

УДК 621.317

© В. В. Шугайло, В. В. Кононенко, **А. М. Хохлов**

## ПРИБОР ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ

В Институте биологического приборостроения РАН разработан и изготовлен "Прибор для измерения межклеточных потенциалов", состоящий из входного усилителя, контроллера связи с компьютером и блока питания. Прибор не содержит никаких ручек, все управление ведется от компьютера, на экране дисплея которого отображаются все установки и результаты измерения. Измерительный прибор имеет высокие метрологические характеристики — чувствительность, входное сопротивление, низкий уровень шумов, хорошую защиту от внешних помех, достаточную полосу пропускания. Кроме того, важными параметрами являются простота настройки, удобный интерфейс пользователя и доступность прибора по цене.

*Кл. сл.:* входной усилитель, контроллер, микроэлектрод, входное сопротивление, полоса частот, уровень шумов, межклеточный потенциал

### ВВЕДЕНИЕ

Электрофизиологические методы широко используются при проведении исследований в области физиологии клеток, клеточных образований и изучения их реакции на различные физические и биохимические воздействия. Электрическая активность клеточных систем — срезов тканей, изолированных нервов и отдельных нервных волокон — регистрируется экстраклеточными и внутриклеточными методами с использованием как низкоомных металлических электродов, так и высокоомных (свыше 10 МОм) стеклянных микроэлектродов.

Предметом интереса может быть спайковая активность (амплитуда 0.01–1 мВ, длительность импульса около 5 мс, частота до 100 Гц) или медленные биопотенциалы (ретинограмма, ольфактограмма, энцефалограмма) с характерным временем фронтов 0.1–10 с. Регистрация столь разнообразных по форме и амплитуде электрических сигналов, источником которых являются объекты с эквивалентным внутренним сопротивлением от 10 кОм (металлические микроэлектроды) до нескольких мегаом (стеклянные микроэлектроды), требует использования специализированных усилителей в каждом конкретном случае в зависимости от уровня полезного сигнала, величины синфазных помех, эквивалентной полосы частот и т. п.

И в отечественной, и зарубежной практике использование специализированных предусилителей было традиционным. Тем не менее в большинстве случаев электрический сигнал после специализированного предусилителя подвергался универсальным преобразованиям — масштабированию, фильтрации, накоплению, оцифровыванию и анализу на компьютере. Оцифрование обычно требу-

ет специализированного интерфейса, дополнительно вводимого в компьютер. Учитывая универсальность большинства стадий прохождения первоначального сигнала в регистрирующей аппаратуре, целесообразным является создание универсального прибора, который бы решал перечисленные задачи и специализированная функция которого была бы реализована лишь на уровне предусилителя. Целесообразно также формировать выходной сигнал двух типов — аналоговый и цифровой. Аналоговый сигнал можно визуализировать с помощью самописца или осциллографа, а цифровой выход можно обеспечить через универсальный порт, например USB, чтобы сигнал можно было бы подавать непосредственно в компьютер без использования дополнительных устройств.

Подобный прибор найдет применение в исследованиях, проводимых в институтах РАН, РАСХН и Минздрава, использующих методы электрофизиологии, а также в учебных заведениях.

При разработке данного прибора ставилась задача создать устройство с минимальным входным током для работы с высокоомными электродами, оптимальной для решаемой задачи полосой усиления, минимальными собственными шумами, возможностями удобной настройки оператором прибора на конкретную методику измерения, высокую надежность и доступную цену.

Исходя из поставленной задачи в Институте биологического приборостроения РАН был разработан и изготовлен "Прибор для измерения межклеточных потенциалов". Работы велись под научным руководством д.б.н., профессора С.С. Колесникова, зав. лабораторией молекулярной физиологии клетки Института биофизики клетки РАН, г. Пущино.

