

Copyright © 2017 by Academic Publishing House Researcher s.r.o



Published in the Slovak Republic  
European Journal of Medicine. Series B  
Has been issued since 2014.  
ISSN: 2409-6296  
E-ISSN: 2413-7464  
2017, 4(1): 30-58

DOI: 10.13187/ejm.s.b.2017.1.30  
[www.ejournal27.com](http://www.ejournal27.com)



## Lock-In/Phase-Sensitive Spectral Nanovoltmetric Patch-Clamp with Frequency Discrimination ( $\varphi$ - $\omega$ -Patch-Clamp) as Simple Technology for Single Ion Channel Registration in Cellular Biomedicine (Including Cell Channelopathy Diagnostics)

Evgenii D. Adamovich <sup>a</sup>, Pavel L. Alexandrov <sup>a</sup>, Oleg V. Gradov <sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Institute for Energy Problems of Chemical Physics (RAS), Moscow, Russian Federation

### Abstract

This paper provides a new approach for ion channels activity registration in noisy conditions with stochastic incoherent open-close transitions on membranes. The required result is obtained using phase-selective nanovoltmetric techniques with frequency discrimination. This technical principle is the foundation for different phase-selective ( $\varphi$ -path-clamp) methods, based on vector voltmeters or lock-in nanovoltmeters for indication of the real and imaginary components of the complex electrophysiological signals in the ion channel activity.

**Keywords:** phase-sensitive detector, lock-in amplifier, lock-in nanovoltmeter, patch clamp, ion channels, frequency discrimination, vector voltmeter, Re/Im indication.

### 1. Введение

Развитие нейробиологии и клеточной биофизики предъявляет особые требования к качеству метрологии и, как следствие, измерительной технике, используемой в указанных отраслях. Появление новейших отраслей, таких как "наноцитобиология" (Nano Cell Biology – см., например, сборник ([NanoCellBiology, 2014](#))) и «нанонейронаука» («nanoneuroscience», ([Woolf et al., 2010](#))), становящихся в последнее время предметом необоснованных спекуляций, однако, ведёт к улучшению технических параметров исследовательских установок, преимущественно, "по пространственному аргументу" или, что не менее важно, по частоте дискретизации или скоростям регистрируемых процессов, но не затрагивает и без того удовлетворительные (для большинства существующих биофизических задач) электрофизические характеристики, поэтому метрологический аспект наномасштаба в указанных направлениях смещен в сторону "имэджинга", то есть фиксации пространственных паттернов ([Lyubchenko, 2013](#); [Kawata, 2013](#)) с нанометровым разрешением (как правило, субдлинноволновым оптическим или атомно-силовым/зондовым инструментарием), либо скоростной регистрации процессов с наносекундным разрешением ([Resink et al., 2014](#); [Schickinger et al., 2013](#)).

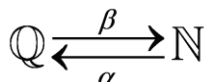
Хорошим примером такого подхода в развитии биофизической техники может считаться общеизвестный метод локальной фиксации потенциала, хорошо известный как «patch-clamp», в котором предельные возможности фиксации по частоте и амплитуде были достигнуты задолго до конца прошлого столетия, но регистрируемая динамика зачастую не могла быть корректно эксплицирована из выборки и интерпретирована в терминах математической и молекулярной биофизики без учета фазы сигнала и синхронизации –

\* Corresponding author

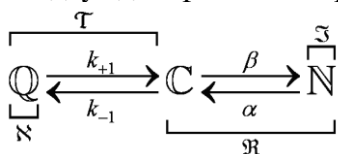
E-mail addresses: [o.v.gradov@gmail.com](mailto:o.v.gradov@gmail.com) (O.V. Gradov)

попадания или непопадания отдельных электрофизиологических состояний ионных каналов во фреймы или бины данных стандартной продолжительности или емкости памяти, что кардинально смещало интерпретацию кинетики процесса.

