Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского
Серия «Биология, химия». Том 23 (62). 2010. № 1. С. 52-57.

УДК 578.087: 612.014.421 : 612.087

УСТРОЙСТВО ДЛЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ РЕГИСТРАЦИИ НЕЙРОННОЙ АКТИВНОСТИ У СВОБОДНОПОДВИЖНЫХ ЖИВОТНЫХ

Куличенко А.М., Павленко В.Б., Фокина Ю.О., Ильичев А.Г.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: kulichenkoa@mail.ru

Разработана и описана конструкция устройства, обеспечивающего возможность точного погружения микроэлектрода на неограниченную глубину к исследуемым структурам мозга животных.
Ключевые слова: микроманипулятор, электрод, нейронная активность.

ВВЕДЕНИЕ

В нейрофизиологических исследованиях часто возникает необходимость применения микроманипуляционной техники, позволяющей осуществлять микроперемещения различных инструментов [1]. Известны пьезоэлектрические, пневматические и механические типы микроманипуляторов. Первые два, в основном, применяются при микрохирургии клетки. Манипуляторы с механическим приводом более широко применяются практике нейрофизиологических экспериментов. Используемые в микроэлектродных исследованиях микроманипуляторы имеют ряд существенных недостатков, ограничивающих возможности их применения. К ним относятся люфт деталей микрометрической подачи, передающийся электроду [2, 3], невозможность изменения трека проходки и небольшая глубина погружения электрода [4-6], приблизительность контроля погружения [2, 4, 5, 7], большие габариты и масса устройств [2, 3, 5]. Кроме того, при исследованиях глубинных структур мозга возникает проблема точности подводки электрода к исследуемым структурам мозга. Поэтому целью настоящей работы является разработка устройства, позволяющего повысить точность погружения электродов к исследуемым структурам, чувствительность и избирательность отведения активности, отличающегося простотой изготовления, смены электродов с учетом возможности изменения трека проходки. В качестве прототипа [6] выбран компактный микроманипулятор, который используется для осуществления хронической экстраклеточной регистрации нейронной активности на фиксированных и свободноподвижных животных. Недостатком прототипа является отсутствие точности подводки электрода к исследуемой структуре, которая, во многом, зависит от строгого соответствия установки держателя микроманипулятора стереотаксическим координатам исследуемой структуры мозга. Кроме того, в устройстве используются микроэлектроды, выполненные из вольфрама, которые имеют относительно большой диаметр. Известно, что тканевая

реакция выражена тем сильнее, чем больше инородное тело. Таким образом, такие электроды существенно разрушают нервную ткань, в результате ограничивая число треков и, соответственно время работы манипулятора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явился характер регистрации экстраклеточной активности нейронов головного мозга мягкофиксированных кошек. Для достижения указанной цели был проведен патентный поиск, разработка и создание устройства, оперативная подготовка животного, отведение биопотенциалов от нейронов ствола головного мозга бодрствующей кошки. Остальные подробности методики отведения нейронной активности подробно описаны в ранее опубликованной статье [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В устройство включено две части: собственно микроманипулятор и направляющая канюля (рис. 1 – 1, А; 1, Б). Основой манипулятора явился подстроечный многооборотный резистор СП5-22 длиной 34,5 мм, шириной 10 мм и высотой 7 мм (рис. 1 – 1, А). С целью обеспечения контроля погружения электрода на боковые поверхности корпуса манипулятора нами были нанесены шкалы (рис. 1 – 2, А). Расположенный внутри корпуса винт (рис. 1 – 3, А) служит для перемещения ползунка (рис. 4, А). Учитывая длительность срока эксплуатации, воздействие температуры во время соединения электродов пайкой и необходимость электроизоляции в качестве материала для его изготовления использован фторопласт. На ползунок с помощью штыревого контакта (рис. 1 – 5, А) была прикреплена контактная пластина из луженой меди (рис. 1 – 6, А). В качестве припоя для крепежа электродов использовали легкоплавкий (температура плавления 65,5°) сплав Вуда.