### ПРИНЦИП ПОСТРОЕНИЯ ПРИБОРА

В настоящее время, используются приборы, состоящие из усилителя, блока стимуляции и системы регистрации результатов измерений [1–4]. Результаты измерений сохраняют при помощи программного обеспечения на жестком диске компьютера, который выполняет роль накопителя и регистратора. Составные части приборов имеют большое количество органов управления и настройки параметров. Предполагается, что работающий на подобном приборе исследователь должен понимать степень влияния настроек на результаты измерений.

На качество результатов большое влияние оказывают помехи, вызванные работой лабораторного оборудования и оргтехники. Учитывая, что интересующие исследователя уровни измеряемых сигналов могут быть порядка единиц микровольт, а сопротивления микроэлектродов — десятки и сотни мегаом, требуется тщательное экранирование объекта исследования и входных цепей усилителя, а также организация эффективного заземления узлов прибора. Поскольку источники помех трудно контролировать непосредственно, то существует проблема уменьшения их влияния на результаты измерений [5, 6].

Переложение функций сбора данных, их обработки и управления на компьютер, оставив за самим прибором съем сигналов с биообъекта, их усиление и аналого-цифровое преобразование, позволило упростить управление прибором и повысить его гибкость.

Применение современных микропроцессорных контроллеров позволяет организовать эффективное управление параметрами прибора и удобный контроль его состояния. Использование микропроцессоров для управления усилением в схеме передачи данных и устройстве сопряжения с компьютером не изменяет существенно цену прибора, но придает ему принципиально новые возможности при планировании и выполнении экспериментов.

Подключение прибора к управляющему компьютеру осуществляется через порт USB.

Прибор для электрофизиологических исследований включает в себя следующее.

1. Входное устройство (головка).
2. Контроллер.
3. Блок питания.
4. Программное обеспечение.

На рис. 1 представлена структурная схема прибора.

