

تکنیک Voltage-Clamp در الکتروفیزیولوژی

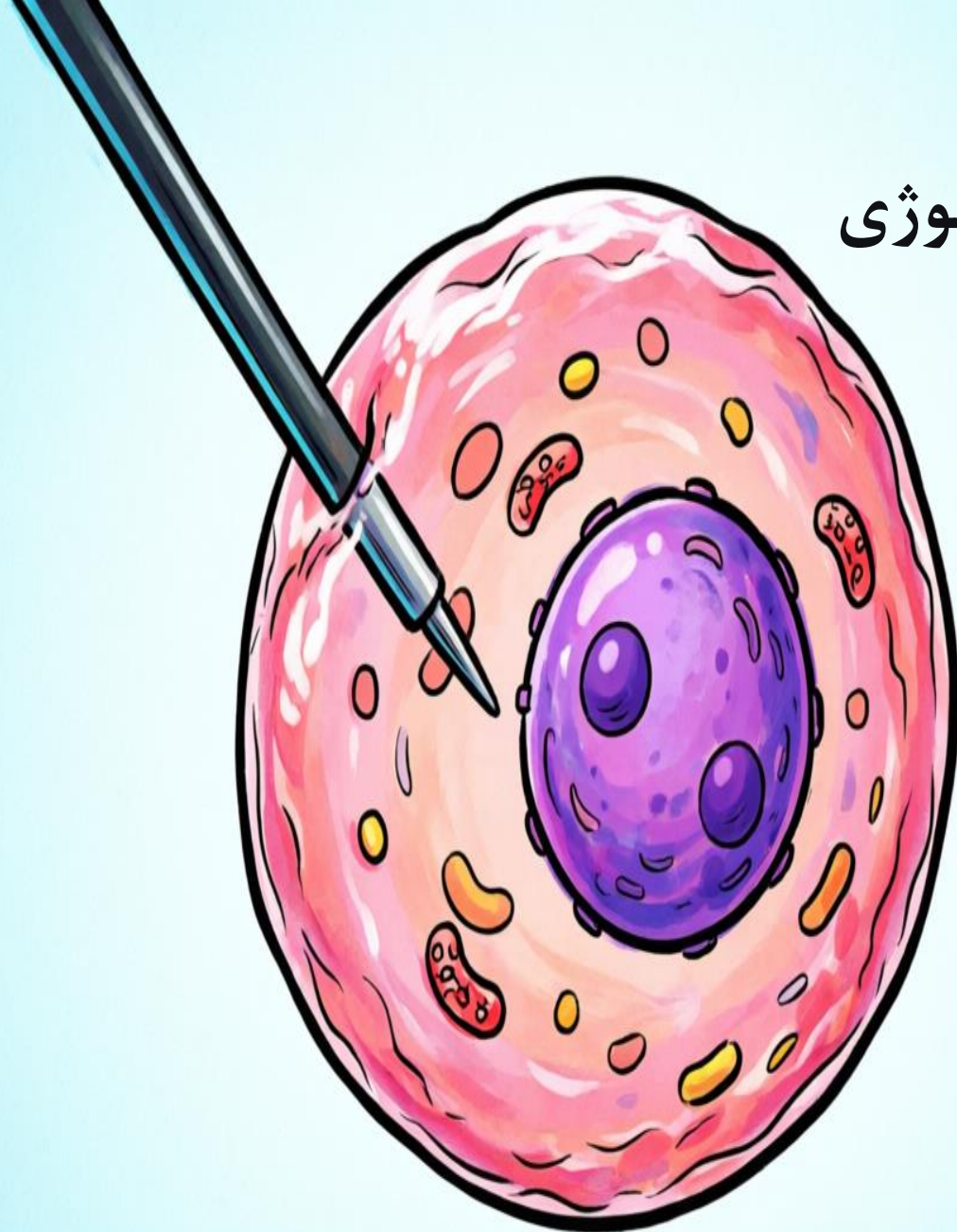
مروری بر روش‌های کلاسیک و مدرن اعمال کلمپ ولتاژ بر روی سلول‌های
عصبی و عضلانی