С целью минимизации люфта детали микрометрической подачи электрода и электрод в манипуляторе должны были иметь независимые направляющие. С учетом этого, подводящую трубку (рис. 1. – 8, А), изготовленную из иньекционной иглы арт. 27G 3/4” (диаметр 0,4 мм), жестко крепили к ползунку. В процессе погружения электрода она перемещается внутри направляющей трубки. Направляющая трубка сделанная из иньекционной иглы арт. 22G 1 1/2” (диаметр 0,7 мм) (рис. 1. – 10, А) была жестко прикреплена к крепежной латунной шайбе манипулятора. В результате конструкция предохраняет от попадания посторонних частиц и механических повреждений, поскольку все подвижные детали, микрометрическая резьба и электрод расположены внутри микроманипулятора.

За счёт включения в устройство направляющей канюли (рис. 1. – 12, Б), жестко скрепленной с основанием (рис. 1. – 11, Б), которая вводится в мозг строго в соответствии стереотаксическим координатам достигается повышение точности погружения электродов к исследуемым структурам.

Электроды. Для внеклеточного отведения использован электрод из серебряного микропровода (диаметр 12 мкм) в стеклянной изоляции (общая толщина 70 мкм), кончик которого с помощью полировального круга, на котором была нанесена алмазная паста, затачивался наискосок подобно кончику инъекционной иглы. В результате достигается относительно низкое сопротивление

электрода (1 Mom) и высокая избирательность регистрации сигнала. Электроды из серебряного микропровода обладают хорошей электропроводностью, биологической инертностью (нетоксичностью), высокой прочностью, возможностью надёжного и удобного крепления, отсутствием поляризации, высокой помехоустойчивостью к специфическим помехам, лёгкостью и пластичностью, физико-химической инертностью, стабильностью измерений, малыми габаритами и весом, простотой и долговечностью. За счет выскокой гибкости и небольшой кривизны, после прохождения трека поворотом манипулятора на небольшой угол позиционирует электрод в трек, отличный от исходного.

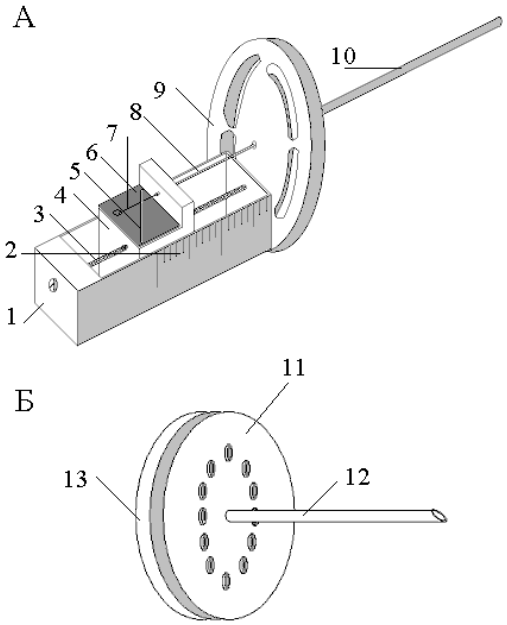

Рис. 1. Устройство для хронической внеклеточной регистрации внеклеточной нейронной активности у фиксированных животных. 1, А – алюминиевый корпус; 2, А – миллиметровая шкала; 3, А – винт; 4, А – ползунок; 5, А – контактный стержень; 6, А – контактная пластина; 7, А – электрод; 8, А – подводящая трубка; 9, А – крепежная шайба; 10, А – направляющая трубка; 11, Б – основание направляющей канюли; 12, Б – направляющая канюля; 13, Б – пластмассовая крышка.

В результате, вращением манипулятора достигается возможность изменения трека проходки электрода и неограниченная глубина погружения электрода. Конструкция электродов предусматривает возможность надёжного и удобного крепления.

Детали крепления микроманипулятора. На черепе животного крепежная шайба микроманипулятора крепится к основанию направляющей канюли винтами (рис. 1. – 11, А).

Порядок работы с устройством. Направляющая канюлю (рис. 1. – 12, А) вводили в мозг в соответствии со стереотаксическими координатами исследуемой структуры таким образом, чтобы её кончик располагался в 2-3 мм от зоны отведения электрической активности нейронов животного. Её основание (рис. 1. – 11, А) с помощью зубного цемента фиксируется к костям черепа.

