникает увеличение усиления в области высоких частот за счет уменьшения реактивного сопротивления в цепи обратной связи. Тем самым мы компенсируем действие входной емкости катодного повторителя на этих частотах, как бы снижаем эту емкость. Отсюда и возник термин «введение отрицательной емкости».

Различные схемы входных каскадов с частотной компенсацией отличаются друг от друга устранением тех или иных недостатков обычного катодного повторителя, но метод компенсации входной емкости принципиально одинаков (рис. 13,а). Наиболее компактной из этих схем является схема Бака, показанная на рис. 13,б. Схема выполнена на двух лампах. Пентод типа Z 729, обладающий малым уровнем шумов и незначительным микрофонным эффектом, используется в качестве входного каскада катодного повторителя. Усилитель, собранный на двойном триоде 12AU7, служит для подачи напряжения обратных связей. В данной схеме имеется несколько цепей обратных связей. Напря-

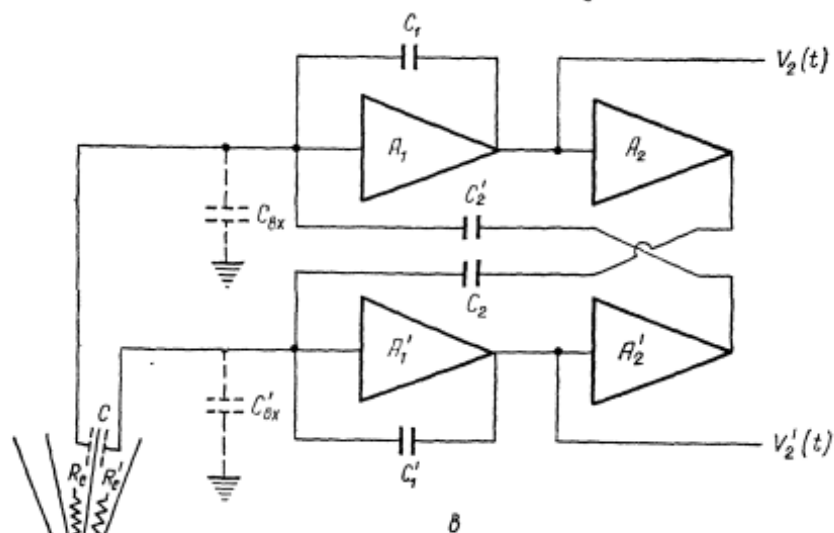
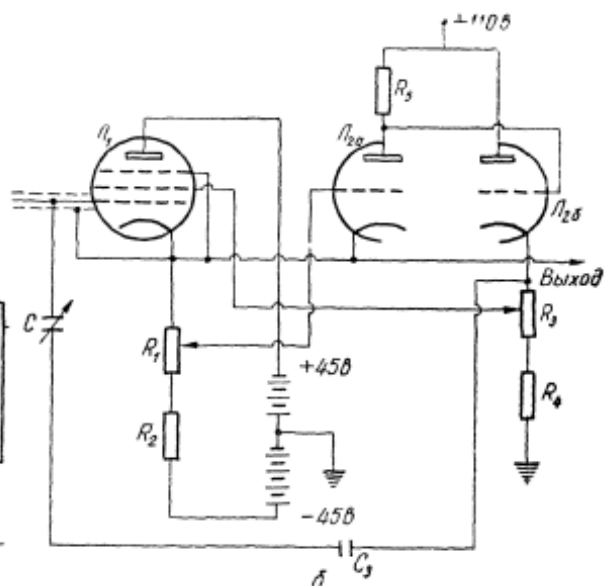
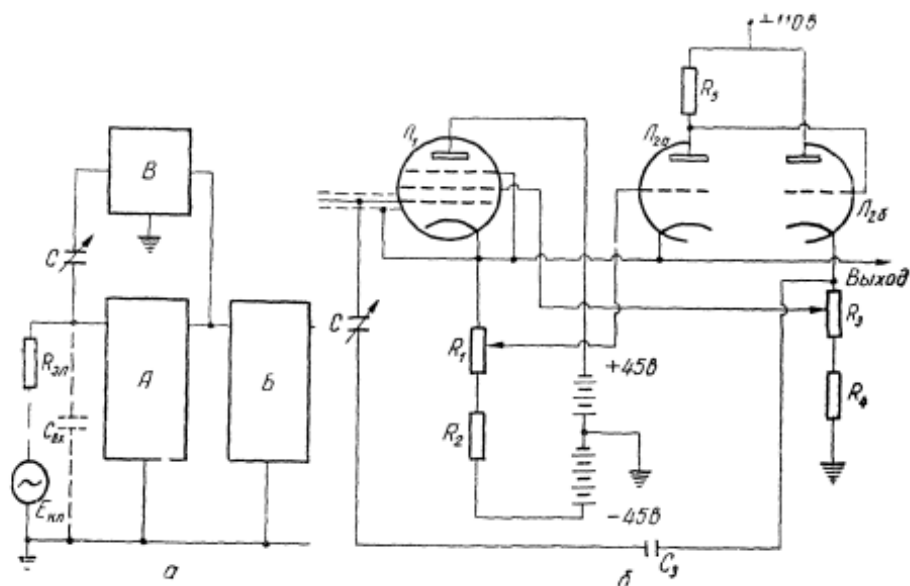


Рис. 13: а — принципиальная схема входного устройства с «отрицательной» емкостью;

А — входной каскад; Б — оконечный усилитель; В — усилитель обратной связи;  $C_{\text{вх}}$  — паразитная емкость электрода и входа усилителя; С — регулируемая емкость в цепи обратной связи;  $R_{\text{эл}}$  — сопротивление электрода;

б — схема устройства, предложенная Баком (1958):

$C_1$ —1,5 д · 7,5 пф,  $C_2$ —250 пф,  $R_1$ —10 ком,  $R_2$ —75 ком,  $R_3$ —5 ком,  $R_4$ —33 ком,  $R_5$ —390 ком;

в — принципиальная схема входного устройства при использовании двойных концентрических микроэлектродов:

$R_e$  и  $R'_e$  — сопротивления каналов микроэлектродов.

жение положительной обратной связи для компенсации действия входной емкости снимается с катодной нагрузки лампы  $L_{26}$  и через емкости  $C_3$  и  $C$  подается на вход первого каскада. Регулировкой емкости  $C$  производится изменение действия обратной связи в зависимости от величины входной емкости. С пэгенциометра  $R_3$  снимается напряжение положительной обратной связи, подаваемое на экранную сетку первой лампы. За счет действия этой обратной связи коэффициент передачи входного каскада может быть доведен до 1. И, наконец, отрицательная обратная связь, образованная общей катодной нагрузкой для ламп  $L_1$  и  $L_{2a}$ , понижает действие емкости  $C_{кз}$ , также улучшая частотную характеристику.

Микроэлектрод соединяется с сеткой входной лампы кабелем с двойным экраном. Первый экран включается на катод  $L_1$ , а второй — на катод  $L_{26}$ , что дополнительно уменьшает действие емкости сетка—земля.

При использовании указанной схемы время нарастания прямоугольного импульса на выходе усилительного устройства при подаче его на вход через сопротивление в  $10 \text{ Мом}$  было не более  $3 \text{ мксек}$ .

Аналогичный принцип компенсации предложен и при использовании концентрических стеклянных микроэлектродов, в которых внутренний канал используется для внутриклеточного, а наружный — для внеклеточного отведения. В таких микроэлектродах, кроме разобранных выше паразитных емкостей, сказывается еще одна — емкость между каналами. Наличие ее приводит к тому, что быстрые колебания потенциалов, отводимые одним каналом, передаются и в другой канал. Предлагается (рис. 13,в) применение двух дополнительных, перекрестных, каналов емкостной обратной связи, компенсирующих эти влияния (Фрейганг и Френк, 1959). На рис. 13,в  $C$  — паразитная емкость между каналами микроэлектрода,  $C_{вх}$  — паразитные емкости входов. Для компенсации  $C_{вх}$  и  $C'_{вх}$  подается положительная обратная связь через емкости  $C_1$  и  $C_1'$ . Усилители  $A_1$  и  $A_1'$  используются такого типа, как показано на рис. 13,б. Компенсация паразитной емкости  $C$  производится при помощи обратной связи, подаваемой через усилители  $A_2$  и  $A_2'$  и емкости  $C_2$  и  $C_2'$ .

Несомненно, что применение таких входных каскадов является самым эффективным способом устранения вредных последствий высокого сопротивления микроэлектродов и наличия паразитных емкостей. Однако все они требуют постоянной регулировки не только перед началом опыта, но и по ходу погружения микроэлектрода, что очень усложняет проведение опыта. Поэтому применение таких входных устройств может быть рекомендовано пока для отдельных случаев, а именно — когда получение максимально неискаженной амплитуды быстрых потенциалов действия является основной задачей эксперимента.

Входное устройство должно содержать и ряд вспомогатель-

ных приспособлений, позволяющих в любой момент быстро измерить сопротивление микроэлектрода, определить усиление усилителя, величину сеточного тока входного каскада и т. д. Для этого в первую очередь в отводящую цепь постоянно включается низкоомный калибратор, позволяющий давать калиброванные разности потенциалов примерно таких величин: 10—100 мкв — 1—10—100 мв. Выходное сопротивление калибратора

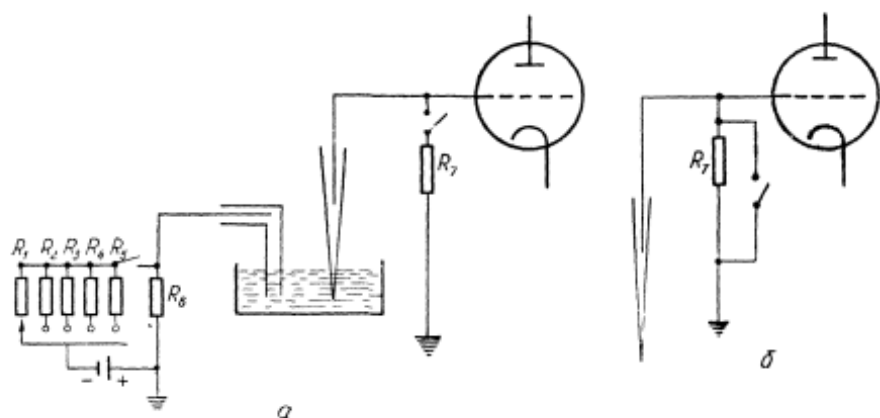


Рис 14: а — схема включения в отводящую цепь калибратора и шунтирующего сопротивления для определения сопротивления микроэлектрода:

$R_1$ — $R_6$  подбираются в зависимости от напряжения источника;  $R_4$  — 5 ом,  $R_7$  — 100 Мом; б — определение при помощи шунтирующего сопротивления величины сеточного тока лампы.

обычно постоянно включается в цепь относительного электрода (между электродом и землей), рис. 14,а.

На сеточном выводе входного каскада предусматривается отвод, позволяющий присоединять к нему сопротивление, постоянно соединенное вторым концом с землей. Отвод должен как можно меньше подниматься над катодным экраном, чтобы не увеличивать емкость сетка—земля (возможно также употребление переключателя, но с минимальной емкостью между контактами). Наличие точно измеренного шунтирующего сопротивления, величина которого должна быть в несколько раз больше величины сопротивления применяемых микроэлектродов, позволяет в любой момент контролировать сопротивление последних и, в частности, судить на этом основании о состоянии их кончика во время погружения. Для этого на вход подается калиброванное напряжение — один раз при подключенном шунте, второй раз без него. Подключение шунта создает на входе делитель, одно плечо которого — стандартный шунт, второе — наш электрод (рис. 14,а). При отключенном шунте на вход подается все напряжение калибратора (если, конечно, сопротивление электрода ничтожно по сравнению с входным сопротивлением



лампы). Сравнивая отклонения луча осциллографа в одном и другом случаях, легко высчитать сопротивление микроэлектрода по формуле  $R_{эл} = R_{ш} \left( \frac{V_1}{V} - 1 \right)$ , где  $V_1$  и  $V$  — соответствующие отклонения в произвольных единицах.

Наличие того же шунтирующего сопротивления позволяет в любой момент проверять сеточный ток лампы; для этого необходимо лишь предусмотреть возможность закорачивания его. При отключенном (поднятом из ткани или жидкости) микроэлектроде включается шунтирующее сопротивление и отмечается положение луча осциллографа; затем это сопротивление закорачивается (рис. 14,б). Смещение луча указывает на наличие сеточного тока, который создает на сопротивлении определенное падение напряжения. Величину тока легко вычислить по закону Ома, зная усиление системы. Чем больше величина шунтирующего сопротивления, тем точнее получается измерение. Сопротивление порядка 100 *Мом* обычно оказывается вполне подходящим для измерения как сеточных токов, так и сопротивлений микроэлектродов.

**б. Усилители.** Применение стеклянных микроэлектродов, кроме специальных входных каскадов, предъявляет особые требования и к усилителям. В данном случае речь идет уже не о компенсации недостатка таких электродов, а об использовании их преимуществ. Так как стеклянные микроэлектроды позволяют проводить внутриклеточное отведение потенциалов, то нужен какой-то критерий нахождения кончика электрода внутри клетки. Для большинства образований это нельзя определить визуально, и единственно возможным контролем является отведение потенциала покоя (мембранного потенциала) клетки. Пока микроэлектрод внутри клетки — отводится постоянная разность потенциалов в несколько десятков милливольт, как только он выходит из нее или клетка гибнет — эта разность потенциалов исчезает. Поэтому внутриклеточное отведение потенциалов требует наличия стабильно работающего усилителя постоянного напряжения. Облегчается эта задача тем, что при внутриклеточном расположении микроэлектрода отводятся значительные разности потенциалов, и вполне достаточным является коэффициент усиления 5000—10 000 (несколько миллиметров отклонения луча на 1 *мв*).

Такой усилитель на базе промышленного осциллографа ЭО-7 разработали в нашей лаборатории Голов и Пятигорский. Ниже приводится принципиальная схема этого усилителя (рис. 15).

Как видно из схемы (см. также схему осциллографа ЭО-7), полной переделке подверглись первые каскады вертикального усилителя. Они полностью демонтируются, и на их месте собирается балансный каскад на двух пентодах типа 6Ж4. Оконечный каскад остается без изменений, однако в связи с тем, что первый и второй каскады связаны гальванически, необходимо

для компенсации постоянной составляющей, попадающей на сетки выходного каскада, увеличить сопротивление в цепи катодов оконечных ламп. Для балансировки входного каскада и одновременно для смещения луча по вертикали служит потенциометр  $R_5$ . Потенциометр  $R_8$  служит для регулировки усиления. Для плавной регулировки усиления этот потенциометр должен иметь

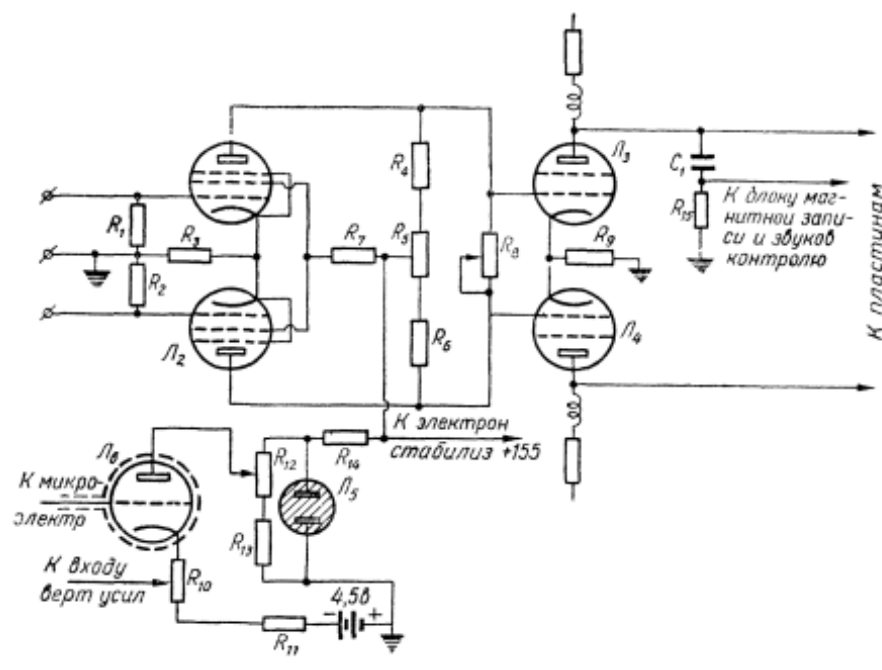


Рис. 15. Схема усилителя постоянного напряжения, разработанная Головым и Пятигорским на базе осциллографа ЭО 7:

$R_1$ —1 Мом,  $R_2$ —1 Мом,  $R_3$ —1,8 ком,  $R_4$ —0,33 Мом,  $R_5$ —0,1 Мом,  $R_6$ —0,33 Мом,  $R_7$ —1 Мом,  $R_8$ —1 Мом,  $R_9$ —3,3 ком,  $R_{10}$ —10 ком,  $R_{11}$ —12 ком,  $R_{12}$ —50 ком,  $R_{13}$ —43 ком,  $R_{14}$ —6 ком, 2вт,  $R_{15}$ —560 ком,  $C_1$ —0,01 мкф.

показательную характеристику. Настройка такого усилителя заключается в основном в подборе идентичных ламп первого каскада. Анодное напряжение для питания катодного повторителя дополнительно стабилизируется после электронного стабилизатора газовым и снимается с потенциометра  $R_{12}$ , служащего для регулировки величины сеточного тока. Ось этого потенциометра выводится «под шлиц» на лицевую панель. Катодный повторитель подключается к осциллографу через разъем.

Для звукового контроля и записи на магнитную ленту используются выводы от вертикальных пластин. На рис. 16 приведена частотная характеристика усилителя. Коэффициент усиления равен 5000. При коэффициенте передачи катодного повторителя

0,8 чувствительность всей установки не менее 0,25 мв на 1 мм. Дрейф усилителя не превышает 2—3 мм в час

В последнее время нашей промышленностью выпущен осциллограф ЭНО-1, имеющий уже в себе усилитель постоянного напряжения, однако его усиление недостаточно для отведения даже внутриклеточных потенциалов (3 мв/мм). Поэтому он может быть использован только при включении предварительного каскада усиления либо после некоторой переделки (Находкина и Евдокимов, 1959). Могут быть использованы, конечно, и дру-

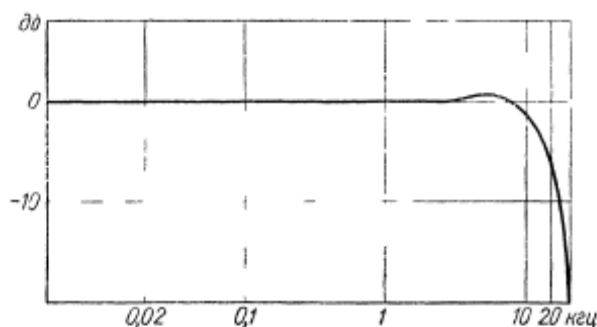


Рис 16 Частотная характеристика того же усилителя

гие схемы усилителей постоянного напряжения (например, Хапанен, 1953, и др.).

Однако при наличии только усилителя постоянного напряжения указанного типа установка для микроэлектродного отведения не является универсальной. Как правило, возникает необходимость тем же микроэлектродом отводить внеклеточные или фокальные переменные потенциалы, амплитуда которых измеряется микровольтами, а не милливольтами. Поэтому целесообразно после катодного повторителя иметь два самостоятельных канала усиления — один, описанный выше, с небольшим коэффициентом усиления, для регистрации внутриклеточных потенциалов, и второй, с большим коэффициентом усиления, для регистрации внеклеточных и фокальных. Нет необходимости, чтобы второй канал также являлся усилителем постоянного напряжения, ибо значительное увеличение  $K$  вызовет увеличение дрейфа. Вполне достаточен обычный трех- или четырехкаскадный усилитель с реостатно-емкостной связью и полосой пропускания от 1 до 10 000 гц. Желательно предусмотреть фильтры по низким частотам, обеспечивающие стабильность регистрации в случаях, когда необходимо отведение лишь потенциалов действия, например при внеклеточном отведении ритмической деятельности отдельных нейронов. Конечно, такие установки с успехом могут быть использованы и для отведения потенциалов любыми металлическими микроэлектродами, хотя для обычных

металлических микроэлектродов применение катодного повторителя, как указывалось, не является обязательным.

**б. Регистрация потенциалов.** Для регистрации фокальных потенциалов, отводимых микроэлектродными, могут быть использованы шлейфные осциллографы; однако катодные осциллографы несомненно предпочтительнее, так как они являются универсальными. Как внеклеточное, так и внутриклеточное отведение потенциалов действия отдельных нейронов может производиться только при использовании катодного осциллографа. Крайне

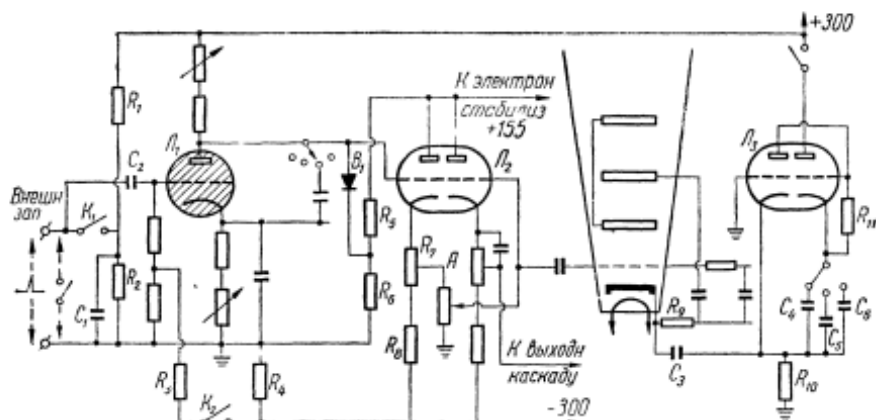


Рис 17. Схема переделки горизонтального усилителя осциллографа ЭО-7 для получения ждущей развертки:

$R_1$ —200 ком,  $R_2$ —43 ком,  $R_3$ —560 ком,  $R_4$ —220 ком,  $R_5$ —150 ком,  $R_6$ —43 ком,  $R_7$ —100 ком,  $R_8$ —120 ком,  $R_9$ —33 ком,  $R_{10}$ —1 ком,  $R_{11}$ —75 ком,  $C_1$ —0,1 мкф,  $C_2$ —0,1 мкф,  $C_3$ —0,05 мкф, (не менее 1500 я),  $C_4$ —0,02 мкф,  $C_5$ —0,03 мкф,  $C_6$ —0,5 мкф,  $V_1$ —ДГЦ-27 (1шт),  $V_2$ —6Н8. Данные емкостей, сопротивлений и ламп, не приведенные в схеме, не изменялись и соответствуют данным осциллографа ЭО-7.

важно наличие ждущей развертки, синхронизированной с раздражениями, позволяющей очень точно анализировать реакции на одиночные импульсы и их взаимодействие.

В нашей лаборатории Пятигорским была разработана схема модернизации осциллографа ЭО-7 с целью получения ждущей развертки. Основные изменения вносятся в горизонтальный усилитель (рис. 17). Для возможности получения медленных разверток в усилителе устраняется переходная емкость, и он превращается в усилитель постоянного напряжения. Потенциометр  $R_7$  служит для установки нулевой разности потенциалов между землей и точкой А, что устраняет необходимость в переходной емкости. Регулировка потенциометра производится при настройке, и его ось на лицевую панель не выводится. В положении ждущей развертки тиратрон заперт отрицательным напряжением, поданным на его сетку. Ключ  $K_1$  служит для переключения запуска развертки либо от положительного импульса, либо от внешнего контакта, работающего на размыкание. Ключ  $K_2$  обеспечивает переход от непрерывной к ждущей развертке. Для



ограничения напряжения заряда емкостей генератора используется диод типа ДГЦ-27. Для измерения скорости развертки на двойном триоде 6Н8 собран генератор меток времени, который дает масштабные метки с периодом в 0,1—0,01—0,004 сек. Импульсы снимаются с сопротивления  $R_{10}$  и подаются через конденсатор  $C_3$  в цепь катода трубки. Конденсатор  $C_3$  должен быть рассчитан на рабочее напряжение не менее 1000 в. Падение напряжения на сопротивлении  $R_9$  запирает луч на время действия импульса. Лампу генератора необходимо экранировать во избежание наводок на вертикальный усилитель.

Иногда ставится задача отведения только постоянных разностей потенциалов (потенциала покоя). В таком случае в качестве регистрирующего прибора можно использовать электрометр (Линг и Джерард, 1949; Курелла, 19586).

Большую помощь в микроэлектродном отведении реакций отдельных клеток оказывает звуковое воспроизведение. Поскольку деятельность отдельных клеток, особенно в центральной нервной системе, обычно носит характер ритмов различной частоты, то она очень хорошо воспринимается и дифференцируется на слух. Это значительно разгружает экспериментатора от очень утомительного непрерывного визуального наблюдения за экраном осциллографа. Для звукового контроля может быть применено дополнительное усиление, которое дает возможность обнаруживать даже слабые электрические изменения на довольно большом расстоянии от клетки, когда последние еще не регистрируются на экране осциллографа. Тем самым значительно облегчается ориентировка при погружении и нахождение работающих клеток.

Весьма важной является регистрация отводимых потенциалов на магнитный носитель. Запись на магнитную ленту обладает целым рядом существенных достоинств, в частности она дает возможность длительной регистрации, последующего электрического анализа и счета импульсов, а также многократного прослушивания или воспроизведения на экране осциллографа. Она очень экономична. К сожалению, обычные системы магнитной записи не дают возможности воспроизведения тех низких частот, с которыми мы встречаемся при микроэлектродном отведении, и тем более записи постоянного тока. Для воспроизведения очень низких частот был предложен способ записи — воспроизведения на несущей частоте. Однако такая система пригодна лишь для частот не выше 150—200 гц. При записи на обычном тракте даже таких коротких колебаний потенциалов, как потенциалы действия, также наступают значительные искажения, в частности превращение монофазных колебаний в сложные многофазные. Поэтому такая запись может быть использована лишь для исследования ритмики этих потенциалов, но не их формы или амплитуды. Основной причиной искажений является применение в обычных записывающих устройствах

специальных цепей для максимального использования динамического диапазона магнитного носителя и соответствующих корректирующих цепей в воспроизводящем усилителе. Все эти цепи дают значительные фазовые искажения, которые незаметны при слуховом восприятии, но существенно искажают форму воспроизводимого импульса. Предложены специальные системы записи, позволяющие без заметных искажений воспроизводить потенциалы действия (Коатон и Уитфилд, 1954) длительностью около 1 мсек. Сущность этого метода заключается в том, что записывающая головка работает не в режиме постоянства тока, как обычно, а в режиме постоянства напряжения. Такая запись может быть затем воспроизведена при подключении головки воспроизведения к обычному физиологическому усилителю. Но такая схема не может без искажений воспроизводить более низкие частоты, например следовые колебания потенциалов или длительные синаптические потенциалы. Для того, чтобы иметь возможность воспроизводить все встречающиеся при микроэлектродном отведении частоты, необходимы весьма сложные установки, включающие в себя различные типы записи для различных частот.

В комплекс аппаратуры для регистрации потенциалов, отводимых при помощи микроэлектродов, нередко включаются устройства для счета импульсов, записи их среднего амплитудного значения, регистрации движения микроэлектрода. Очень эффективны счетчики импульсов при внеклеточном отведении потенциалов ритмически активных нейронов в центральной нервной системе. Применение их позволяет быстро и точно определять особенности конвергенции различных возбуждающих и тормозящих влияний на данных нейронах. Получаемые данные могут сразу выдаваться при использовании чернильно-пишущего счетчика в виде кривой зависимости частоты от времени (Колмодин, 1957). Отпадает необходимость в кропотливом и малопродуктивном сравнении большого количества осциллограмм. Все эти устройства получили широкое распространение в технике и могут быть непосредственно использованы для физиологических нужд. В связи с этим описание этих устройств здесь не приводится. При применении всей указанной аппаратуры возникают довольно сложные установки, позволяющие с максимальной эффективностью использовать преимущества микроэлектродной техники. Блок-схемы таких установок приводились рядом авторов (Френк и Фьюртс, 1955, Хапанен, Колмодин и Скоглунд, 1957, Кумс, Кертис и Экклс, 1959, Костюк, 1960, и др.)

Фотографическая регистрация осциллограмм может производиться обычными способами. При регистрации одиночных пробегов луча, синхронизированных с раздражениями, наиболее удобным методом является фотографирование их поперек пленки при помощи обычного фотоаппарата с насадочной линзой.

Если у аппарата имеется синхронизатор, то его можно использовать для одновременного запуска ждущей развертки в момент открывания затвора. При регистрации длительной активности удобнее фотографировать на движущуюся пленку при помощи любого лентопротяжного механизма. В некоторых случаях можно сочетать движение пленки с одновременной ритмической горизонтальной разверткой. В этом случае пленка движется мимо экрана осциллографа в вертикальном направлении, а горизонтальная развертка прочерчивает поперек нее наклонные линии. Поскольку обратный пробег луча происходит очень быстро, то фактически получается непрерывная запись отводимых колебаний потенциалов при значительной экономии пленки. Примеры такой записи можно видеть в ряде работ.

#### IV. ОСОБЕННОСТИ ФОКАЛЬНОГО ОТВЕДЕНИЯ

**а. Общие закономерности отведения в объемном проводнике.** Если источник ЭДС (клетка) погружен в проводник второго рода (объемный проводник), каким является мозг или другие ткани организма, а отводящий электрод представляет собой точку, находящуюся в этом проводнике где-то возле источника, то принцип отведения оказывается значительно отличающимся от отведения, допустим, электродами, приложенными к поверхности нерва или мышцы, находящихся в воздухе или другой непроводящей среде. Для выяснения особенностей отведения точечным электродом в объемном проводнике большую роль сыграли модельные опыты в максимально простых условиях, позволяющие точный анализ результатов. В качестве моделей используется погружение в электролит либо электродов, соединенных с источником постоянного тока (физическая модель), либо нерва лягушки, раздражаемого одиночными индукционными ударами (физиологическая модель). В различные точки возле электродов или нерва помещается микроэлектрод; второй отводящий электрод помещается как можно дальше от них. Тем самым имитируется положение, имеющее место при обычном униполярном методе отведения при помощи микроэлектрода. На основании большого количества отведений потенциалов из различных точек объемного проводника составляются карты распределения в нем потенциалов, позволяющие осуществлять последующий подробный их анализ.