استاد مربوطه: دکتر علی مالکی

دانشجو: علی یزدانفرد



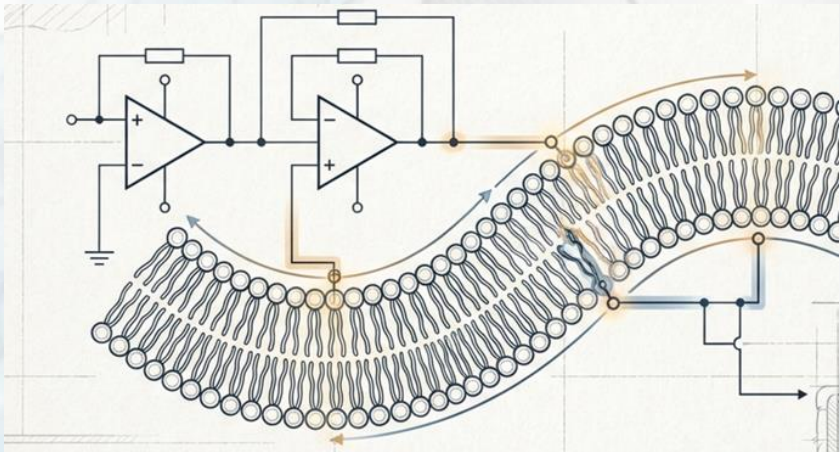
تابستان ۱۴۰۵

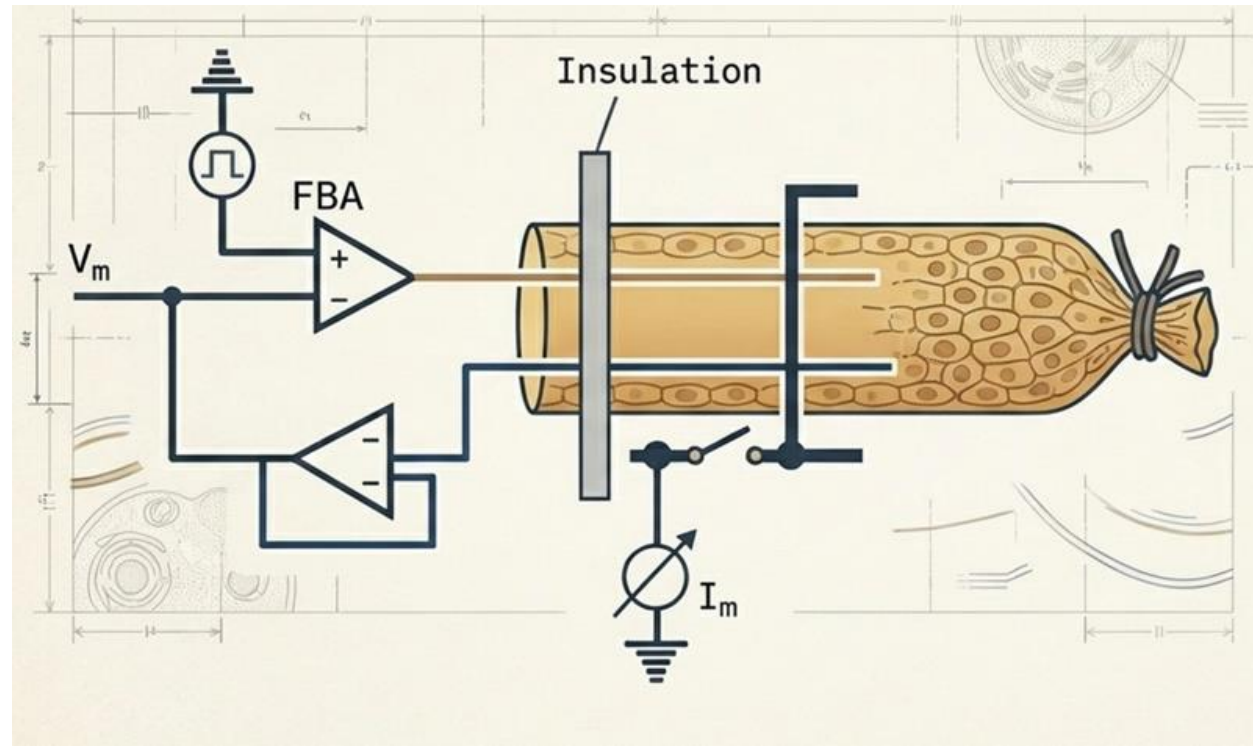


در تکنیک Voltage Clamp ولتاژ غشای سلول روی یک مقدار ثابت نگه داشته می‌شود. هر زمان جریان‌های یونی بخواهند ولتاژ را تغییر دهند، دستگاه جریان مخالف را تزریق می‌کند تا ولتاژ ثابت بماند. بنابراین جریان تزریق‌شده نشان‌دهنده جریان یونی واقعی غشا است.

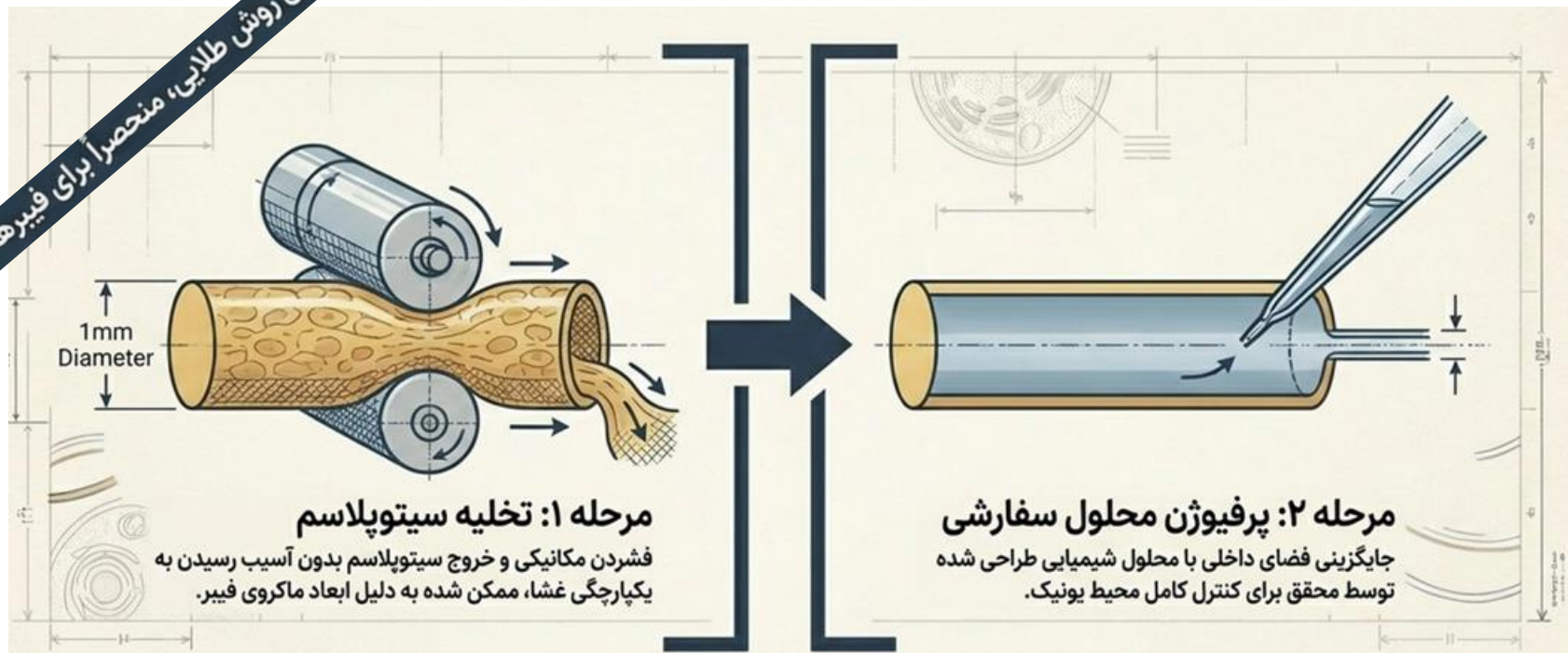
چرا به جای اندازه‌گیری ولتاژ، جریان را اندازه می‌گیریم؟

چون ولتاژ را خودمان ثابت نگه داشته‌ایم؛ بنابراین هر جریانی که دستگاه برای ثابت نگه داشتن ولتاژ تزریق می‌کند، همان جریان یونی غشا است.