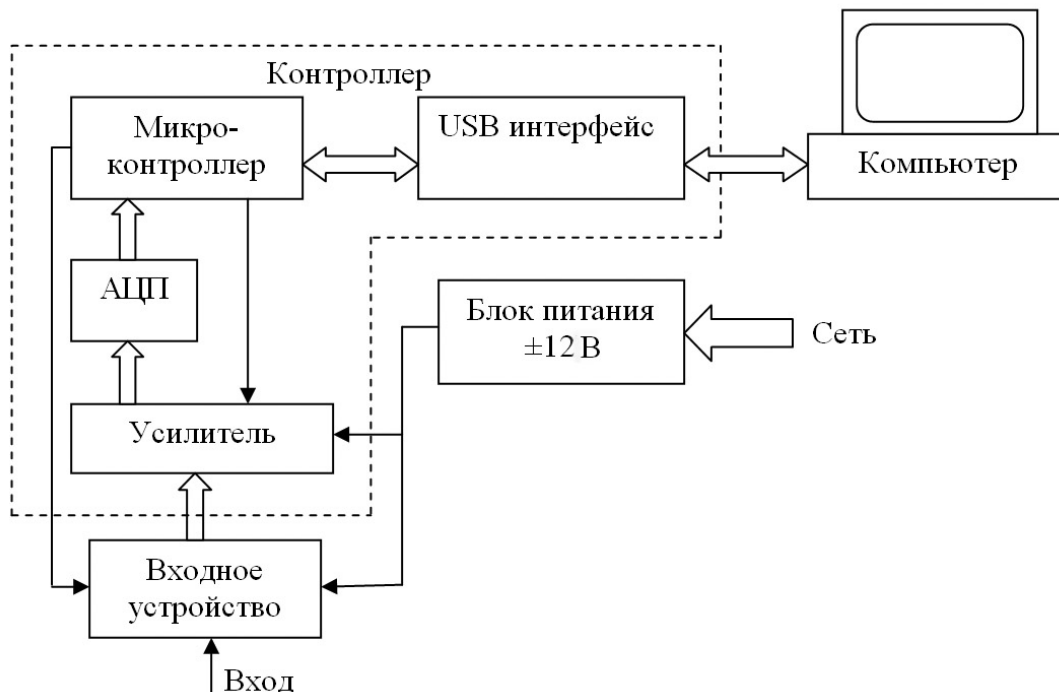


Рис. 1. Структурная схема прибора

**Назначение частей блок-схемы**

- Входное устройство (головка) выполняет роль предварительного усилителя сигнала по току и трансформатора входного импеданса.
- Контроллер усиливает аналоговый сигнал головки по напряжению, преобразует его в код, корректирует смещение нулевой линии входного сигнала, компенсирует влияние входной емкости электрода и через USB-порт принимает или передает данные в компьютер.
- Блок питания питает двухполярным напряжением аналоговые усилители.
- Компьютер обрабатывает полученные данные, отображает результаты обработки на экране монитора, управляет контроллером и входным устройством.

Для получения высоких параметров разрабатываемого прибора применены современные электронные компоненты — малошумящие высокостабильные операционные усилители (ОУ) с полевыми транзисторами, имеющие достаточно широкий диапазон полосы усиливаемых частот и специальные цифровые резисторы, управляющие коэффициентами усиления ОУ. Для снижения уровня шумов разработчики отказались от активных дискретных элементов. Это повысило надежность, технологичность и снизило себестоимость изделия.

**Структурная схема входного устройства** показана на рис. 2. Входной сигнал от электрода подается на прямой вход ОУ А2 типа AD712JR, являющегося прецизионным спаренным усилителем с низкими шумами и большими входными со-

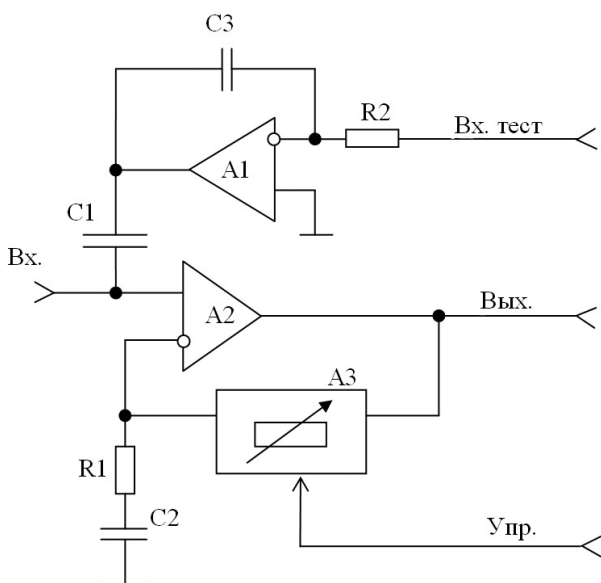


Рис. 2. Структурная схема входного устройства

противлениями. Его параметры: входной ток не более 26 нА, входное сопротивление не менее 100 ГОм, среднеквадратичное значение напряжения шума, приведенного ко входу, не более 2 мкВ в диапазоне от 0–10 Гц, корпус SOIC.

На ОУ А1 и управляемом резисторе А3 типа AD5290 выполнен компенсатор входной емкости усилителя. Эта емкость состоит из емкости электрода и входной емкости ОУ А2. Совместно с сопротивлением электрода она образует фильтр нижних частот (ФНЧ), ограничивающий полосу пропускания прибора и искажающий форму входного импульса.

Для компенсации этих искажений выполнен их имитатор: на вход ОУ А1 подается тестовый прямоугольный сигнал. Он интегрируется цепью А1, С3, R2 (имитируя искажения) и через конденсатор очень малой емкости С1 подается на вход ОУ А2, который совместно с А3, R1 и С2 образует фильтр верхних частот (ФВЧ). При условии равенства постоянных времени этих фильтров искажения будут скомпенсированы. Постоянная времени ФВЧ изменяется путем управления от компьютера переменным резистором А3. Момент компенсации определяется по отсутствию искажений тестовых импульсов на экране монитора.

Для уменьшения внешних помех питание входного усилителя производится от отдельного линейного стабилизированного блока питания напряжением ±12 В.