Использование в качестве модели нерва и его потенциалов действия является для наших целей особенно удобным, поскольку в этом случае источник ЭДС является таким же, как и в естественных условиях при микроэлектродном отведении, например из глубины мозга, и упрощение условий сводится лишь к созданию совершенно однородной среды, в которой происходит распределение потенциалов, к однородному (параллельному) расположению элементов, генерирующих эти потенциалы, и к



обеспечению возможности точной локализации микроэлектрода по отношению к этим элементам. Подобные опыты проводились многократно (Лоренте де Но, 1939, 19476; Ллойд, 1953; Костюк, 1956а, и др.) и приводили все к одним и тем же выводам.

Для того, чтобы физическая модель лучше имитировала электрические явления, развивающиеся при возбуждении в физиологическом образовании, лучше применить погружение трех электродов, из которых наружные соединены с положительным полюсом батареи, а внутренний — с отрицательным.

В этом случае должны возникать такие же токи, какие имеют место перед и после распространяющегося импульса возбуждения, область которого, как известно, характеризуется отрицательным потенциалом по отношению к невозбужденным частям того образования, в котором этот импульс возникает. Если в этом случае микроэлектрод помещать в различные точки возле поляризующих электродов, а вторую клемму гальванометра соединить с проволочкой, помещенной в жидкости как можно дальше от них, то после многократных измерений можно построить следующую карту распределения потенциалов вокруг электродов (рис. 18).

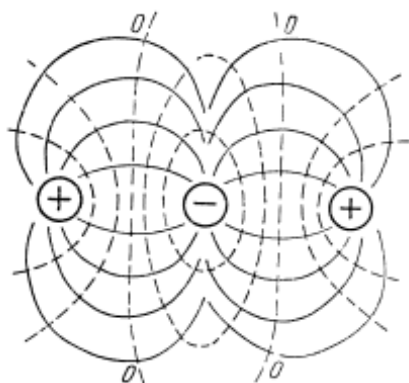


Рис. 18. Схема распределения потенциалов в объемном проводнике вокруг триполя, образованного соединенными с источником постоянного напряжения электродами

Распределение потенциалов для упрощения дано для одной плоскости; ясно, что в действительности мы имеем объемное их распределение, которое можно себе представить, если вращать схему вокруг оси  $X$ . Изопотенциальные линии образуют изопотенциальные поверхности вокруг поляризующих электродов.

Как видно, при расположении микроэлектрода возле положительного полюса (или источника тока — *current source*) микроэлектрод регистрирует положительный потенциал по отношению к отдаленному (относительному) электроду, при расположении возле отрицательного полюса (стока тока — *current sink*) — отрицательный. Чем ближе микроэлектрод к источнику тока или стоку тока, тем больше регистрируемая разность потенциалов. Положение же относительного электрода при условии, что он удален в область, где плотность проходящих токов практически является ничтожной, не сказывается на получаемых результатах. С какой бы стороны мы его не располагали, направление и величина отводимой разности потенциалов оказывается одной и той же и зависит только от положения микроэлектрода. Относительный электрод отводит все время некоторый средний, не-



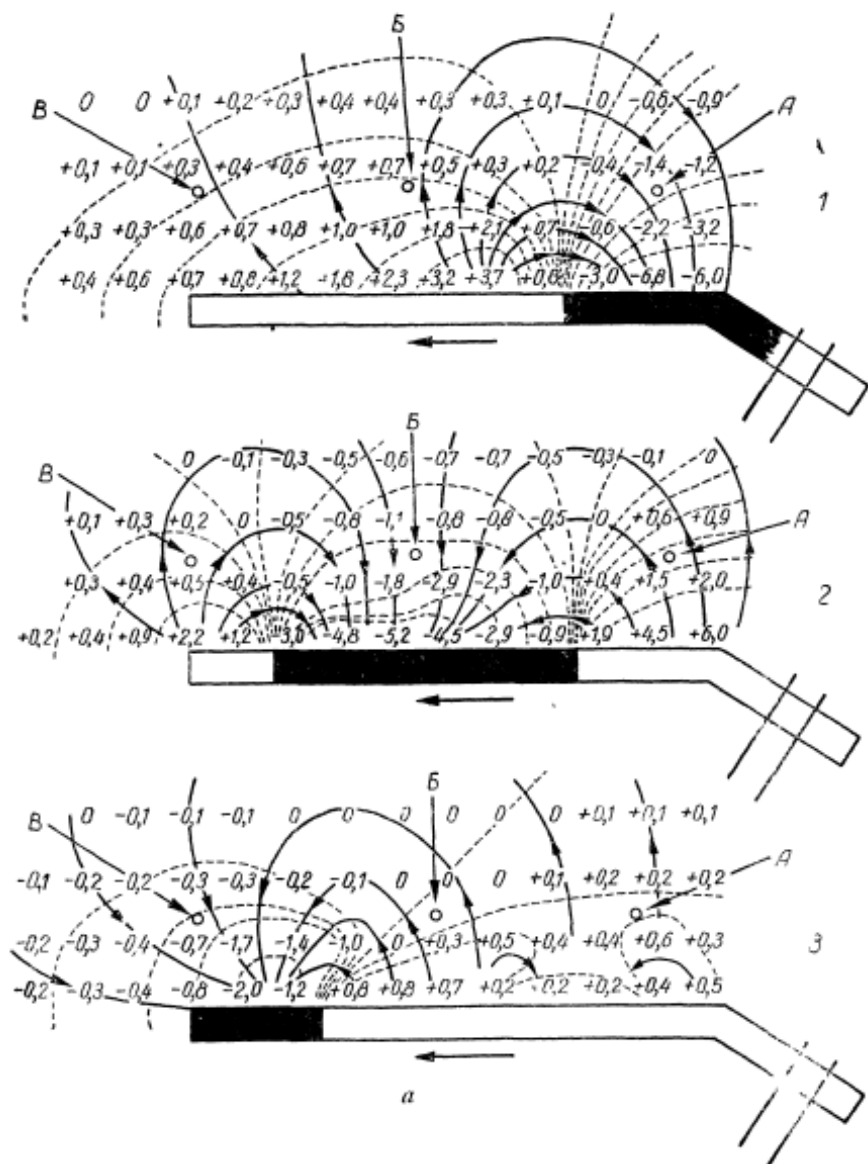


Рис. 19. *a* — схемы распределения потенциалов в объемном проводнике вокруг седального нерва лягушки после нанесения на его конец одиночного раздражения:

1 — через 1,5; 2 — через 2,5, 3 — через 3,5 мсек;

изменяющийся («нулевой») потенциал, по отношению к которому и отсчитывается потенциал микроэлектрода.

Точно такая же картина получается, если микроэлектрод располагать в различных точках объемного проводника вокруг

нерва, по которому распространяется нервный импульс. При таких опытах также обычно прибегают к упрощению, помещая нерв не в объем, а на плоскость — на лист фильтровальной бумаги, смоченной рингеровским раствором. Микроэлектрод прикасается к различным точкам этого листа, а относительный электрод прикрепляется к его краям. При этом устанавливается распределение потенциалов на одной плоскости, на основе которого легко себе представить и объемное их распределение. Зарегист-

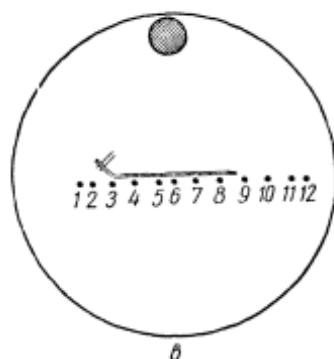
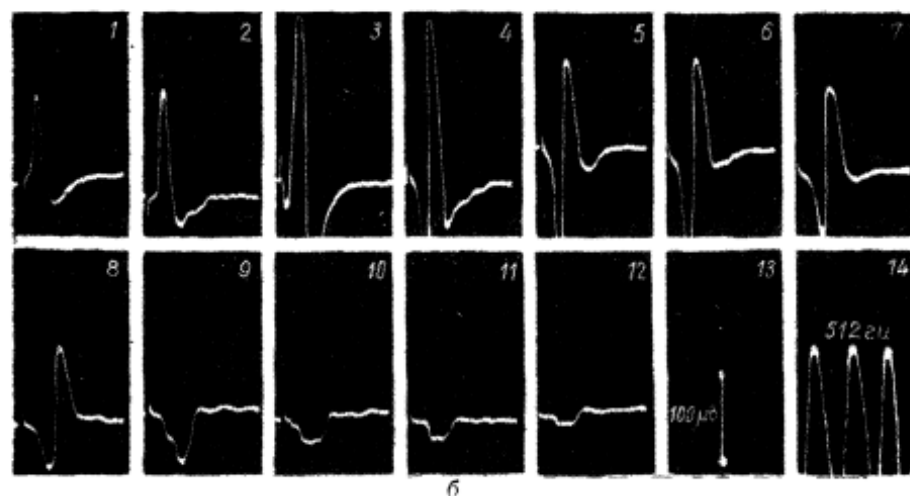


Рис. 196 — часть осциллограмм, на основании которых строились схемы рис. 19а; в — точки объемного проводника, от которых отводились эти осциллограммы.

рировав осциллограммы отводимых колебаний потенциалов от большого количества точек вокруг нерва, можно построить карты их распределения для любого момента времени после нанесения на нерв раздражения и тем самым установить особенности этих потенциалов в различные фазы распространения импульса

по нерву (в момент его входа в объемный проводник, при движении внутри этого проводника и при достижении конца нерва).

На рис. 19а показаны (только в одну сторону от нерва) полученные нами экспериментально карты такого распределения для трех различных интервалов после нанесения раздражения, когда импульс входит в объемный проводник, находится посредине нерва и доходит до его конца. Рассмотрим вначале наиболее типичный случай (2) — когда нервный импульс распространяется по нерву внутри объемного проводника. Если сравнить распределение потенциалов в среде в этом случае и при использовании физической модели, приведенной выше, то ясно видна идентичность результатов. Поверхность нерва также представляет собой два участка, являющиеся источниками токов в окружающей среде, и расположенный между ними участок, к которому эти токи направляются (сток тока); последний, конечно, и представляет собой участок возбуждения, несущий отрицательный заряд по отношению к соседним, невозбужденным участкам нерва. Положительный потенциал регистрируется микроэлектродом при расположении последнего возле источника тока, отрицательный потенциал — возле стока тока; чем ближе микроэлектрод расположен к источнику или стоку тока, тем больше регистрируемая разность потенциалов. Таким образом, распространяющийся импульс в электрическом отношении оказывается тем же триполем, который мы ранее создавали искусственно.

В чем же существенное различие этого отведения от обычного, когда нерв находится в непроводящей среде? В случае обычного отведения *оба электрода должны непосредственно касаться источника ЭДС*; разница потенциалов между ними будет отсчитываться до тех пор, пока несущий отрицательность участок возбуждения не *окажется непосредственно под одним из электродов*. При отведении в объемном проводнике электрическое поле *существует в среде все время, пока находящаяся в нем клетка активна*, и расположенные в среде электроды *будут при любом положении отводить эту активность*, если только они расположены так, что между ними существует разность потенциалов.

Приведенные на рис. 19а схемы распределения потенциалов показывают, что отведение в объемном проводнике дает различные результаты в зависимости от того, как перемещается нервный импульс и создаваемое им электрическое поле по отношению к микроэлектроду. Допустим, что микроэлектрод расположен возле средней части нерва так, что импульс и поле могут приблизиться к нему и пройти дальше мимо (рис. 19а, точка Б). В этом случае микроэлектрод последовательно будет расположен возле источника (схема 1), стока (схема 2) и снова возле источника (схема 3) тока; соответственно зарегистрируется

трехфазное колебание его потенциала по отношению к отдаленному электроду (например, осц. 3—6 на рис. 19б).

Если микроэлектрод находится возле той точки, где нерв входит в жидкость (точка *A*), то создаваемое импульсом поле сразу возникает возле электрода и затем распространяется дальше. Зарегистрируется двухфазное колебание, связанное с нахождением микроэлектрода сначала в области стока (схе-

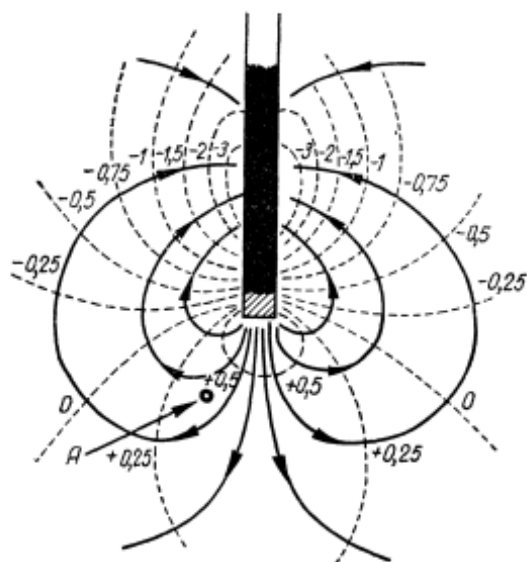


Рис 20 Особенности отведения потенциалов в объемном проводнике в том случае, когда распространение импульса блокировано на некотором расстоянии от места расположения микроэлектрода (участок блока заштрихован).

ма 1), а затем — в области источника позади импульса (схемы 2 и 3, осц. 1—2).

Если микроэлектрод находится возле конца нерва (рис. 19а, точка *B*) так, что импульс доходит до него, но не распространяется дальше, то вновь регистрируется двухфазное колебание, но с обратным соотношением фаз — сначала положительной, а потом отрицательной (осц. 7—12); причина этого уже ясна из сказанного выше.

Особый интерес представляет случай, когда импульс вообще не доходит до области расположения микроэлектрода, например, если проведение по нерву блокировано на некотором расстоянии от конца нерва (рис. 20). В этом случае микроэлектрод, расположенный возле конца нерва, например в точке *A*, будет находиться только в области источника тока и, следовательно,



будет регистрировать только однофазное положительное колебание потенциала по отношению к отдаленному электроду.

Резюмируя, можно сказать, что отведение трехфазного колебания свидетельствует о прохождении волны возбуждения мимо микроэлектрода, двухфазного — о появлении ее в области электрода и уходе дальше (— +) или, наоборот, приходе ее к микроэлектроду и угасанию здесь (+—) и, наконец, монофазного по-

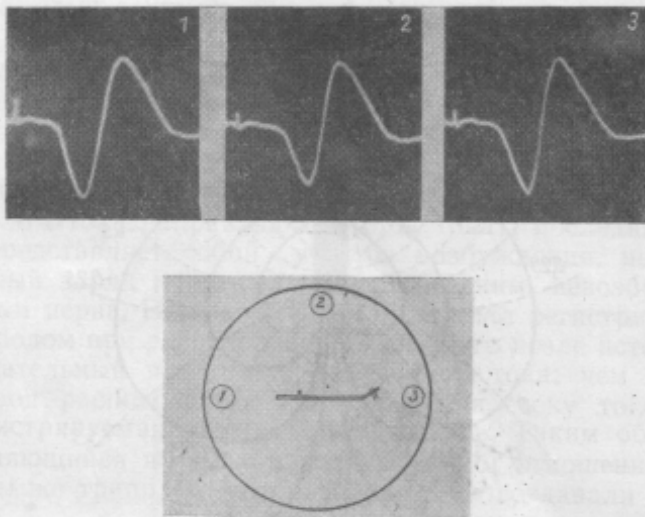


Рис. 21. Отсутствие зависимости отводимых в объемном проводнике колебаний потенциалов при изменении положения относительного электрода. На схеме показано положение относительного электрода для каждой осциллограммы; точкой указано положение микроэлектрода.

ложительного — о задержке волны до подхода к микроэлектроду.

Обусловленность всех указанных особенностей отводимых потенциалов изменениями именно под микроэлектродом, а не под относительным электродом легко проверить экспериментально. Если расположить микроэлектрод в одной точке возле нерва, а затем помещать относительный электрод в различные точки вокруг него на расстоянии более 5 см, то форма отводимых колебаний потенциалов окажется совершенно одинаковой (рис. 21).

Большое количество работ на подобных моделях позволило дать детально разработанную теорию отведения биопотенциалов в объемном проводнике (подробное ее изложение см. Рэншоу, Форбс и Морисон, 1940; Лоренте де Но, 19476). Создание этой теории имеет существенное значение для анализа результатов, получаемых при микроэлектродном отведении. Кроме определения зависимости формы отводимых колебаний от про-

странственного расположения и движения участка возбуждения по отношению к микроэлектроду, она устанавливает также условия, определяющие амплитуду отводимых колебаний. Последняя оказывается зависящей не просто от количества возбужденных клеток, но и от величины участка, охваченного в каждой из них соответствующим электрическим изменением. Если изменение потенциала на поверхности клетки захватывает лишь небольшую ее часть, то это создает большую плотность тока в окружающей среде; наоборот, если потенциал изменен на большом участке клеточной поверхности, то плотность токов в среде оказывается очень незначительной. Поэтому, например, в объемном проводнике плохо отводятся длительные следовые изменения поляризации, наступающие после потенциала действия.

Конечно, говоря при отведении в объемном проводнике о расположенных на поверхности возбужденной клетки источниках и стоках тока, мы это делаем условно. Собственно говоря, сток тока представляет собой часть поверхности клетки, в которой проходящий через нее ток имеет направление снаружи внутрь. Именно этот трансмембранный ток, представляющий собой с наибольшей вероятностью движение внутрь катионов  $\text{Na}^+$ , является первичным изменением при возбуждении, связанным с вызываемым возбуждением специфическими изменениями проницаемости клеточной поверхности\*.

Участок поверхности, характеризующийся как источник тока, является местом выходящих трансмембранных токов, создаваемых вторично как следствие изменений в участке возбуждения. Возникающие токи начинаются от внутренней поверхности участка возбуждения, выходят наружу через имеющие собственную поляризацию прилегающие невозбужденные участки клеточной поверхности и подходят к наружной поверхности участка возбуждения (рис. 24, а). Выходящие токи, которые можно в данном случае рассматривать как «пассивные», вызванные первичными «активными» трансмембранными токами в участке возбуждения, раздражают соседние участки клеточной поверхности и служат основой для распространения нервного импульса. Промежуточная, «нулевая», зона на поверхности представляет собой место извращения трансмембранных токов (перехода от входящего их направления к выходящему), пограничную зону между возбужденным и возбуждаемым участком поверхности нерва.

Следует специально подчеркнуть, что единственным источником электрических процессов, связанных с процессами возбуждения и торможения в клетке, является разность потенциалов,

---

\* Подробнее о трансмембранных токах можно прочесть в ряде специальных работ, например в работах Годжкина и его сотрудников (см. обзор Годжкина. 1951).

создаваемая жизнедеятельностью клетки, обменом веществ на ее поверхности и сводящаяся к неодинаковой концентрации определенных ионов на обе стороны от этой поверхности. Соответственно токи действия текут всегда между различными частями *одной и той же* клетки. Источником токов действия не могут быть различия электрических зарядов *различных* клеток, и поэтому электрические влияния одной клетки на другую могут возникать лишь за счет поляризации одной при прохождении через нее описанных выше кольцевых токов от другой.

Нами были освещены общие закономерности отведения потенциалов при наиболее широко применяемом способе микроэлектродного отведения — при помощи точечного («активного») и отдаленного («относительного») электродов. Возможно, конечно, применение двух точечных микроэлектродов, помещаемых в объемный проводник возле источника ЭДС. В этом случае результат отведения будет уже определяться изменениями не под одним электродом, а под двумя, и, конечно, он будет более сложным и труднее анализируемым, чем при применении одного «активного» микроэлектрода. Поэтому такой метод отведения применяется редко, хотя для некоторых специальных случаев он может оказаться весьма полезным (см. Воронцов, 1958), поскольку он может давать сведения не только о характере движения нервного процесса мимо микроэлектрода, но и о направлении этого движения.

**б. Применение фокального отведения.** Отведение электрических потенциалов от группы клеток может иметь значение и без специального учета закономерностей отведения в объемном проводнике, например для локализации участков мозга, куда распространяются определенные нервные влияния, и электрофизиологического прослеживания внутрицентральных связей. В этих случаях важно просто установить наличие в том или ином участке мозга быстрых колебаний в ответ на раздражение, форма же этих колебаний не представляет особого значения. Однако если речь идет о более детальном изучении внутрицентральных отношений и о функциональном значении различных фаз колебаний, отводимых микроэлектродом, то тут учет приведенных в предыдущей главе закономерностей необходим.

Далеко не всегда, конечно, можно легко объяснить с этой точки зрения причину возникновения и значение того или иного электрического колебания. Главной трудностью является то, что в основном объекте применения фокального отведения — центральной нервной системе — такая правильная ориентация элементов, которая имеет место в нашей модели — нерве, — довольно редкое явление. Одновременно возбуждающиеся элементы при различной их пространственной ориентации дают столь сложное перекрытие внешних электрических полей, что установление какой-либо закономерности в пространственном распределении потенциалов оказывается невозможным. Поэтому



му особое значение анализ результатов фокального отведения на этой основе приобретает в тех случаях, когда правильная структурная ориентация элементов несомненно имеет место или предполагается. В первом случае возможно выяснение особенностей движения нервных процессов в отводимых элементах. Если же при морфологически неизвестном положении клеток выявляются особенности в отводимых потенциалах, предполагаемые теорией отведения в объемном проводнике для правильно ориентированных структур, то это можно рассматривать как одно из доказательств наличия такой ориентации.

Подтверждение допустимости приложения установленных на моделях закономерностей к анализу результатов фокального отведения из мозга было получено рядом авторов при отведении потенциалов из областей с хорошо выраженной ориентацией нервных элементов. В латеральном коленчатом теле имеется четкое послойное распределение тел, дендритов и аксонов нервных клеток, и электрод можно локализовать в любом слое. Если рассматривать начальное колебание потенциала, которое, очевидно, представляет собой потенциал действия пресинаптических элементов, то оно оказывается двухфазным при расположении кончика микроэлектрода в области клеточных тел (+ —) и трехфазным при погружении еще глубже (+ — +). Но как только электрод поднимается в область дендритов, оно становится положительным. Рассматривая такие данные с точки зрения закономерностей объемного проводника, можно заключить, что нервный импульс в афферентных волокнах поднимается до слоя нервных клеток и здесь угасает. Наоборот, второй компонент ответа, который, вероятно, представляет собой постсинаптический ответ, имеет при отведении из области клеточных тел характер отрицательного колебания или двухфазной волны, но с обратным отношением фаз (— +). Это свидетельствует о том, что второй компонент возникает именно здесь и затем распространяется дальше по аксонам (Бишоп и О'Лири, 1942, а также П. Бишоп, 1953).

Аналогичные условия имеются также в коре больших полушарий, где пирамидные клетки ориентированы перпендикулярно к поверхности коры; их аксон уходит в белое вещество, а дендрит поднимается к поверхности и там разветвляется. Проведенное рядом авторов фокальное отведение (см. Чжан Сян-Дун, 1951; Эклс, 1951; Бернс, 1951; Ройтбак, 1955) показало, что при прямом раздражении поверхности коры в области раздражения возникает отрицательное колебание потенциала. Если электрод погрузить в IV слой коры, где в основном расположены тела пирамидных нейронов, то там в это же время отводится почти симметрическое по форме положительное колебание. Наоборот, при возбуждении сомы этих клеток, например при прямом раздражении (Эдриан, 1936), от поверхностных слоев в это же время регистрируется положительность. Мо-



жет быть сделано следующее заключение: поверхностное раздражение вызывает в области дендритов только локальное возбуждение, которое не распространяется дальше к соме, об этом говорит однофазность отрицательного колебания у поверхности мозга и положительного — в глубине его. Поверхность сомы служит источником токов к возбужденным участкам дендритов. Точно так же в области сомы можно вызвать возбуждение, которое не распространяется к апикальным дендритам. Последние теперь будут служить источниками токов к соме, соответственно в области расположения сомы пирамидных нейронов будет регистрироваться отрицательное колебание, а в поверхностных слоях — положительное.

При усилении раздражения поверхности коры от нее отводитcя двухфазное колебание ( $- +$ ), соответствующее также двухфазному колебанию, но с противоположным порядком фаз, в глубине мозга ( $+ -$ ). Это ясно указывает на то, что теперь участок возбуждения не остается только в области дендритов, через некоторое время после раздражения возбужденная область перемещается из дендритов в сому (для нас в данном случае не существенно, каким образом происходит это перемещение — путем ли прямого распространения по дендритам или путем синаптического возбуждения сомы), что и проявляется в изменении направления токов в объемном проводнике на противоположное.

Для наглядности на рис. 22 приведены схемы, показывающие механизм отведения фокальных потенциалов в указанных выше случаях.

Такой анализ был применен рядом исследователей и при отведении фокальных ответов, возникающих в различных слоях коры при поступлении в нее афферентного импульса («первичных ответов»). Литература по электрофизиологическому анализу первичных ответов чрезвычайно обширна, и обзор ее можно найти у Ройтбака (1955) и ряда других авторов. Одиночный афферентный импульс обычно вызывает положительное колебание потенциала на поверхности мозга, соответствующее отрицательному на глубине IV слоя. Следовательно, можно думать, что поступающий импульс вызывает первоначально локальный, нераспространяющийся процесс возбуждения в участках пирамидных нейронов, расположенных на этой глубине, т. е. в соме и основаниях дендритов. Апикальные дендриты в это время не охвачены возбуждением и поэтому могут служить источниками токов к возбужденным участкам. Позже возникают более сложные фазы фокального потенциала, указывающие на дальнейшее распространение активности из места ее первоначального возникновения. В это время в поверхностных структурах развивается отрицательная волна, которая при погружении микроэлектрода в IV—V слои извращается в положительность, следовательно, позже деполяризация охватывает и апикальные ден-

дриты. Действительно, гистологические данные показывают, что афферентные проекционные волокна заканчиваются синаптическими окончаниями на пирамидных нейронах именно в области IV—V слоя, и здесь процессы возбуждения при поступлении афферентного импульса должны быть первичными.

Очень хорошо проявляется совпадение выводов, получаемых на основании анализа результатов фокального отведения, с дан

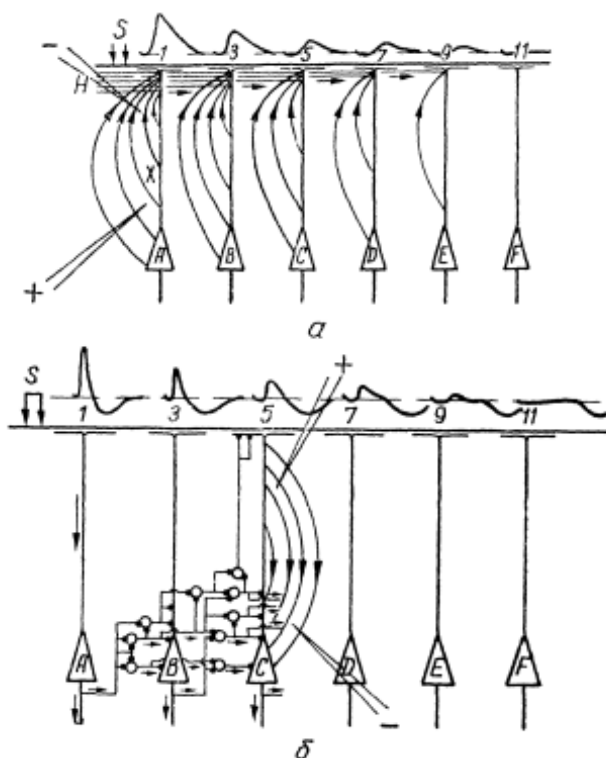


Рис 22 а — схема, показывающая возможный механизм отведения поверхностного отрицательного и глубокого положительного колебания в коре больших полушарий при прямом раздражении ее поверхности; б — схема, показывающая возможный механизм появления глубокого отрицательного колебания и поверхностной положительности при усилении раздражения поверхности коры (по Экклсу, 1951).

ными о пространственном расположении возбужденных объектов при сравнении ответов коры на поступление афферентного импульса по специфической и неспецифической афферентным системам (Ли, Куллен и Джаспер, 1956а, б). В первом случае извращение последовательности фаз локального ответа при погружении микроэлектрода (+ — на — +) происходит на строго определенном уровне, что соответствует, как уже указывалось,

локализованному расположению окончаний специфических афферентных волокон на пирамидных нейронах. Во втором случае поверхностная отрицательная волна извращает свой знак при погружении микроэлектрода очень непостоянно, в пределах 0,4—1,5 мм от поверхности коры. Оказывается, что и окончания неспецифических путей очень широко распространены по различным слоям коры, вызывая тем самым локальные процессы возбуждения и в ряде участков дендритов пирамидных нейронов, которые, естественно, будут являться уже не источниками, а стоками тока.

В спинном мозге и в стволе головного мозга имеется относительно правильная ориентация мотонейронов и их аксонов; поэтому фокальное отведение может быть использовано для установления особенностей распространения процесса возбуждения в различных частях этих клеток — миелинизированной и немиелинизированной части аксона, соме и отчасти дендритах (последние идут во все стороны и образуют сплетение, и поэтому точный анализ их реакций здесь затруднителен). Фокальное отведение от ядер мотонейронов (Лоренте де Но, 1947а, 1953; Ллойд, 1951а; Фатт, 1957а, и др.) позволяет при антидромном возбуждении последних довольно четко выделить ряд последовательных колебаний, которые с наибольшей вероятностью могут быть связаны с последовательным возбуждением указанных их частей. На основании уже известного нам чередования фаз в этих колебаниях можно установить особенности распространения импульса по нейрону при тех или иных условиях, локализовать место его блокирования, например при аффиксии (Ллойд, 1953), и т. д. В то же время можно сделать заключения об особенностях протекания процесса возбуждения в этих частях нейрона, в частности о его длительности. В этом случае метод фокального отведения может быть настолько точным, что позволяет даже анализировать особенности течения следовых изменений в различных частях мотонейрона (Ллойд, 1951б). Этому способствует, конечно, значительно бóльшая величина следовых изменений потенциала в центральных участках мотонейрона по сравнению с его аксоном.