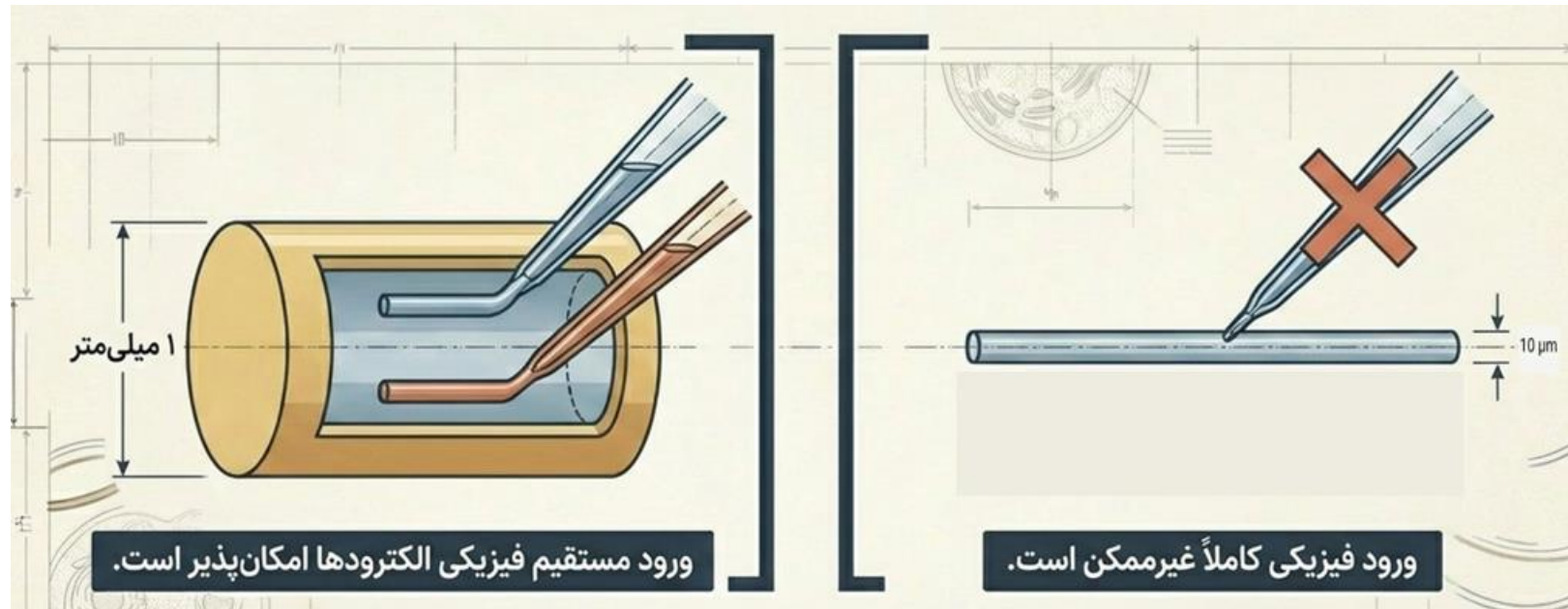
اولین آزمایش‌های موفق تکنیک Voltage Clamp توسط آلن هاککین و اندرو هاکسلی روی آکسون غول‌پیکر ماهی مرکب انجام شد. دلیل انتخاب ماهی مرکب این بود که آکسون آن قطر بسیار بزرگی، حدود ۰٫۵ تا ۱ میلی‌متر، دارد؛ در حالی که قطر آکسون‌های انسان معمولاً فقط چند میکرومتر است. این قطر بزرگ باعث می‌شد بتوان به راحتی الکترودها را داخل آکسون قرار داد و ولتاژ و جریان‌های یونی را با دقت اندازه‌گیری کرد. با استفاده از این تکنیک، آن‌ها توانستند برای نخستین بار جریان‌های سدیم و پتاسیم را به صورت جداگانه بررسی کنند و نقش هر یک را در ایجاد پتانسیل عمل مشخص کنند. نتایج این تحقیقات پایه و اساس مدل معروف هاککین-هاکسلی شد که هنوز هم یکی از مهم‌ترین مدل‌های الکتروفیزیولوژی محسوب می‌شود و به همین دلیل این دو دانشمند جایزه نوبل فیزیولوژی و پزشکی را دریافت کردند.



در این آماده سازی ابتدا، با استفاده از غلتک‌های مخصوص، سیتوپلاسم داخل آکسون به آرامی تخلیه می‌شود، بدون آنکه غشای سلول آسیب ببیند. این کار به دلیل قطر بزرگ آکسون ماهی مرکب امکان پذیر است. سپس در مرحله دوم، فضای داخلی آکسون با یک محلول مصنوعی و با ترکیب یونی مشخص جایگزین می‌شود. این محلول توسط پژوهشگر طراحی می‌شود تا غلظت یون‌هایی مانند سدیم، پتاسیم و کلر به طور دقیق کنترل شود. با این روش، پژوهشگران می‌توانند اثر هر یون را به صورت جداگانه بر جریان‌های یونی و پتانسیل عمل بررسی کنند و نقش هر کانال یونی را با دقت بیشتری مطالعه نمایند.