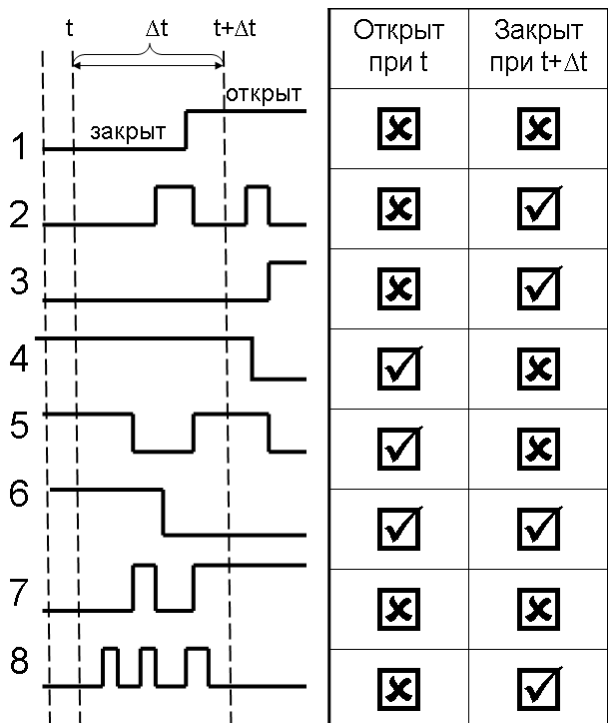
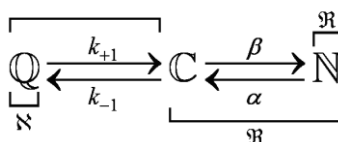
Проиллюстрируем этот тезис. Хемометрический физико-химический подход к анализу данных патч-клампа позволяет рассматривать скорость реакции закрывания и открытия каналов как аналог константы скорости реакции в химической кинетике. В наиболее элементарном случае реакция может рассматриваться как переключение канала из закрытого состояния в открытое (Colquhoun and Hawkes, 1995):



В случае если для активации канала необходима супрамолекулярная фиксация лиганда, то в эту элементарную модель добавляется промежуточная стадия, так как для данного механизма, согласно классической модели (del Castillo and Katz, 1957), характерно наличие двух дискретных закрытых состояний и одного открытого:



где  $\square$  – занятое лигандом дискретное состояние, причем на выделенных квадратной скобкой стадиях:  $\tau$  – канал закрыт,  $\mathfrak{S}$  – канал открыт,  $\mathfrak{N}$  – канал вакантен для фиксации лиганда,  $\mathfrak{R}$  – канал занят.



**Рис. 1.** Эффект воздействия периода на вероятность попадания в бин (по Неру и Саксу)

Однако, так как процесс открытия каналов носит вероятностный характер, попадание или непопадание в период записи также носит вероятностный характер. В итоге формирующаяся в результате записи может содержать: сигналы, не попавшие в бин целиком;

сигналы, попавшие в него частично; сигналы, только конец которых приходится на данный бин; сигналы, которые не могут быть интерпретированы из-за длительности открытого/закрытого состояния канала, превышающей длительность бина; пачечные сигналы, после которых наступает «истощение» по статистике накопления на несколько бинов, и т.д. Данная ситуация продемонстрирована на Рис. 1. Пачечная активность канала, как правило, приводит к двухфазному характеру релаксаций (Neher and Steinbach, 1978). Отсутствие учета фазовых распределений и принятие во внимание только функций плотности вероятности времён усугубляет ситуацию, связанную с парадоксами времен ожидания и времен жизни в открытом состоянии в пачечных сигналах, а также артефактами, связанными с интерпретацией распределений времен жизни на неблокированных каналах (Colquhoun and Hawkes, 1995). Таким образом, необходима дополнительная техника для задач, связанных с обеспечением селективности подобных измерений.

**Потенциальные источники частотно-фазовой селективности.** Принцип патч-кламп, позволяющий регистрировать активность одиночных ионных каналов (Single-Channel Recording, 2009), позволивший также индивидуально работать с множеством одиночных клеток в среде или в ткани и проводить ультрамикромасштабный скрининг фармацевтических препаратов (Brueggemann et al., 2014), не может быть сделан более эффективным средством измерения без внедрения источника фазовой селективности. Переход на наномасштабы пространственного разрешения не вносит качественных изменений в метрологический уровень электрофизиологической диагностики, так как стандартизированная и оптимальная для данных задач чувствительность, достигаемая специализированными коммерческими приборами без специальных преобразований, не может быть улучшена оптимизацией аддитивных параметров. Пример подобной картины наблюдался в Швейцарском проекте нано-патч-кламп, где существенное улучшение качества аппаратуры (Lehnert and Gijs, 2000), исходно позиционировавшейся как микро-патч-кламп (Lehnert et al., 2002), не было сопряжено с направленным изменением селективности в сопряженной с амплитудой сигнала переменной (АЧХ, ФЧХ и пр., в которых возможно улучшение за счет оптимизации частотных полос или фазы и частоты), по причине чего извлечь заявленные параметры зачастую не было возможно без применения специальных математических техник, реализованных на цифровом уровне.