Усиленный по току сигнал поступает на вход контроллера, который служит для усиления сигнала по напряжению, преобразования его в двенадцатиразрядный цифровой код и передачи в компьютер через USB-интерфейс. Управление всеми узлами производится микроконтроллером по командам от компьютера.

Усиление сигнала по напряжению производится в ОУ контроллера, коэффициент усиления которого может меняться от 10 до 1000 по сигналам компьютера, команды которого через процессор воздействуют на управляемый резистор обратной связи ОУ (микросхемы AD5290). Аналогоцифровой преобразователь собран на микросхеме AD7893 с опорным источником напряжения AD870. Входная шкала ±10 В, число разрядов 12. Управление работой узлами прибора осуществляется от микроконтроллера ATtiny2313, связанного с компьютером через USB-порт через управляющую микросхему FT232RL.

Питание всех микросхем контроллера, кроме ОУ, производится от USB-шины; операционный усилитель питается от того же источника питания, что и входной усилитель.

**Структурная схема контроллера** показана на рис. 3. Конструктивно контроллер размещен в пластмассовом корпусе, с одной стороны которого



Рис. 3. Структурная схема контроллера

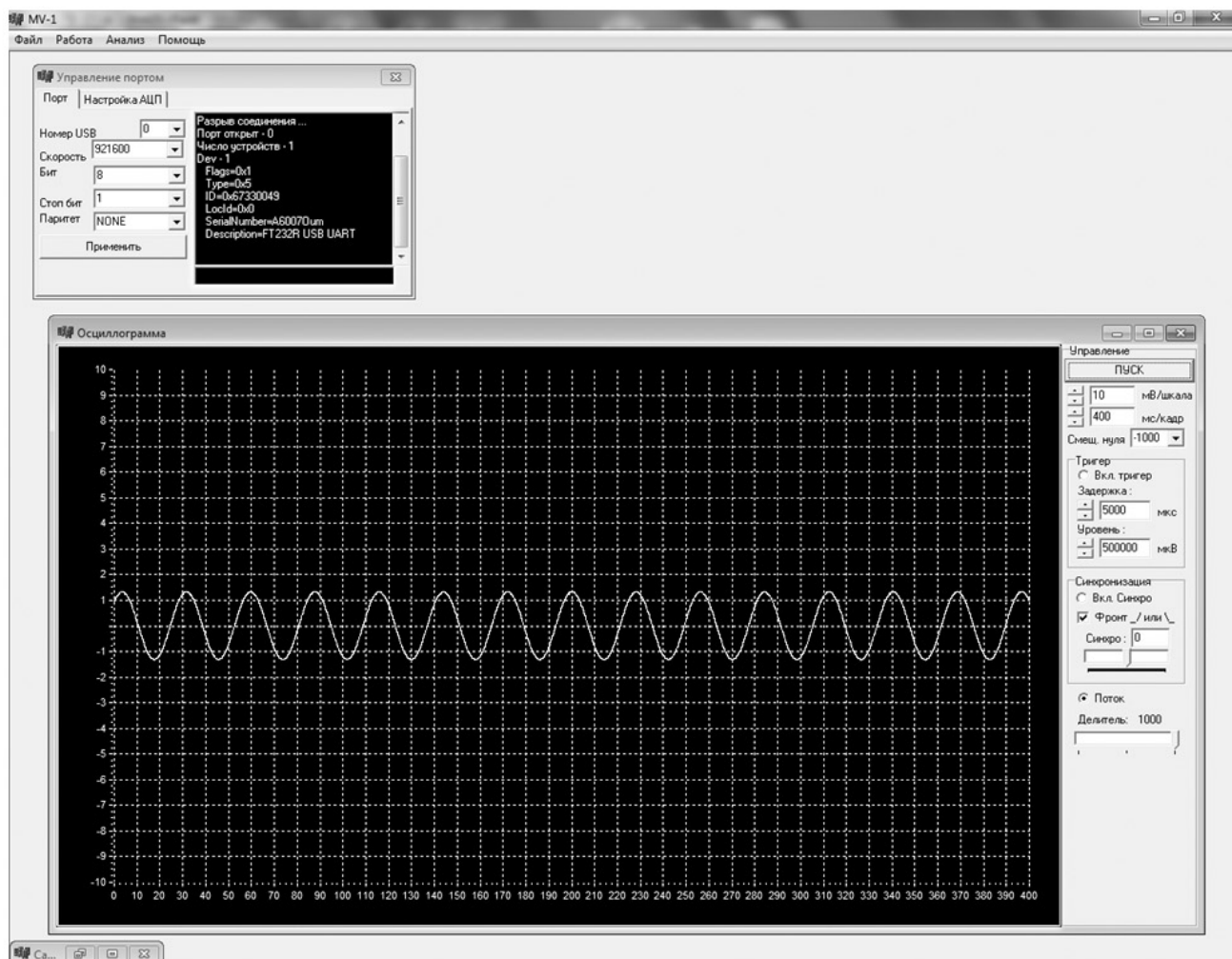


Рис. 4. Внешний вид экрана компьютера в режиме Осциллограф. Входной сигнал амплитудой 1.3 мВ и частотой 40 Гц

находится разъем USB, с другой — разъем связи с входным устройством.

**Программное обеспечение прибора (ПО)** состоит из управляющей программы для компьюте-

ра и программы управления микроконтроллером.

Управляющая программа работает в ОС WINDOWS и обеспечивает:

- автоматический поиск при запуске подключенного через интерфейс USB устройства;

- выбор режима работы, задание параметров, настроек;
- отображение в окне графиков измеренных потенциалов (отображаемые графики синхронизированы и представляют динамику изменения потенциалов во времени);
- сохранение в файле измеренных значений;
- сохранение настроек при выходе из программы для использования при последующих запусках.