چرا سیتوپلاسم را تخلیه می‌کنند؟

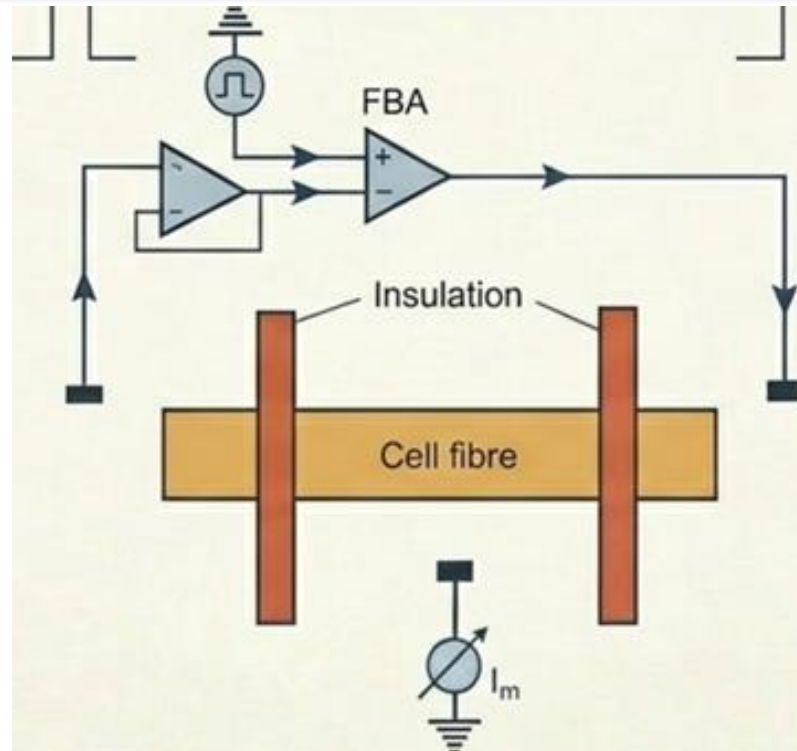
زیرا سیتوپلاسم طبیعی ترکیب یونی ثابتی ندارد و ممکن است روی نتایج آزمایش اثر بگذارد. با تخلیه سیتوپلاسم و جایگزینی آن با یک محلول مصنوعی، پژوهشگر می‌تواند شرایط داخل سلول را کاملاً کنترل کند و اثر هر یون را به صورت مجزا بررسی کند.



در این شکل، تفاوت بین آکسون غول پیکر ماهی مرکب و آکسون های معمولی نشان داده شده است. در سمت چپ، آکسون ماهی مرکب با قطری حدود یک میلی متر دیده می شود که به دلیل قطر زیاد، امکان ورود مستقیم چند الکترودها به داخل آن بدون آسیب جدی به غشا وجود دارد. به همین دلیل، انجام آزمایش هایی مانند Voltage Clamp و اندازه گیری دقیق جریان های یونی روی این آکسون امکان پذیر بود. اما در سمت راست، یک آکسون معمولی با قطری حدود ۱۰ میکرومتر نشان داده شده است. این آکسون بسیار نازک است و ورود چند الکترودها به داخل آن عملاً غیرممکن یا همراه با آسیب شدید به سلول است. همین محدودیت باعث شد پژوهشگران به سمت توسعه روش های جدید و دقیق تر مانند Patch Clamp حرکت کنند که امکان مطالعه کانال های یونی را حتی در سلول های کوچک نیز فراهم می کند.

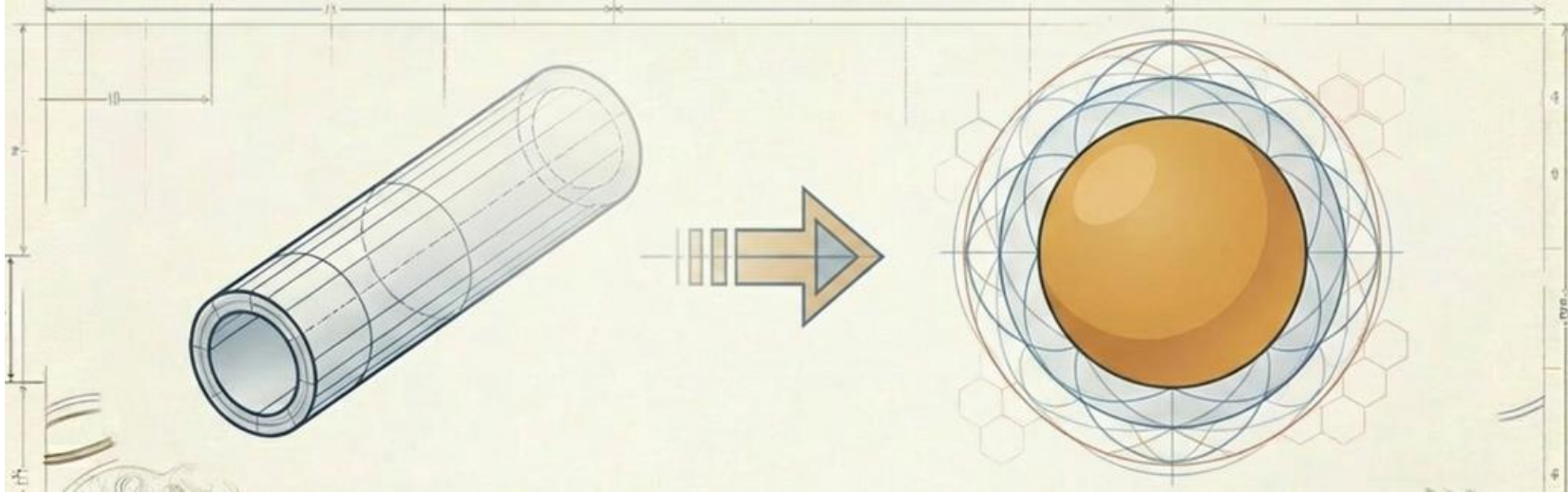
سوال کلیدی: وقتی قطر فیبر به ۱۰ میکرومتر کاهش می یابد، چگونه می توانیم بدون ورود فیزیکی الکترودها به داخل سلول، پتانسیل آن را کلمپ کنیم؟