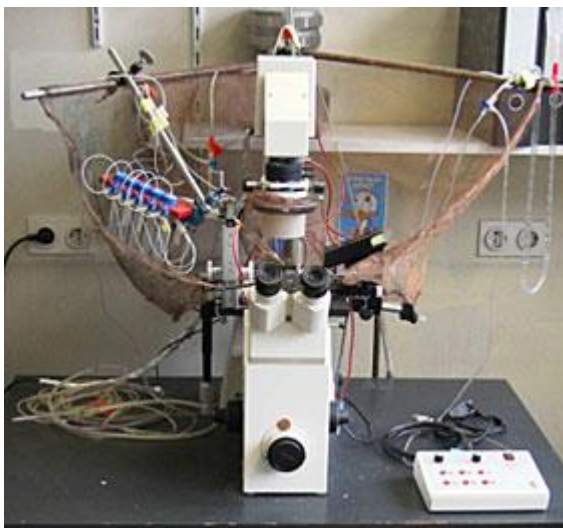
Между тем, общеизвестно, что различные каналы имеют разные частоты открытия и блокирования, разные постоянные времени. Так: быстрые калиевые каналы имеют порог активации – 70 мВ, активируются за 1-2 мс и инактивируются за 10-15 мс, то есть меняют состояние с на порядок отличающимися скоростями; в то же время, для калиевых каналов с медленной активацией константы скоростей могут достигать секунд. С другой стороны, электробиологическое взаимодействие каналов приводит к смещению аддитивного набора скоростей или гистограммы частот, так как, например: кальциевый ток через т.н. "CRAC-каналы" (Ca-Release-Activated Ca-channels) может увеличивать частоту постсинаптических сигналов; каналы, обеспечивающие действие If-токов, контролируют частоту ритмических осцилляций нейронных структур; активация Kir-каналов уменьшает частоту сокращений в сердечной мышце в силу гиперполяризации мембраны;  $K_{Ca}$ -каналы участвуют в регуляции интервалов потенциала действия и настройке на определенные частоты при акустическом восприятии и т.д. (см., напр., сводку (Ситдикова и др., 2011) российско-немецкой группы авторов (Sitdikova et al., 2010; Hermann et al., 2010)). То есть, иными словами, происходит индуцированное изменение по иерархии ритма, связанное с активностью ионных каналов.

Существует иерархия времён и соответствующих частот, на которых происходят физически-отличимые друг от друга процессы, характер которых может быть однозначно сопоставлен их частотно-временной характеристике (а учитывая различимые параметры нарастания и спада – и фазе), вследствие чего становится возможным, исследуя процессы на определенном узком частотном диапазоне, селективно исследовать процессы генерации потенциала (voltage-clamp)/ионного тока (current clamp) в определенных физиологией и биофизикой клетки ограниченных частотных зонах без параллельной регистрации шумов на других – нерепрезентативных или нерелевантных для данной задачи частотах. Этот факт мог бы весьма упростить саму процедуру регистрации и способствовать внедрению патч-кламп в исследовательских DIY условиях, становящихся всё более распространенными в бывшем СССР и СЭВ (Schiermeier, 2002), а также – в полевых условиях, где возможности

фильтрации шумов сводятся к минимуму, а использование принципиально необходимых клеток Фарадея (Bazzone et al., 2013), показанных на Рис. 2-а, Рис. 2-б) не всегда возможно или целесообразно.



**Рис. 2-а.** Патч-кламп-стенд с клеткой Фарадея (Гарвард, Lichtman Lab)



**Рис. 2-б.** Патч-кламп-стенд без полноценной клетки Фарадея (Китай)

Для внедрения этого иерархического подхода необходимо использование устройств, работающих в диапазоне от одного (или менее) до сотен герц при узкой эквивалентной полосе пропускания, что позволило бы "вытягивать" сигнал из шумов с максимальной для частотно-селективного детектирования эффективностью. Из последнего также следует, что этот прибор, в идеальном случае, должен быть также фазочувствительным. Можно доказать, что новизна подобного подхода вытекает из отсутствия аналогичных средств измерений в приложении к методикам патч-кламп, в связи с чем предварительно требуется дать краткий аналитический обзор последних в рамках данного качественного перечня технических требований.

Следует дать ответ на вопросы: является ли сейчас современным требование фазовой чувствительности в локальной фиксации потенциала и требуется ли селективность по частоте, а также в каких границах потенциала это может/должно применяться? Корректный ответ на поставленный комплекс вопросов тождествен биологически-точному "техническому заданию" и упрощает подбор метрологического инструментария потенциальными пользователями.