ПО позволяет управлять режимами работы прибора и алгоритмами цифровой обработки сигналов в мультиоконном режиме. Прибор имеет два основных режима приема входной информации: Осциллограф (режим 1) и Самописец (режим 2). В первом режиме прибор является цифровым осциллографом — принимает входную информацию в виде потока, оцифровывает ее, записывает в память ПК и отображает на экране дисплея. Поток сигналов может быть асинхронный или синхронизироваться по входному сигналу. Уровень дискриминации входного сигнала (амплитуда запуска) устанавливается на экране ПК. Возможна задержка времени развертки относительно момента запуска с целью наблюдения переднего фронта сигнала. Величину времени задержки можно устанавливать в окне ПК, пример реализации которого показан на рис. 4. При такой синхронизации появляется возможность запуска процесса не только от электрического, а и от химического стимула.

Режим 2 ( Самописец ) предполагает регистрацию весьма медленных процессов без изменения частоты опроса АЦП. При этом в память записываются не все измерения, а часть — через одну, две, четыре точки и т. д. На экране монитора формируется развертка входного сигнала за установленное от компьютера время. Кратность изменений также задается от компьютера. Для уменьшения влияния различных помех и шума на результаты измерений кроме обычного экранирования применена цифровая фильтрация сигнала методом кубической интерполяции по формуле [7]:

$$f(x) = ax^3 + bx^2 + cx + d,$$

где

$x$  — абсцисса текущей точки;

$$\begin{aligned} a &= [y(3) - y(2)] - [y(0) - y(1)]; \\ b &= [y(0) - y(1)] - a; \\ c &= y(2) - y(0); \\ d &= y(1); \end{aligned}$$

$y(0)$ – $y(3)$  — ординаты четырех ближайших точек.

## РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Изготовленный прибор был испытан на реальных объектах в Институте биофизики клетки РАН. Измерялись трансмембранные потенциалы обонятельного эпителия, изменяющиеся в ответ на стимуляцию эпителия различными пахучими веществами. Измерения производились стеклянным микроэлектродом с сопротивлением 1 МОм. Размер клетки эпителия от 5 до 20 мкм.