تکنیک شکاف وازلین / ساکاروز برای محاسبه جریان یونی غشا در فیبرهای نازک



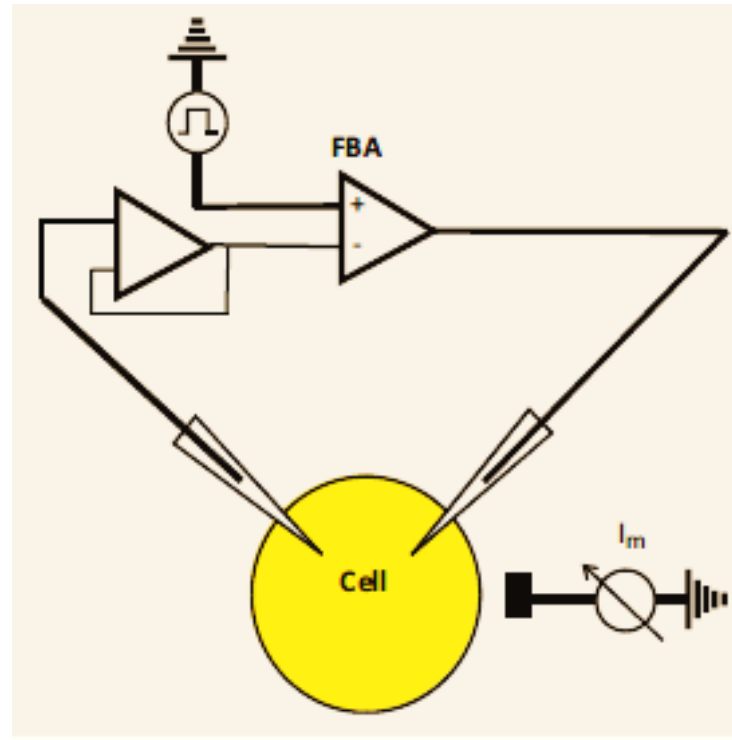
تکنیک شکاف وازلین یا ساکاروز (Vaseline/Sucrose-Gap) برای اندازه‌گیری دقیق جریان‌های یونی در فیبرهای عصبی و عضلانی طراحی شده است. در این روش، به جای وارد کردن چند الکتروود به داخل سلول، از شکاف‌هایی پر شده با وازلین یا محلول ساکاروز استفاده می‌شود تا بخش کوچکی از فیبر از نظر الکتریکی از سایر قسمت‌ها ایزوله شود. سپس از طریق انتهای بریده‌شده فیبر، ارتباط الکتریکی با سیتوپلاسم برقرار می‌شود؛ بنابراین دیگر نیازی به سوراخ کردن غشای ناحیه مورد مطالعه نیست و آسیب کمتری به سلول وارد می‌شود. در مدار نشان داده‌شده، تقویت‌کننده فیدبک یا FBA ولتاژ فرمان را با ولتاژ واقعی غشا مقایسه می‌کند و در صورت وجود اختلاف، جریان لازم را تزریق می‌کند تا ولتاژ ناحیه ایزوله‌شده ثابت بماند. در همین زمان، جریان غشایی (I_m) اندازه‌گیری می‌شود که بیانگر مجموع جریان‌های یونی عبوری از کانال‌های غشایی است. این روش به دلیل کاهش نشت جریان و افزایش دقت اندازه‌گیری، به‌ویژه در مطالعه فیبرهای عصبی و عضلانی، کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده است.

تفاوت شکلی سلول های ریز و کروی در مقایسه با فیبر های کشیده



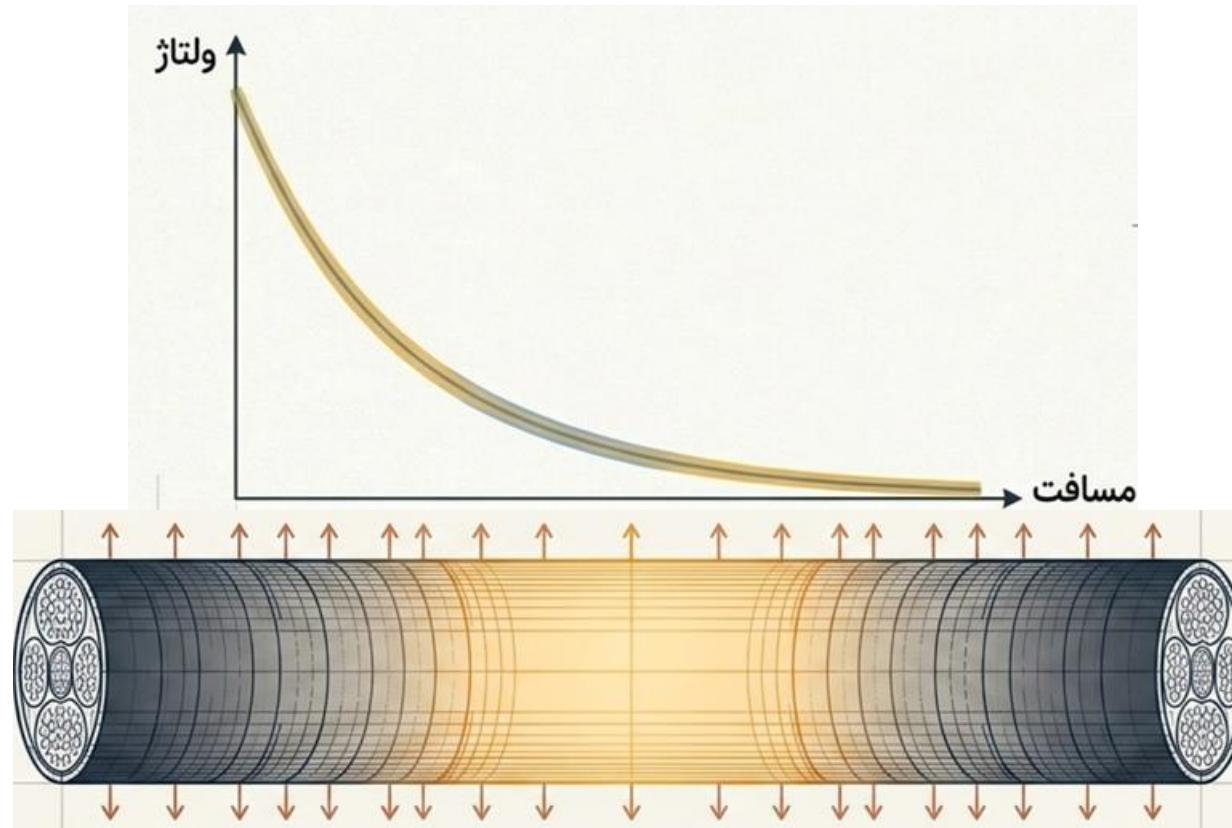
برای مطالعه سلول های سالم و کروی شکل (مانند اووسیت ها) تکنیک انتهای بریده شده دیگر کارایی ندارد در حین حال سلول نباید تخریب شود. در نتیجه به روشی نیاز داریم که با نفوذ حداقلی، پتانسیل کل غشای پلاسمایی را در محدوده میلی ثانیه تحت کنترل در آورد.