**Фазочувствительность.** В интернациональной периодике, как правило, не делается принципиальных различий между терминами "lock-in amplifier" и "phase-sensitive detector" –



обозначениями усилителей, предназначенных для вытягивания сигнала из экстремально зашумленного фона (на понятных радиоэлектронных принципах, связанных с синхронным детектированием и фазой). Поэтому, хотя в работах по патч-клампу используются и первый, и второй вариант терминологии, в настоящей работе мы не разделяем типически-однородный класс приборов на две группы, а используем единую терминологию.

Фазовые детекторы были впервые применены в технике патч-клампа в 1980-х гг. при исследовании экзоцитоза и эндоцитоза, когда оказалось, что фазово-емкостные параметры данных процессов лучше фиксируются в означенной технике детектирования (Joshi and Fernandez, 1988). Более полное описание этого детектирования попало в "Handbook of Membrane Channels", где было напрямую указано на его оптимальность ("by applying a sinusoidal voltage and using a phase-sensitive detector"). Данная практика была достаточно распространенной в 1990-е и 2000-е гг. как при исследованиях трансмембранного везикулярного переноса как такового (Solsona et al., 1998), так и при расширенных сводных исследованиях секреции как цитофизиологического процесса (Pan and Fox, 2000), что было обусловлено появлением компьютерно-управляемых детекторов с дружественным GUI (графическим интерфейсом пользователя).

С начала 2000-х гг. программно-аппаратные комплексы такого рода были настолько оптимизированы, что говорить о прямом аппаратном или программно-опосредованном методе регистрации сигнала по отдельности стало невозможно: с одной стороны, экспоненциально-релаксационное фитирование, как правило, реализуемое не без использования программных вычислительных средств, и чисто аналоговые подходы в техниках фазового детектирования стали совместимы по выборке и технически сопоставимы (Thompson et al., 2001); с другой стороны, с равным результатом использовались как установки с программным контролем – "lock-in software-based phase-sensitive detector" (Granfeldt et al., 2006), так и используемый в рамках автоматизированных систем (напр., в картировании потенциала – "voltage imaging"-е) т.н. "off-line digital phase-sensitive detector" (Ceriani and Mammano, 2013).



**Рис. 3.** Самобалансирующий фазочувствительный детектор - усилитель для локальной фиксации потенциала с оптической трансмиссией ("Optopatch").

Различия между автоматической и неавтоматической модальностью возможно пояснить следующим образом: в чисто-аппаратной модальности прибор должен быть способен без использования цифровых паттернов из баз данных и подгружаемых в память результатов компенсационного моделирования корректировать показания и фиксировать сигнал среди шумовых помех (что является сложной схмотехнической задачей), тогда как при наличии ЭВМ указанные функции берет на себя последняя. Хорошим примером этого может быть программно-управляемый фазочувствительный детектор (SLIA, software lock-in amplifier) популярной в Европе конструкции EPC-9, снабженный программным обеспечением типа "PULSE" различных версий, корректирующим ослабление при фильтрации низких частот и фазовые сдвиги во избежание артефактов при регистрации

(Gillis, 2000). Хорошим же примером полностью аналоговой регистрации, в которой корреляция измерений замещает цифровую сравнительную модель, может являться версия патч-кламп с двумя фазовыми детекторами на двух мембранных токовых выходах (Dempster, 2001) или двойной патч-кламп (Elhamodani et al., 2006); при этом, зная о пространственно-временной динамике движущейся волны (возбуждения) вдоль клеточной мембраны, можно снимать сигнал в различных точках.

В начале 2000-х гг. за рубежом был внедрен в производство самобалансирующийся фазочувствительный детектор, усилитель для патч-клампа с оптической трансмиссией (Johnson et al., 2002), названный при вводе в серию "Optopatch" (см. Рис. 3). Этот прибор имеет режим записи калибровки по натурному объекту ("track-in"), полосу до 200 кГц, заведомо превышающую известные в физиологии характеристики генерации сигнала, четырех- (модель 7700-4) или восьми- (модель 7700-8) полюсную фильтрацию (фильтрами Бесселя). Таким образом, он совмещает в себе аппаратные свойства классических моделей высокого уровня и средства записи, свойственные для программных комплексов, включая хронологически более новые (Neef et al., 2007). Безусловно, по сравнению с работами начала 1990-х гг., выполнявшимися с использованием более простых фазовых детекторов (Zierler, 1992; Debus et al., 1995), достигнут существенный системотехнический прогресс! Современный фазовый детектор - усилитель для локальной фиксации потенциала представляет собой высокотехнологичный продукт, оптимальный и для поверхностно-контактных методов регистрации ("cell attached" (Klyachko et al., 2008)), и для регистрации потенциала с подсосом клеточно-цитоплазматического содержимого (т.н. "whole cell" метод (Olapinski et al., 2008)).