На рис. 23 приведен полученный в нашей лаборатории пример фокального отведения потенциалов антидромно-возбуждаемых мотонейронов, позволяющий выделить компоненты, связанные с активностью различных отделов мотонейронов. Осциллограммы получены при ходе микроэлектрода от дорзальной до вентральной поверхности мозга (см. схему). Первое колебание, обозначенное 1, безусловно связано с распространением возбуждения вдоль аксонов мотонейронов. В области, расположенной дорзальнее места расположения мотонейронов (даже в белом веществе бокового столба), оно имеет форму положительного колебания, которое возникает с небольшим скрытым периодом после петли раздражающего тока дей-



ствия. При приближении микроэлектрода к вентральной поверхности мозга и области хода аксонов мотонейронов положительное колебание превращается в типичный трехфазный потенциал (особенно осц. 8), характерный для проходящего мимо электрода нервного импульса. Ясно видно, что положительное колебание в дорзальных частях мозга в этот период не представляет собой какой-либо самостоятельной реакции, поскольку скрытый период ее начала одинаков во всех отведениях. Это равенство может быть объяснено только тем, что такое колебание связано с появлением кольцевых токов от еще невозбужденных

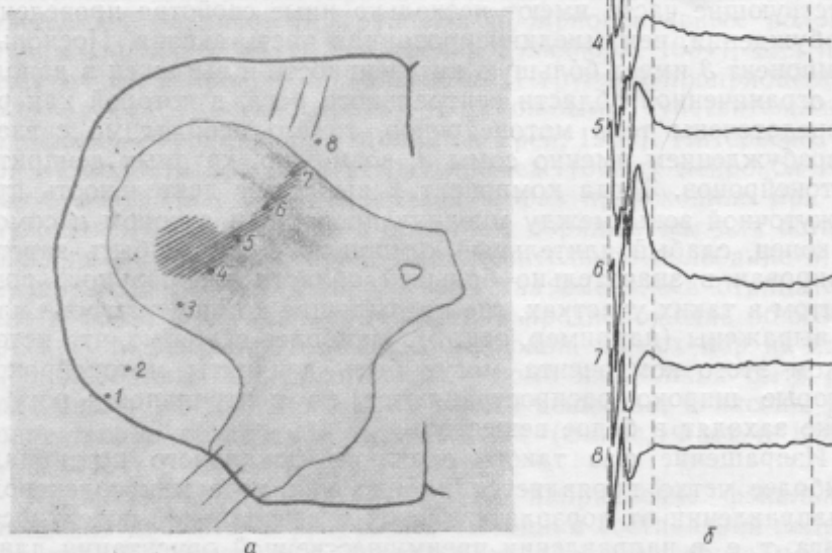


Рис. 23. Фокальное отведение потенциалов из различных точек вентрального рога спинного мозга кошки при антидромном возбуждении мотонейронов:

а — схема расположения микроэлектрода (заштриховано ядро икроножной мышцы); б — осциллограммы (вычерчены одна под другой для более точного выделения отдельных компонентов).

участков клетки к участку возбуждения, перемещающемуся вдоль аксона. При проникновении микроэлектрода в серое вещество к этому начальному колебанию присоединяются четкие дополнительные колебания (осц. 3). Они хорошо заметны и на последующих осциллограммах; лишь после выхода микроэлектрода из серого вещества в вентральный столб они вновь стали малозаметными. Из состава дополнительных колебаний можно выделить отдельные компоненты — два более быстрых (2 и 3) и интенсивных и один медленный, незначитель-



ный по амплитуде (4). Хорошо видно, что при погружении микроэлектрода эти компоненты изменялись неодинаково. На осц. 3—5 компонент 2 имеет форму положительного зубца, который присоединяется к начальному пику в виде небольшого зубчика. Лишь на глубине, соответствующей осц. 6, он приобрел отрицательный знак, сохраняя его, по-видимому, и на осц. 7, где он очень маскируется интенсивным первым компонентом. Компонент 3 имел отрицательный знак сразу же после проникновения микроэлектрода в серое вещество, зато он раньше сменился симметричной отрицательностью. Есть все основания рассматривать эти два компонента как выражение распространения антидромного возбуждения в проксимальном направлении от миелинизированной части аксона. То, что они довольно четко отделяются от первого пика, свидетельствует о том, что соответствующие части имеют несколько иные свойства проведения возбуждения, чем миелинизированная часть аксона. Поскольку компонент 3 имеет большую интенсивность и выражен в довольно ограниченной области вентрального рога, в которой как раз сосредоточены тела мотонейронов, то его необходимо связать с возбуждением именно сомы и, возможно, крупных дендритов мотонейронов. Тогда компонент 2 выражает деятельность промежуточной зоны между миелинизированным аксоном и сомой. Наконец, слабый длительный компонент 4 может быть зарегистрирован в значительно большей области вентрального рога, притом в таких участках, где предыдущие компоненты уже плохо выражены (например, осц. 3). Наиболее вероятно, что источником этого компонента могут быть дендриты мотонейронов, которые широко распространяются по вентральному рогу и даже заходят в белое вещество.

Извращение фаз такого сложного фокального потенциала наиболее четко проявляется именно при ходе микроэлектрода в направлении от дорзолатеральной к вентральной поверхности мозга, т. е. в направлении преимущественной ориентации длинника мотонейронов, что целиком соответствует закономерностям отведения в объемном проводнике и подтверждает связь наблюдаемых колебаний именно с этими клетками. Выделенные компоненты легко могут быть анализируемы в отношении длительности течения, изменений при взаимодействии на мотонейронах различных импульсов или действия химических факторов и т. д. Можно, например, отметить, что при поступлении к мотонейронам тормозящих импульсов изменяются только компоненты 3 и 4, но не 2 и 1.

Применение фокального отведения и учет особенностей отведения в объемном проводнике могут быть использованы на спинном мозге, а также и на других отделах центральной нервной системы для суждения о возможной ориентации клеточных элементов, которые удастся выделить только физиологически, но не морфологически. Ряд таких попыток был сделан по отно-

шению к промежуточным нейронам спинного мозга, которые, несомненно, значительно отличаются друг от друга в функциональном отношении и в направлении хода аксонов, но которые трудно различимы по морфологическим признакам (кроме длинно аксонных промежуточных нейронов восходящих путей) Для этого путем множественного отведения фокальных потенциалов определяется линия, по которой происходит извращение знака фаз фокального потенциала Можно предполагать, что создающие этот фокальный потенциал нейроны идут в основном перпендикулярно к этой линии, причем в ту сторону от нее где отводятся начальные отрицательные колебания, расположена сома клеток, а в ту сторону, где при этом отводится положительность, простираются их аксоны Такой анализ оказался возможным для сегментарных промежуточных нейронов, возбуждаемых различными группами проприоцептивных волокон группы I (Экклс, Фатт, Лендгрэн и Уинсбюри, 1954), для промежуточных нейронов, связанных со II группой проприоцептивных волокон (Костюк, 1957а) и с кожными чувствительными волокнами (Фернандес де Молина и Грей, 1957) Интересно, что при активности предполагаемых промежуточных нейронов Реншоу в вентральном роге извращение фаз происходило при погружении микроэлектрода в обратном порядке, чем для остальных промежуточных нейронов (положительное колебание в более дорзальных частях серого вещества сменялось отрицательным в более вентральных) Возникло предположение об особой ориентации этих гипотетических нейронов, до сих пор не идентифицированных морфологически,— сома их должна быть расположена у вентрального края серого вещества, а аксоны располагаться в возвратном направлении (Экклс, Фатт и Кокетсу, 1954)

Крайнего своего развития это направление фокального отведения достигло в разработке методики составления подробных карт распределения потенциалов для всего среза мозга в различные моменты после поступления в мозг нервного импульса Первоначально такие карты составлялись на основании погружения в данной плоскости среза от 9 до 18 микроэлектродов (Питтс, Уолл и Леттвин, 1952), затем их количество было увеличено до 300—450 (Леттвин, Маккаллох и др., 1953) Такие карты представляют собой очень детальную картину распределения источников и стоков тока, позволяющую сделать целый ряд выводов о движении нервных импульсов через мозг Но, конечно, столь трудоемкая работа может проводиться лишь для отдельных исключительных случаев отведения, она вряд ли может быть осуществлена в серийном масштабе

Нередко вызывает неясности вопрос какому же функциональному состоянию нервных клеток отвечает отведение возле их поверхности положительного колебания потенциала по отношению к отдаленному электроду? Если не учитывать зако-

номерностей отведения в объемном проводнике, то, конечно, возникает впечатление, что такое отведение свидетельствует о гиперполяризации поверхности клетки в этой области. Такой поспешный вывод был сделан некоторыми исследователями как для противоположных фаз фокальных потенциалов в поверхностных и глубоких слоях коры (Ройтбак, 1955), так и для аналогичного извращения фаз при погружении микроэлектрода от дорзальной поверхности спинного мозга до его вентральной по-

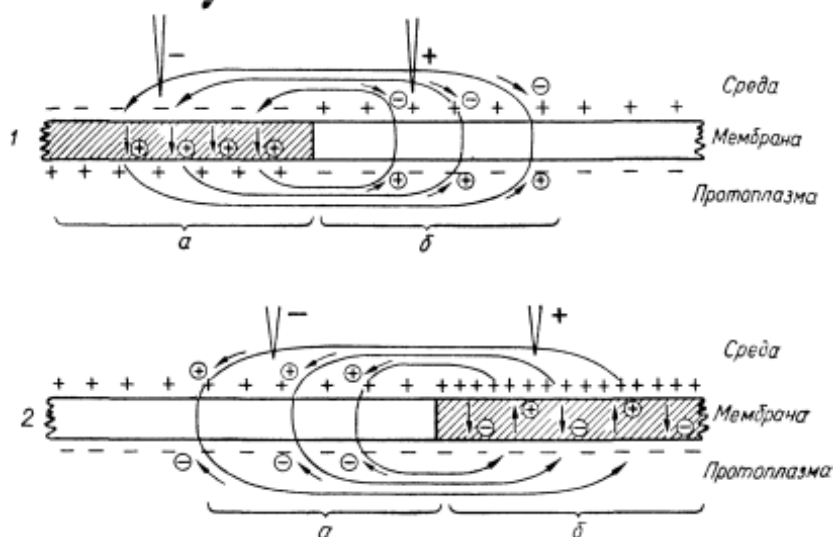


Рис 24 Схемы, показывающие причины возникновения различий в отведении потенциалов внеклеточным микроэлектродом (отводящим распределение потенциалов в окружающем клетку объемном проводнике) и внутриклеточным микроэлектродом (регистрирующим истинные изменения электрической поляризации клеточной поверхности)

1 — возникновение возбуждения в клетке (деполяризация) а — участок возбуждения, б — участок каталектрона 2 — возникновение торможения в клетке (гиперполяризация) а — участок аналектрона, б — участок торможения

верхности (Моцный, 1955) Между тем совершенно ясно, что отведение такого положительного колебания не говорит о повышении потенциала поверхности клетки в этой области; наоборот, здесь развивается снижение трансмембранной разности потенциалов, деполяризации клеточной поверхности.

Обратимся еще раз к приведенным в предыдущем разделе картам электрических полей в объемном проводнике, в частности к случаям, когда микроэлектрод отводит положительный потенциал по отношению к отдаленному электроду. Как уже подчеркивалось, это имеет место тогда, когда микроэлектрод находится возле участка поверхности, лежащего либо перед возбужденным участком, либо позади него — точно так же, как это имеет место в случае отведения потенциала в естественных условиях от различных слоев коры. Что же происходит в этом участке с



электрической поляризацией клетки, т. е. с разностью потенциалов между наружной и внутренней стороной ее поверхности? Поскольку через клеточную поверхность в этой области проходят выходящие токи, созданные расположенным рядом возбужденным участком (рис. 24, а), то они будут приводить к накоплению на внутренней стороне клеточной поверхности положительно заряженных катионов, а на наружной — отрицательно заряженных анионов. Тем самым существующая в покое электрическая поляризация клеточной поверхности будет *снижаться*, а не повышаться, как это может казаться на основании фокального отведения. В этом случае мы видим обычный пример катэлектротонических влияний возбужденного участка на соседние участки клеточной поверхности.

Таким образом, во избежание неправильных выводов из экспериментальных данных необходимо твердо помнить, что фокальное отведение положительного колебания потенциала отражает не истинное изменение величины электрической поляризации клеточной поверхности, а лишь соотношение потенциалов различных точек внешнего по отношению к клетке электрического поля. Более того, отведение такого положительного колебания указывает на вероятность наличия в расположенных в этой области участках клетки катэлектрических изменений.

В связи с таким положением важен вопрос о том, можно ли на основании фокального отведения вообще судить об истинном увеличении электрической поляризации клетки. Этот вопрос важен потому, что основные случаи торможения в нервных клетках связаны, как показывает прямое отведение потенциалов покоя клетки при помощи внутриклеточных микроэлектродов (см. раздел V, б), именно с увеличением этих потенциалов. По-видимому, фокальное отведение само по себе не может служить доказательством истинной гиперполяризации клеточной поверхности. Конечно, если в одном из участков клеточной поверхности по какой-либо причине возникнет увеличение разности потенциалов между наружной и внутренней ее стороной по сравнению с этой же разностью в других участках поверхности той же клетки, то это тоже может стать причиной внеклеточных токов в окружающем объемном проводнике. Эти токи будут иметь такое же направление, как и между покоящимся и возбужденным участком клеточной поверхности (рис. 24, сравни а и б). Результатом их будет распространение анэлектротонического влияния на соседние участки клетки, в которых величина электрической поляризации ранее была нормальной. Помещенный в возникшее электрическое поле микроэлектрод будет регистрировать положительное колебание потенциала по отношению к отдаленному микроэлектроду возле гиперполяризованного участка поверхности, который теперь является источником тока, и отрицательное колебание возле нормального участка поверхности (стока



тока). Положение теперь окажется противоположным предыдущему — фокальное отведение отрицательности будет соответствовать в действительности анэлектротонической поляризации клеточной поверхности. Отличить на основании фокального отведения рассмотренный ранее случай, когда имела место деполаризация клетки, от последнего случая не представляется возможным. Но поскольку величина деполаризационного изменения потенциала покоя клетки при процессах возбуждения очень значительна и достигает сотни милливольт, в то время как величина гиперполяризации клетки при торможении измеряется лишь несколькими милливольтами, то практически электрические поля, создаваемые истинной гиперполяризацией, всегда будут замаскированы во много раз более интенсивными полями, созданными возбуждательными процессами. Теоретически на основании фокального отведения можно было бы судить о возникновении истинной гиперполяризации только в случае, если бы она была очень интенсивна, а процессы возбуждения в этом участке мозга практически отсутствовали бы (см. также Колмодин и Скоглунд, 1953), но практически такой случай вряд ли возможен. Поэтому первоначальное доказательство связи торможения с гиперполяризацией, полученное именно на основе фокального отведения (Брукс и Экклс, 1948), само по себе не является убедительным.

Для анализа результатов фокального отведения весьма важен также вопрос о том, какие формы активности клеток отражают отводимые колебания электрических потенциалов. Дифференциация должна быть сделана между двумя основными формами — потенциалами действия и синаптическими потенциалами; она возможна на основании двух следующих признаков:

1. Длительность потенциалов действия значительно короче, чем синаптических, и составляет 1—2 мсек. Длительность синаптических потенциалов точно измерить труднее в связи с их способностью к временной суммации. Для точного измерения их течения удобной оказалась моносинаптическая рефлекторная дуга, при возбуждении которой дисперсия импульсов во времени практически исключается и двигательные клетки подвергаются почти синхронному синаптическому воздействию. Если при этом при помощи наркотиков подавить возбудимость спинного мозга так, чтобы потенциалы действия не возникали, то при фокальном отведении регистрируется отрицательное колебание потенциала длительностью около 10 мсек, которое и можно рассматривать как выражение локального процесса возбуждения, возникшего в области синаптических окончаний (Брукс и Экклс 1947). Последующие данные, полученные при помощи внутриклеточных микроэлектродов, подтвердили этот вывод. Отведение фокальных потенциалов из ряда других ядер мозга показало что длительность течения одиночных синаптических потенциалов во всех нейронах составляет примерно такую же величину

(Герман, 1941,— на ядре Бурдаха; Бишоп и Маклеод, 1954,— на коленчатом теле и т. д.). Поэтому при отведении при помощи микроэлектрода медленного колебания потенциала такой или большей длительности есть все основания рассматривать его как проявление локального процесса возбуждения — синаптический потенциал.

2. Распространяющиеся и локальные процессы возбуждения отличаются по форме колебаний, которые они дают при фокальном отведении. Как мы уже рассматривали выше, распространяющийся импульс дает колебание, состоящее из нескольких фаз: (+ — +) — если он проходит мимо электрода, (+ —) — если доходит до микроэлектрода и здесь затухает и (— +) — если возникает в области микроэлектрода и затем уходит. Локальный процесс возбуждения, естественно, вызывает лишь однофазное колебание, связанное с таким же однофазным колебанием противоположного направления в области источника токов к возбужденному участку. Правда, в опыте встречаются случаи, усложняющие такое разделение. Выше уже приводились примеры, когда медленное колебание, по длительности вполне соответствующее нераспространяющимся синаптическим потенциалам, затем сменяется еще более длительным колебанием противоположного направления, что говорит как будто о перемещении локального возбуждения со свойственной ему деполяризации в другую часть клетки. Эти усложнения могут быть связаны с рядом обстоятельств.

Во-первых, передвижение локального процесса возбуждения из одной части клетки в другую, например из апикальных дендритов пирамидных нейронов в их сому, может быть лишь кажущимся. В действительности же, когда мы усиливаем раздражение поверхности коры и тем самым превращаем однофазный фокальный потенциал в двухфазный, происходит просто возбуждение дополнительных нервных волокон, которые спустя соответствующий скрытый период вызывают самостоятельно, через расположенные на соме синаптические окончания, новые локальные процессы возбуждения, локализованные теперь уже в соме, а не в дендритах. Внешне же этот процесс воспринимается как перемещение возбуждения вдоль дендритов к соме.

Во-вторых, может иметь место и настоящее перемещение локального процесса возбуждения из одной части клетки в другую при помощи механизма, локализованного в самой клетке. Предположим, что в каком-либо нейроне с коротким аксоном, заканчивающимся через несколько миллиметров синаптическими окончаниями на других нейронах, под влиянием афферентного импульса возникают локальные синаптические потенциалы. Это будет сопровождаться отведением однофазного отрицательного колебания при расположении кончика микроэлектрода в области расположения тела такого промежуточного нейрона и симметричного положительного — в области разветвления его ак-

сонов. Если мы усилим раздражение, то в части нейронов локальные изменения достигнут критической величины и вызовут распространяющийся процесс, который быстро распространится в область разветвлений их аксонов. Некоторые авторы предполагают, что даже в самых тонких терминальных разветвлениях аксона процесс возбуждения протекает так же кратковременно, как и в основной его части, но, с другой стороны, есть ряд фактов, указывающих на возможность перехода распространяющегося импульса в концевых разветвлениях в длительное изменение, нелогичное локальному процессу возбуждения (например, Ллойд, 1952; Лоренте де Но, 1953; Костюк, 1956б). Тем самым может создаваться условие, аналогичное описанному выше и также связанное с извращением фаз фокально отводимых локальных потенциалов. Такое объяснение предлагалось для особенностей фокальных потенциалов, отводимых от сегментарных (короткоаксонных) промежуточных нейронов спинного мозга (Костюк, 1957а).

В-третьих, возможны и переходные формы между локальными и распространяющимися процессами возбуждения. Такое явление, как существенное замедление скорости распространения возбуждения при его движении вдоль апикальных дендритов пирамидных нейронов (Чжан Сян-дун, 1955) и превращение его в длительную реакцию (Клэр и Бишоп, 1955), несомненно, должно заметно стирать разницу в электрофизиологическом отведении между этими двумя основными типами процессов.

Следует обратить внимание на то обстоятельство, что хотя величина потенциалов действия примерно в десять раз больше величины синаптических потенциалов, однако при фокальном отведении основным типом активности всегда являются медленные колебания, соответствующие именно второму типу потенциалов. Вопрос о том, почему фокальные электроды отводят потенциалы действия хуже, чем синаптические потенциалы, не вполне ясен, вероятно, здесь действует ряд факторов. Несомненно, локальные изменения происходят всегда в значительно большем количестве клеток, чем распространяющиеся разряды: обычно в ядре лишь около 10% нейронов оказываются вступающими в разряд, остальные же составляют «подпороговую кайму». Поскольку при фокальном отведении пространственное распределение зарядов играет существенную роль, то большое количество полей, создаваемых сравнительно небольшими синаптическими потенциалами, может иметь большее значение, чем интенсивные поля клеток, давших распространяющийся импульс. Далее, в большинстве случаев разряды отдельных клеток происходят асинхронно, притом нередко со значительной частотой. Соответственно различные нейроны создают внешние электрические поля, которые при быстром движении импульсов накладываются друг на друга в противоположных фазах и взаимно компенсируются. В тех случаях, когда возможен более



или менее синхронный разряд клеток (например, при моноси-наптическом или антидромном возбуждении мотонейронов), фо-кальное отведение обнаруживает и потенциалы действия

## **V. ОСОБЕННОСТИ ОТВЕДЕНИЯ ОТ ОТДЕЛЬНЫХ КЛЕТОК**

**а. Внеклеточное отведение.** Основным условием возможности отведения электрических потенциалов отдельных клеток является уменьшение диаметра кончика микроэлектрода. Роль этого уменьшения сводится к тому, чтобы иметь возможность отводить потенциалы от незначительного сечения объемного проводника, расположенного как можно ближе к поверхности клетки. Поскольку плотность токов в окружающей среде значительно возрастает при приближении к поверхности создающей их клетки, то отводимый электродом потенциал окажется довольно значительным, несмотря на существенное уменьшение сечения микроэлектрода; влияние же потенциалов, создаваемых электрическими полями других, отдаленных, клеток будет уменьшено во столько раз, во сколько уменьшена площадь сечения кончика микроэлектрода.

По мере уменьшения диаметра электрода переход от фо-кального отведения к отведению потенциалов отдельных клеток происходит, конечно, не сразу. Постепенно на фоне слитного медленного колебания выделяются отдельные быстрые зубчики, величина которых по отношению к величине медленного колебания нарастает. При достаточно тонком микроэлектроде отводится четкий ритм потенциалов действия, имеющих постоянную амплитуду и характерный для деятельности одной клетки правильный ритм; нередко одновременно отводится ряд таких ритмов, которые отличимы друг от друга по различной амплитуде пиков и выражают одновременное отведение активности ряда клеток. Чем тоньше микроэлектрод, тем лучше он дифференцирует клетки и тем легче добиться отведения одного ритма.

Такого результата можно достичь на различных объектах при помощи микроэлектродов различного диаметра. Собственно говоря, внеклеточное отведение деятельности отдельных клеток нашло себе применение в трех случаях — при отведении из мышц, из некоторых рецепторов (например, сетчатки) и из центральной нервной системы. В первом случае отводится обычно активность не одного волокна, а целой группы их, соединенных с одним нервным волокном и составляющих нейромоторную единицу. Поскольку в этом случае имеет место синхронная деятельность ряда мышечных волокон, то для ее отведения нет необходимости в особенно тонких электродах; деятельность нейромоторной единицы можно зарегистрировать обычными игольчатыми электродами с диаметром кончика в несколько десятых долей миллиметра или биполярными концентрическими игольчатыми электродами (подробнее о принципах отведения потен-



циалов нейромоторной единицы см. Бухталь, 1934; Вауэнс, 1952, и др.).

При отведении от сетчатки возможно зарегистрировать деятельность отдельных ганглиозных элементов даже без погружения микроэлектрода, путем прикладывания его к внутренней ее поверхности (см. обзор Гранита, 1947, а также Бонгард и Смирнов, 1957). И в этом случае нет необходимости добиваться особенно тонких кончиков у микроэлектродов; общий их диаметр может составлять несколько десятых долей миллиметра при диаметре проводящей части 20—40  $\mu$ .

В некоторых отделах центральной нервной системы удается успешно отводить потенциалы отдельных нейронов, применяя микроэлектроды в несколько десятков микрон (например, при отведении из ретикулярной формации мозгового ствола — Шейбель, Шейбель, Моллика и Моруцци, 1955). Обычно для успешного отведения потенциалов отдельных нейронов в коре применяются электроды с диаметром 4—12  $\mu$  (Аммасьян, 1953). По нашим данным, для успешного внеклеточного отведения потенциалов от промежуточных нейронов спинного мозга необходимы микроэлектроды с диаметром кончика 1—2  $\mu$ ; деятельность отдельных мотонейронов может быть зарегистрирована и микроэлектродом с большим диаметром. Для успешного отведения потенциалов отдельных волокон внутри мозга в связи с очень тесным их расположением некоторые авторы считают необходимым доводить диаметр кончика микроэлектрода до 0,2  $\mu$  (Катсуки и др., 1958).

Возникновение потенциалов действия постоянной величины, связанное с подчинением распространяющихся процессов в клетке правилу «все или ничего», является фактически единственным критерием отведения от одной клетки. Трудно представить себе случай, при котором бы две клетки разряжались с совершенно одинаковой частотой и находились в совершенно одинаковых пространственных отношениях к кончику микроэлектрода, так чтобы их потенциалы полностью сливались. Поэтому внеклеточное отведение оказывается особенно успешным для ритмически активных клеток, создающих очень удобные условия для сравнения амплитуд последовательных колебаний потенциалов. Для большинства клеток центральной нервной системы в той или иной степени характерно это свойство; часть из них обнаруживает постоянную ритмику даже вне специальных раздражений, что является выражением их тонической деятельности, другие клетки отвечают ритмическим рядом потенциалов действия на поступающий к ним афферентный импульс. Во всех этих случаях внеклеточное отведение потенциалов действия может быть с успехом использовано для исследования конвергенции к нейронам возбуждающих и тормозящих нервных импульсов, изменений деятельности их при различных физиологических условиях или под влиянием фармакологических агентов и т. д.

Определение того, отводятся ли потенциалы от одного элемента в случае, когда последний реагирует на раздражение лишь одним импульсом, труднее. Для этого может быть рекомендовано исследование зависимости отводимого потенциала действия от силы раздражения. Наличие изменений его величины при изменении силы раздражения указывает на суммирование в нем потенциалов нескольких клеток, пороги возбуждения которых неодинаковы.

Что касается формы отводимых колебаний, то к ней целиком относится все то, что было сказано в предыдущем разделе в отношении фокального отведения в объемном проводнике. Ведь по механизму возникновения отводимой разности потенциалов этот случай ничем принципиально не отличается от фокального отведения, разница только в том, что раньше мы отводили потенциалы, создаваемые электрическими полями большого количества клеточных элементов, а теперь — полем одной клетки.

Отводимые внеклеточные потенциалы действия имеют форму трехфазных (+ — +), двухфазных (+ — или — +) или монофазных положительных колебаний. Очевидно, причина такого разнообразия формы колебаний также заключается в различной ориентации клетки и, следовательно, движения нервного процесса по отношению к микроэлектроду. Однако использовать отведение от отдельной клетки колебаний с различным чередованием фаз для физиологического анализа вряд ли возможно. Индивидуальные вариации хода отростков различных клеток настолько велики, что они создают бесконечные возможности для вариаций расположения по отношению к кончику микроэлектрода, если последний по сечению во много раз меньше их длины. Надеяться вывести какую-либо закономерность можно было бы только в случае чрезвычайной упорядоченности хода отростков (как, например, хода дендритов у клеток Пуркинье). Однако каких-либо указаний на такую возможность пока нет; нужно помнить, что у нас нет пока и возможности локализовать кончик микроэлектрода с такой точностью, чтобы определить его расположение по отношению к отросткам отдельной клетки.

На рис. 25 приведены примеры внеклеточного отведения ликовых потенциалов нейрона; регистрация производилась от промежуточного нейрона поясничного отдела спинного мозга кошки, диаметр электрода 1  $\mu$  (Костюк, 1960).

Внеклеточное отведение синаптических потенциалов отдельных клеток обычно значительно менее эффективно, чем отведение потенциалов действия, поскольку создаваемые этими потенциалами электрические поля во много раз слабее полей, создаваемых последними. Для их обнаружения оказывается необходимым очень большое усиление, при котором менее четкие по форме синаптические потенциалы маскируются собственным шумом электрода и усилителей. Практически оказывается не-

возможным точно убедиться и в том, что отводится активность одной клетки, поскольку синаптические потенциалы не подчиняются правилу «все или ничего» и величина их оказывается весьма вариабельной в одном и том же нейроне.

Следует отметить, что внеклеточное отведение потенциалов отдельных нейронов пока является единственным возможным методом наиболее тонкого анализа деятельности нервной системы в условиях эксперимента, близких к хроническим. При особых методах погружения микроэлектродов (см. раздел II, а) достаточно длительное внеклеточное отведение возможно на животных без наркоза, при сохраненной высшей нервной деятельности (Риччи, Дон и Джаспер, 1957); это позволяет изучать активность отдельных нейронов при выработке условных рефлексов.

