

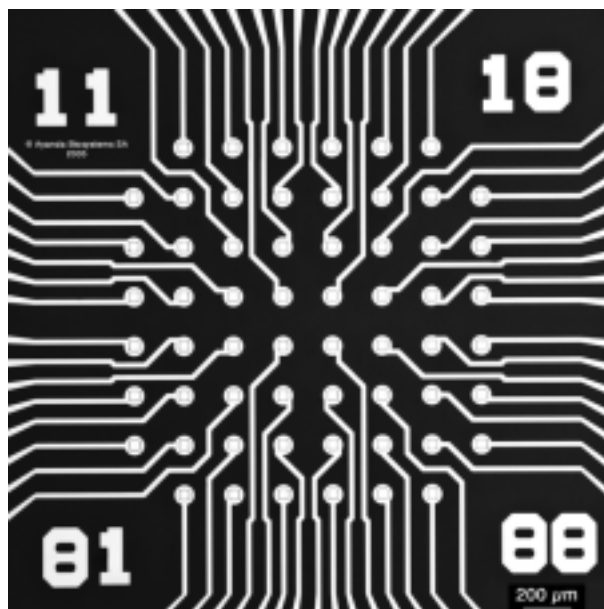
Zajem in obdelava signalov dinamičnega elektrokemičnega potenciala celic

Erik Margan

Že dolgo je znano, da živčne celice in še nekatere druge celice živih organizmov sproščajo svoj elektrokemični membranski potencial v obliki kratkih impulzov ali ponavljajočih se večkratnih pulzov, ki se v primeru živčnih celic prenašajo po nevronskih vlaknih do sinaps, ter naprej do ostalih celic v organizmu.

Raziskovanje teh pojavov v živih organizmih predstavlja resen etični problem, povrh pa tudi tehnično-tehnološki, ter biološki, oziroma medicinski problem.

Zato se je v zadnjem času razvila tehnika opazovanja teh pojavov *in vitro*, torej v laboratorijskih pogojih v posebej za ta namen prirejeni posodi, poljudno imenovani *bio-chip*. Osnovna značilnost teh posod je na steklenem ali keramičnem dnu postavljena gosta mreža elektrod, običajno razmaknjenih za 0,1 do 0,2 mm, s premerom okoli 0,05 mm, na katero postavimo bodisi bio-električno aktivno tkivo, bodisi gosto skupino celic, zalito v posebej prirejeno raztopino v kateri celice lahko živijo. Prek elektrod potem zajemamo električni tok, ki je posledica šibkih sproščanj elektrokemičnega potenciala celic. Elektrode, ki morajo biti narejene iz biokemično nevtralne kovine (najpogosteje platine), so ponavadi razporejene v obliki matrike 8×8, pri čemur več manjših ali ena večja elektroda, ki obkroža vse ostale, predstavlja referenčni električni potencial, prek katerega se električni tok zaključuje. **Sl.1** predstavlja eno možnih oblik elektrod.



Sl.1: Mreža elektrod na dnu bio-chipa (povečava 35×). Okrogle elektrode na zgornji strani stekla so s prevodnimi kanali povezane na linije na spodnji strani, ki vodijo do naprave za zajem signalov.

Signali, ki jih oddajajo celice so zelo šibki. Njihova napetost znaša, odvisno od vrste celic in lastnosti raztopine v kateri se nahajajo, od 10 do 500 μV (1 μV je ena milijoninka volta), jakost toka pa pogosto znaša le nekaj nA (1 nA je ena milijardinka ampera). Zato je zajem teh signalov tehnično izredno zahtevna naloga.

Raztopina, v kateri celice živijo, mora biti rahlo električno prevodna in njena prevodnost predstavlja tudi določeno breme za celične signale, ki jih delno oslabi. Zato je električno vezje, ki naj zajame te signale, soočeno z dvema nasprotujočimi se zahtevami: po eni strani mora biti vhodna impedanca (kompleksna upornost) vezja kar se da velika, da čim manj obremenjuje celice; po drugi strani pa visoka vrednost upornosti pomeni tudi veliko termičnega šuma, ki zakrije celični signal. Problem termičnega šuma dodatno poveča zahteva po vzdrževanju ustrezne temperature okolja v katerem bivajo celice, okoli 37°C, in termični šum s temperaturo narašča.