Животное находилось в магнито-экранированной камере. Снимается предохранительная крышка (рис. 1. – 13, А), прикрывающая основание (рис. 1. – 11, А). С помощью винтов с резьбой, соответствующей резьбовым отверстиям основания (рис. 1. – 11, А) корпус манипулятора крепится к направляющей канюле (рис. 1. – 12, А). Электрод (рис. 1. – 7, А) припаянный к контактной пластине (рис. 1. – 5, А) посредством штыревого контакта подключается к предусилителю для усиления электрической активности нейронов. Погружение электрода (рис.1. – 7, А) осуществляется посредством вращения винта (рис. 1. – 3, А). Микрометрическая подача микроманипулятора обеспечивает плавное перемещение электрода на 10-15 мм и надежную фиксацию на заданной глубине.

Величина перемещения в данном устройстве определяется шагом резьбы винта и составляет 0,35 мм на 1 оборот. Это позволяет отводить электрическую активность нейронов коры и глубинных структур мозга животного с точным учётом локализации структур в соответствии со стереотаксическими координатами. Малые габариты и масса (высота корпуса устройства 34,5 мм, масса с электродом 7,8 г) позволяют устанавливать его на черепе любых экспериментальных животных (крыс, кроликов, кошек и др.).

ФИА нейронов, отводимая микроэлектродом, поступала на вход миниатюрного предварительного усилителя. Малые габариты и вес предварительного усилителя позволяют устанавливать его в непосредственной близости от микроманипулятора на голове животного. Это также обеспечивало минимизацию сетевых наводок и артефактов движения. С электрофизиологической установкой предварительный усилитель соединяли тонким и гибким кабелем. Дальнейшее усиление импульсной активности и массовой электрической активности неокортекса осуществлялось с помощью установки УФУ-БК (производство ЭПМ НИИЭМ РАМН, Санкт-Петербург). Полоса пропускания тракта импульсной активности нейронов составляла 10-10000 Гц.

Оригинальные потенциалы действия поступали через лабораторный интерфейс на вход компьютера IBM PC. Частота оцифровки нейронной активности составляла 10000 $с^{-1}$.

В процессе исследования характера регистрации экстраклеточной активности нейронов головного мозга на каждом из двух животных сделано от 50 до 100 треков. Время работы устройства достигало одного года. В результате выявлен следующий характер регистрации экстраклеточной активности нейронов головного мозга мягкофиксированных кошек. На качество записи нейронной активности практически не оказывали влияние движения животного. Амплитуда потенциалов

действия зарегистрированных нейронов достигала 150 вкВ. Амплитуда шума при этом достигала 25 мкВ (рис. 2).

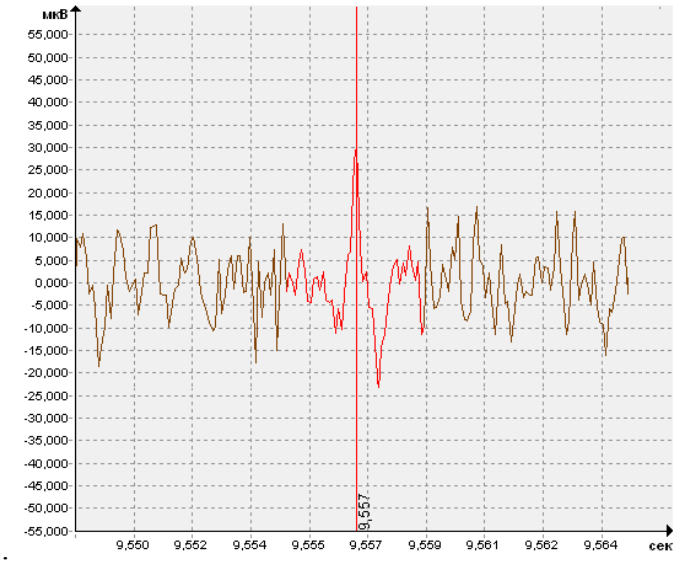

Рис. 2. Пример записи потенциала действия исследованного нейрона.