#### б. Внутриклеточное отведение.

Переход от внеклеточного отведения потенциалов отдельной клетки к внутриклеточному их отведению связан с существенным изменением в механизме отведения биоэлектрической активности. Внутриклеточный микроэлектрод, с одной стороны, остается точечным электродом, погруженным в объемный проводник и отводящим все внешние электрические поля, возникающие в последнем. Но в отношении той клетки, которую микроэлектрод проколел, его функция меняется. Здесь микроэлектрод отводит не распределение потенциалов, созданное во внешней среде токами

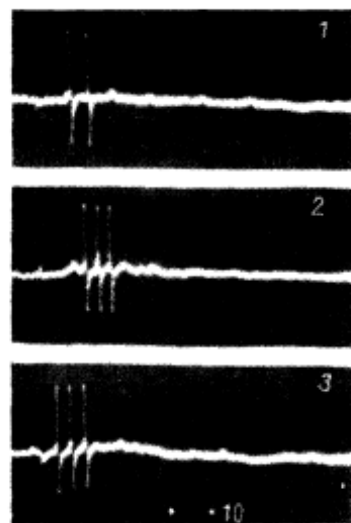


Рис 25 Пример внеклеточного отведения потенциалов действия отдельного промежуточного нейрона спинного мозга кошки при одиночных раздражениях соответствующего кожного нерва (сила раздражения в осц 1—3 увеличивалась; время в мсек).

от одного участка клеточной поверхности к другой, а непосредственно ЭДС, являющуюся источником этих токов — разность потенциалов между наружной и внутренней стороной поверхности клетки. Эта разность потенциалов оказывается полностью включенной между внутриклеточным и наружным относительно электродом и является настолько большой, что коэффициент усиления должен быть значительно уменьшен. Поэтому слабые потенциалы внешних электрических полей, как правило, перестают регистрироваться.

Выше уже указывалось, что лишь в отдельных случаях можно непосредственно, под контролем микроскопа, видеть проникновение микроэлектрода внутрь клетки. Это возможно на по-



верхностно расположенных мышечных волокнах изолированной мышцы, на которых и было впервые осуществлено внутриклеточное отведение (Линг и Джерард, 1949; Настук и Годжкин, 1950), на волокнах сердечной мышцы (Дрепер и Вайдман, 1951). Визуальный контроль проникновения микроэлектрода в нервную клетку был осуществлен первоначально для клеток спинального ганглия лягушки (Светихин, 1951). Чрезвычайно удобным объектом для этого оказались клетки нервных узлов

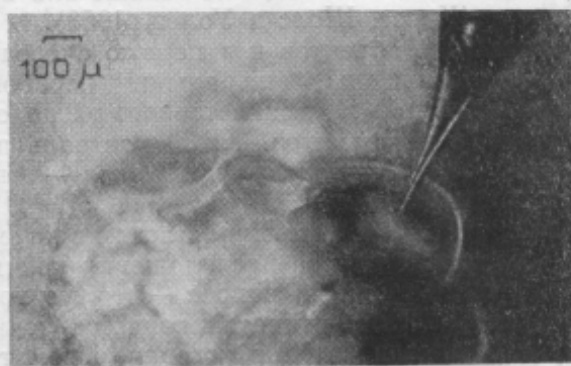


Рис. 26. Пример из работы Арванитакис и Халазонитис, показывающий возможность визуального контроля проникновения микроэлектрода в нервные клетки нервного узла моллюска.

беспозвоночных животных, в частности некоторых моллюсков, у которых размеры сомы нейронов очень велики (Арванитакис и Халазонитис, 1955). На рис. 26 приведена микрофотография из этой работы, свидетельствующая, насколько четко можно видеть на таком объекте соотношения кончика микроэлектрода и нервной клетки. Размеры клетки легко позволяют вводить в нее на различном расстоянии два микроэлектрода (Фессар и Ток, 1957); можно также выбрать две рядом расположенные клетки и ввести в каждую из них по микроэлектроду, изучая таким образом формы их взаимодействия (Халазонитис и Арванитакис, 1958). На нервных ганглиях моллюсков и ракообразных оказалось возможным даже введение микроэлектродов в окончания преганглионарных волокон, образующих синаптические контакты на поверхности нейронов ганглия, что дает возможность необычайно детального анализа механизма синаптической передачи (Хагивара и Тасаки, 1958; Фуршпан и Поттер, 1959).

Проведение такой работы требует особых методических условий. В большинстве случаев необходима изоляция объекта из организма, помещение его в соответствующую среду, поддер-

живающую удовлетворительное функциональное состояние клеток, создание хорошего освещения. Обычно применяется освещение в проходящем свете; в некоторых случаях, например при поисках области иннервации мышечных волокон, рекомендуется поляризованный свет. Конечно, изолирование объекта из организма не является особенно желательным. Показано, например, что у изолированных мышц нормальные электрические потенциалы отводятся только от самых поверхностных волокон; чем глубже расположено волокно, тем больше оно оказывается деполаризованным (Кризе, Шолс и Уолен, 1958).

Для всех остальных объектов и в первую очередь для внутриклеточного отведения из центральной нервной системы непосредственный контроль внутриклеточного расположения кончика микроэлектрода невозможен. Такой контроль производится лишь на основании электрических признаков — отведения потенциала покоя клетки.

Использование отведения потенциала покоя в качестве основного критерия внутриклеточного расположения кончика микроэлектрода ставит очень важный вопрос — что же представляет собой этот потенциал? Общепринятой является точка зрения, которую мы уже излагали выше и которая рассматривает его как естественную поляризацию клеточной поверхности, существующую постоянно и поддерживаемую метаболизмом клетки. Внедрение микроэлектрода не является причиной возникновения этого потенциала, а лишь создает условия для отведения предсуществующей разности потенциалов между внутренней и наружной стороной клеточной поверхности. Однако и сейчас высказываются предположения, что в покое электрическая поляризация клеточной поверхности отсутствует, а погружение микроэлектрода вызывает повреждение клетки и появление альтерационного потенциала, который и отводится в качестве потенциала покоя (Трошин, 1956; Сегал, 1958). Если это так, то необходимо признать, что весь огромный материал, полученный к настоящему времени при помощи внутриклеточного отведения касается не нормально функционирующих, а альтерированных клеток.

В пользу первой точки зрения говорит большое количество фактических данных, полученных на самых разнообразных объектах в различных лабораториях. Вторая же точка зрения базируется в основном на косвенных соображениях, вытекающих из общих теоретических установок ее авторов. Изложение всего материала, обосновывающего предсуществование электрической поляризации клеточной поверхности и обусловленность отводимого внутриклеточным микроэлектродом потенциала покоя этой поляризацией, а не повреждением клетки, потребовало бы специальной книги, и поэтому здесь приводятся лишь наиболее существенные, на наш взгляд, данные.

1. Потенциал покоя отводится от всех клеток, в которые может быть погружен микроэлектрод. В случае, когда клетка очень велика по сравнению с кончиком электрода, этот потенциал может без существенных изменений регистрироваться в течение многих часов или даже дней. Чем меньше клетка (и чем, следовательно, больше возможность ее повреждения микроэлектродом), тем менее постоянна величина отводимого потенциала покоя; он быстро уменьшается и нередко полностью исчезает. Если бы потенциал покоя был связан с альтерацией, то он должен был бы быть лучше выраженным именно во втором случае, а не в первом.

2. В одну и ту же клетку при достаточной ее величине на небольшом расстоянии друг от друга могут быть введены два микроэлектрода. Величина потенциала покоя, отводимого каждым из этих электродов, оказывается одинаковой (Настук, 1953). Если бы первый электрод вызывал альтерацию клетки, то потенциал, отводимый при втором погружении, не мог бы быть равен первому. То же самое можно продемонстрировать и одним и тем же микроэлектродом — многократное его введение в одну и ту же точку каждый раз дает одну и ту же величину потенциала покоя. Если же взять толстый микроэлектрод, заведомо повреждающий клетку, то с каждым последующим введением отводимая разность потенциалов оказывается все меньше и, в конце концов, исчезает совершенно.

Таким образом, отведение значительного потенциала покоя связано как раз не с альтерацией, а с неповрежденным состоянием клетки. Повреждение клетки ведет к *уменьшению существующей поляризации, а не к ее созданию.*

3. Между величиной потенциала и функциональным состоянием клетки существует теснейшая связь, причем нормальное функционирование клетки происходит тогда, когда от клетки отводится значительный потенциал покоя (подробнее о методах изменения потенциала покоя и влияниях этого изменения на функцию клетки см. раздел VI, б). Как чрезмерное снижение потенциала покоя, так и его дальнейшее повышение ведет к нарушению функции клетки; особенно четко зависимость функционального состояния клетки от определенного уровня потенциала покоя проявляется на фоне ее ритмичной активности (Костюк, Сорокина и Шаповалов, 1959; Костюк и Шаповалов, 1960а). Если бы потенциал покоя был результатом альтерации, то оптимальным условием для деятельности клетки была бы минимальная, а не оптимальная его величина.

4. Величина потенциала покоя тесно связана с метаболизмом клетки, причем при нормальном течении обменных процессов этот потенциал является высоким. Блокирование определенных звеньев обмена веществ ведет к падению величины потенциала покоя (Линг и Джерард, 1949; Сорокина, 1959б и др.). Если бы потенциал покоя носил альтерационный характер, то



также следовало бы предполагать противоположные отношения

Таким образом, наличие значительного потенциала покоя является *необходимым условием нормальной жизнедеятельности* клетки, а снижение его величины связано с серьезными нарушениями последней.

По видимому, все эти обстоятельства смущают и сторонников альтерационного происхождения потенциала покоя клетки, поскольку в последнее время они основную роль в механизме отведения постоянной разности потенциалов при нахождении микроэлектрода внутри клетки отводят уже не столько самой альтерации клетки, сколько возникновению жидкостного контактного потенциала между наполнителем микроэлектрода и протоплазмой. Они полагают, что такой потенциал не имеет прямого отношения к жизнедеятельности клетки, а является, собственно говоря, артефактом физико-химической природы. Для того, чтобы объяснить возникновение столь значительных разностей потенциалов, какие наблюдаются в опыте (до 70—80 мВ), допускается возможность избирательного движения из электрода ионов калия и задержка движения ионов хлора, что и должно создавать отрицательный заряд микроэлектрода по отношению к среде, в которую он погружен. Мы уже рассматривали вопрос о собственном потенциале электрода и указывали, что действительно в его кончике может возникать некоторая собственная разность потенциалов, затрудняющая *точное определение* истинной величины потенциала покоя. Источником ее могут быть различия в движении ионов через кончик микроэлектрода (Эдриан, 1956). Но легко убедиться в том, что собственный потенциал электрода может лишь несколько изменять величину отводимого потенциала покоя, но не создавать основную его часть. При отборе микроэлектродов можно легко найти такие, которые практически не имеют жидкостного контактного потенциала и у которых, следовательно, нет существенной разности в скорости движения ионов электролита наполнителя. Эти электроды дают при погружении в клетку примерно такую же величину потенциала покоя, как и электроды со значительным собственным потенциалом, различия составляют в худшем случае несколько милливольт. Микроэлектроды можно заполнять самыми различными наполнителями, ионы которых имеют разнообразнейший диаметр, заряд и подвижность, но которые тем не менее все отводят из данного типа клеток примерно одну и ту же величину потенциала покоя. Объяснить эти факты с позиций, рассматривающих потенциал покоя как жидкостный контактный потенциал между протоплазмой и электродом, невозможно; совершенно необъясним с этой точки зрения указанный выше параллелизм между величиной потенциала и функциональным состоянием клетки.

Исходя из всего сказанного, мы считаем, что отводимый мик-

роэлектродом потенциал покоя безусловно является выражением естественной для клетки, постоянно существующей поляризации ее поверхности. Он является точным критерием нахождения микроэлектрода внутри клетки и в то же время прямым показателем ее функционального состояния.

Конечно, нельзя сказать, что нахождение микроэлектрода в клетке является для нее совершенно безразличным. По-видимому, решающим в этом отношении является соотношение между поперечным сечением микроэлектрода и величиной поверхности клетки. При диаметре кончика микроэлектрода около  $0,5 \mu$  его поперечное сечение оказывается примерно в 100 000 раз меньше поверхности сомы мотонейрона (последняя составляет около  $5 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2$  — Экклс, 1957), что позволяет регистрировать неизменные реакции из такой клетки нередко в течение нескольких часов. При отведении такими микроэлектродами электрических потенциалов гораздо меньших по размеру промежуточных нейронов спинного мозга значительная часть последних обнаруживает признаки повреждения (Френк и Фюртс, 1956а; Костюк, 1958б; Хаапанен, Колмодин и Скоглунд, 1958). При введении микроэлектрода в клетку, поверхность которой можно контролировать под микроскопом (например, в поперечнополосатое мышечное волокно), видно, что более толстые микроэлектроды до прокола клеточной поверхности сначала прогибают ее и лишь затем скачком проникают внутрь. Микроэлектроды с диаметром кончика около  $0,5 \mu$  проходят внутрь волокна без всякого смещения клеточной поверхности. Если сопоставлять эти наблюдения с отведением электрических потенциалов, то оказывается, что в первом случае обычно имеет место довольно сложная картина. Сначала возникает постепенно нарастающая отрицательность микроэлектрода, что совпадает с периодом прогиба волокна, и только при дальнейшем погружении скачкообразно возникает вся величина потенциала покоя. Если же электрод проходит через клеточную поверхность без прогиба, то и разность потенциалов возникает практически мгновенно, именно в момент прохода кончика микроэлектрода через клеточную поверхность. Окончательная величина потенциала покоя в первом случае оказывается обычно ниже, чем во втором. На основании таких наблюдений можно считать, что скачкообразное возникновение потенциала покоя при проколе клетки указывает на минимальное ее повреждение электродом. Медленное же возникновение разности потенциалов и уменьшение ее окончательной величины является свидетельством того, что электрод давит на клетку и вызывает более или менее значительную ее альтерацию, выражающуюся в деполяризации — снижении величины потенциала покоя.

Нередко при погружении микроэлектрода в клетку можно наблюдать возникновение потенциала покоя не сразу в виде его максимальной величины. Вся разность потенциалов устанавли-

ливается двумя скачками. В таких случаях можно было думать, что микроэлектрод последовательно проходит через две находящиеся на некотором расстоянии друг от друга мембраны, на каждой из которых имеется разность потенциалов. Но для большинства клеток это мало вероятно с морфологической стороны. Ведь проникновение того же микроэлектрода в другие, рядом расположенные клетки аналогичного строения сопровождается только одним скачком потенциала, происходящим при проколе поверхности. Дальнейшее движение микроэлектрода в протоплазме не дает никаких колебаний потенциала, пока после прокола противоположной поверхности и выхода кончика электрода наружу разность потенциалов также скачкообразно не исчезнет. Поэтому в таких случаях принято считать, что наличие нескольких этапов в появлении потенциала покоя связано с неодинаковым охватом микроэлектрода проколотой мембраной клетки. В начале погружения этот охват может быть недостаточно совершенным, вдоль наружной поверхности электрода возникает низкоомный шунт между внутренней и наружной средой клетки, который и снижает отводимую величину потенциала покоя. Если электрод вдвигается несколько дальше, так что в отверстии поверхности оказывается более широкая часть его конуса, то охват становится более совершенным, шунтирование электрода прекращается и отводится полная разность потенциалов между наружной и внутренней стороной поверхности клетки.

Но в некоторых случаях микроэлектрод может внутри клетки прокалывать также и дополнительные мембраны, на которых имеется своя разность потенциалов. Так, на гигантских нейронах моллюсков было показано, что при проникновении микроэлектрода в область расположения ядра клетки, так же как и при проколе наружной поверхности, скачкообразно возникает новая разность потенциалов, являющаяся, очевидно, потенциалом покоя ядра (Арванитакис и Халазонитис, 1956).

При возбуждении клетки внутриклеточный электрод отводит быстрое колебание потенциала покоя — потенциал действия. В большинстве клеток потенциал действия оказывается превышающим на ту или иную величину потенциал покоя. Таким образом, подтверждается установленное первоначально на гигантских аксонах головоногих моллюсков правило, что возбуждение связано не просто с исчезновением существующей на поверхности поляризации, а с появлением на ней разности потенциалов противоположного направления (см. Годжкин, 1951). Это превышение было показано для поперечнополосатых мышечных волокон (Настук и Годжкин, 1950), для сердечных мышечных волокон (Дрепер и Вейдман, 1951), для соматических нейронов спинного мозга (Брок, Кумс и Экклс, 1952) и нейронов беспозвоночных (Арванитакис и Халазонитис, 1955). Правда, отведение из гладких мышечных волокон (Бюль-



бринг, 1954) промежуточных нейронов спинного мозга (Костюк, 1958б; Хаапанен, Колмодин и Скоглунд, 1958) не обнаружило здесь превышения потенциалов действия над потенциалом покоя; первые были либо меньше, либо, в крайнем случае, равнялись потенциалу покоя. Пока трудно сказать, идет ли здесь речь об особом физико-химическом механизме возникновения пика или это связано с тем, что такие небольшие по размеру клетки все же заметно повреждаются микроэлектродом (повреждение всегда сопровождается снижением амплитуды потенциалов действия).

Отводимый изнутри клетки потенциал действия всегда является монофазным при *положительном* потенциале микроэлектрода по отношению к относительному электроду. Единственное исключение из этого правила было обнаружено на инфузории *Noctiluca scintillans*, из которой при помощи внутриклеточного микроэлектрода были отведены отрицательные потенциалы действия, т. е. связанные с увеличением потенциала покоя (Хисада, 1957). После потенциала действия, конечно, могут наблюдаться длительные колебания потенциала в противоположном направлении (следовая гиперполяризация), но по своей длительности и амплитуде они ничего общего с потенциалом действия не имеют и их легко можно отличить от истинной второй фазы пика. Невозможность отведения двухфазного потенциала действия при таких условиях отведения должна быть ясна из изложенных выше отличий механизма внутриклеточного и внеклеточного отведения. Ведь при внутриклеточном расположении микроэлектрода отводится непосредственно *разность потенциалов* на клеточной поверхности в отличие от отведения *внеклеточных токов* при внеклеточном положении микроэлектрода. При возбуждении ни в одном участке клеточной поверхности не происходит увеличения потенциала покоя (рис. 24, а). Снижается лишь существующая на клеточной поверхности разность потенциалов, что и регистрируется микроэлектродом как положительное колебание. Увеличение потенциала покоя возможно только при развитии следовых процессов или при торможении. Отведение двухфазного пика при внеклеточном расположении микроэлектрода означает лишь изменение направления тока во внешней среде по отношению к отводящим электродам, но не двухфазное изменение клеточной поляризации.

Эта особенность внутриклеточных потенциалов действия не позволяет на их основе определять направление движения процесса возбуждения. Однако если поверхность клетки более или менее значительна, то внутриклеточное отведение позволяет отличить пиковые потенциалы, связанные с активностью в участке, расположенном в месте внедрения микроэлектрода, от процессов в более отдаленных ее участках. Если участок клеточной поверхности, в котором развивается активный процесс возбуждения, захватывает микроэлектрод, то отводится типичный ги-

гантский потенциал действия, достигающий или превышающий величину потенциала покоя. Если этот активный участок находится рядом с местом внедрения микроэлектрода и поверхность в области последнего лишь подвергается некоторой деполяризации кольцевыми токами (катэлектротоническому воздействию), то отводится значительно уменьшенный по амплитуде пик, тем слабее, чем слабее деполяризирующее влияние. Наконец, если микроэлектрод внедрен в той части поверхности клетки, кото-

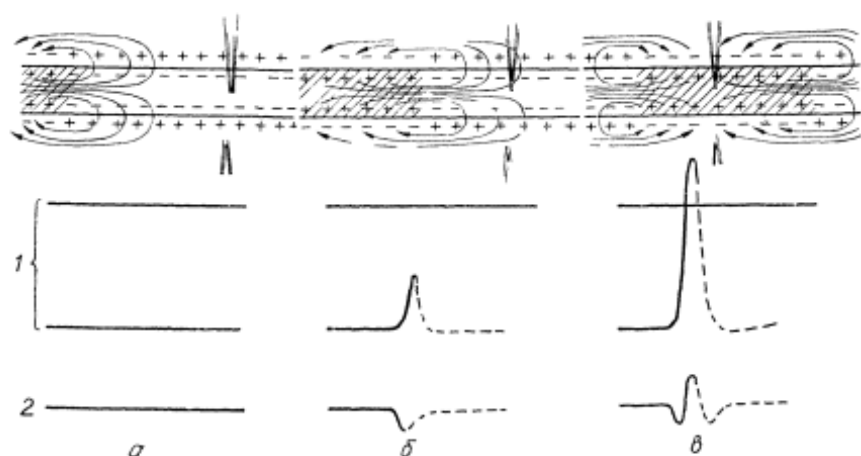


Рис 27 Схемы, показывающие возможные пространственные соотношения между волной возбуждения, внеклеточным и внутриклеточным микроэлектродами

*a* — микроэлектрод в области не захватываемой катэлектротоническими влияниями; *б* — микроэлектрод в области катэлектротонического влияния перед волной возбуждения (пассивная деполяризация), *в* — микроэлектрод в области возбуждения (активная деполяризация), 1 — внутриклеточное отведение, 2 — внеклеточное отведение

рую не захватывают даже кольцевые токи перед распространяющимся импульсом, то отводится только постоянный потенциал покоя. Схематически такие три случая показаны на рис. 27

Использование этих принципов дает возможность при одном и том же положении внутриклеточного микроэлектрода дифференцировать активность различных участков клетки, например, отличать при положении микроэлектрода в соме нервной клетки, кроме ее собственного потенциала действия, также потенциалы действия начальной, немиелинизированной, части аксона и миелинизированной его части (Брок, Кумс и Экклс, 1953). Поэтому возможно на основании внутриклеточного отведения измерение скорости проведения в волокнах (Костюк, 1955) путем сравнения скрытых периодов возникновения возбуждения и расстояния между точками приложения раздражающих и введения отводящего электродов.

Отведение строго монофазного положительного потенциала действия, наряду с появлением потенциала покоя, может быть

использовано как критерий перехода от внеклеточного к внутриклеточному отведению. На рис. 28 (верхний ряд) показан пример изменений отводимых микроэлектродом потенциалов в случае, когда его кончик находится возле поверхности возбуждаемого одиночным импульсом мышечного волокна, а затем проникает внутрь последнего (Костюк, 19576). Кураризированная мышца возбуждалась одиночными прямыми раздражениями. Отклонение луча вверх соответствует положительности микроэлектрода; расстояние между горизонтальными линиями на осц. 1 и 2 соответствует величине потенциала покоя. Типичный трехфазный пик, характерный для внеклеточного отведения в объемном проводнике, при проникновении микроэлектрода в клетку сразу же превращается в монофазный; одновременно происходит увеличение его амплитуды в десятки раз. При том же внутриклеточном расположении микроэлектрода он остается внеклеточным для соседних волокон, и если последние оказываются расположенными таким удачным образом, что создаваемые ими внешние кольцевые токи проходят внутрь отводимого волокна, то наряду с монофазным внутриклеточным пиком микроэлектрод будет отводить и многофазные внеклеточные пики других волокон. Пример такого отведения виден и на рис. 28 (нижний ряд). На осц. 2 показан случай, когда из одного и того же волокна отводился собственный потенциал действия и внеклеточный потенциал соседнего волокна. Если активность в соседних волокнах возникает во время развития потенциалов действия отводимого волокна, когда сопротивление его мембраны снижается, то проникновение внешних токов через последнюю должно облегчаться, поэтому на фоне такого пика внеклеточные потенциалы действия других волокон бывают выражены лучше (см. Истон, 1956).

Сравнение вне- и внутриклеточного отведения из одной и той же клетки позволяет, между прочим, установить, какая часть отводимого изнутри клетки пикового потенциала отражает ак-

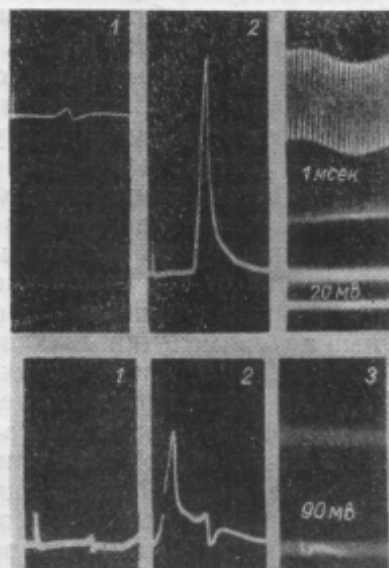


Рис. 28. Верхний ряд — пример изменений потенциалов, отводимых микроэлектродом при переходе от внеклеточного (осц. 1) к внутриклеточному отведению (осц. 2) от поперечнополосатого мышечного волокна. Нижний ряд — отведение потенциалов при внутриклеточном расположении микроэлектрода в волокне, поляризуемом током действия соседнего возбужденного волокна.



тивное, возбужденное, состояние прилежащей части клетки (рис. 27, положение *а*), а какая представляет собой «пассивный» компонент, т. е. вызывается электротоническим снижением поляризации клеточной поверхности кольцевыми токами от соседних возбужденных участков клетки (положение *б*). В разделе IV, а указывалось, что внеклеточное отведение регистрирует положительное колебание потенциала при положении кончика микроэлектрода возле источника тока, т. е. именно возле части поверхности, подвергающейся «пассивным» изменениям, и отрицательное колебание — при положении возле стока тока, т. е. в области «активной» части. Следовательно, часть внутриклеточного пика, совпадающая с положительным компонентом внеклеточного пика, является «пассивным» компонентом, созданным электротонически импульсом, находящимся еще в соседних частях клетки; часть же его, совпадающая с отрицательным компонентом внеклеточного пика, отражает активное, возбужденное, состояние клетки в области микроэлектрода. При таком сравнении нужно только быть уверенным, что внеклеточный пик отводится от той самой клетки, что и внутриклеточный. Недавно для таких точных сравнений был предложен метод, основанный на применении двухканальных концентрических микроэлектродов (Фрейганг и Френк, 1959).

Для более четкого отделения друг от друга различных компонентов внутриклеточного потенциала действия, которые обычно в значительной мере сливаются, было предложено также применение дифференцирующих усилителей. Параллельно с обычным усилительным каналом, усиливающим постоянные напряжения и служащим для регистрации общей формы внутриклеточного пика и положения микроэлектрода, включается второй канал, усилитель которого имеет на входе дифференцирующую цепочку (небольшую емкость и сопротивление утечки) и в связи с этим очень небольшую постоянную времени. При применении таких усилителей амплитуда регистрируемого импульса оказывается зависящей не только от его максимального напряжения, но в значительной мере и от скорости его нарастания. Если в составе отводимого потенциала действия имеются компоненты, хотя бы незначительно отличающиеся друг от друга по скорости нарастания, то они окажутся четко разделенными. Благодаря применению дифференцирующих усилителей (Фатт, 1957б) удалось, например, четко выделить из состава потенциала действия мотонейрона, вызванного ортодромным импульсом, те же два компонента, которые раньше обнаруживались лишь при антидромном возбуждении этой клетки. Первый из них, достигающий около 30% максимального пика, обычно связывается с потенциалом действия прилежащей части аксона, электротонически распространяющимся на сому, а второй — с активным процессом в самой соме. Указанный факт привел к весьма важному выводу о том, что возбуждение в мотонейроне всегда воз-

никает первоначально в области аксонного холмика или немиелинизированной части аксона и лишь затем в возвратном направлении охватывает всю сому клетки (Кумс, Кертис и Экклс, 1957а, б).

Кроме анализа потенциалов действия, внутриклеточное отведение оказывается весьма эффективным при изучении других видов активности клетки, в частности при изучении потенциалов, связанных с локальным возбуждением и торможением

Введение микроэлектрода в поперечнополосатое мышечное волокно в области концевой пластинки позволяет отводить здесь при действии нервного импульса локальную деполяризацию (потенциал концевой пластинки), которая рассматривается как реакция этой пластинки на выделяемый пресинаптическим окончанием медиатор. Поскольку при внутриклеточном расположении микроэлектрода регистрируется истинное изменение разности потенциалов на клеточной поверхности, то возникает возможность для точных расчетов величины зарядов, переносимых через постсинаптическую мембрану при синаптической передаче нервного импульса, определения критической величины локальной деполяризации, необходимой для возникновения распространяющегося возбуждения, и т. д. (Фатт и Кац, 1951). Те же перспективы открывает применение внутриклеточного отведения для анализа механизма синаптической передачи в мотонейронах (Брок, Кумс и Экклс, 1952), где аналогичные по течению деполяризационные изменения, возникающие при синаптическом возбуждении, получили название «возбудительных постсинаптических потенциалов». В частности, очень большой интерес представляет сравнение, по аналогии с потенциалами действия, вне- и внутриклеточного отведения таких потенциалов для решения вопроса о том, выражают ли они активное состояние постсинаптической мембраны или связаны лишь с пассивной деполяризацией последней под влиянием электрических токов, генерируемых пресинаптическим окончанием. Для синаптической активации мотонейронов такая попытка была сделана указанными выше авторами. По их данным, при внеклеточном расположении микроэлектрода не отводится положительное колебание потенциала, которое должно было бы иметь место, если бы деполяризация клеточной поверхности создавалась внешним током, наоборот, отводится очень слабое колебание в противоположном направлении. Нужно, однако, иметь в виду, что в связи с небольшой величиной изменений потенциала клеточной поверхности при локальных синаптических процессах внеклеточное поле оказывается очень слабым, а в связи со сложностью и вариабельностью подхода к поверхности пресинаптических окончаний определить ориентацию кончика микроэлектрода по отношению к последним невозможно. Поэтому нет уверенности, что отводимые вне- и внутриклеточные изменения действительно отражают один и тот же процесс.

Внутриклеточное отведение из нервных клеток при поступлении к ним тормозящих импульсов позволило с несомненностью установить связь торможения с увеличением разности потенциалов на клеточной поверхности (Брок, Кумс и Экклс, 1952). Применение таких микроэлектродов для изучения природы тормозных процессов имеет исключительно большое значение, поскольку, как указывалось выше, фокальное и внеклеточное отведение не может дать убедительных доказательств истинной гиперполяризации клетки. Внутриклеточное отведение позволило точно установить течение изменений поляризации клеточной поверхности не только при простейшем, «прямом», торможении, но и при полисинаптическом, реципрокном, торможении (Костюк, 1958а; Колмодин и Скоглунд, 1958), наличие такого же механизма торможения в нервных клетках беспозвоночных животных (Ток, 1957) и ряд других важных фактов.