سوژه ایده‌آل: سلول‌های
توبی شکل و بزرگتر از ۱
میلی‌متر (مانند اووسیت‌های
دوزیستان).



مکانیسم: نفوذ مستقیم دو
میکروالکترود شیشه‌ای به درون
سلول دست‌نخورده برای کنترل
یکپارچه ولتاژ.

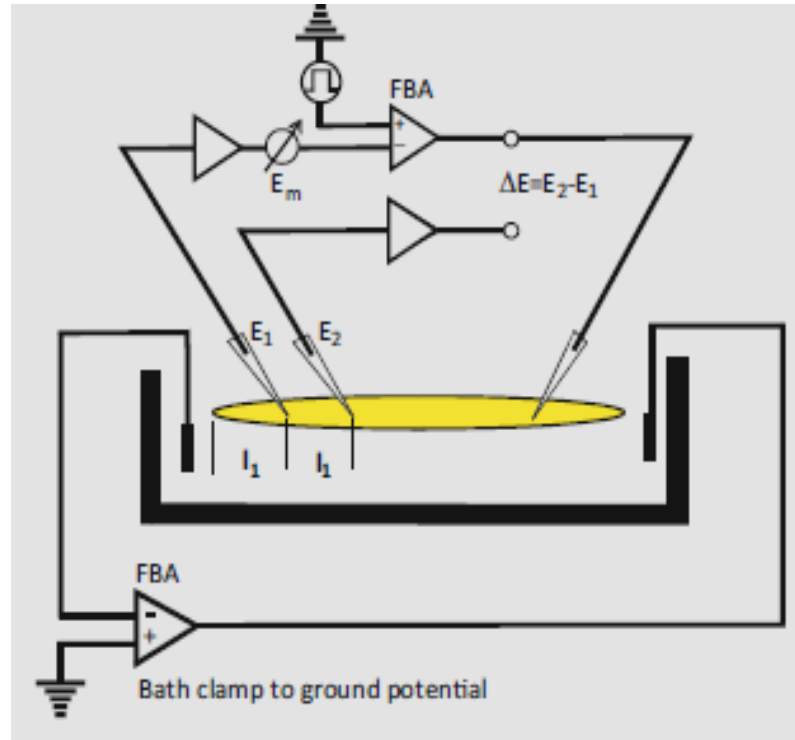
عملکرد تکنیک ولتاژ کلمپ دو میکروالکترودی (Two-Microelectrode Voltage Clamp) به این نحو می‌باشد که، دو میکروالکترود شیشه‌ای به‌طور مستقیم وارد سلول می‌شوند که هر کدام وظیفه متفاوتی دارند. یکی از الکترودها ولتاژ واقعی داخل سلول را به‌طور مداوم اندازه‌گیری کرده و آن را به مدار تقویت‌کننده بازخورد (FBA) ارسال می‌کند. هم‌زمان، پژوهشگر با استفاده از مولد ولتاژ فرمان، ولتاژ دلخواه را تعیین می‌کند. FBA ولتاژ اندازه‌گیری‌شده را با ولتاژ فرمان مقایسه می‌کند و اگر اختلافی بین آن‌ها وجود داشته باشد، از طریق الکترود دوم جریان مناسبی را به داخل یا خارج سلول تزریق می‌کند تا ولتاژ غشای سلول دقیقاً روی مقدار تعیین‌شده ثابت بماند. در این شرایط، جریان تزریق‌شده توسط دستگاه با جریان یونی عبوری از غشای سلول متناسب است و به‌عنوان جریان غشایی (I_m) ثبت می‌شود. از آنجا که دو الکترود مستقیماً وارد سلول می‌شوند، این روش بیشتر برای سلول‌های بزرگ مانند اووسیت قورباغه یا برخی سلول‌های بزرگ عصبی و عضلانی مناسب است؛ زیرا ورود هم‌زمان دو الکترود به سلول‌های کوچک دشوار بوده و می‌تواند به غشای آن‌ها آسیب وارد کند.