Как показали испытания, технические и эксплуатационные параметры испытываемого прибора значительно превышают параметры существующих аналогов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Перенесение функциональной обработки сигналов из прибора в компьютер позволило создать удобный, недорогой прибор с высокими метрологическими параметрами и простым интерфейсом пользователя. Модификация прибора под различные задачи исследования может производиться путем изменения ПО компьютера, не затрагивая конструкцию.

2. Применение современных прецизионных операционных усилителей со входом на полевых транзисторах позволило изготовить входное устройство прибора с очень низкими собственными шумами, высоким входным сопротивлением и достаточной для поставленной задачи полосой частот, не прибегая к использованию навесных активных элементов. Это уменьшило габариты входного устройства, устанавливаемого обычно под экраном на микроманипулятор микроскопа.

3. Применение входных микросхем в сверхминиатюрном корпусе позволило уменьшить габариты устройства и собственную емкость ОУ по отношению к внешним поверхностям, что существенно снизило наводки на ОУ и исключило микрофонный эффект входного устройства даже при изготовлении его корпуса из тонкого листового металла.

4. Комбинированная схема синхронизации съема данных позволила получить информацию при химическом способе запуска прибора.

### *Полученные параметры прибора*

- Входное сопротивление: 100 ГОм.
- Входной ток: 10 нА.
- Полоса частот входного сигнала: 0–10 кГц.
- Среднеквадратичное напряжение шума, приведенного по входу: 2 мкВ.
- Компенсация входной емкости: до 25 пФ.
- Компенсация сдвига нуля: ±50 мВ.

- Интерфейс связи с компьютером: USB.
- Диапазон входных напряжений АЦП:  $\pm 10$  В.
- Число разрядов АЦП: 12.
- Коэффициент усиления аналогового тракта: от 10 до 1000.
- Габариты, вес  
входного устройства: 35×10×70 мм, 50г;  
контроллера: 125×60×30 мм, 200 г;  
блока питания: 80×82×55 мм, 400 г.

Разработана конструкторская документация, позволяющая тиражировать прибор малыми сериями.

5. *Первис Р.* Микроэлектродные методы внутриклеточной регистрации и ионофореза. Пер. с англ. М.: Мир, 1983. 208 с.
6. *Барнс Д.* Электронное конструирование: методы борьбы с помехами. Пер. с англ. М.: Мир, 1990. 283 с.
7. *Кирьянов Д.В., Кирьянова Е.Н.* Вычислительная физика. URL: (<http://www.polybook.ru/comm/>).

*Институт биологического приборостроения  
с опытным производством РАН,  
г. Пущино Моск. обл.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. URL: (<http://www.wpiinc.com/>).
2. URL: (<http://www.dagan.com/2400a.html>).
3. URL: (<http://www.heka.com/physio/equipment/interfaces/itc18.html>).
4. URL: (<http://www.biotechnologies.ru/>).

Контакты: *Кононенко Владимир,*  
Vovakonog@rambler.ru

Материал поступил в редакцию 30.05.2011.

## INSTRUMENT TO MEASURE INTERCELLULAR POTENTIALS

V. V. Shugaylo, V. V. Kononenko, **A. M. Khokhlov**

*Institute for Biological Instrumentation with Manufacturing Facilities of the RAS, Pushchino, Moscow region*

The "Device for measuring intercellular potentials" consisting of the entrance amplifier, controller of connection with the computer and a power unit was developed and made in Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences. The device has no handles; control is by the computer, which display shows all installations and results of measurement. The measuring device has high metrological characteristics - sensitivity, entrance resistance, low noise level, good protection against environmental disturbances, sufficient pass-band. Besides, the important parameters are simplicity of the adjustment, friendly users interface and availability of the device under the price.

*Keywords:* entrance amplifier, controller, microelectrode, entrance resistance, strip of frequencies, noise level, intercellular potential