Широкое применение внутриклеточное отведение может найти и уже нашло себе при изучении деятельности рецепторов, в частности при изучении происхождения и значения генераторных потенциалов (Светихин, 1957; Томица, 1956, и др.), при изучении деятельности секреторных клеток (Лундберг, 1955), при анализе механизма клеточной автоматии (Вейдман, 1951; Костюк, Сорокина и Шаповалов, 1958, и др.) и даже при изучении тканей, лишенных возбудимости, например эпителиальной (Шефер и Шанне, 1956; Латманисова, 1959).

Вместе с тем, необходимо указать на те трудности, которые возникают при применении внутриклеточного отведения и создают определенные ограничения для его использования. Одна из основных трудностей возникает в связи с необходимостью полной иммобилизации объекта. Иногда это возможно, и тогда отведение из клетки может продолжаться любое время, необходимое для выполнения поставленной задачи, без того, чтобы клетка обнаруживала признаки альтерации. Но для очень многих объектов полная иммобилизация практически невозможна, и успешное отведение из одной клетки может продолжаться лишь на протяжении очень ограниченного промежутка времени, так как вскоре микроэлектрод либо выскакивает из клетки или даже ломается, либо при своем движении механически повреждает клетку. Так, например, отведения из кураризованных мышечных волокон потенциалов концевых пластинок возможны в течение очень длительного времени, поскольку они не сопровождаются сокращением волокна. Но отведение потенциалов действия, сопровождающихся сокращением, даже при употреблении указанных выше методов борьбы со смещениями микроэлектрода оказывается во много раз труднее. В большинстве волокон сразу же после отведения одного пика потенциал покоя скачкообразно исчезает — микроэлектрод выскакивает из волокна. Если он и остается в волокне, то в период сокращения часто возникают разнообразные длительные колебания потен-



циала электрода (Костюк, 1957б). Само по себе сокращение не связано с какими-либо изменениями электрической поляризации волокна (при удачном введении можно регистрировать только потенциал действия без всяких специальных изменений в период сокращения). Значит, такие колебания являются артефактом, связанным с движением микроэлектрода в волокне (механическим деполяризующим его влиянием на клеточную поверхность, изменением собственного потенциала электрода при закупорке кончика внутриклеточными структурами и т. д.)

Еще более сложной задачей является отведение потенциалов действия мышечного волокна при ритмическом его возбуждении. Если и удастся сохранить внутриклеточное положение микроэлектрода, то в связи с альтерацией волокна последующие потенциалы действия быстро уменьшаются по амплитуде и, в конце концов, превращаются в небольшие колебания, аналогичные по форме локальным потенциалам. Лишь при проведении большого количества отведений можно отобрать удачные случаи, в которых по причине какого-то удобного расположения микроэлектрода альтерация развивалась очень медленно, и мало измененные потенциалы действия могли отводиться в течение достаточно продолжительного для анализа времени (Костюк, 1958в).

При внутриклеточном отведении на центральной нервной системе те же препятствия чинят дыхательные и пульсовые колебания мозга. Если указанными в разделе II, б мероприятиями удастся достаточно успешно бороться с этими пульсациями на спинном мозге, то на головном мозге устранить их влияние настолько трудно, что успешное внутриклеточное отведение оказывается возможным в лучшем случае лишь из нескольких нейронов в течение всего опытного дня. Большинство клеток, в которые, судя по появлению потенциала покоя, попадает микроэлектрод, сразу же после прокола начинают давать высокочастотные разряды — разряды повреждения (см. ниже), после чего быстро погибают. В связи с этими обстоятельствами некоторые исследователи поднимают вопрос, целесообразно ли вообще добиваться внутриклеточного отведения на таких объектах, в частности на коре больших полушарий, и не лучше ли ограничиваться внеклеточной регистрацией потенциалов отдельных нейронов (Ли, 1955).

Следует учитывать, что даже при полностью неподвижном объекте и достаточно тонком кончике микроэлектрода возможность отведения из одной клетки не является беспредельной. Диффузия электролита из электрода, хотя и незначительная, постоянно имеет место и, в конце концов, приводит к такому изменению во внутриклеточном содержании электролитов, что деятельность клетки начинает заметно нарушаться. Поэтому для длительного отведения определенных форм электрической активности клетки нередко приходится применять микроэлектро-

ды с различными наполнителями, подбирая такие, которые менее всего влияют на интересующие нас процессы, о чем уже говорилось в разделе I, б. Наиболее четким примером роли диффузии при длительном отведении из клетки является отведение тормозных постсинаптических потенциалов из мотонейронов. Если микроэлектрод заполнен хлористым калием, то неизбежно величина отводимой из клетки гиперполяризации со временем уменьшается. Через несколько десятков минут пребывания микроэлектрода внутри клетки тот же нервный импульс перестает вызывать гиперполяризацию, а еще позже его эффект извращается — вместо тормозного постсинаптического потенциала генерируется возбуждательный (деполяризационный). Если же использовать микроэлектроды, заполненные  $K_2SO_4$ , то этого явления не наступает; в течение того же времени отводится гиперполяризация постоянной величины. Следовательно, диффузия ионов хлора из микроэлектрода особенно неблагоприятно сказывается на отведении электрической активности, связанной с процессами торможения, и при необходимости специального изучения последних ее следует по возможности устранять.

Целый ряд возможностей повреждения клеток при внутриклеточном отведении требует серьезного подхода к критериям такого повреждения. Многочисленные наблюдения, на которых мы уже отчасти останавливались, свидетельствуют, что серьезное повреждение клетки всегда сопровождается снижением ее потенциала покоя. Поэтому следует рассматривать в качестве поврежденных те клетки, у которых величина потенциала покоя быстро снижается или у которых она первоначально была значительно ниже величин, обычно регистрируемых у данного типа клеток. Почти всегда по ходу снижения потенциала покоя происходит также быстрое изменение потенциалов действия, которые, в конце концов, исчезают. Очевидно, в таких случаях в клетках развивается типичное парабактериальное состояние — катодическая депрессия.

Но явное нарушение нормальной деятельности клетки может иметь место и тогда, когда потенциал покоя у нее имеет величину, близкую к нормальной. Поэтому величина последнего сама по себе еще не может дать уверенности в том, что внутриклеточное отведение отражает нормальную картину. В ряде случаев нам приходилось наблюдать на мышечных волокнах быстро прогрессирующее уменьшение амплитуды потенциалов действия и затягивание их длительности при незначительном изменении потенциала покоя. Очевидно, в области введения микроэлектрода развивается по какой-то причине блок проведения некатодического характера, возможно, вследствие механического давления электрода на клетку. Поэтому желателен постоянный контроль и за формой отводимых потенциалов действия, которая также может служить вторым контролем клеточного состояния.

Нередко микроэлектрод оказывает на клетку механическое раздражающее действие. Особенно постоянно такое действие проявляется в случае, когда клетка и без того предрасположена к спонтанной ритмической активности (при недостаточности кальция в окружающей среде), но оно может иметь место и в обычных условиях — при отведении от нейронов центральной нервной системы. Это явление даже послужило поводом для предположения о наличии у центральных нейронов механорецептивных свойств (Аланис и Мэттьюз, 1952). Разряды от механического действия микроэлектрода имеют характер правильных ритмов, нередко очень высокой частоты, отсутствующих до прокола (при расположении микроэлектрода возле клеточной поверхности) и возникающих сразу же после прокола клетки микроэлектродом. В большинстве случаев такие разряды свидетельствуют о значительном повреждении клетки микроэлектродом; последняя быстро деполяризуется и гибнет. Но иногда можно наблюдать случаи, когда, несмотря на появление после прокола явной механически вызванной активности, клетка затем в течение длительного времени продолжает нормально реагировать на афферентную импульсацию и сохраняет нормальную величину потенциалов действия и потенциала покоя. Как правило, без серьезных последствий механическое действие электрода переносят клетки больших размеров, например могонейроны; промежуточные же нейроны дают описанные выше высокочастотные разряды и сразу же гибнут.

При отведении электрических потенциалов от спинальных нейронов нам приходилось нередко наблюдать, что клетки, обнаруживающие такие низкие величины потенциалов покоя, какие обычно рассматриваются как несомненные признаки альтерации, в течение длительного времени дают тем не менее совершенно постоянные по величине и длительности пиковые потенциалы действия и, таким образом, по второму критерию должны рассматриваться как функционирующие нормально (Костюк, 1960). Причина этого явления неясна. Возможно, что для некоторых клеток действительно характерна очень небольшая величина потенциала покоя.

В итоге можно сказать, что определение нормального или альтерированного состояния клетки, из которой производится отведение, должно производиться с учетом всех указанных факторов, причем основное внимание, по-видимому, должно обращаться не на величины отводимых потенциалов, а на их постоянство, отсутствие их изменений во времени в связи с пребыванием в клетке микроэлектрода.

Определенные ограничения в использовании внутриклеточного отведения (как, впрочем, и внеклеточного отведения от отдельных элементов) в центральной нервной системе вносят трудность дифференциации отводимых клеток. Ведь погружение микроэлектрода в этом случае производится вслепую, и кри-



терием попадания в клетку является лишь поведение луча осциллографа. Гистологическая локализация нейронов находится пока лишь в стадии начальной разработки (см. раздел II, в), и единственным критерием того, деятельность какого из них отводится, может быть функциональный принцип — способность отвечать на определенные нервные импульсы. Основы такой дифференциации были заложены для спинного мозга Вудбюри и Пэттоном (1952). В качестве двигательных нейронов дифференцируются такие клетки, которые отвечают потенциалом действия на антидромный импульс из соответствующего вентрального корешка. Для того, чтобы иметь возможность дифференцировать двигательные нейроны, вентральные корешки соответствующих сегментов спинного мозга предварительно перерезаются и проксимальные их отрезки укрепляются на раздражающих электродах. Следует иметь в виду, что антидромный потенциал действия должен возникать в мотонейроне с очень коротким латентным периодом, не допускающим возможности синаптической задержки; это обстоятельство нужно учитывать потому, что некоторые промежуточные нейроны (так называемые клетки Реншоу) также активируются антидромным импульсом из вентрального корешка, но синаптическим путем.

Определение афферентных волокон производится на основании возникновения одного потенциала действия на каждое раздражение периферических афферентных волокон (или дорзального корешка) также с таким коротким латентным периодом, который не допускает возможности синаптической его передачи.

Все остальные клетки, которые по характеристикам своих ответных реакций на ортодромный импульс не могут быть отнесены к афферентным волокнам и в то же время не дают типичного антидромного ответа, могут быть отнесены к промежуточным нейронам.

В отношении некоторых промежуточных нейронов спинного мозга (восходящих) точная дифференциация может быть проведена на основании того же принципа, что и в отношении мотонейронов, — путем антидромного возбуждения их аксонов, проходящих в составе определенного пучка спинномозговых столбов (через погруженные в этот пучок раздражающие микроэлектроды). Таким образом удалось точно идентифицировать клетки Кларкова столба, раздражая волокна в составе пучка Флексига (Кертис, Экклс и Лундберг, 1958).

Нужно сказать, что определение характеристик клеточных реакций элементов, дифференцированных на три группы по указанным принципам, показывает, что они действительно по своим функциональным свойствам существенно отличаются друг от друга. Эти отличия настолько значительны, что при определенном опыте можно сразу по первому же зарегистрированному потенциалу действия сказать, от какого элемента он отводится. Мотонейроны характеризуются большими стабильными величи-

нами потенциалов покоя (до 75 мв) и значительным превышением над ними потенциалов действия (до 25 мв), наибольшей длительностью пика (2—3 мсек) и развитием после него интенсивной и продолжительной гиперполяризации. На афферентный импульс они отвечают, как правило, одним потенциалом действия. Промежуточные нейроны имеют менее значительную и менее постоянную величину потенциала покоя (до 50 мв) и меньшую длительность пика (около 1 мсек), не обнаруживающего превышения и следовой гиперполяризации. Особенно характерной для промежуточных нейронов является чрезвычайно выраженная способность к ритмической активности как вне раздражения, так и в ответ на одиночный афферентный импульс. Ответы могут быть вызваны из различных периферических источников. Наконец, потенциалы действия афферентных волокон особенно кратковременны (около 0,75 мсек), а явления конвергенции в них, естественно, отсутствуют. Иногда и афферентные волокна обнаруживают стойкую ритмическую активность (как следствие раздражения позиционных рецепторов), но она характеризуется исключительной правильностью в отличие от менее правильной ритмики промежуточных нейронов, а ее источник обычно легко может быть найден при небольших движениях конечности, изменяющих условия раздражения этих рецепторов.

О том, что указанные функциональные особенности действительно отражают деятельность совершенно различных типов спинальных клеточных элементов, а не связаны просто с особенностями их иннервации, говорит тот факт, что такие же группы могут быть выделены на основании прямого раздражения различных клеточных нейронов через внутриклеточный микроэлектрод (Костюк и Шаповалов, 1960).

Для других отделов центральной нервной системы, отличающихся еще большим разнообразием клеточных элементов, дифференциация их оказывается более сложной проблемой. Нейроны, имеющие длинные аксоны, уходящие в другие нервные образования, устанавливаются на основании метода антидромного возбуждения (клетки Пуркиньи в мозжечке — Гранит и Филлипс, 1956; клетки Беца в коре — Филлипс, 1956). Однако дифференциация короткоаксонных нейронов на основании различных косвенных признаков может быть проведена лишь крайне предположительно.

## VI. ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ РАЗДРАЖЕНИЯ И ПОЛЯРИЗАЦИИ

**а. Применение внеклеточных микроэлектродов.** Внеклеточные микроэлектроды давно нашли себе широкое применение для локального раздражения различных структур центральной нервной системы. Использование для этой цели микроэлектро-

дов мало чем отличается от обычного раздражения электродами, приложенными к поверхности мозга или к нерву, и поэтому мы остановимся на нем лишь в общих чертах.

Можно выделить два способа раздражения при помощи внеклеточных микроэлектродов — униполярный и биполярный. При униполярном раздражении «активным» является лишь один электрод, погруженный в мозг. Второй электрод в виде большой пластинки соединяется с какой-либо поверхностной частью организма. Фактически при таком способе раздражающий ток пропускается через всю толщу мозга и окружающих тканей. Но поскольку его плотность велика только у острия микроэлектрода, а дальше силовые линии тока расходятся широко, то практически раздражаться будут только образования, расположенные близко к острию. Такой метод широко применялся для раздражения в работах Лоренте де Но, Беритова и сотрудников и ряда других исследователей.

При биполярном раздражении два проводника располагаются либо рядом, либо один в другом (концентрический электрод) и вместе погружаются в мозг. Расстояние между ними обычно составляет 0,1—0,3 мм (см., например, Воронцов, 1958), но некоторым авторам удалось свести его до 10 $\mu$  (Питтс, Маккаллох и др., 1954). При биполярных микроэлектродах нет того широкого ветвления токов по мозгу, которое всегда есть при монополярном раздражении, и в этом отношении они предпочтительнее. Но, с другой стороны, они сильнее повреждают ткань при погружении, а незначительное межэлектродное расстояние требует применения более сильных раздражающих токов.

Если применяется раздражение толчками тока одного направления (например, прямоугольными), то необходимо принятие мер для предупреждения возможной поляризации электродов; при применении раздражения переменным током (например, индукционными ударами) поляризация не возникает.

Что же касается непосредственных механизмов уни- и биполярного раздражения клеток, то они, ясно, одинаковы. Возбуждение возникает в участках клеток, где ток выходит из них и тем самым вызывает снижение электрической поляризации клеточной поверхности до необходимого критического уровня (деполяризацию). Тот же ток где-то в другом участке клетки входит в нее и вызывает здесь противоположные, анэлектротонические изменения. Очевидно, большое значение должна иметь ориентация клеточных структур в создаваемом электрическом поле. Если они ориентированы по его длине, то в клетках должно иметь место хорошее пространственное разделение ан- и катэлектротонических участков, и раздражение будет более эффективным; если же клетки (и особенно волокна) ориентированы перпендикулярно силовым линиям тока, то раздражение будет наименее эффективным.



Поскольку различные клеточные образования в мозгу имеют различные пороги возбудимости, то путем применения градуированных раздражений можно пытаться возбуждать их дифференцировано. Такая методика была применена Лоренте де Но для прямого раздражения двигательных ядер черепномозговых нервов; по периферическим ответам он заключил, что при постепенном усилении раздражения сначала появляется характеризующийся более значительным латентным периодом «синаптический ответ» (вызванный раздражением пресинаптических волокон), а затем связанный с возбуждением сомы мотонейронов «прямой ответ». По изменениям последнего при различных условиях можно судить о течении изменений возбудимости сомы мотонейронов и т. д. (см. подробнее Лоренте де Но, 1935). Правда, аналогичные факты могут получить и иное толкование. Так, Эдисен (1956), например, считает, что скачкообразное укорочение скрытого периода ответной реакции при усилении раздражения области мотонейронов связано с переходом места возбуждения от дендритов к соме клетки или начальной части аксона.

Аналогичный прием используется для разделения реакций, связанных с деятельностью промежуточных и двигательных нейронов спинного мозга (Бернгард и Рексед, 1945). При раздражении определенных точек серого вещества можно вызвать в вентральном корешке две ответные реакции, разделенные значительным интервалом, что позволяет думать об обусловленности первой из них прямым раздражением мотонейронов, а последующей — вовлечением их в деятельность посредством промежуточных нейронов. Подбирая место раздражения, можно добиться исчезновения первой реакции при сохранении второй или наоборот. Можно полагать, что соответствующие точки указывают примерно на локализацию участвующих в реакции моторных и промежуточных нейронов.

Естественно, что микроэлектрод может быть также использован для определения таких характеристик возбудимости образований, возле которых он расположен, как хронаксия и аккомодация (Моцный, 1951), для измерения сопротивления и емкости различных участков ткани (например, Бызов, 1958), для поляризации их подпороговыми токами, приводящими к преимущественным кат- или анэлектротоническим изменениям, и т. д.

Несомненно, применение для раздражения очень тонких внеклеточных микроэлектродов, позволяющих оказывать максимально локализованные влияния, открывает перед такой методикой дополнительные возможности. В связи с этим следует указать хотя бы на такие работы, как детальное прослеживание точек в сером веществе спинного мозга, характеризующихся наиболее низкими порогами для вызова прямого ответа мотонейронов. Полученные точки оказываются расположенными по

определенным линиям, расходящимся от центров и определенно указывающим на локализацию сомы соответствующих нейронов и ход их дендритов (Остром, 1947) Дальнейшее усовершенствование такого строго локального раздражения дало возможность определять распределение в мозге центральных разветвлений различных афферентных волокон (по отведению от их периферических участков возникающих при таком раздражении антидромных импульсов), распределение окончаний различных нисходящих путей (на основании того же принципа отведения в вышележащих участках белого вещества антидромных импульсов) и т. д. Для решения этих задач было возможно использовать как монополярные, так и биполярные микроэлектроды, но и те и другие не должны были превышать по диаметру 10  $\mu$  (Уолл, Маккаллох и др., 1955/56). Посылая через такие электроды прямое раздражение в различные периоды развития в соответствующих структурах естественного нервного импульса, можно детально проследивать происходящие при этом изменения возбудимости. Это оказывается особенно важным для изучения деятельности окончаний афферентных волокон, поскольку они недоступны для внутриклеточного отведения, а точное знание особенностей их возбуждения крайне важно для понимания механизма синаптической передачи, посттетанической потенциации и других явлений (Уолл, Леттвин и др., 1956).

**б. Внутриклеточные микроэлектроды.** Пропускание электрического тока через микроэлектрод, находящийся внутри клетки, позволяет решать целый ряд очень важных физиологических задач. Оно может быть использовано для прямого раздражения клетки (при деполяризации) или, наоборот, ее торможения (при гиперполяризации). Наряду с этим открывается возможность точного измерения электрических характеристик поверхности клетки (ее сопротивления, емкости, постоянной времени). Большой интерес представляет искусственное изменение поляризации поверхности клетки в ту или другую сторону на определенную величину и наблюдение изменений, возникающих при этом в электрической активности (постсинаптических потенциалов и потенциалах действия). Измененный уровень потенциала покоя меняет электрохимические градиенты для различных ионов, меняет тем самым движение последних через поверхность клетки и может поэтому как количественно, так и качественно изменять электрическую активность клетки. Все это дает возможность судить о ионных процессах, лежащих в основе процессов возбуждения, торможения, секреции.

Казалось бы, что высокое собственное сопротивление стеклянных микроэлектродов должно быть определенным препятствием для использования их с целью раздражения. Но необходимо учитывать, что при внутриклеточном расположении одного из электродов пропускаемый через него ток полностью проходит через поверхность клетки. Если же оба электрода распо-

ложены вне клетки, то лишь незначительная часть тока проходит через поверхность и поэтому является эффективной; подавляющая его часть шунтируется через внеклеточную жидкость и с точки зрения раздражения оказывается бесполезной. Поэтому электроды даже с самым высоким сопротивлением (до 100 *Мом*) могут быть применены для внутриклеточного раздражения.

Самым простым методом внутриклеточного раздражения и одновременного отведения электрических реакций той же клетки является введение в нее двух микроэлектродов, через один из которых пропускается ток, а через второй — отводятся внутриклеточные потенциалы. К сожалению, такой метод возможен только на сравнительно крупных клетках, притом таких, на которых введение может контролироваться визуально. Введение двух электродов в одно волокно широко практикуется на поперечнополосатых мышечных волокнах, где его впервые применили Фатт и Кац (1951) для определения критической величины деполяризации поверхности клетки, необходимой для возникновения пикового потенциала. Пропускание выходящего тока через один микроэлектрод (положительный), находившийся на расстоянии 50  $\mu$  от другого, вызвало при достаточной силе тока снижение потенциала покоя, пропорциональное приложенному к электродам напряжению и распространявшееся электротонически до второго микроэлектрода. Когда оно достигало величины примерно 40 мВ, появлялась активная реакция — потенциал действия, — не зависящая уже от дальнейшего пропускания тока. Если расстояние между электродами увеличивать, то электротонические потенциалы постепенно ослабевают, и в конце концов регистрируется только потенциал действия. Таким образом можно изучать соотношение между электротоническими потенциалами и потенциалами действия в отдельных мышечных волокнах и, в частности, особенности движения максимальных и ослабленных рефрактерностью потенциалов действия (Костюк, 1959).

Введение двух микроэлектродов удается также и на гладких мышечных волокнах, где оно обнаруживает неспособность таких волокон проводить возбуждение на большое расстояние (Бюлбринг, Бернсток и Хольман, 1958), на сердечных мышечных волокнах (Вайдман, 1951) и на тонических волокнах в поперечнополосатых мышцах (Бюрк и Гинсбург, 1956).

Большие удобства для введения двух или даже нескольких микроэлектродов представляют нервные клетки беспозвоночных животных. Обычно для этого используются гигантские нейроны из узлов аплизии или виноградной улитки, где два электрода могут быть помещены под контролем микроскопа в различные участки сомы (Фессар и Ток, 1957). Нейроны гачглиев кальмара или рака, имеющие гигантские синапсы, могут быть использованы для введения микроэлектродов одновременно в преси-



наптическое волокно и в постсинаптическую клетку Пропускание тока через один из этих электродов и регистрация вторым электротонических потенциалов позволяет решить для данных синаптических связей исключительно важный теоретический вопрос о возможности или невозможности трансинаптической передачи электрических влияний (Хагивара и Тасаки, 1958; Фуршпан и Поттер, 1959).

При использовании двух внутриклеточных микроэлектродов для определения изменений сопротивления и емкости клеточной поверхности необходимо расположение их на достаточно близком расстоянии друг от друга, при котором вызванное под одним электродом изменение потенциала клеточной поверхности передается электротонически к другому электроду. Активное сопротивление измеряется при помощи пропускания через полярирующий электрод толчков постоянного тока и регистрации возникающих на поверхности клетки потенциалов. При прочих равных условиях величина возникающей на поверхности клетки разности потенциалов будет пропорциональной ее сопротивлению. Таким образом можно измерять сопротивление в различные периоды развития потенциала действия (Фатт и Кац, 1951; Вайдман, 1951) и потенциала концевой пластинки (Кастильо и Кац, 1954). По величине пропускаемого тока и возникающей разности потенциалов может быть рассчитана абсолютная величина сопротивления клетки, однако перерасчет его на единицу поверхности, в особенности для волокон, представляет определенные трудности и требует ряда допущений. Ведь частично падение потенциала происходит на внутреннем сопротивлении клетки (сопротивление протоплазмы); у длинного волокна полярирующий ток несомненно не проходит равномерно через всю поверхность клетки. Принцип расчета строится на теории распространения потенциалов в кабеле, определяющей зависимость между потенциалом в одной точке (под одним электродом), величиной поляризующего тока во второй, продольным сопротивлением оси кабеля (в данном случае внутренним сопротивлением волокна) и поперечным сопротивлением оболочки (клеточной мембраны), см. Ходжкин и Рэштон (1946). Величина удельного сопротивления протоплазмы примерно известна; диаметр волокна может быть определен на основе микроскопических измерений, как и расстояние между электродами. Все это дает необходимые данные для расчета продольного сопротивления. Соответственно дальше может быть рассчитано и поперечное сопротивление клеточной поверхности, величина которого оказывается значительно выше внутреннего сопротивления клетки. Поэтому последним обычно пренебрегают и говорят лишь о сопротивлении клеточной поверхности. (Подробнее о методе определения величины сопротивления клеточной поверхности при помощи двух микроэлектродов см. Фатт и Кац, 1951).

Тот же принцип применяется при определении двумя микроэлектродами постоянной времени и емкости клеточной поверхности. Постоянная времени измеряется по скорости, с которой спадает изменение потенциала, вызванное поляризующим током, после выключения последнего (как это уже использовалось для определения постоянной времени входного каскада, см. раздел III, а). Нередко на практике за постоянную времени берут время полуспада, а не спада, на 63% первоначальной величины (до величины  $1/e$ ). Чем больше расстояние между электродами, тем эта скорость будет меньше, поэтому лучше всего проводить измерение при минимальном расстоянии между электродами. Если же между электродами имеется определенное расстояние, то возможно погружение отводящего микроэлектрода дважды, на различном расстоянии от поляризующего электрода, и сравнение полученных постоянных времени для определения того, насколько они увеличиваются при удалении от места поляризации.

Зная величину сопротивления поверхности клетки  $R$  и ее постоянную времени  $\tau$ , можно определить емкость клеточной поверхности, поскольку  $\tau = RC$ .

При введении двух электродов в меньшие по размеру образования (например, сому нейрона), которые можно представить как шар, приведенные измерения несколько упрощаются, поскольку в этих случаях можно считать, что пропускаемый ток вызывает равномерные поляризационные изменения на всей клеточной поверхности. Расчет сопротивления может идти прямо на всю величину клеточной поверхности, а определение постоянной времени не требует перерасчета на расстояние от места поляризации. Соответственно и рассчитанная емкость оточится ко всей клеточной мембране.

Другой возможностью определения емкости клеточной мембраны при помощи внутриклеточных микроэлектродов является применение поляризации переменным током (Тасаки и Хагивара, 1957; Хагивара и Саито, 1959). Сила тока поддерживается постоянной при изменении его частоты; при этом величина возникающей на поверхности клетки разности потенциалов оказывается обратно пропорциональной частоте. По наклону линии отношения между изменением потенциала и частотой может быть высчитана емкость. Конечно, такой метод может быть использован только при поляризации клетки подпороговыми токами, так как возникновение возбуждения резко изменяет электрические характеристики клеточной поверхности, и указанная линейная зависимость исчезает.

В самое последнее время оказалось возможным использовать два внутриклеточных микроэлектрода и для определения электрических токов, текущих через поверхность клетки при возникновении в ней активного процесса — возбуждения. Такая методика была в свое время разработана Годжкиным и Хаксли

(1952) и получила название «фиксации напряжения» (voltage clamp). Сущность ее заключается в применении особого усилителя с обратной связью, который через специальный («компенсационный») внутриклеточный электрод поддерживает разность потенциалов на поверхности клетки на постоянном, заранее заданном уровне посредством компенсации возникающих трансмембранных токов токами противоположного направле-

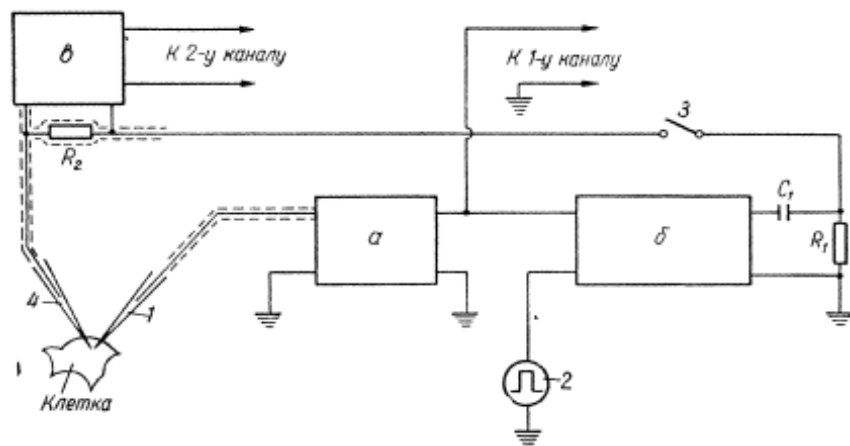


Рис. 29. Схема «фиксации напряжения» по Хагивара и Саито (1959):

1 — отводящий микроэлектрод; 2 — генератор прямоугольных импульсов, служащих для компенсации изменений мембранного потенциала,  $R_1$  — 40 Мом,  $R_2$  — 5 Мом,  $C$  — 4 мкф; а — входной каскад; б — симметричный усилитель, в — симметричный катодный повторитель

ния. Компенсирующие токи регистрируются специальной системой, и на их основании определяются собственно трансмембранные токи. Второй микроэлектрод «управляет» всей этой системой, отводя разность потенциалов клеточной поверхности. По схеме (рис 29) импульсы от генератора прямоугольных импульсов подаются на одно плечо симметричного усилителя с частотной характеристикой от 0,1 гц до 40 кгц, в котором происходит изменение их амплитуды в зависимости от подаваемого на второе плечо входного сигнала от входного каскада. Импульсный ток с выхода усилителя через цепочку  $R_1$  и  $C$  и ключ (3) подается на компенсационный микроэлектрод (4). Сила тока, необходимая для компенсации изменения мембранного потенциала, измеряется по падению напряжения на сопротивлении  $R_2$ , снимаемому симметричным катодным повторителем.