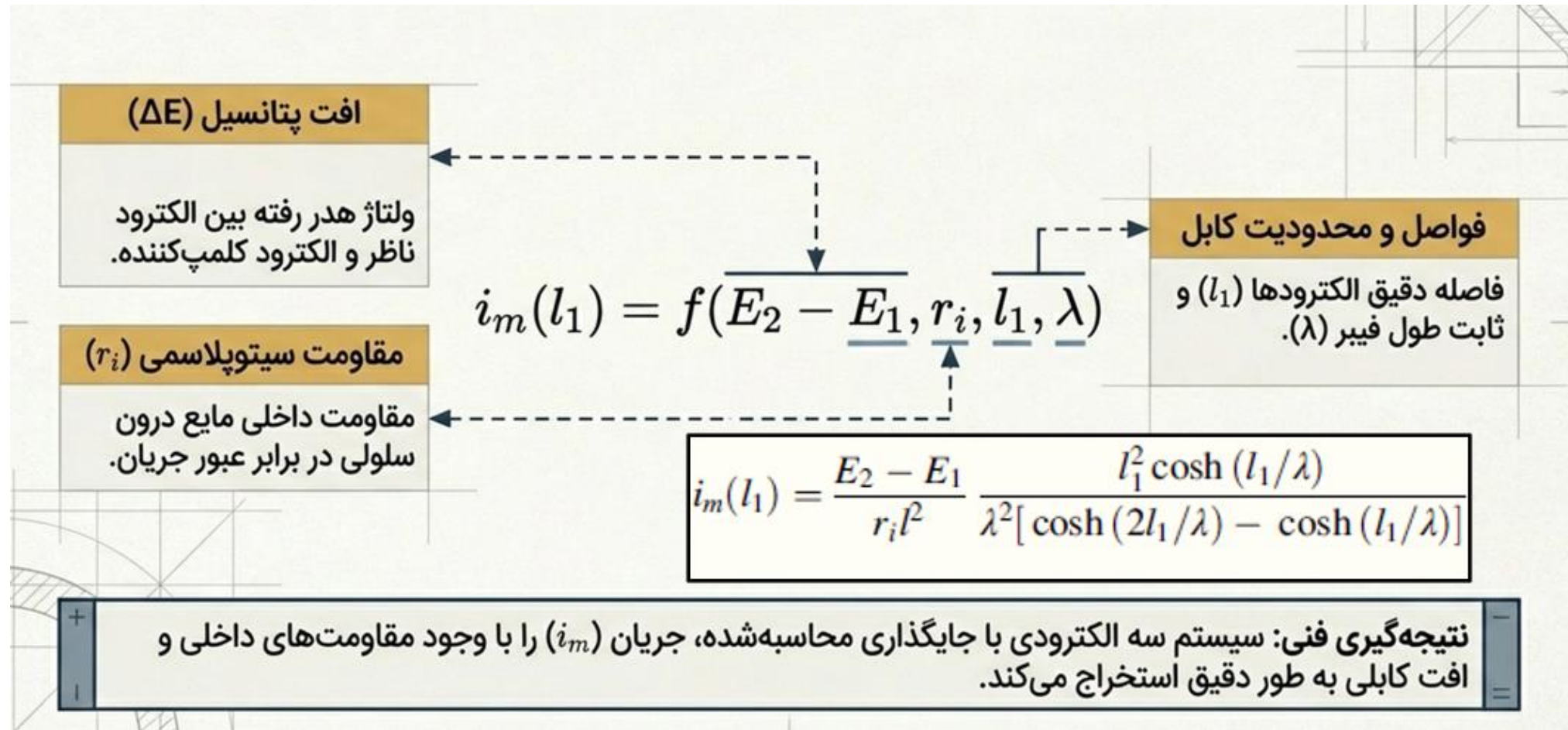
$$E_l = E_0 \cosh\left(\frac{l}{\lambda}\right)$$

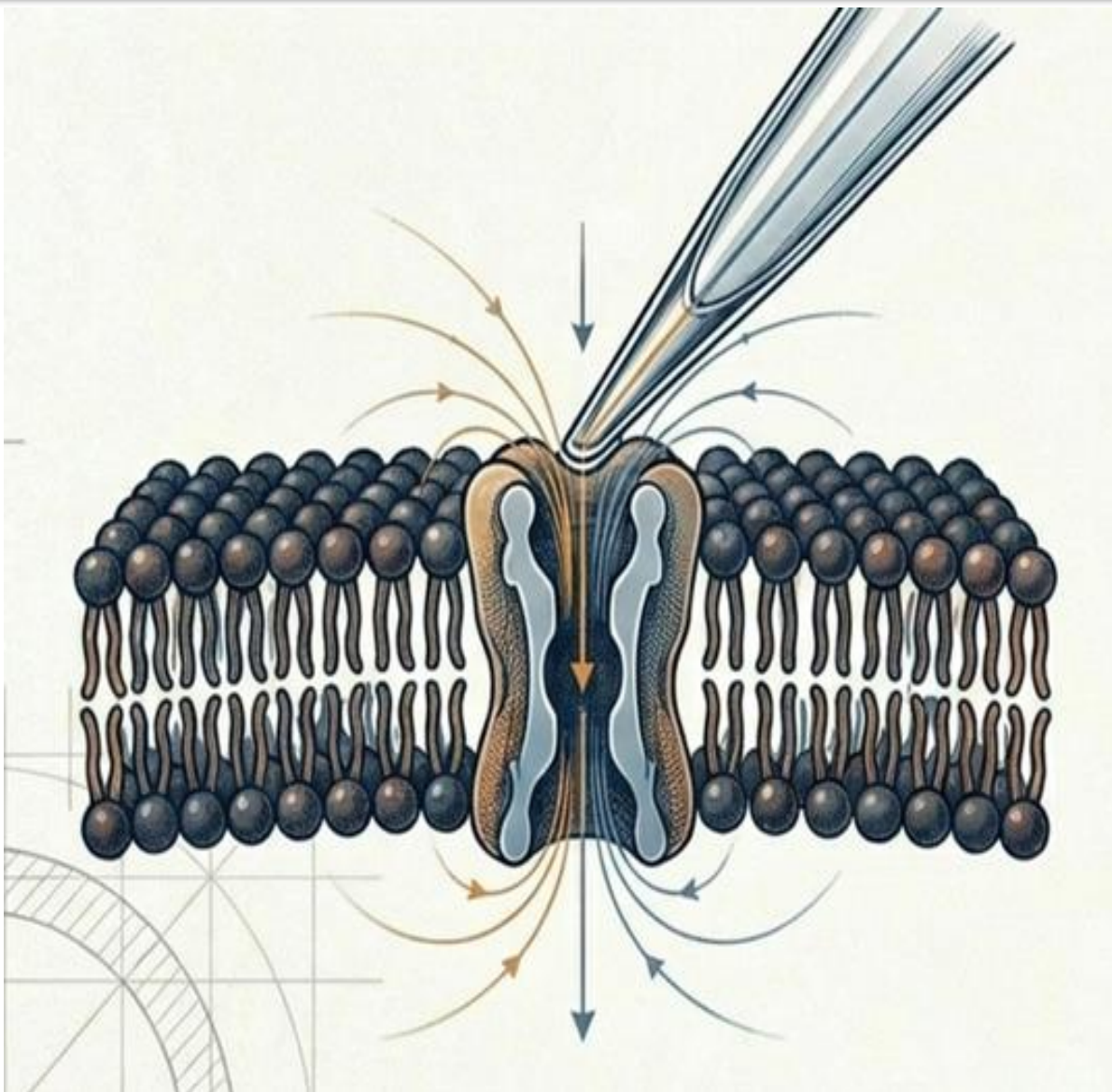
فیبر ها همانند یک سیم ایده آل نمی باشد. در فیبر های عضلانی سالم و طویل به دلیل مقاومت سیتوپلاسمی و طول زیاد استفاده از سیستم دو الکترودی باعث از دست رفتن کنترل یکنواخت ولتاژ میشود و مقدار ولتاژ در سطح طول فیبر یکسان نمی باشد.