Naivno bi pričakovali, da v prevodniku, ki ni priključen na noben napetostni vir tudi nobenega toka ni. Vendar se izkaže, da nosilci električnega naboja (prosti elektroni) v prevodniku čutijo tako medsebojna električna polja, kot tudi termična naključna nihanja atomov okoli njihove ravnovesne lege v snovi, zato se obnašajo tako kot gruča frnikol v škatli, ki jo močno tresemo. Tako v vsaki snovi v kateri obstajajo ionizirani atomi in prosti elektroni imamo opravka tudi s termičnim šumom. Povprečna moč šuma je tako sorazmerna z absolutno temperaturo, z efektivno vhodno upornostjo, ter s širino frekvenčnega območja, ki ga zaznavamo. Ker je moč sorazmerna kvadratu napetosti, narašča šumna napetost sorazmerno korenu iz zmnožka temperature, upornosti in pasovne širine.

Če privzamemo, da v snovi pri običajnih temperaturah gostota šume moči sledi Gaussovi porazdelitvi, lahko na osnovi statističnih metod izračunamo da ima termični šum spektralno obliko *belega šuma* (po analogiji z belo svetlobo, v kateri so prisotna nihanja na vseh frekvencah v enaki meri). Zato je gostota moči med, denimo, 100 in 200 Hz enaka kot med 1100 in 1200 Hz ali 10100 in 10200 Hz (1 Hz je frekvenca ki ustreza enemu celemu nihaju v sekundi). Vendar človeško uho zaznava frekvenčna razmerja v logaritmičnem merilu, kjer glasbena oktava predstavlja podvojitve frekvence. Ker je v višji oktavi, denimo med 1000 in 2000 Hz, dvakrat več frekvenc kot v nižji, denimo med 500 in 1000 Hz, tudi šumna gostota v logaritmičnem merilu narašča s frekvenco. Če torej beli šum močno ojačimo in priključimo na zvočnik, bomo zaznavali predvsem visoke frekvence. In če šum pogledamo na osciloskopu (instrumentu ki kaže trenutno vrednost signala v časovni odvisnosti) bomo videli da ta zgloda kot nekakšna trava. Kakršen koli drugi signal, ki zaseda omejeno frekvenčno območje, bo preprosto dodan šumu.

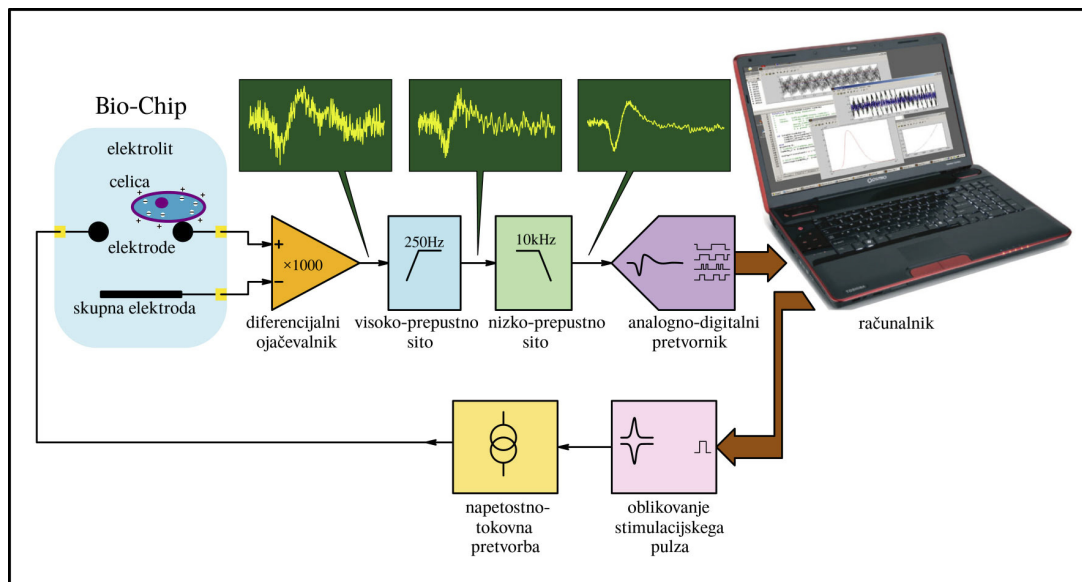
Poleg belega šuma v uporih, nastopa pri aktivnih komponentah ojačevalnikov (tranzistorji) še nekaj fizikalnih pojavov, ki za posledico imajo povečan šum. Na nizkih frekvencah je najbolj značilno puščanje polprevodniških P-N spojev. P-N spoji se obnašajo kot nekakšni ventili, ki v prevodni smeri prepuščajo tok, v zaporni pa ne. Vendar zaradi kvantnih naključij noben P-N spoj ni idealen in nekaj malega toka le teče tudi v zaporni smeri. To puščanje ima frekvenčni spekter, ki narašča z nižanjem frekvence, zato mu matematično pravimo $1/f$ šum. Teoretično bi pri zelo nizkih frekvencah ta naraščal v neskončnost, vendar zaradi omejenih dimenzij vezja in posledično kratke povprečne poti prostih nosilcev naboja ta šum doseže maksimum pri frekvenci okoli 0.1 Hz, nakar spet pada. Ta šum se, tako kot signal, dodaja ostalim šumnim frekvencam.