До сих пор указанная методика могла быть использована лишь на гигантских аксонах, позволяющих введение внутрь весьма грубых электродов. Разработка способов использования для этой цели обычных внутриклеточных микроэлектродов (Такеучи и Такеучи, 1958; Хагивара и Саито, 1959) дала возможность прямого определения направления токов через клеточную по-



верхность при локальных синаптических процессах возбуждения в концевых пластинках мышечных волокон и нервных клетках беспозвоночных животных, а также при потенциалах действия в нейронах ганглиев рыб. Однако нужно учитывать, что осуществление этого метода упирается в первую очередь в изготовление электродов, которые имели бы достаточно тонкий кончик и не повреждали клетку и в то же время пропускали ток порядка  $10^{-6}$  а, необходимый для компенсации трансмембранных токов (обычно для раздражения через внутриклеточный микроэлектрод нужен ток порядка  $10^{-8}$ — $10^{-9}$  а). По данным авторов, такие электроды могут быть получены лишь путем длительного отбора их из большого количества обычных микроэлектродов.

Введение двух микроэлектродов в одну клетку дает хорошую возможность для изучения течения электрических реакций клетки при различных уровнях ее потенциала покоя. Такое изучение широко практикуется в отношении потенциалов концевой пластинки в поперечнополосатых мышечных волокнах. Установление пропорциональности между величиной потенциала концевой пластинки и величиной потенциала покоя, сохраняющейся в широком пределе (Фатт и Кац, 1951), позволяет, например, заключить, что физико-химическим механизмом первого является неспецифическое повышение проницаемости клеточной поверхности к различным ионам. Если бы потенциал концевой пластинки создавался за счет движения через мембрану пластинки только иона натрия, то он должен был бы значительно меньше зависеть от величины потенциала покоя и сходить к нулю только при создании на поверхности клетки такой разности потенциалов, которая компенсирует именно электрохимический градиент ионов натрия. Такие же исследования при помощи двух микроэлектродов оказались возможными также для тонических мышечных волокон в составе скелетной мышцы (Бюрк и Гинсборг, 1956).

Источником раздражающего или поляризующего напряжения может быть батарея или генератор прямоугольных импульсов, в качестве второго электрода используется обычно такой же электрод, как и при отведении потенциалов. Следует учитывать, что окружающие клетку ткани или жидкости являются в значительной мере общим сопротивлением для раздражающей и поляризующей цепей, на котором происходит некоторое дополнительное падение раздражающего напряжения, отводимое регистрирующей цепью. Хотя это сопротивление, учитывая большой объем внеклеточной среды, обычно незначительно и мало сказывается на результатах, все же при проведении точных измерений постоянных клеточных потенциалов при поляризации желательно второй электрод располагать по возможности ближе к отводимым образованиям и не делать его общим с относительным отводящим электродом. Необходимость отдельных

внеклеточных электродов диктуется еще и тем, что в цепь наружного поляризующего электрода обычно включается прибор для регистрации пропускаемого через электроды тока.

Поляризующая цепь не должна также создавать возможности для саморазряда той разности потенциалов, которая имеется на клеточной поверхности. Если ввести в клетку микроэлектрод и соединить его накоротко (или через источник питания с низким внутренним сопротивлением) с наружным электродом, то при сопротивлении микроэлектрода в  $10 \text{ Мом}$  и потенциале покоя  $70 \text{ мв}$  в цепи должен возникнуть ток  $7 \cdot 10^{-9} \text{ а}$ , который

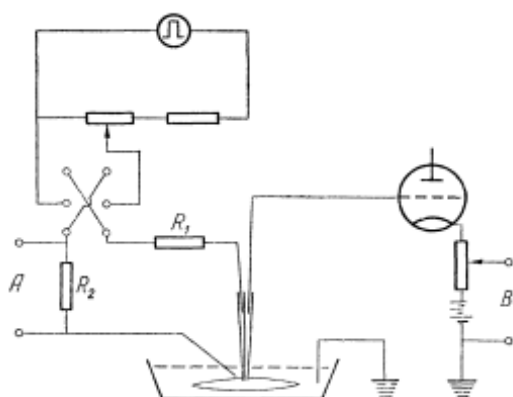


Рис 30 Схема раздражающей и отводящей цепей при введении в клетку одновременно двух микроэлектродов (или одного двухканального микроэлектрода) для одновременного раздражения и отведения потенциалов.

Измерение поляризующего тока производится по снятию разности потенциалов на сопротивлении  $R_2$ , усиливаемой далее усилителем постоянного тока  $A$  и регистрируемой вторым лучом осциллографа.  $B$  — усилитель постоянного тока регистрации внутриклеточных потенциалов

сам по себе относится к пороговым токам и несомненно будет вызывать значительные катэлектротонические изменения в клетке. Поэтому в раздражающую цепь необходимо включение сопротивления хотя бы  $100 \text{ Мом}$ , позволяющего уменьшить этот ток до величин порядка  $10^{-10} \text{ а}$  ( $R_1$  на схеме, рис. 30).

Поскольку внутриклеточное отведение почти всегда является монофазным, а относительный отводящий электрод заземляется, то раздражающая цепь не может быть заземлена. Заземление ее в цепи наружного электрода делает невозможным работу калибратора в отводящей цепи и измерение тока в раздражающей, а заземление в плече внутриклеточного электрода делает невозможным и само раздражение (рис. 30). При использовании в качестве источника поляризующего тока батарей эта трудность преодолевается просто. Однако генераторы

прямоугольных импульсов всегда имеют заземленный или во всяком случае низкоомный по отношению к земле выход. В некоторых случаях конструируются специальные стимуляторы с батарейным питанием, которые не заземляются. Более удобным является включение на выходе обычного стимулятора устройств, исключающих связь раздражающих электродов с землей. Это может быть трансформатор, но он искажает прямоугольные импульсы и поэтому не подходит для целей поляризации. Значительно удобнее изолирующие устройства с радиочастотной связью, позволяющие передавать импульсы любой формы и длительности. Все они построены по принципу создания маленьких высокочастотных генераторов, частота которых модулируется сигналом с выхода стимулятора (последний служит анодным напряжением для лампы генератора). Колебания воспринимаются контуром, соединенным с раздражающими электродами, и дегактируются полупроводниковыми диодами. Описание таких устройств опубликованы рядом авторов (Шмидт и Дуббарт, 1949; Хаапанен, Хид и Скоглунд, 1953; Костюк, 1959; Остерман, 1959). Они выполняются в виде миниатюрных блоков, размещаемых непосредственно возле объекта и соединяемых со стимулятором кабелем. В раздражающей цепи должно быть предусмотрено устройство для переключения направления тока.

Для того, чтобы раздражающий ток был эффективным, он должен иметь определенную силу:  $10^{-9}$ — $10^{-8}$  а. Применение более сильных токов для раздражения нецелесообразно, поскольку они будут вызывать значительный побочный эффект (выведение большого количества ионов из электрода в клетку и др.). Для измерения таких токов наиболее удобным является осциллографический метод, особенно при наличии двухлучевого осциллографа. В раздражающую цепь включается сопротивление (лучше несколько мегом), падение напряжения на котором подается на вход второго усилителя постоянного тока и регистрируется по отклонению луча осциллографа ( $R_2$  на схеме, рис. 30). Величина проходящего через сопротивление тока рассчитывается по закону Ома. Отклонения луча (при постоянном коэффициенте усиления усилителя) могут быть заранее прокалиброваны в единицах тока; они регистрируются на один кадр вместе с отводимыми вторым внутриклеточным микроэлектродом клеточными потенциалами. Если второго луча нет, то могут быть использованы и другие приборы, например зеркальный гальванометр.

Поскольку при внутриклеточном положении поляризующего микроэлектрода весь пропускаемый ток проходит через клеточную поверхность и вызывает на ней падение потенциала, то соотношение между силой тока и изменением потенциала покоя должно быть прямо пропорциональным и определяться только сопротивлением клеточной поверхности (при условии примене-



ния подпороговых поляризующих токов, не вызывающих активного состояния клетки, связанного со значительными изменениями этого сопротивления). Возможен очень наглядный способ определения зависимости между силой поляризующего тока и изменением потенциала покоя: при выключенном генераторе развертки сила тока (снимаемая как падение напряжения на указанном выше сопротивлении в раздражающей цепи) подается через горизонтальный усилитель постоянного тока на горизонтальные пластины осциллографической трубки, а потенциал покоя — через вертикальный усилитель на вертикальные пластины. При пропускании тока различной силы на экране возникает готовая кривая зависимости изменения потенциала покоя от силы тока (Фуршпан и Поттер, 1959). Такой метод особенно удобен для изучения выпрямляющих свойств клеточной поверхности.

Основным преимуществом отдельного введения двух микроэлектродов в клетку является незначительное взаимодействие раздражающей и отводящей цепей. Отводимые из клетки электрические изменения, вызванные пропусканием тока, могут быть практически без всякой коррекции отнесены к структурам псследованной. Но такой метод имеет и свои недостатки. Даже в крупные, хорошо видимые под микроскопом объекты введение двух микроэлектродов — довольно кропотливая работа. Особенно трудно это сделать в случае, когда объект подвижен (например, мышечное волокно при надпороговом раздражении). Наш собственный опыт показывает, что при этом для получения одного успешного отведения необходимо огромное количество проб; ведь возможность и без того постоянно имеющих место повреждений клетки или выскакивания из нее электрода значительно возрастает. Несколько облегчает указанную задачу введение микроэлектродов не отдельно, а одновременно. В специальном штативе предварительно закрепляются оба электрода; при помощи имеющихся в нем подающих винтов их кончики устанавливаются под микроскопом в одной плоскости и на одном уровне на желаемом расстоянии друг от друга. Затем плоскость, в которой установлены микроэлектроды, ориентируется строго параллельно ходу мышечных волокон, и весь штатив при помощи микроманипулятора постепенно опускается до проникновения микроэлектродов в желаемое волокно.

В целый ряд клеток, которые малы по размерам или незвидимы под микроскопом, два микроэлектрода вообще ввести не удастся. Поэтому разработаны методы поляризации клетки и отведения ее потенциалов через один и тот же внутриклеточный микроэлектрод. Этот микроэлектрод делается либо двухканальным (с двумя отверстиями на одном кончике), либо включается в специальную схему, исключающую попадание поляризующего тока в систему отведения.

Двухканальные микроэлектроды были применены впервые Кумс, Экклс и Фатт (1955) для одновременного раздражения и отведения потенциалов отдельных мотонейронов спинного мозга, а затем нашли себе применение при изучении деятельности

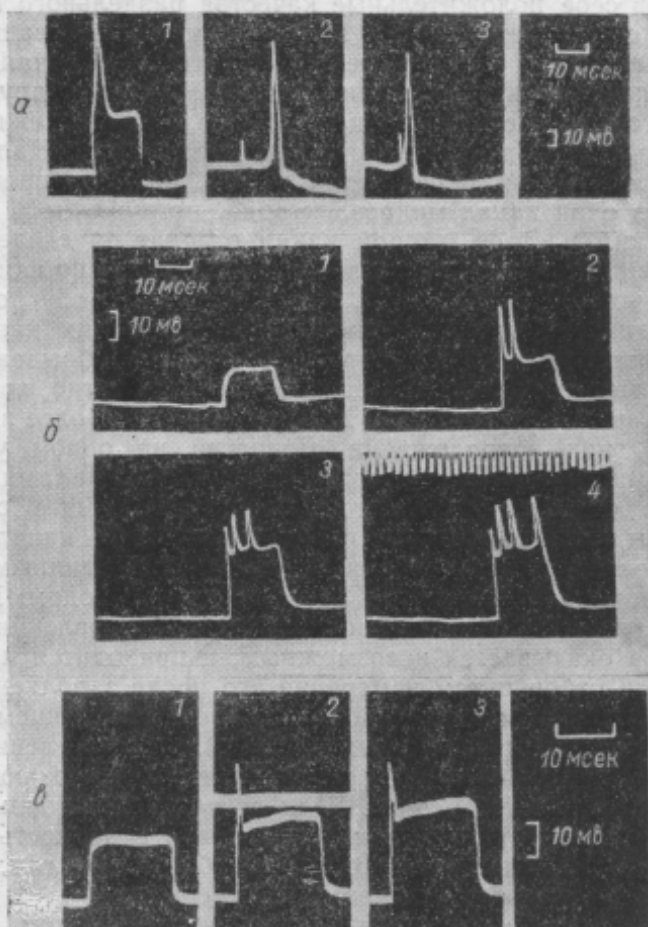


Рис. 31. Примеры прямого раздражения различных клеточных образований спинного мозга кошки через двухканальный внутриклеточный микроэлектрод:

*а* — мотонейрон (осц. 1 — прямое раздражение, осц. 2 — ортодромное синаптическое, осц. 3 — антидромное); *б* — промежуточный нейрон (осц. 1—4 — прямое раздражение возрастающей силы); *в* — афферентное волокно (прямое раздражение возрастающей силы).

секреторных клеток (Лундберг, 1958), сердечных мышечных волокон (Джонсон, Робертсон и Тилле, 1958), поперечнополосатых мышечных волокон и промежуточных нейронов спинного мозга (Костюк и Шаповалов, 1960 а, б). На рис. 31 показан

пример из последней работы, иллюстрирующий возможность прямого раздражения через двухканальный микроэлектрод различных клеточных образований спинного мозга.

Двухканальные микроэлектроды, казалось бы, должны совмещать в себе положительные качества раздельного погружения двух микроэлектродов и простоту манипулирования с одним. Однако дело обстоит не так просто. Оба канала оказываются в значительной степени связанными друг с другом. Эта связь обуславливается наличием общего сопротивления в кончике микроэлектрода и емкости между каналами. Наличие общего сопротивления проявляется в том, что при пропускании тока через один канал микроэлектрода, погруженного просто в рингеровский раствор, второй канал отводит определенное падение потенциала, которое оказывается чрезвычайно изменчивым у различных микроэлектродов. Эта изменчивость обуславливается, по-видимому, особенностями окончания обоих каналов на верхушке электрода; в некоторых случаях они обрываются так, что связь между ними менее значительна (вероятно, когда один кончается несколько выше другого), в других — более выражена (вероятно, при расположении отверстий на одном уровне и особенно при обрыве перегородки между каналами раньше наружной стенки). Ясно, что чем больше общее сопротивление, тем большая часть отводимой вторым каналом разности потенциалов оказывается связанной не с истинным изменением клеточной поляризации, а с самым электродом. Предсказать величину общего сопротивления при изготовлении микроэлектродов оказывается невозможным, и приходится проводить длительный отбор путем измерения его после заполнения электрода электролитом. При отборе электродов по общему сопротивлению возможен следующий критерий. Сопротивление между внутренней средой, например мотонейрона, и окружающей средой составляет около 1 *Мом*. Если считать достаточным определение измерений клеточных потенциалов с точностью  $\pm 5\%$ , то общее сопротивление не может быть больше 50 *ком*; чем оно будет меньше, тем точнее окажется измерение.

Вместе с тем наименьшим общим сопротивлением, как оказывается, обладают электроды с большим диаметром кончика; электроды с диаметром около 0,5  $\mu$  всегда имеют высокое общее сопротивление. Поэтому применение электродов, отобранных на минимальное общее сопротивление, оказывается возможным только для клеток большого размера, как, например, двигательные нейроны. Применение двухканальных микроэлектродов для таких объектов, как промежуточные нейроны, требует отбора в первую очередь по диаметру кончика и заставляет мириться с общим сопротивлением. В таких случаях нельзя по отводимому потенциалу непосредственно судить об истинных изменениях поляризации клеточной поверхности, вызываемых поляризующим током (Джонсон, Робертсон и Тилли, 1957; Кос-



тук и Шаповалов, 1960б) Можно учитывать лишь силу поляризующего тока, которая пропорциональна возникающей разности потенциалов Последнюю можно примерно рассчитать на основании данных о сопротивлении клеточной поверхности

Возможен следующий метод учета общего сопротивления. Один и тот же ток пропускается через канал поляризации при положении микроэлектрода непосредственно возле поверхности клетки и внутри нее Поскольку при втором положении сопротивление цепи увеличивается на сопротивление клеточной поверхности, то отводимая разность потенциалов окажется большей, разница между ее величиной при втором и первом отведении должна соответствовать падению потенциала на клеточной поверхности Этот метод основывается на предположении, что общее сопротивление микроэлектрода не меняется при проколе клетки, однако полной уверенности в этом нет

Наконец, указание на величину общего сопротивления в электроде и сопротивления поверхности клетки дает следующий косвенный метод При отведении из клетки регистрируются изменения разности потенциалов, вызываемые поляризующим током различной силы, на фоне неактивного состояния клетки Далее регистрируются вызываемые теми же силами тока изменения величины потенциалов действия Строятся линии зависимости потенциалов от силы тока для обоих случаев, наклон которых по закону Ома определяется величиной сопротивления, на котором происходит падение напряжения Наклон линии напряжение — сила тока для потенциалов действия оказывается значительно меньшим, что связано с тем, что в активном состоянии сопротивление клеточной поверхности ничтожно и составляет всего около 5% ее сопротивления в состоянии покоя, следовательно, высчитанное из ее наклона сопротивление главным образом отражает общее сопротивление в электроде Величина сопротивления, полученная из наклона линии для неактивного состояния, минус величина общего сопротивления в электроде составит величину сопротивления клеточной поверхности в покое (Кумс, Кертис и Экклс, 1957 б)

Все эти сложные методы важны только при необходимости точного измерения возникающих при поляризации изменений постоянной электрической поляризации клетки Если же речь идет лишь об отведении быстрых колебаний, то в них нет необходимости

Второй недостаток двухканальных микроэлектродов — емкостная связь между каналами — приводит к появлению артефактов в момент замыкания или размыкания поляризующего тока Величина этой емкости составляет около 20 пф, и возникающее при ее заряде или разряде колебание делает невозможным определение изменений, развивающихся в клетке в первые несколько миллисекунд после замыкания или размыкания поляризующего тока Если речь идет о регистрации результатов

длительной поляризации, то такие кратковременные эффекты совершенно не сказываются, и нет никакой необходимости в применении специальных мер для их устранения (Костюк и Шаповалов, 1960а). Однако в случае необходимости изучения кратковременных процессов, например механизма генерации потенциала действия при прямом раздражении, емкостные артефакты оказываются очень неудобными. Поэтому предложены устройства для их компенсации (Кумс, Кертис и Экклс, 1957а; (Кумс, Кертис и Экклс, 1959, схема). Принцип этой схемы заключается в применении балансного катодного повторителя, одно плечо которого соединяется с микроэлектродом, а второе — с эквивалентной схемой, представляющей имеющиеся в микроэлектроте паразитные емкости и сопротивления. Стимул подается симметрично как на микроэлектрод, так и на эквивалентную схему. Регулировкой емкостей и сопротивлений в этой схеме можно добиться того, что оба плеча оказываются совершенно симметричными, и возникающие емкостные артефакты полностью компенсируются. Конечно, такая регулировка, включающая в себя подбор четырех переменных емкостей и четырех переменных сопротивлений, является очень сложным делом и может применяться, очевидно, только в случае крайней необходимости. Для облегчения регулировки авторы предлагают в начале опыта включать вместо микроэлектрода и клетки эквивалентную схему, учитывающую емкость, сопротивление и потенциал клеточной поверхности, общее сопротивление и сопротивления отдельных каналов микроэлектрода.

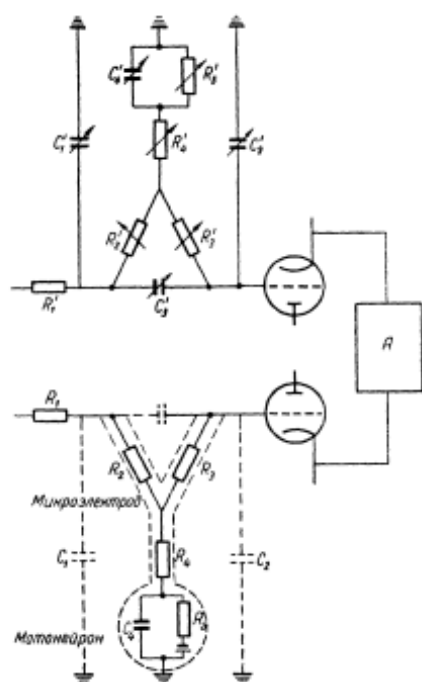


Рис. 32. Схема компенсационной цепи, предложенная Кумс и др. (1959), для устранения емкостных артефактов при использовании двухканальных внутриклеточных микроэлектродов. Нижнее плечо — эквивалентная схема отводящей и раздражающей цепей, верхнее плечо — компенсационная цепь:

$R_1$  — сопротивление в поляризирующей цепи (100 Мом);  $R_2R_3$  — сопротивление каналов микроэлектрода (10 Мом);  $R_4$  — общее сопротивление в микроэлектроте (50 ком);  $R_5$  — сопротивление мембраны клетки (1 Мом);  $C_1, C_2$  — паразитные емкости входа и поляризирующей цепи (5 пф);  $C_3$  — паразитная емкость между каналами (20 пф),  $C_4$  — емкость мембраны клетки (2500 пф);  $A$  — симметричный усилитель. (В компенсационной цепи величины сопротивлений и емкостей подбираются в соответствии с указанным выше величинами).

трода и клетки эквивалентную схему, учитывающую емкость, сопротивление и потенциал клеточной поверхности, общее сопротивление и сопротивления отдельных каналов микроэлектрода.

На рис. 32 приведена эквивалентная схема двойного микроэлектрода с клеткой, а также схема компенсационной установки.

Использование двойного микроэлектрода, как и введение двух электродов на очень близком расстоянии друг от друга, упрощает теоретические расчеты при определении электрических характеристик тех клеток, которые можно рассматривать как сферические. Постоянная времени определяется по времени спада потенциала при выключении поляризующего тока до величины  $1/e$ ; экспериментально измеренная по одному из указанных выше методов величина сопротивления пересчитывается на единицу поверхности клетки (для мотонейрона, например, последняя принимается равной  $5 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2$ ). Исходя из постоянной времени и сопротивления, может быть рассчитана величина емкости на единицу поверхности. (Подробнее об этом см. Э к к л с, 1957, стр. 11 — 29).

Сложность изготовления двухканальных микроэлектродов, которые имели бы достаточно тонкий кончик и в то же время удовлетворительные электрические характеристики, заставляет в ряде случаев применять одноканальные микроэлектроды одновременно для отведения потенциалов и раздражения клетки. Все предложенные для этого методы основываются на одном принципе и отличаются друг от друга только деталями. Микроэлектрод и клетка включаются в одно плечо мостовой схемы, на противоположные точки которой подается поляризующее или раздражающее напряжение. Вход усилителя (катодный поглотитель) используется как нуль-инструмент и включается на другие две противоположные точки моста. Мост балансируется таким образом, что поляризующее напряжение не дает разности потенциалов в точках включения входа усилителя и поэтому не мешает регистрации отводимых из клетки потенциалов; в то же время поляризующий ток может течь через микроэлектрод и клетку. Описания соответствующих схем можно найти у Араки и Отани (1955), Френка и Фюортса (1956), Ито (1957), Кокетсу и Ниши (1957). На рис. 33 для иллюстрации приведена схема Френка и Фюортса в модификации, позволяющей при помощи второго усилителя постоянного тока регистрировать ток, текущий через микроэлектрод при поляризации (по падению потенциала на сопротивлении  $R_3$ ). Компенсация моста производится подбором сопротивлений  $R_1$  и  $R_2$  до такого положения, пока включение поляризующего тока от стимулятора ( $\theta$ ) между точками 1 и 3 не перестанет вызывать отклонение луча осциллографа, что свидетельствует о равенстве потенциалов в точках 2 и 4.

При раздражении через один и тот же электрод (как и через двухканальный) для раздражающей цепи необходимо соблюдать все те же условия, что и при применении других методов внутриклеточного раздражения. Как видно из приведенной вы-



ше схемы, последовательно с микроэлектродом включается большое сопротивление ( $R_3$  от 50 до 100 Мом); кроме того, предусматривается включение определенного напряжения от компенсатора (б) навстречу напряжению, создаваемому клеткой. Регулировкой компенсатора можно полностью скомпенсировать потенциал покоя клетки и таким образом устранить всякую возможность тока между наружной и внутренней стороной клеточной поверхности через раздражающую цепь. Стимулятор дол-

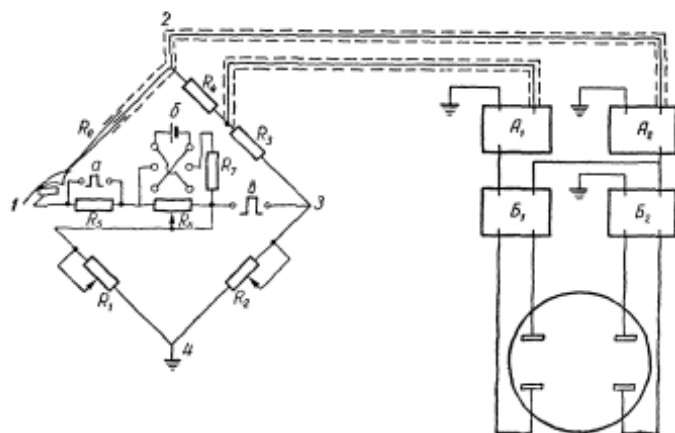


Рис. 33. Схема для одновременного раздражения клетки и отведения ее электрических потенциалов через один и тот же внутриклеточный микроэлектрод (Френк и Фюрте):  $R_1$ —1 ком,  $R_2$ —10 ком,  $R_3$ —44 Мом,  $R_4$ —5Мом,  $R_5$ ,  $R_6$ —100 ом,  $R_7$ —подбирается; а—калибратор; б—компенсатор; в—стимулятор;  $A_1$  и  $A_2$ —входные каскады;  $B_1$  и  $B_2$ —усилители.

жен быть включен в цепь через изолирующее устройство, лучше всего на радиочастотной связи.

Конечно, применение одного и того же электрода для раздражения и отведения исключает возможность прямого измерения изменений электрической поляризации клетки, вызываемых поляризующим током. Измеряться могут только сила последнего и активные электрические реакции, возникающие в клетке. При желании установить величину поляризации, созданной на клеточной поверхности проходящим током, необходимо пользоваться косвенными методами, высчитывая ее по силе тока и сопротивлению клеточной поверхности. Для определения величины потенциала действия или постсинаптического потенциала. Путем многократных измерений строится кривая зависимости величины потенциала действия или синаптического потенциала от силы поляризующего тока и по ее наклону высчитывается сопротивление клеточной мембраны в период развития распространяющегося или локального процесса возбужде-

ния. Используя данные о 95%-ном уменьшении сопротивления клеточной поверхности при развитии процесса возбуждения, выводится величина сопротивления клеточной поверхности в спокойном состоянии и уже из нее — разность потенциалов, которая создается на ней поляризующим током. Конечно, получаемые величины вряд ли можно считать особенно точными.

Существенные трудности представляет регулировка мостовой схемы, которую нередко приходится проводить не только в начале, но и во время дальнейшего погружения микроэлектрода, поскольку сопротивление его во время погружения нередко изменяется и мост разбалансируется. Применение такой схемы в нашей лаборатории показало большую сложность работы с ней и, очевидно, рациональнее тем, где возможно использовать не требующие такой регулировки двухканальные микроэлектроды, даже если они имеют значительное общее сопротивление.

Мостовые схемы не устраняют емкостных артефактов при включении и выключении поляризующего тока, возникающих в этом случае за счет емкостной связи между электродом и землей, и если важно их устранение, то необходима дополнительная компенсация по такому же принципу, как и при использовании двухканальных микроэлектродов (Кумс, Кертис и Экклс, 1959).