Таким образом, отношение сигнал/шум удовлетворяет требованиям эксперимента.

Малые габариты и масса (максимальная высота 23,8 мм, максимальный диаметр 5,6 мм, масса устройства с электродом, отводящим проводом и деталями крепления 0,9 г) позволяют устанавливать данный микроманипулятор на черепе любых экспериментальных животных (крыс, кроликов, кошек и др.). Микроманипулятор легко разбирается, благодаря чему замена изношенных частей не вызывает затруднений. Кроме того, предусмотрена возможность снимать устройство с черепа животного по окончании каждого эксперимента.

ВЫВОДЫ

1. Разработанное устройство для хронической внеклеточной регистрации внеклеточной нейронной активности у свободноподвижных животных сравнительно просто в изготовлении и эксплуатации и позволяет позиционировать электроды из серебряного микропровода во время длительных (до 1 года) экспериментов по регистрации нейронной активности у свободноподвижных животных.
2. Используемые в устройстве электроды позволяют погружения на большую глубину с возможностью измененять трек проходки.
3. Использование разработанного и описанного устройства позволит отводить электрическую активность нейронов у свободноподвижных животных с большим рабочим диапазоном, высокой чувствительности и избирательности

отведения активности и высокой точностью измерения глубины погружения электрода.

Список литературы

1. Костюк П.Г. Микроэлектродная техника : монография / П.Г. Костюк. – Киев: Наукова думка, 1960. – 130 с.
2. Воробьев Г.В. Новые модификации манипуляторов для микроэлектродных исследований / Г.В. Воробьев, В.Ф. Захаров // Физиол. журн. СССР. – 1972. – Т. 58, № 6. – С. 960.
3. Догадов А.А. Компактный микроманипулятор для хронического эксперимента / А.А. Догадов, Ю.В. Николаев, В.Н. Овощников // Физиол. журн. СССР. – 1974. – Т. 64, № 2. – С. 249.
4. Котляр Б.И. Активность нейронов дорсального гиппокампа у свободнопередвигающихся кроликов / Б.И. Котляр, О.Б. Зубова // Биол. Науки. – 1974, № 5. – С. 23.
5. Brown F.A. An orientation response to weak gamma radiation / F.A Brown // Biological Bulletin – 1963. – Vol. 125, №2. – P. 206–225.
6. Korshunov V.A. A micromanipulator for two-channel recording of neuron activity with high-impedance electrodes in freely moving animals / V.A. Korshunov // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 1999. – V. 29, № 6. – P. 677–680.
7. Гринченко Ю.В. Простой микроманипулятор для исследований нейронной активности у кроликов в свободном поведении / Ю.В. Гринченко, В.Б. Швырков // Журн. высш. нервн. деят-сти. – 1974. – Т. 24, № 4. – С. 870.
8. Куличенко А.М. Изменения ээг и активности предполагаемых дофаминергических нейронов вентрального тегментума при проведении сеансов обратной связи / А.М. Куличенко, Ю.О. Фокина, В.Б. Павленко // Нейрофизиология. 2009. – Т. 41, № 3. – С. 235–240.

Куліченко О.М. Пристрій для хронічної реєстрації позаклітинної нейронної активності у вільнорухомих тварин / О.М. Куліченко, В.Б. Павленко, Ю.О. Фокіна [та ін.] // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Сєрія „Біологія, хімія". – 2010. – Т. 23 (62). – № 1. – С. 52-57.

Розроблена і описана конструкція пристрою, що забезпечує можливість точного занурення мікроелектроду на необмежену глибину до досліджуваних структур мозку тварин.

***Ключові слова*:** мікроманіпулятор, електрод, нейронна активність.

Kulichenko A.M. Device for chronic registration of extra-cellular neuron activity at freely-moving animals / A.M. Kulichenko, V.B. Pavlenko, Y.O. Fokina [et al] // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – V.23 (62). – № 1. – P. 52-57.

Construction of device providing a possibility of exact immersion of microelectrode on an unlimited depth to the explored structures of animal brain is developed and described.

Keywords: micromanipulator, electrode, neuron activity.

Поступила в редакцию 02.03.2010 г.