Однако усовершенствование функциональных характеристик для пользователя привело к усложнению ремонтно-эксплуатационных условий, а также цен на приборы такого уровня (до десятков тысяч долларов, в зависимости от числа каналов, не считая периферии; так, известный EPC-10 USB Quadro Patch Clamp Amplifier можно найти не менее, чем за \$ 32 000), что сделало их малодоступными для развивающихся стран. Это обстоятельство порождает (в последних) необходимость поисков функциональных замен дорогостоящим установкам, одновременно допускающих работу в упрощенных условиях, без ячейки Фарадея, а значит – с дополнительным механизмом селективности для шумоподавления, пренебрежения наводками в частотной полосе без ущерба для регистрации сигнала в режиме реального времени (Alexandrov, Gradov, 2014; Александров, Градов, 2014).

**Частотная селективность.** Достижение эксплуатационной выгоды при упрощении и достижении робастности экспериментальной конструкции в неблагоприятных условиях не может быть достигнуто без понижения размерности пространства переменных урезанием широкодиапазонных выборок измерений до отдельных не зашумленных диапазонов контроля. Это, в свою очередь, требует использования узкой полосы пропускания. Если говорить об электрофизиологических измерениях, где используют вторичный анализ регистрируемых в цифровой форме данных локальной фиксации потенциала, получая из них амплитудные гистограммы (Schroder et al., 2005; Yakubovich et al., 2009), спектры мощности (Hoshiko, 1978), характеристики частотного отклика (Zimmermann et al., 2008) etc., то достаточно рациональной (для ограниченного круга задач) представляется возможность вести измерения на отдельных частотах.

Действительно, даже в исследовании нелинейных электрофизиологических процессов таких, как передача импульсов от механорецепторов, часто используют лишь анализ главных динамических мод (Marmarelis et al., 1999), изредка синхронизируясь с измерением гармонических/нелинейных искажений и поиском искаженных мод (Takahashi and Santos-Sacchi, 1999). Позитивным контрольным методом в данном контексте может являться анализ мембранных резонансов (Hutcheon et al., 1996; Yan et al., 2002), так как вполне очевидно, что нарастание амплитуды вынужденных колебаний при приближении к резонансным частотам приводит селективно к возрастанию сигнала (и, соотв., оптимизации соотношения сигнал/шум) на указанных частотах и, как следствие, не требующему аппаратной "эквализации" выделению уровней этих частот при детектировании из общего массива сканирующим по частоте устройством регистрации. Опуская вопросы добротности, можно лишь дать ссылки на синхронизацию локальной фиксации потенциала и

импедансной спектроскопии на клетках и модельных мембранах (Weckström et al., 1992; Mayer et al., 2004; Alberti et al., 2014), поскольку частотные восприимчивости и резонансные параметры клеточных структур и модельных мембран напрямую связаны с этим, а отсутствие частот селективности у какой-либо группы каналов (Kaestner, 1999) свидетельствует о малой биофизической специфичности и расширенной лабильности.

В сущности, молекулярная биофизика клетки представляет собой множество процессов разной лабильности, а значит – с разной частотой предельного раздражения (как известно, нейрофизиолог Введенский считал мерой лабильности высшую частоту раздражения живой структуры, воспроизводимую последней без потери ритма, что затем было верифицировано осциллографическим методом на нейронной структуре (Gulyaev, 1957)).

Не имея целью останавливаться на этом подробно, достаточно ограничиться несколькими ссылками на частотно-зависимые или, что подобно, частотно-специфические процессы активации каналов/рецепторов (Du et al., 2000; Yin and Lovinger, 2006), а также явления унифицированной селективности, обуславливаемые полно-спектральными зависимостями (Ilyin et al., 2005; Bamann et al., 2008). Если в первом случае возможно измерить сигнал в одиночной полосе, то глубина флуктуаций по частоте во втором случае требует расширения диапазона регистрации, что не всегда доступно при синхронном анализе большого числа ионных каналов и большой поверхности контакта.