Несмотря на все трудности, возникающие при применении для раздражения двух- и одноканальных внутриклеточных микроэлектродов, их применение раскрыло огромные перспективы в изучении клеточных механизмов, в первую очередь механизмов деятельности центральной нервной системы, где введение двух электродов в одну клетку не может быть осуществлено. Вся сложность регулировки и расчетов вполне окупается возможностью прямого определения основных свойств нервной клетки, находящейся в естественном положении и в различных активных состояниях. Особенно следует подчеркнуть большое значение этих методик для определения связи различных форм электрической активности клетки с движением определенных ионов через клеточную поверхность, что можно сделать двумя микроэлектродами на концевой пластинке мышечного волокна (см. выше). Такими методами можно менять величину и даже извращать знак возбудительных и тормозных постсинаптических потенциалов, возникающих в нервной клетке. Между тормозными (гиперполяризационными) и возбудительными (деполяризационными) постсинаптическими потенциалами оказывается разительное различие. Первые увеличиваются по амплитуде при снижении потенциала покоя, а при увеличении последнего уменьшаются и переходят в деполяризационные (Кумс, Экклс и Фатт, 1955б). Вторые же, наоборот, ослабевают при снижении потенциала покоя и переходят в противоположные по знаку изменения только при перезаряде поверхности клетки

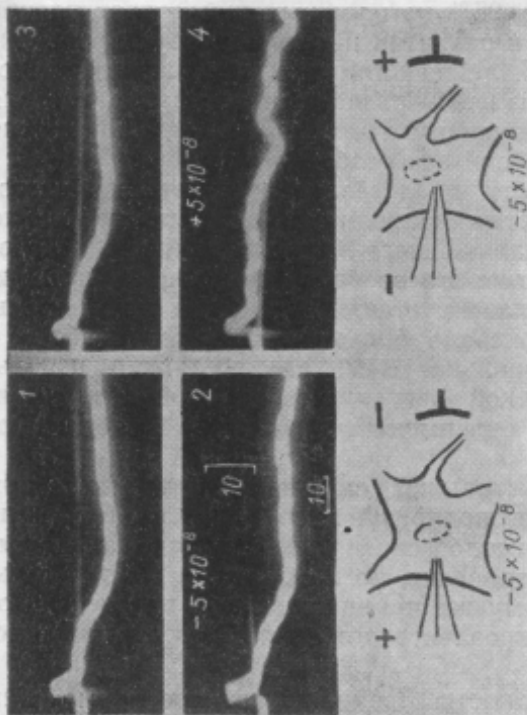
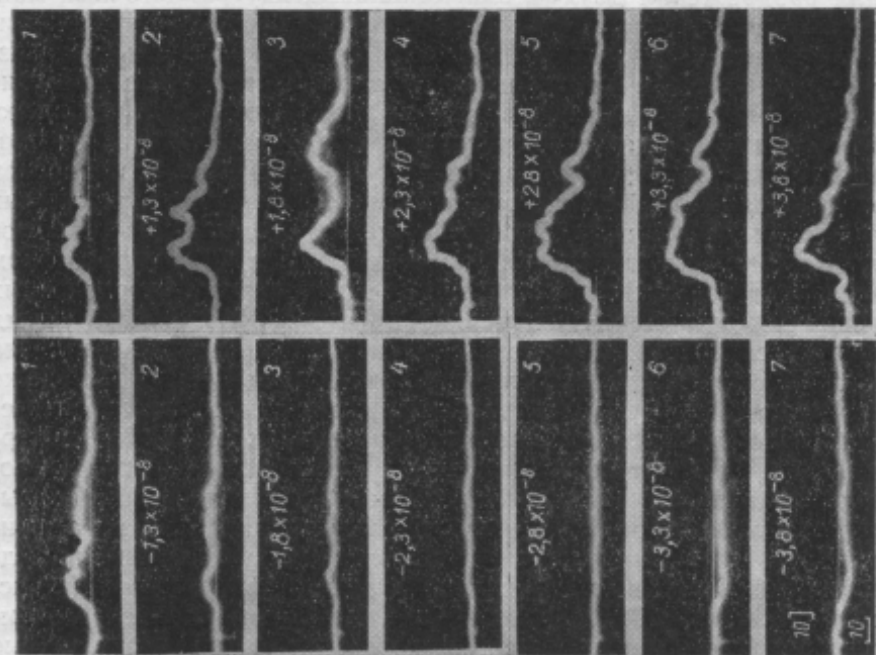


Рис. 34: *а* — пример изменений возбудительного постсинаптического потенциала двигательного нейрона при деполаризации (слева) и гиперполяризации (справа) его клеточной поверхности; *б* — пример изменения при тех же условиях тормозного постсинаптического потенциала. (Сила поляризирующего тока указана под осциллограммами, направление тока — на схеме).



разностью потенциалов противоположного направления (Кумс, Экклс и Фатт, 1955в) Таким образом, устанавливается существенное различие в синаптических механизмах создания возбуждательных и тормозных процессов в нервных клетках, это различие полностью сохраняется и при исследовании других видов тормозных и возбуждательных процессов в центральной нервной системе позвоночных, а также и в червях и в червях клетках беспозвоночных животных. Для примера на рис. 34 приведены полученные в нашей лаборатории изменения тормозных и возбуждательных полисинаптических постсинаптических потенциалов, возникающих при обычном реципрокном торможении и возбуждении (Костюк и Семенютин) Поляризация клетки вызывалась через двухканальный микроэлектрод (ее сила и направление показаны на осциллограммах).

Зная примерно концентрации различных ионов внутри клетки и в ее наружной среде, можно высчитать электрохимические градиенты для этих ионов Если один из них совпадает с тем потенциалом, при котором происходит извращение знака соответствующего постсинаптического потенциала, то есть все основания заключить, что последний вызывается именно движением этого иона через поверхность клетки вдоль своего электрохимического градиента; создаваемый искусственно потенциал на поверхности, превышающий электрохимический потенциал, заставляет тот же ион двигаться в противоположном направлении и вызывать противоположные по знаку постсинаптические потенциалы Таким образом, например, было установлено, что тормозной постсинаптический потенциал, в отличие от возбуждательного, связан с повышением проницаемости не ко всем ионам, а только к ионам с небольшим диаметром (ионы калия и хлора).

## **VII. ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ МИКРОИНЪЕКЦИЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ pH**

**а. Микроинъекции.** Кроме основной функции— отведения электрических потенциалов и электрического раздражения,— микроэлектроды (стеклянные) могут быть использованы и для одновременного разрешения другой важной задачи — непосредственного подведения к отводимой клетке или введения внутрь ее различных химических веществ. Сочетание прямого химического воздействия на отдельную клетку с непосредственным отведением ее биоэлектрической активности открывает большие возможности при решении таких задач, как выяснение механизма синаптической передачи, ионных механизмов процессов возбуждения и торможения, а также при решении ряда фармакологических и токсикологических вопросов

Для микроинъекций применяются те же стеклянные микропипетки, которые используются для вне- и внутриклеточного

отведения; они заполняются желаемым веществом. Микропипетка в одних случаях может быть использована самостоятельно, лишь для инъекций, и отведение проводится при помощи второго микроэлектрода с обычным наполнителем. В других же случаях (если наполняющее вещество является электролитом) один и тот же микроэлектрод может одновременно использоваться как для микроинъекций, так и для одновременного отведения потенциалов.

Заполнение микроэлектродов для последующей инъекции может производиться различными методами, которые уже описывались в разделе I, б.

Поскольку диаметр отверстия микроэлектрода (особенно при введении его внутрь клетки) должен быть очень незначительным, в связи с чем выход заполняющего вещества очень затруднен, обычно применяется заполнение микроэлектродов необходимым веществом как можно более высокой концентрации. Ацетилхолин применяется в концентрациях от 0,5 до 3,3 М (Кастильо и Кац, 1955а), различные соли калия, натрия и других металлов при необходимости введения соответствующих ионов — в концентрациях, близких к насыщенным (Кумс, Эклс и Фатт, 1955а), тетраэтиламмоний — до 10 М (Кокетсу, Церф и Ниши, 1959). Очень важно применять как можно более высокие концентрации растворов-наполнителей в тех случаях, когда микроэлектроды употребляются одновременно для инъекции и отведения потенциалов. Это позволяет по возможности снизить сопротивление таких электродов (поскольку, особенно при употреблении плохо диссоциирующих соединений, оно может оказаться очень высоким и тем самым серьезно затруднить отведение быстрых колебаний потенциалов).

При внеклеточной аппликации вещества кончик электрода-инъектора лишь подводится к поверхности клетки; естественно, в таких случаях необходим второй внутриклеточный электрод для регистрации клеточных эффектов. Особенно часто и успешно внеклеточная микроаппликация производится в области концевых пластинок мышечных волокон для изучения влияния различных агентов, в частности ацетилхолина, на синаптическую передачу. Предложенный Настуком (1953), этот метод был затем детально разработан Кастильо и Кацом (1955а). Он основывается на выведении положительных ионов ацетилхолина из микропипетки при помощи пропускания через нее постоянного электрического тока соответствующего направления. Благодаря тому, что ацетилхолин вызывает деполяризацию клеточной поверхности лишь в области концевой пластинки, этот метод оказался более удобным способом поисков мест расположения концевых пластинок на мышечном волокне, чем кропотливый и связанный с возможностью повреждения обычный метод многократного введения микроэлектрода в различные участки волокна до нахождения области возникновения специ-

фических потенциалов концевой пластинки Схемы установки Кастильо и Кац приведены на рис 35

Позже была разработана аналогичная методика и для подведения различных веществ к отдельным нейронам центральной нервной системы В этом случае нельзя контролировать визуально положение микроэлектрода возле определенной клетки Поэтому предлагается использование двух- или многоканального микроэлектрода, один из каналов которого заполнен обычным наполнителем (KCl) и служит для отведения внеклеточных пиковых потенциалов, на основании которых по описанным в разделе V, а принципам определяется положение кончика электрода возле клетки, остальные же наполнены теми веществами, которые необходимо апплицировать

Применение, например, пятиканальных микроэлектродов (Кертис и Эклс, 1958) позволяет изучать влияние на ритмическую деятельность одной и той же клетки четырех различных веществ Использование такого метода весьма важно потому, что, во-первых, многие вещества являются весьма активными при подведении их непосредственно к поверхности клетки, хотя они совершенно лишены активности при внутривенной или внутриартериальной инъекции (Кертис и Эклс, 1958 б) в связи с задержкой гемэнцефалическими барьерами, во-вторых, возможно изучение непосредственного влияния веществ на нервные клетки и точная дифференциация его от косвенных влияний (путем возбуждения других структур центральной нервной системы или рецепторов)

Внутриклеточная инъекция может быть применена как для клеток периферических органов, так и для клеток центральной нервной системы Микропипетки, используемые только для инъекции, требуют при этом специальных методов для определения действительно внутриклеточного их расположения Таким методом может быть отведение вторым электродом, введенным в клетку для регистрации ее активности, интенсивных электрогенетических потенциалов в случае пропускания через пипетку-инжектор постоянного тока При расположении последней сна-

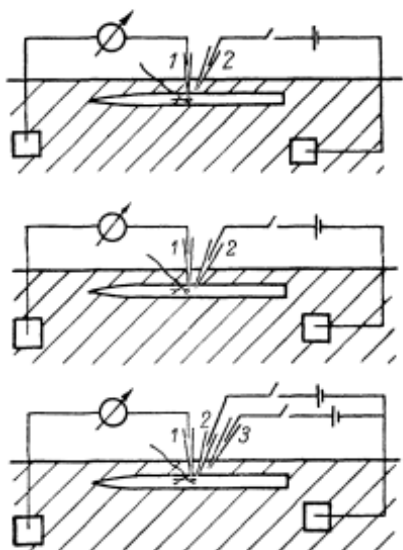


Рис 35 Схемы установок для внеклеточного и внутриклеточного приложения ацетилхолина при помощи микропипеток (дель Кастильо и Кац)

1 — микроэлектрод для отведения потенциалов 2 и 3 — микропипетки с ацетилхолином



ружи клетки вызываемые током электротонические изменения будут настолько слабыми, что вообще не будут регистрироваться при усилениях, применяемых для внутриклеточного отведения. Если микроэлектрод служит одновременно для двух целей, то его положение определяется по обычному методу отведения потенциала покоя.

Для выведения вещества из микроэлектрода через кончик наружу разработаны два способа. Первым способом является использование диффузии, ускоряемой приложением к наполнителю электрода повышенного давления. Все стеклянные микроэлектроды в той или иной мере вводят в отводимые клетки наполняющий их электролит. В некоторых случаях такая диффузия даже общепринятого заполнителя — хлористого калия — может приводить к специфическим эффектам, а именно — к постепенному ослаблению тормозных постсинаптических потенциалов и даже к превращению их в возбуждающие. Использование для микроинъекций только одной диффузии мало эффективно, поскольку она незначительна по величине и приводит к существенным изменениям в деятельности клетки лишь при длительном расположении электрода в последней. Кроме того, количество поступающего с диффузией вещества плохо поддается учету (ведь точное измерение диаметра отверстия невозможно на серийных микроэлектродах, а суждение о нем по сопротивлению электрода дает лишь очень приблизительные данные). Диффузию можно скорее рассматривать как нежелательный фактор при микроинъекции, и применяются даже специальные методы для устранения ее влияния. Так, для предупреждения постоянного выхода из электрода ионов ацетилхолина (при заполнении последнего ацетилхолин-хлоридом) к микроэлектроду прикладывается небольшое отрицательное напряжение по отношению к отдаленному электроду. Оно вызывает незначительный (менее  $10^{-8}$  а) ток, противоположный по направлению тому току, который применяется для выведения ионов ацетилхолина из микроэлектрода. Этим самым можно «запереть» микроэлектрод и устранить постоянную слабую деполаризацию концевой пластинки, которая иначе проявляется при приближении к ней микропипетки с ацетилхолином.

Если внутреннее содержание микропипетки выжимать под давлением, то в этом случае, конечно, можно апплицировать достаточные количества веществ для вызова быстрых эффектов. Важной особенностью такой инъекции является то, что могут быть использованы вещества-неэлектролиты, которые не выводятся путем ионофореза. При наполнении микропипетки электролитом в клетку будут, конечно, входить и катионы, и анионы. Однако создать эффективное устройство для инъекций под давлением через микропипетки с таким диаметром, который вполне удовлетворяет требованиям внутриклеточного отведения, не удается. Даже при давлении в несколько атмосфер вещество не

выходит из кончика в заметном количестве; часто кончик ломается, и лишь тогда начинается сильный ток жидкости из электрода. Поэтому такой метод пока удается использовать лишь для введения веществ через пипетки с диаметром кончика в  $1 \mu$  и более, следовательно, только в очень крупные клетки. Созданы конструкции специальных аппаратов, позволяющих проводить такие инъекции, используя для создания давления какой-нибудь инертный газ\*. Микроинъекторы с давлением чаще используются для гигантских аксонов, но иногда и для мышечных волокон. Таким образом удается вводить в мышечное волокно различные соли, а также такие вещества, как АТФ, и наблюдать их влияние на электрические потенциалы и сократительные свойства этого волокна.

Вторым методом выведения вещества из микропипетки является ионофорез, осуществляемый пропусканием через нее и отдаленный электрод тока соответствующего направления. Такой метод является значительно более эффективным; кроме того, он позволяет путем измерения силы пропускаемого тока и длительности его пропускания примерно вычислить количество ионов, перенесенных этим током. Очень важно то, что при ионофорезе для микроинъекций могут быть применены электроды любого, самого незначительного диаметра, и поэтому инъекции можно проводить в любые клетки, из которых вообще возможно внутриклеточное отведение.

Для микроинъекции путем ионофореза не требуется каких-либо особых электрических устройств — инъекция может производиться при помощи той же цепи, которая используется для раздражения через стеклянный микроэлектрод. Сила пропускаемого тока обычно берется порядка  $10^{-8}$ — $10^{-7}$  а, длительность подбирается такой, чтобы ввести достаточное количество ионов для получения желаемого эффекта. Так, например, для получения потенциалов концевой пластинки в поперечнополосатом мышечном волокне при внеклеточном расположении микропипетки с ацетилхолином при токе  $10^{-7}$  а достаточно 0,5 мсек (около  $7 \cdot 10^{-11}$  кулонов). В то же время внутриклеточное введение значительного количества ионов ацетилхолина в концевую пластинку не дает никакого физиологического эффекта (Кастильо и Кац, 1955а). В случае необходимости воздействовать различными веществами могут применяться указанные выше двух- и многоканальные микропипетки; пропускание через различные каналы токов различной длительности и силы позволяет создавать на одной клетке фоновые и быстрые эффекты (Кац и Чеслефф, 1957) и т. д. При сочетании микроинъекции с одновременной поляризацией клетки через другой электрод возможно изучение особенностей действия приложенного ве-

\* Описания конструкций специальных аппаратов см в работах Грундфест, Као и Альтамирано, 1954, Фальк и Джерард, 1955, Гэджин и Кейнс, 1956

щества при различных уровнях потенциала покоя клетки (Кастильо и Кац, 1955 б).

Введение различных ионов в нервные клетки путем ионофореза позволяет изменять их внутриклеточную концентрацию и создавать новые концентрационные градиенты между протоплазмой и наружной средой клетки. При помощи этого метода, как и при помощи изменения величины потенциала покоя, мож-

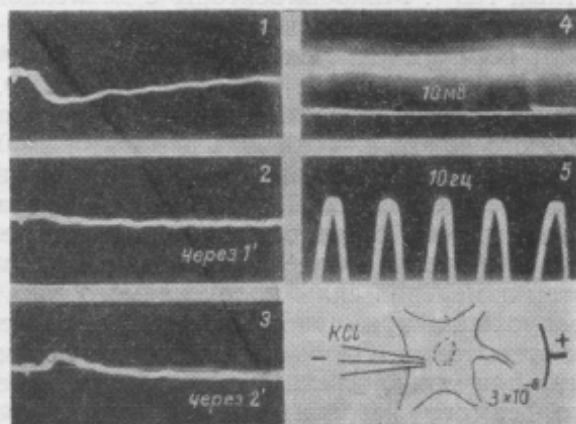


Рис. 36. Пример превращения тормозного постсинаптического потенциала мотонейрона в возбуждательный под влиянием внутриклеточной инъекции ионов  $Cl^-$ . (Длительность пропускания тока через микроэлектрод указана на осц. 2 и 3, сила тока и направление — на схеме.)

но изменять направление движения различных ионов через клеточную поверхность и приводить, например, к превращению тормозных постсинаптических потенциалов в возбуждательные (Кумс, Экклс и Фатт, 1955б). Особенно постоянным эффектом является быстрое ослабление связанной с торможением гиперполяризации и превращение ее в деполяризацию при введении внутрь нейрона ионов хлора. На рис. 36 приведен такой пример, полученный в отношении полисинаптического торможения мотонейронов в работе Костюка и Семенютина. Через введенный в клетку микроэлектрод, заполненный 3-М хлористым калием, пропускался постоянный ток входящего направления (микроэлектрод отрицателен, наружный электрод положителен). Тот же афферентный импульс от кожного нерва, который вызывал первичную гиперполяризацию клеточной поверхности, после пропускания тока начал сразу вызывать деполяризационные возбуждающие изменения. Дело в этом случае заключается именно в инъекции анионов хлора, а не в каком-нибудь ином, побочном действии тока. Об этом свидетельствует отсутствие каких-либо изменений тормозных постсинаптических потенциалов при про-



пускании тока такой же силы и длительности через микроэлектрод, заполненный  $K_2SO_4$ .

При использовании микроинъекций с помощью ионофореза для изменения концентрационных градиентов ионов, создающих электрическую поляризацию клетки, весьма важно точно знать количество ионов, выведенных из электрода в клетку. Принцип расчета можно найти в приведенной выше работе (Кумс, Экклс и Фатт, 19556, дополнение), но нужно сказать, что он оказывается довольно сложным и включает в себя ряд моментов, которые трудно точно определить. Усложняющие моменты заключаются, во-первых, в том, что выведение ионов происходит не только под влиянием пропускаемого тока, но и под влиянием обычной диффузии. Оба эти процесса взаимодействуют между собой так, что пропускаемый ток, например, входящего в микроэлектрод направления (микроэлектрод отрицателен) будет задерживать диффузию из него катионов и ускорять диффузию анионов. Если предположить, что при применяемых для поляризации силах тока (порядка  $10^{-8}$  а) диффузия катионов из кончика прекращается полностью, а обратного их переноса из клетки в микроэлектрод не происходит в связи с высокой концентрацией катиона  $K^+$  в микроэлектроде по сравнению с его концентрацией в протоплазме, то, следовательно, весь ток должен переноситься через кончик микроэлектрода анионами, количество которых может быть высчитано по числу Фарадея. Эта величина составляет около 0,1 *пикаэжв/сек* на каждые  $10^{-8}$  а ( $1 \text{ пикаэжв} = 10^{-12} \text{ экв}$ ). К этому количеству должно быть прибавлено количество анионов, выходящих за счет пассивной диффузии, что составляет примерно 0,04 *пикаэжв/сек*.

Второй трудностью в подсчетах является то, что пропускание тока не связано только с движением ионов между кончиком микроэлектрода и протоплазмой. Поляризующий ток должен в каком-то месте выходить из клетки через ее поверхность наружу, причем количество перенесенного здесь электричества, а следовательно, и количество ионов должно быть одинаковым с таковыми в кончике микроэлектрода. Мы не имеем точных данных о том, какими именно ионами переносится ток через поверхность нейрона. На основании исследований на гигантских аксонах, а также на основании данных о ионном составе протоплазмы (обнаруживающей значительный дефицит неорганических анионов, восполняемый, вероятно, крупными малоподвижными органическими анионами) предполагают, что большая часть тока через поверхность клетки (70%) обеспечивается катионами  $K^+$  и  $Na^+$  и только 30% — анионами. Значит, при расчете необходимо несколько уменьшить количество поступивших в клетку анионов за счет выхода их через поверхность наружу, но вместе с тем учесть поступление через поверхность клетки внутрь определенного количества катионов  $K^+$  (а также отчасти и  $Na^+$ , к которым проницаемость клеточной поверхности в

покое невелика) Все же в возникающих при пропускании тока изменениях именно инъекция анионов из микроэлектрода должна играть решающую роль, поскольку в связи с небольшой концентрацией их в клетке будет происходить очень большое относительное изменение последней, в то время как при высокой концентрации катиона  $K^+$  в клетке пропускаемый ток не в состоянии изменить ее на сколько-нибудь существенную относительную величину.

Наконец, необходимо иметь в виду и третье обстоятельство. Накопление в клетке при ионофорезе избыточного количества ионов должно приводить к повышению осмотического давления в ней и, следовательно, к усилению поступления внутрь воды. Это будет приводить к выравниванию вызванных изменений внутриклеточной концентрации ионов; очевидно, производимые расчеты будут тем менее точными, чем больше времени проходит после пропускания тока.

Аналогичный анализ можно провести и для случая, когда через микроэлектрод пропускается ток выходящего направления (микроэлектрод положителен). Нужно сказать, что при наполнении микроэлектрода  $KCl$  эффект такой инъекции будет весьма незначительным, так как вызвать заметный относительный прирост внутриклеточной концентрации ионов  $K^+$  очень трудно. При заполнении электрода другими солями, например  $Na^+$ , ионов которого в протоплазме очень мало, эффект должен быть более заметным, при таком методе фактически будет происходить замещение внутриклеточного калия (теряемого наружной поверхностью клетки при прохождении через нее тока выходящего направления) на поступающий из микроэлектрода  $Na^+$ .

Все это говорит о том, что получение при микроинъекции путем ионофореза таких точных данных, которые можно было бы прямо использовать для расчетов равновесных потенциалов и т. д., пока невозможно. Но примерное суждение о количестве введенных в клетку ионов составить можно, что важно для анализа физико-химических механизмов клеточных процессов.

**б. Внутриклеточное определение рН.** Введенный внутрь клетки стеклянный микроэлектрод открывает возможности для очень точного прямого определения в ней концентрации водородных ионов и сравнения этой концентрации с электрической поляризацией клеточной поверхности. Методика для определения внутриклеточного рН при помощи погружаемого в клетку стеклянного электрода была предложена Калдвеллом (1958). Запаянная на конце микропипетка заполнялась раствором, используемым для стеклянных микроэлектродов, и затем, кроме погружаемого в клетку кончика, изолировалась снаружи. В ту же клетку вводился обычный внутриклеточный микроэлектрод, используемый как относительный, а также третий микроэлектрод для измерения потенциала покоя клетки. Однако изготовленные Калдвеллом электроды оказались очень грубыми и могли быть

использованы только для измерения рН в гигантских аксонах и гигантских мышечных волокнах беспозвоночных. В нашей лаборатории Сорокиной была разработана модификация этого метода, позволяющая измерять рН в более мелких клетках, например в поперечнополосатых мышечных волокнах лягушки.

Микроэлектроды для измерения рН изготовлялись из трубочек стекла ЭС-1 путем вытягивания их в обычном аппарате для

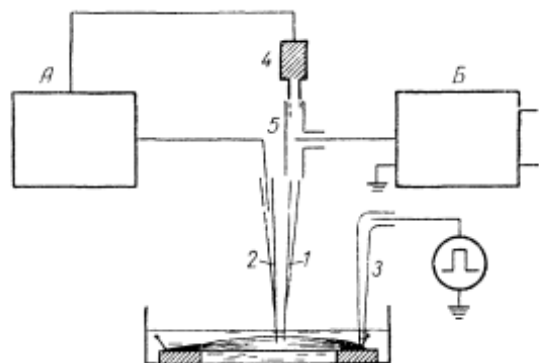


Рис 37 Схема установки для измерения внутриклеточного рН при помощи стеклянного микроэлектрода

1—стеклянный микроэлектрод для определения рН, 2—обычный микроэлектрод с КС1, 3—внеклеточный микроэлектрод, 4—каломельный электрод, 5—переходный тройник с КС1 6—входной каскад усилителя для измерения клеточных потенциалов, А—ламповый потенциометр, Б—входной каскад

работы. Заполнение микроэлектрода производилось 2-н. раствором серной кислоты с сернистой окисью ртути. В качестве контакта в него опускалась амальгамированная платиновая проволочка. Запаянные микропипетки имели сопротивление свыше 100 Мом. Затем пипетки до самого кончика (под контролем микроскопа) покрывались расплавленным шеллаком; оставался непокрытым лишь участок, достаточный для проникновения в одну клетку. Сопротивление их при этом увеличивалось до 1000 Мом. Погружение микроэлектрода производилось до тех пор, пока изоляция не соприкасалась вплотную с клеточной поверхностью, а неизолированный кончик оказывался внутри клетки. Тем самым достигалась изоляция стеклянной мембраны электрода от соприкосновения с окружающим клетку раствором. Поскольку изготовленные электроды обнаруживали значительный потенциал асимметрии (т. е. давали разность потенциалов даже при погружении в раствор с той же концентрацией водородных ионов, что и наполнитель), то их предварительно выдерживали до 10 дней в растворе 0,1-н. соляной кислоты; перед опытом каждый электрод калибровали в стандартных буферных растворах.



Относительный микроэлектрод, заполненный 3-М КСl, погружался в то же волокно. Для облегчения попадания двумя электродами в одно и то же волокно применялась предварительная установка их кончиков на одном уровне и в одной плоскости при помощи специального держателя с микрометрическими винтами. Регистрация возникающей разности потенциалов производилась при помощи потенциометра ЛП5 МОСКИП. Величина рН рассчитывалась по обычной формуле. На рис. 37 приведена схема такой установки.

Тот же внутриклеточный электрод с 3-М КСl мог быть использован в сочетании с обычным внеклеточным электродом для отведения потенциала покоя волокна. Если микроэлектрод для определения рН использовался в сочетании не с внутриклеточным, а с внеклеточным относительным электродом, то в получаемую величину разности потенциалов необходимо было вносить поправку на величину потенциала покоя, включенную в данном случае последовательно с потенциалом стеклянного электрода.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенный обзор современного состояния микроэлектродной техники свидетельствует, как нам кажется, достаточно убедительно о тех исключительно широких возможностях, которые открывает ее применение в самых различных областях физиологии, и в первую очередь, конечно, в области физиологии центральной нервной системы. Основным направлением развития микроэлектродной техники является все более точное выделение деятельности отдельных клеток, переход от простой регистрации этой деятельности к активному вмешательству в работу клетки и управлению последней. Тем самым обеспечивается наиболее верный путь для познания клеточных основ важнейших физиологических свойств и процессов.

Конечно, использование анализа единиц («unity analysis» — термин, под которым нередко объединяют вне- и внутриклеточное отведение потенциалов от отдельных клеток) выдвигает важную проблему—каким образом интегрировать те данные, которые получены от отдельных клеток. Ведь ясно, что естественная рефлекторная деятельность состоит из одновременной активности многих тысяч нейронов. При помощи микроэлектродов мы можем только последовательно исследовать одну клетку за другой, для того же, чтобы получить хорошие результаты отведения даже от нескольких сотен клеток, необходимо большое количество опытов на ряде животных. Лишь при внеклеточном отведении можно зарегистрировать достаточное количество нейронов, чтобы иметь возможность представлять суммарные данные об общем характере ответов клеток на определенные раздражения в той или иной области мозга, рецептора и т. д. (например, об ответах нейронов на условный и безусловный раз-

дражитель в различных участках коры при выработке условного рефлекса). Но и в этом случае статистический анализ дает лишь самые поверхностные результаты, поскольку количество вариантов все же ничтожно по сравнению с количеством нервных клеток, принимающих в действительности участие в выработке этого рефлекса.

Поэтому потребуется еще существенный дальнейший прогресс в микроэлектродной технике, прежде чем на ее основе можно будет прямо решать проблемы интеграции, особенно для высших отделов центральной нервной системы. Но в этом отношении не в лучшем положении находится и метод регистрации суммарной активности — то ли при помощи фокального отведения потенциалов, то ли путем регистрации эффекторных ответов. В обоих случаях мы наблюдаем лишь результат физической суммации потенциалов различных клеток, а о механизмах их физиологической связи можем делать только умозаключения на основании известных общепфизиологических положений. В более простых случаях, как например при анализе электрической активности, вызванной отдельными афферентными импульсами, такой логический анализ дает положительные результаты, но для более сложных, как например для электроэнцефалограммы,—он пока ни к чему не приводит.

Основным достоинством современной микроэлектродной техники является именно то, что она непрерывно расширяет наши сведения по общей физиологии клетки, раскрывает механизмы возникновения возбуждения под влиянием внешнего раздражения, его синаптической передачи, взаимодействия волн возбуждения в клетке и их перехода в торможение и т. д. Тем самым наши заключения о целостной деятельности центральной нервной системы, о способах передачи к ней информации от рецепторов, ее переработки и запоминании, механизмах регуляции эффекторной деятельности становятся на все более конкретную, точную основу и все более и более правильно отражают действительность.