Posledično nam v boju s šumom ne preostane drugega, kot da naredimo efektivno upornost med elektrodami in celicami kar se da majhno, ne da bi obenem preobremenili celico, za ojačevalnik vzamemo take tranzistorje, ki imajo kar se da

majhen lastni šum, ter končno omejimo pasovno širino sistema na le tiste frekvence znotraj katerih najdemo celični signal.

Pasovno širino sistema omejimo s *filtri*. Te si lahko predstavljamo kot frekvenčna sita, ki prepuščajo le tiste frekvence, katerih valovi so krajši od karakteristične frekvence filtra (vrzeli v situ). To dosežemo z uporabo frekvenčno odvisnih pasivnih komponent, kot so kondenzatorji in tuljave. Upori ne izkazujejo frekvenčne odvisnosti (vsaj ne znotraj frekvenčnega pasu ki nas zanima). Kondenzator se obnaša kot razklenjen tokokrog pri nizkih frekvencah, zato le teh ne prevaja. Če damo kondenzator zaporedno z vzporedno vezano upornostjo dosežemo, da se signal deli v razmerju njunih upornosti na različnih frekvencah, torej bomo višje frekvence spustili skozi, nizke pa ustavili. Če pa vezje obrnemo dosežemo obraten učinek, da gredo nizke frekvence skozi, visoke pa ne. Z ustrežno izbiro vrednosti posameznih komponent dosežemo, da naše vezje prepušča le natanko določen frekvenčni pas. Tuljave so pri nizkih frekvencah velike in tudi občutljive za magnetna polja, zato se njihovi uporabi raje izognemo. Vendar obstaja možnost, da z uporabo aktivnih komponent (tranzistorjev, ali v ojačevalnik vezano skupino tranzistorjev) obrnemo obnašanje kondenzatorjev in tako simuliramo induktivnost tuljave. V takem primeru govorimo o aktivnih filtrih.

Kvaliteta filtrov nam govori o njegovi uglašenosti in gladkosti (dušenju neenakomernosti) v prepustnem delu frekvenčnega območja, od stopnje filtra (števila uporov in kondenzatorjev) pa je odvisna ostrina rezanja v neprepustnem delu frekvenčnega območja, ki se kaže v večjem ali manjšem naklonu frekvenčne odvisnosti. Na **SI.2** je blokovni načrt celotnega sistema za zajem celičnih signalov.



SI.2: Blok shema sistema za zajem celičnih signalov. Spremembe električnega potenciala na celični membrani (in posledično toka skozi elektrolit v katerega so potopljene celice) zajame najbližja elektroda. Razliko napetosti med to in referenčno skupno elektrodo ojači ojačevalnik za približno $1000\times$ in poveča signal na velikost v območju od 10 do 500 mV, kar že zadošča da signal pretvorimo v digitalno (številčno) obliko. Vendar se prej s pomočjo ustreznih filtrov znebimo odvečnega šuma na prenizkih in previsokih frekvencah. Digitalni signal prenesemo v računalnik prek USB vrat, kjer ga nato dodatno obdelujemo in analiziramo. Računalnik lahko celice tudi vzbudi s podobnimi pulzi, s katerimi posnema celični odziv in doseže, da se celica odzove enako, kot če bi jo vzbujala sosedna celica.

Celice občasno spontano sproščajo svoj elektrokemični potencial, vendar se tudi pogosto odzivajo na spremembo potenciala sosednjih celic. Od tod ni daleč misel, da s pomočjo podobnih pulzov, kot jih lahko zaznamo, celice tudi umetno vzbudimo. V ta namen potrebujemo oblikovalec digitalnih pulzov v analogne (zvezno spremenljive) količine in dobljeno napetost spremenimo v tok primerne jakosti, ki ga napeljemo na vzbujevalno elektrodo (v splošnem je to lahko tudi ista elektroda na kateri po kratkem času zaznamo tudi odziv vzbujene celice).

Na tak način si prizadevamo vzpostaviti povratno zanko zaporednega vzbujanja in zaznavanja signalov. Ob ustrezni analizi in interpretaciji odziva celic lahko dosežemo, da se celice naučijo določenega odziva na ustrezno prirejene dražljaje.