ولتاژ کلمپ سه الکترودی (three-electrode voltage clamp)



در این روش، بخشی از فیبر عصبی یا عضلانی به وسیله دو ناحیه عایق از جنس وازلین از سایر قسمت‌های فیبر جدا می‌شود تا جریان الکتریکی فقط از ناحیه مورد مطالعه عبور کند. دو الکترود اندازه‌گیری با نام‌های E_1 و E_2 ولتاژ دو نقطه از این ناحیه را ثبت می‌کنند و اختلاف ولتاژ بین آن‌ها به صورت $\Delta E = E_2 - E_1$ محاسبه می‌شود تا از یکنواخت بودن ولتاژ در طول ناحیه مورد مطالعه اطمینان حاصل شود. هم‌زمان، ولتاژ فرمان (E_m) به تقویت‌کننده بازخورد یا FBA اعمال می‌شود. این تقویت‌کننده ولتاژ واقعی را با ولتاژ فرمان مقایسه کرده و در صورت وجود اختلاف، از طریق الکترود تزریق جریان، جریان لازم را وارد فیبر می‌کند تا ولتاژ غشا در مقدار مورد نظر ثابت باقی بماند. علاوه بر این، مدار Bath Clamp در پایین شکل، پتانسیل محلول اطراف فیبر را روی صفر ولت یا زمین الکتریکی نگه می‌دارد تا تمام اندازه‌گیری‌ها نسبت به یک مرجع ثابت انجام شوند. در نهایت، جریان تزریق‌شده توسط FBA معادل جریان یونی عبوری از غشاست و برای بررسی عملکرد کانال‌های یونی مانند کانال‌های سدیمی و پتاسیمی مورد استفاده قرار می‌گیرد.





یکی از مهم ترین پیشرفت ها در الکتروفیزیولوژی، Patch Clamp است. برخلاف روش های کلاسیک Voltage Clamp که جریان مجموع همه کانال های یونی یک سلول را اندازه گیری می کردند، Patch Clamp این امکان را فراهم کرد که جریان عبوری از یک کانال یونی منفرد با دقت بسیار بالا ثبت شود. در این روش، یک پیپت شیشه ای با نوک بسیار ظریف روی بخش کوچکی از غشای سلول قرار می گیرد و با ایجاد یک اتصال محکم، موسوم به Gigaseal، جریان عبوری از کانال های یونی اندازه گیری می شود. این تکنیک نقش بسیار مهمی در شناخت عملکرد کانال های یونی، نحوه باز و بسته شدن آنها و بررسی اثر داروها بر این کانال ها داشته است. بر پایه این روش، تکنیک Sniffer Patch نیز توسعه یافت که از پیپت به عنوان یک حسگر زیستی برای تشخیص آزاد شدن موضعی نوروترنسمیترها در فضای سیناپسی استفاده می کند. همچنین، با پیشرفت فناوری، سیستم های Automated Patch Clamp معرفی شدند که با خودکار کردن مراحل آزمایش، امکان بررسی تعداد زیادی سلول را در مدت زمان کوتاه فراهم کرده اند و امروزه به طور گسترده در تحقیقات دارویی و غربالگری داروهای جدید مورد استفاده قرار می گیرند.

نوع سلول	ابعاد سلول	تکنیک کلمپ	نوآوری کلیدی
اکسون ماهی مرکب	۱ میلی متر	سیم های کلاسیک	امکان پرفیوژن داخلی
فیبرهای عصبی نازک	تا ۱۰ میکرومتر	شکاف وازلین/ساکاروز	دسترسی الکتریکی از انتهای بریده
سلول های کروی (اووسیت)	بزرگتر از ۱ میلی متر	دو میکروالکترودی	حفظ یکپارچگی غشا با آمپلی فایر پر قدرت
فیبر عضلانی اسکلتی	طویل (چند میلی متر)	سه الکترودی	غلبه بر خطای Space Clamp با الکتروود ناظر



سیر تکامل نبوغ در الکتروفیزیولوژی

تکامل تکنیک Voltage-Clamp صرفاً تاریخچه‌ای از ابزارها نیست؛ بلکه داستانی از غلبه پیوسته مهندسی بر موانع بیوفیزیکی است. از حل محدودیت‌های ابعادی در اکسون‌ها، تا حل معمای Clamp Space در عضلات، و رسیدن به دقت بی‌نظیر سطح تک‌کانال‌های یونی.