## ЛИТЕРАТУРА

- Беритов И. С., Бакурадзе А. Н., Характеристика рефлекторных реакций при электрическом раздражении спинного мозга, Тр. Ин-та физиол. АН ГрузССР, 5, 1943, 1.
- Беритов И. С., Бакурадзе А. Н., Ройтбак А. И., Об электрических явлениях спинного мозга кошки, Тр. Ин-та физиол. АН ГрузССР, 7, 1948, 89.
- Бонгард М. М., Смирнов М. С., Кривые спектральной чувствительности приемников, связанных с одиночными волокнами зрительного нерва лягушки, «Биофизика», 2, 1957, 336.
- Бонч-Бруевич А. М., Применение электронных ламп в экспериментальной физике, ГИТТЛ, 1954.
- Бызов А. Л., К методике микроэлектродного отведения потенциалов действия одиночных ганглиозных клеток сетчатки, «Биофизика», 2, 1957, 252.
- Бызов А. Л., Сопротивление и емкость различных слоев сетчатки лягушки, «Биофизика», 3, 1958, 658.
- Бызов А. Л., Бонгард М. М., Катодный повторитель для работ с микроэлектродами, «Физиол. журн. СССР», 45, 1959, 110.
- Бызов А. Л., Утина И. А., Движение ядер палочек сетчатки лягушки и место возникновения электроретинограммы, «Биофизика», 4, 1959, 187.
- Воронцов Д. С., Электрический ответ коры больших полушарий на прямое ее раздражение, «Журн. высш. нерв. деят.», 7, 1957, 929.
- Воронцов Д. С., Дальнейшие исследования электрического ответа коры больших полушарий на прямое ее раздражение, «Журн. высш. нерв. деят.», 8, 1958, 286.
- Голов Д. А., Костюк П. Г., Входной каскад усилителя для внутриклеточного отведения потенциалов, «Физиол. журн. СССР», 42, 1956, 117.
- Каминер Л. Б., Катодный повторитель, М.—Л., 1955
- Коган А. Б., Электрофизиологическое исследование центральных механизмов некоторых сложных рефлексов, М., 1949
- Коган А. Б., Методика хронического живления электродов для отведения потенциалов и раздражения мозга, М., 1952.
- Костюк П. Г., Исследование распространения возбуждения в мышце при помощи внутриклеточного отведения электрических потенциалов, ДАН СССР, 105, 1955, 858.
- Костюк П. Г., О месте возникновения электротонических потенциалов в спинномозговых корешках при раздражении мышечных нервов, «Физиол. журн. СССР», 42, 1956, 800.
- Костюк П. Г., Розвиток процесу збудження у над- і підпорогово збуджених мотонейронах спинного мозку, Наук. зап. КДУ, XV, в. 17, 1956, 29.
- Костюк П. Г., Дослідження електричних реакцій центральної частини дуги рефлексу розтягання за допомогою мікроелектродів, Наук. зап. КДУ, XVI, в. 18, 1957, 5.



- Костюк П. Г., Внутриклеточное отведение потенциалов мышечных волокон. Одиночные раздражения, «Биофизика», 2, 1957, 401.
- Костюк П. Г., Электрические проявления реципрокного возбуждения и торможения в отдельных мотонейронах, ДАН СССР, 119, 1958, 1255.
- Костюк П. Г., Внутриклеточное отведение потенциалов мышечных волокон. Повторные раздражения, «Биофизика», 3, 1958, 274.
- Костюк П. Г., Электрофизиологическая характеристика отдельных нейронов спинного мозга, «Физиол. журн. СССР», 46, 1960, 19.
- Костюк П. Г., Сорокина З. А., Шаповалов А. И., Внутриклеточное отведение потенциалов мышечных волокон. Ритмическая активность, «Биофизика», 4, 1959, 134.
- Костюк П. Г., Шаповалов А. И., Зависимость между электрической поляризацией и ритмической активностью поперечнополосатого мышечного волокна, «Биофизика», 5, 1960 (в печати).
- Костюк П. Г., Шаповалов А. И., Особенности ответов различных нейронов спинного мозга на прямое раздражение, Бюлл. экспер. биол. и мед., 1960 (в печати).
- Кризе С. Н., Усилители напряжения низкой частоты, ГЭИ, 1955.
- Курелла Г. А., Метод изготовления внутриклеточных микроэлектродов, «Биофизика», 3, 1958, 243.
- Курелла Г. А., Методика исследования динамики потенциала покоя на отдельных мышечных волокнах, «Биофизика», 3, 1958, 614.
- Латманисова Л. В., Внутриклеточные потенциалы эпителиальной ткани, «Физиол. журн. СССР», 45, 1959, 710.
- Мещерский Р. М., Стереотаксический прибор для мелких лабораторных животных, «Физиол. журн. СССР», 45, 1959, 498.
- Могилевський А. Я., Стереотаксичний метод у експерименті на собаці, «Фізіол. журн. АН УРСР», 5, 1959, 270.
- Моцный П. Е., Об измерении скорости аккомодации в двигательных центрах спинного мозга при возбуждении и торможении, «Вопросы физиологии», 1, 1951, 61.
- Моцный П. Е., О биоэлектрических явлениях в центрах спинного мозга при торможении, «Физиол. журн. СССР», 41, 1955, 346.
- Находкина Л. Г., Евдокимов С. А., Установка для внутриклеточного отведения электрических потенциалов, «Физиол. журн. СССР», 45, 1959, 716.
- Остерман Л. А., Простая приставка к стимулятору, «Биофизика», 4, 1959, 238.
- Ройтбак А. И., Биоэлектрические явления в коре больших полушарий, Тбилиси, 1955.
- Сорокина З. О., Залежність потенціалу спокою поперечносмугастого м'язевого волокна від зовнішньої концентрації іонів К, Na, та Cl, «Фізіол. журн. АН УРСР», 5, 1959, 451.
- Сорокина, З. А., Роль обмена веществ в поддержании потенциала покоя поперечнополосатого мышечного волокна, «Физиол. журн. СССР», 45, 1959, 1360.
- Трошин А. С., Проблемы клеточной проницаемости, М.—Л., 1956.
- Шинтльмейстер Н., Электронная лампа как прибор для физических измерений, ГИТТЛ, 1949.
- Adrian E. D., The spread of activity in the cerebral cortex, J. Physiol. (London), 88, 127, 1936.
- Adrian R. H., The effect of internal and external potassium concentrations on the membrane potential of frog muscle, J. Physiol. (London), 133, 631, 1956.
- Alanis J., Matthews B., The mechano-receptor properties of central neurones, J. Physiol. (London), 117, 59-P, 1952.
- Alexander J., Nastuk W., An instrument for the production of microelectrodes used in electrophysiological studies, Rev. Sci. Instr., 24, 528, 1953.

- A massian V., Evoked single cortical unit activity in the somatic sensory areas, EEG, clin. Neurol., 5, 415, 1953.
- Andersen P., Localisation of micro-electrode sites by silver impregnation, Acta physiol. scand., 35, 305, 1956.
- Araki T., Otani T., Response of single motoneurons to direct stimulation in toad's spinal cord, J. Neurophysiol., 18, 472, 1955.
- Arvanitaki A., Chalazionitis N., Potentiels d'activité du soma neuronique géant (Aplisia), Arch. sci. physiol., 9, 115, 1955.
- Arvanitaki A., Chalazionitis N., Biopotentiels neuroniques a l'échelle infracellulaire. Stimulation mécanique graduee dans le soma géant d'Aplisia, Bull. de l'Institut Oceanograph., Monaco, 53, № 1079, 1956.
- Aström K. E., On the functional organization of the motoneurons in the lumbo-sacral segments of the spinal cord, Acta physiol. scand., 14, suppl. 47, 10, 1947.
- Back A. F. A unity gain cathode follower, EEG. clin. Neurol., 10, 745, 1958.
- Bauwens P., Technical advances in electrodiagnostic equipment, Proc. Int. Congr. Phys. Med., 282, 1952.
- Baumgarten R., Koordinationsformen einzelner Ganglienzellen der rhomencephalen Atemzentren, Pflügers Arch. ges. Physiol., 262, 573, 1956.
- Baumgarten R., Zur Technik der Mikroableitung am pulsierenden Gehirn, Naturwissenschaften, 44, 22, 1957.
- Bernhard C., Rexed B., The localization of the premotor interneurons discharging through the peroneal nerve, J. Neurophysiol., 8, 387, 1945.
- Bishop G., O'Leary J., Factors determining the form of the potential record in the vicinity of the synapses of the dorsal nucleus of the lateral geniculate body, J. Cell. Comp. Physiol., 19, 315, 1942.
- Bishop P., Synaptic transmission. An analysis of the electrical activity of the lateral geniculate nucleus in the cat after optic nerve stimulation, Proc. Roy. Soc., B., 141, 362, 1953.
- Bishop P., Collin R., Steel microelectrodes, J. Physiol. (London), 112, 8-P, 1951.
- Bishop P., McLeod J. G., Nature of potentials associated with synaptic transmission in lateral geniculate of cat, J. Neurophysiol., 17, 387, 1954.
- Brock L., Coombs J., Eccles J., The recording of potentials from the motoneurons with an intracellular electrode, J. Physiol. (London), 117, 431, 1952.
- Brock L., Coombs J., Eccles J., Intracellular recording from antidromically activated motoneurons, J. Physiol. (London), 122, 429, 1953.
- Brooks C., Eccles J., Electrical investigation of the monosynaptic pathway through the spinal cord, J. Neurophysiol., 10, 251, 1947.
- Brooks C., Eccles J., Inhibitory action on a motor nucleus and focal potentials generated therein, J. Neurophysiol., 11, 401, 1948.
- Buchthal F., Potentialänderungen bei der Kontraktion einzelner Muskelfasern, Skand. Arch. Physiol., 78, 187, 1934.
- Bülbring E., Membrane potentials of smooth muscle fibres of the taenia coli of the Guinea-pig, J. Physiol. (London), 125, 302, 1954.
- Bülbring E., Burnstock G., Holman M., Excitation and conduction in the smooth muscle of the isolated taenia coli of the Guinea-pig, J. Physiol. (London), 142, 420, 1958.
- Burke W., Ginsborg B., The action of the neuro-muscular transmitter on the slow muscle fibre membrane, J. Physiol. (London), 132, 599, 1956.
- Burns B. D., Some properties of isolated cerebral cortex in the unanaesthetized cat, J. Neurophysiol., 112, 156, 1951.
- Burns B. D., The production of after-bursts in isolated unanaesthetized cerebral cortex, J. Physiol. (London), 125, 427, 1954.

- Burns B D, Grafstein B, Olszewski J, Identification of neurones giving burst response in isolated cerebral cortex, *J Neurophysiol*, 20, 202, 1957
- Caldwell P C, Studies on the internal pH of large muscle and nerve fibres, *J Physiol (London)*, 142, 22, 1958
- del Castillo J, Katz B, The membrane changes produced by the neuromuscular transmitter, *J Physiol (London)*, 125, 546, 1954.
- del Castillo J, Katz B, On the localisation of acetylcholine receptors, *J Physiol (London)*, 128, 157, 1955
- del Castillo J, Katz B, Local activity of a depolarized nerve muscle junction, *J Physiol (London)*, 128, 396, 1955
- Chalazonitis N, Arvanitaki A, Derivation endocytairé simultaneé de l'activité de différents neurones in situ, *Copmt rendus de l'Acad Paris*, 246, 161, 1958
- Chang H T, Dendritic potential of cortical neurones produced by direct electrical stimulation of the cortex, *J Neurophysiol*, 14, 229, 1951
- Chang H T, Cortical response to stimulation of medullary pyramid in rabbit, *J Neurophysiol*, 18, 332, 1955
- Clare M, Bishop G, Properties of dendrites, apical dendrites of the cat cortex, *EEG clin Neurol*, 7, 85, 1955
- Caton J W, Whitfield I C, Reproduction of the waveforms of nerve activity by magnetic tape recording, *J Physiol (London)*, 125, 13-P, 1954
- Coombs J S, Curtis D R, Eccles J C, The interpretation of spike potentials of motoneurones, *J Physiol (London)*, 139, 198, 1957
- Coombs J S, Curtis D R, Eccles J C, The generation of impulses in motoneurones, *J Physiol (London)*, 139, 232, 1957
- Coombs J S, Curtis D R, Eccles J C, The electrical constants of the motoneurone membrane, *J Physiol (London)*, 145, 505, 1959
- Coombs J S, Eccles J C, Fatt P, The electrical properties of the motoneurone membrane, *J Physiol (London)*, 130, 291, 1955
- Coombs J S, Eccles J C, Fatt P, The specific ionic conductances and the ionic movements across the motoneuronal membrane that produce the inhibitory post synaptic potential, *J Physiol (London)*, 130, 326, 1955
- Coombs J S, Eccles J C, Fatt P, Excitatory synaptic action in motoneurones, *J Physiol (London)*, 130, 374, 1955
- Creese R, Scholes N, Whalen W, Resting potentials of diaphragme muscle after prolonged anoxia, *J Physiol (London)*, 140, 301, 1958
- Curtis D R, Eccles R, The excitation of Renshaw cells by pharmacological agents applied electrophoretically, *J Physiol (London)*, 141, 435, 1958
- Curtis D R, Eccles R, The effect of diffusional barriers upon the pharmacology of cells within the central nervous system, *J Physiol (London)*, 141, 446, 1958
- Curtis D R, Eccles J C, Lundberg A, Intracellular recording from cells in Clarke's column, *Acta physiol scand*, 43, 303, 1958
- Curtis D R, Krnjevic K, Miledi R, Crossed inhibition of sacral motoneurones, *J Neurophysiol*, 21, 319, 1958
- Draper M N, Weidmann S, Cardiac resting and action potentials recorded with an intracellular electrode, *J Physiol (London)*, 115, 74, 1951
- Easton D, Dependence of intracellular end plate action potential on adjacent fiber activity, *Amer J Physiol*, 187, 199, 1956
- Eccles J C, Interpretation of action potentials in the cerebral cortex, *EEG clin Neurol*, 3, 449, 1951
- Eccles J C, The physiology of nerve cells, Oxford Univ Press (London), 1957



- Eccles J. C., Fatt P., Koketsu K., Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons, *J. Physiol. (London)*, **126**, 524, 1954.
- Eccles J. C., Fatt P., Landgren S., Winsbury G., Spinal cord potentials generated by volleys in the large muscle afferents, *J. Physiol. (London)*, **125**, 590, 1954.
- Eccles R. M., Intracellular potentials recorded from a mammalian's sympathetic ganglion, *J. Physiol. (London)*, **130**, 572, 1955.
- Edisen A., Excitation and inhibition of spinal motoneurons. Synaptic excitation and inhibition, *Amer. J. Physiol.*, **184**, 223, 1956.
- Eyzaguirre C., Kuffler S., Processes of excitation in the dendrites and in the soma of single isolated sensory nerve cell, *J. Gener. Physiol.*, **39**, 87, 1955.
- Falk G., Gerard R., Effect of micro-injected salts and ATP on the membrane potential and mechanical response of muscle, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **43**, 393, 1954.
- Fatt P., Electric potentials occurring around a neurone during its antidromic activation, *J. Neurophysiol.*, **20**, 26, 1957.
- Fatt P., Sequence of events in synaptic activation of a motoneuron, *J. Neurophysiol.*, **20**, 61, 1957.
- Fatt P., Katz B., An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode, *J. Physiol. (London)*, **115**, 320, 1951.
- Fernandez de Molina A., Gray J., Activity in the dorsal spinal gray matter after stimulation of cutaneous nerves, *J. Physiol. (London)*, **137**, 126, 1957.
- Fessard A., Tauc L., Comparaison entre la dissipation des potentiels postsynaptiques et électrotoniques dans le soma neuronique de l'Aplysia, *J. de physiol. (Paris)*, **49**, 162, 1957.
- Frank K., Fuortes M. G. F., Potentials recorded from the spinal cord with microelectrodes, *J. Physiol. (London)*, **130**, 625, 1955.
- Frank K., Fuortes M. G. F., Unitary activity of spinal interneurons of cats, *J. Physiol. (London)*, **131**, 424, 1956.
- Frank K., Fuortes M. G. F., Stimulation of spinal motoneurons with intracellular electrodes, *J. Physiol. (London)*, **134**, 451, 1956.
- Freycang W. H., Intracellular recording from the lateral geniculate nucleus, *Amer. J. Physiol.*, **187**, 600, 1956.
- Freycang W. H., Frank K., Extracellular potentials from single spinal motoneurons, *J. Gener. Physiol.*, **42**, 749, 1956.
- Furshpan E., Potter D., Transmission at the giant motor synapses of the crayfish, *J. Physiol. (London)*, **145**, 289, 1959.
- Graham J., Gerard R., Membrane potentials and excitation of impaled single muscle fibres, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **28**, 99, 1946.
- Granit R., Sensory mechanisms of the retina, Oxford Univ. Press, London, 1947.
- Granit R., Phillips C., Excitatory and inhibitory processes acting upon individual Purkinje cells of the cerebellum in cats, *J. Physiol. (London)*, **133**, 520, 1956.
- Granit R., Phillips C., Effect on Purkinje cells of surface stimulation of the cerebellum, *J. Physiol. (London)*, **135**, 73, 1957.
- Green J. D., A simple microelectrode for recording from the central nervous system, *Nature*, **182**, 962, 1958.
- Grundfest H., Kao C., Altamirano M., Bioelectrical effects of ions microinjected into the giant axon of *Loligo*, *J. Gener. Physiol.*, **38**, 245, 1954.
- Grundfest H., Sengstaken R. W., Oettinger W. H., Gurry R. W., Stainless steel micro-needle electrodes made by electrolytic pointing, *Rev. Sci. Instr.*, **21**, 360, 1950.
- Haapanen L., Hyde J., Skoglund C. R., The application of radiofrequency coupled input stages and stimulators to neurophysiological experiments, *Acta physiol. scand.*, **29**, suppl. 106, 394, 1953

- Haapanen L, Kolmodin G, Skoglund C R, Membrane and action potentials of spinal interneurons in the cat, *Acta physiol scand*, **43**, 315, 1958
- Haapanen L, Ottoson D, A frequency compensated input unit for recording with microelectrodes, *Acta physiol scand*, **32**, 271, 1954
- Hagiiwara S, Saito N, Membrane potential change and membrane current in supramedullary nerve cells of Puffer, *J Neurophysiol*, **22**, 204, 1959
- Hagiiwara S, Tasaki T, A study on the mechanism of impulse transmission across the giant synapse of the Squid, *J Physiol (London)*, **143**, 114, 1958
- Hisada M, Membrane resting and action potential from a protozoan, *Nocti-cula scintillans*, *J Cell Comp Physiol*, **50**, 57, 1957
- Hodgkin A L, The ionic basis of electric activity in nerve and muscle, *Biol. Rev.*, **26**, 339, 1951
- Hodgkin A L, Huxley A F, Current carried by sodium and potassium ions through the membranes of the giant axon of Loligo, *J Physiol (London)* **116**, 449, 1952
- Hodgkin A L, Keynes R D, Experiments on the injection of substances into Squid giant axons by means of a microsyringe, *J Physiol (London)*, **131**, 592, 1956
- Hodgkin A L, Rushton W A H, The electrical constants of crustacean nerve fiber, *Proc Roy Soc B*, **123** 444, 1946
- Holland B, Lettwin J, McCulloch W, Pitts W, Wall P, On microelectrodes for plotting currents in nervous tissue, *J Physiol (London)*, **122**, 24-P, 1953
- Hubel D, Tungsten microelectrodes for recording from single units, *Science*, **125**, 549, 1957
- Ito M, The electrical activity of spinal ganglion cells investigated with intracellular microelectrodes, *J Physiol (Japan)*, **7**, 297, 1957
- Johnson E, Robertson P A, Tille J, Purkinje and ventricular membrane resistance during the rising phase of the action potential, *Nature*, **182**, 1161, 1958
- Kao C Y, A method of making prefilled microelectrodes, *Science*, **119**, 846, 1954
- Katsuki Y, Sumi T, Uchiyama H, Watanabe T, Electric responses of auditory neurones in cat to sound stimulation, *J Neurophysiol*, **21**, 569, 1958
- Katz B, Thesleff S, A study of the «desensitization» produced by acetylcholine at the motor end plate, *J Physiol (London)*, **138**, 63, 1957
- Koketsu K, Intracellular potential changes of primary afferent nerve fibers in spinal cord of cats, *J Neurophysiol*, **19**, 375, 1956
- Koketsu K, Ceri J A, Nishi S, Effect of quaternary ammonium ions on electrical activity of spinal ganglion cells in frogs, *J Neurophysiol*, **22**, 177, 1959
- Koketsu K, Nishi S, Action potentials of single intrafusal muscle fibres of frogs, *J Physiol (London)*, **137**, 193, 1957
- Kolmodin G M, Integrative processes in single spinal interneurons with proprioceptive connections, *Acta physiol scand*, **40**, suppl 139, 1957
- Kolmodin G M, Skoglund C R, Potentials within isolated segments of the frog's spinal cord during reflex activation and changes induced by cholinesterase inhibitors and temperature variations, *Acta physiol scand*, **29**, suppl 106, 503, 1953
- Kolmodin G M, Skoglund C R, Slow membrane potential changes accompanying excitation and inhibition of spinal moto- and interneurons in the cat during natural activation, *Acta physiol scand*, **44**, 11, 1958
- Krnjević K, Intracellular recording of cortical potentials, *Feder Proc* **15**, 113, 1956

- Lettwi n J., McCulloch W., Pitts W., Wall P., The origin of potentials in the spinal cord, XIX internat. Physiol. Congress, Abstr. of Comm., 555, 1953.
- Li C.-L., Action and resting potentials of cortical neurones, J. Physiol. (London), 130, 96, 1955.
- Li C., Cullen C., Jasper H., Laminar microelectrode studies of specific somatosensory cortical pathways, J. Neurophysiol., 19, 111, 1956.
- Li C., Cullen C., Jasper H., Laminar microelectrode analysis of cortical unspecific recruiting responses and spontaneous rhythms, J. Neurophysiol., 19, 131, 1956.
- Ling G., Gerard R., The normal membrane potential of frog sartorius fiber, J. Cell. Comp. Physiol., 34, 383, 1949.
- Ling G., Gerard R., The membrane potential and metabolism of muscle fibres, J. Cell. Comp. Physiol., 34, 413, 1949.
- Lloyd D. P. C., Electrical signs of impulse conduction in spinal motoneurons, J. Gener. Physiol., 35, 255, 1951.
- Lloyd D. P. C., After-currents, after-potentials, excitability and ventral root electrotonus in spinal motoneurons, J. Gener. Physiol., 35, 289, 1951.
- Lloyd D. P. C., Electrotonus in dorsal nerve roots, Cold Springs Harbor Symp. Quant. Biol., 17, 203, 1952.
- Lloyd D. P. C., Influence of asphyxia upon the responses of spinal motoneurons, J. Gener. Physiol., 36, 673, 1953.
- Lorente de Nó R., The electrical excitability of the motoneurons, J. Cell. Comp. Physiol., 7, 47, 1953.
- Lorente de Nó R., Transmission of impulses through cranial motor nuclei, J. Neurophysiol., 2, 402, 1939.
- Lorente de Nó R., Action potential of the motoneurons of the hypoglossus nucleus, J. Cell. Comp. Physiol., 29, 207, 1947.
- Lorente de Nó R., A study of nerve physiology, New-York, Rockefeller Institute, part II, 384—477, 1947.
- Lorente de Nó R., Conduction of impulses in the neurones of the oculomotor nucleus, Spinal cord (London), 132, 1953.
- Lundberg A., The electrophysiology of the submaxillary gland of the cat, Acta physiol. scand., 35, 1, 1955.
- Lundberg A., Electrophysiology of salivary glands, Physiol. Rev., 38, 21, 1958.
- Malcolm J., Perry W., A method for recording intracellular potentials, from a sympathetic ganglion, J. Physiol. (London), 128, 29-P, 1955.
- Mountcastle V., Davies P., Berman A., Response properties of neurones of cat's somatic cortex to peripheral stimuli, J. Neurophysiol., 20, 374, 1957.
- Nastuk W., The electrical activity of the muscle cell membrane at the neuro-muscular junction, J. Cell. Comp. Physiol., 42, 249, 1953.
- Nastuk W., Hodgkin A., The electrical activity of single muscle fibres, J. Cell. Comp. Physiol., 35, 39, 1950.
- Oikawa T., Ogawa T., Motokawa K., Origin of the so-called cone action potential, J. Neurophysiol., 22, 102, 1959.
- Pascoe J., A technique for the introduction of intracellular electrodes, J. Physiol. (London), 128, 26-P, 1955.
- Phillips C. G., Cortical motor threshold and the threshold and distribution of excited Betz cells in the cat, Quart. J. exper. Physiol., 41, 70, 1956.
- Pitts W., McCulloch W., Wall P., Lettwi n J., Howland B., Maps derived by bipolar microelectrode stimulation within the spinal cord, Feder. Proc., 13, 112, 1954.
- Pitts W., Wall P., Lettwi n J., Sources and sinks of current in the spinal cord, Feder. Proc., 11, 124, 1952.



- R a y p o r t M., Anatomical identification of somatic cortical neurones responding with short latencies to specific afferent volleys, *Feder. Proc.*, **16**, 453, 1957.
- R e n s h a w B., F o r b e s A., M o r i s o n B., Activity of isocortex and hippocampus: electrical studies with microelectrodes, *J. Neurophysiol.*, **3**, 74, 1940.
- R i c c i G., D o a n e B., J a s p e r H., Microelectrode studies of conditioning technique and preliminary results, IV internat. Congress EEG clin. Neurophysiol., Bruxelles, 401, 1957.
- S c h a e f e r H., S c h a n n e O., Membranepotentiale von Einzelzellen in Gewebkulturen, *Die Naturwissenschaften*, **43**, 445, 1956.
- S c h e i b e l M., S c h e i b e l A., M o l l i c a A., M o r u z z i G., Convergence and interaction of afferent impulses on single units of reticular formation, *J. Neurophysiol.*, **18**, 309, 1955.
- S c h m i t t O. H., D u b b e r t D. R., Tissue stimulators utilizing radio-frequency coupling, *Rev. Sci. Instr.*, **20**, 170, 1949.
- S e g a l J., *Die Erregbarkeit der Lebenden Materie*, Jena, 1958.
- S o l m s S. J., N a s t u k W. L., A l e x a n d e r J. T., Development of a highfidelity preamplifier for use in the recording of bioelectric potentials with intracellular electrodes, *Rev. Sci. Instr.*, **24**, 960, 1953.
- S v a e t i c h i n G., Electrophysiological investigation on single ganglion cells, *Acta physiol. scand.*, **24**, suppl. 86, 1951.
- S v a e t i c h i n G., The cone action potential, *Acta physiol. scand.*, **29**, suppl. 106, 565, 1953.
- T a s a k i I., H a g i w a r a S., Capacity of muscle fibre membrane, *Amer. J. Physiol.*, **188**, 423, 1957.
- T a s a k i I., P o l l e y E., O r r e g o R., Action potentials from individual elements in cat geniculate and striate cortex, *J. Neurophysiol.*, **17**, 454, 1954.
- T a k e u c h i N., T a k e u c h i A., Direct determination of the active phase of the end-plate potential, *Nature*, **181**, 779, 1958.
- T a u c L., Potentials postsynaptiques d'inhibition obtenus dans les somas neuroniques de ganglions de l'Aplisia et de l'Escargot, *J. de physiol. (Paris)*, **49**, 396, 1957.
- T h e r m a n P., Transmission of impulses through the Burdach nucleus, *J. Neurophysiol.*, **4**, 154, 1941.
- T o m i t a T., The nature of action potentials in the lateral eye of the horseshoe crab as revealed by simultaneous intra- and extracellular recording, *J. Physiol. (Japan)*, **6**, 327, 1956.
- T o m i t a T., T o r i h a m a Y., Further study of the intraretinal action potentials and on the site of ERG generation, *J. Physiol. (Japan)*, **6**, 118, 1956.
- W a l l P., M c C u l l o c h W., L e t t w i n J., P i t t s W., The terminal arborizations of the cats pyramidal tract determined by a new technique, *Yale, J. Biol. Med.*, **28**, 457, 1955/56.
- W a l l P., L e t t w i n J., M c C u l l o c h W., P i t t s W., The nature and origin of prolonged events in the terminal arborizations of spinal afferent fibres, XX Internat. Physiol. Congress, Abstr. of Comm., Bruxelles, 41, 1956.
- W e a l e R., A method for drawing micro-capillary tubes, *J. Physiol. (London)*, **112**, 4-P, 1951.
- W e i d m a n n S., Effect of current flow on the membrane potential of cardiac muscle, *J. Physiol. (London)*, **115**, 227, 1951.
- W h i t f i e l d I., An introduction to electronics for physiological workers, (London), 100—106, 1953.
- W i n s b u r y G., Machine for the production of microelectrodes, *Rev. Sci. Instr.*, **27**, 514, 1956.

- W o o d b u r y J. W., Recording central nervous activity with intracellular ultra-microelectrodes: use of negative-capacity amplifier to improve transient responses, *Feder. Proc.*, **12**, 159, 1953.
- W o o d b u r y J. W., P a t t o n H., Electrical activity of single spinal cord elements, *Cold Springs Harbor Symp. quant. Biol.* **17**, 185, 1952.
- Y a m a m o t o S., S u g i h a r a S., K u r u M., Microelectrode studies on sensory afferents in the posterior funiculus of cat, *J. Physiol. (Japan)*, **6**, 68, 1956.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие . . . . .	4
I. Изготовление микроэлектродов . . . . .	5
II. Погружение микроэлектродов . . . . .	19
III. Входные каскады и усилители . . . . .	29
IV. Особенности фокального отведения . . . . .	46
V. Особенности отведения от отдельных клеток . . . . .	67
VI. Применение микроэлектродов для раздражения и поляризации . . . . .	87
VII. Применение микроэлектродов для микроинъекций и определения pH . . . . .	107
Заключение . . . . .	116
Литература . . . . .	118



**Платон Григорьевич Костюк**  
**Микроэлектродная техника**

*Печатается по постановлению ученого совета Института физиологии им. А. А. Богомольца Академии наук Украинской ССР*

Редактор издательства *Э. Б. Янковская*

Технический редактор *А. М. Лисовец*

Корректор *Е. Н. Антомен*

---

БФ 01645 Зак № 2613 Изд № 334 Тираж 1000 Формат бумаги 60×92<sup>1</sup>/<sub>2</sub>, Печ листов 2  
Учетно издат листов 81 Подписано к печати 28 I 1960 г Цена 4 р 10 коп

---

Типография Издательства АН УССР, Киев Репина 2

## ОПЕЧАТКИ

Стр.	Строка	Напечатано	Следует читать
18	заглавие к таблице	между искусствен- ной плазмой.	между микроэлектродом с 3-М КСl
58	1 сн.	тока действия	тока
62	10 сн.	деполяризации	деполяризация
66	13 сн.	нейтронов	нейронов
115	20 сн.	работы	изготовления микроэлектро- дов

зак. 2613

4 руб. 10 коп.



4 руб. 10 коп.