Поэтому очевидно, что, если не рассматривать мало распространенный и сложно воспроизводимый в доступных экспериментальных условиях случай регистрации в полосе "мембранных резонансов", рационально характеризовать хотя бы спектрально-узкополосные отклики клетки на возбуждение. Иными словами, нами предложен метод, в котором селективность достигается не только по фазе, но и по частоте, однако это не тождественно снятию фазо-частотной характеристики, так как измерения ведутся лишь на специально выделенных диапазонах, причем в базу данных автоматизирующей установку ЭВМ заложены значения частот/диапазонов, соответствующих каким-либо процессам или каналам (из литературы).

## 2. Материалы и методы

При выборе измерительной аппаратуры мы ориентировались по нескольким критериям, основными из которых являлись сопоставимость метрологических диапазонов приборов с параметрами сигналов биологических объектов и биомиметических мембран и доступность, а следовательно, элементарная воспроизводимость предлагаемых технологий регистрации в малобюджетных лабораториях. Кроме того, принималась во внимание простота автоматизации аппаратуры и возможность её встраивания в компьютерные системы сбора данных с помощью неэкзотических интерфейсов.

Как следует из поставленных в тексте вводно-обзорной части задач, мы ставили цель подбора аппаратуры с наиболее эффективной частотной характеристикой – с минимальной достижимой полосой пропускания, однако так как подход адаптирован нами для российских или восточноевропейских условий, мы вынуждены были упрощать схему и использовать не самые оптимальные (весьма дорогостоящие), а наиболее доступные и дешевые аналоги, что зачастую сохранились с конца 1980-х – начала 1990-х.

В результате тестирования множества отечественных и зарубежных приборов были использованы несколько моделей, наиболее удовлетворяющих критерию минимальной эквивалентной полосы пропускания при весьма хорошем соотношении «цена/качество»; в частности, доступный на постсоветской территории селективный фазочувствительный нановольтметр "Unipan 232B" (lock-in nanovoltmeter), аннотируемый как аналоговый корреляционный приёмник с эквивалентной полосой пропускания, доводимой до 0,001 Гц. Данный прибор может быть использован в рассматриваемой технике регистрации, так как при диапазоне 1 Гц – 100 кГц и указанной минимальной полосе пропускания он способен аналоговым путем «вытягивать» сигналы из сильного зашумления. До настоящего времени данные приборы использовались в: лазерной физике и лазерной химии (Kraśiński et al., 1974; Stacewicz, 1981; Stacewicz and Kraśiński, 1981); фотонике кристаллов (Zimmerman et al., 1983; Pflieger, 1990) или фотовольтаике (Zhechev and Todorov, 1997; Bryushinin et al., 1999; Sergeev et al., 2011), в частности – в измерениях проводимости и фотопроводимости (Gotszak

and Lisowski, 1987; Georgobiani et al., 1984; Zaretskii et al., 1988; Bletskan et al., 2006); анализе параметров катодных разрядов оптогальваническим методом (Zhechev and Atanassova, 1998) и измерениях на сцинтилляторах (Autrata et al., 1983; Barbu et al., 1995; Horak and Shauer, 2006; Wandrol and Horak, 2007); анализе параметров тонких пленок и мультислоев (Hajiek and Ošt'adal, 1984; Yankelevich et al., 1992; Nesheva et al., 1994, 1995); фотолюминесцентных и электролюминесцентных измерениях (Mugeński and Cywiński, 1984; Misiewicz et al., 1989; Chimpu et al., 2005; Radeva et al., 2009); измерениях синглетного кислорода и кислородных включений в физике твердого тела (Cywiński and Damm, 1983; Ryskin et al., 1983); техниках измерения фотоингибирования в фотобиохимии (Nedbal et al., 1986); спектроскопических и спектрофлуориметрических техниках (Bierzynski and Jasny, 1975; Pavluch and Eckertova, 1985; Rostami, 2004; Avakyants et al., 2005; Ulasevich et al., 2013); поляризационных методиках измерений (Nowak et al., 1984; Petkova et al., 2007, 2010; Ivanov et al., 2013) и радиочастотных измерениях (Masterov et al., 1997; Bakhushhev et al., 2003; Uvarov and Kornilovich, 2010); целом ряде кристаллохимических и кристаллофизических направлений (Strek et al., 1987; Aneva et al., 1994; Nesheva et al., 1995; Bunzarov et al., 2008; Bletskan et al., 2010) и т.д.\* Однако в патч-кламп-регистрациях подобные аппараты не замечены.

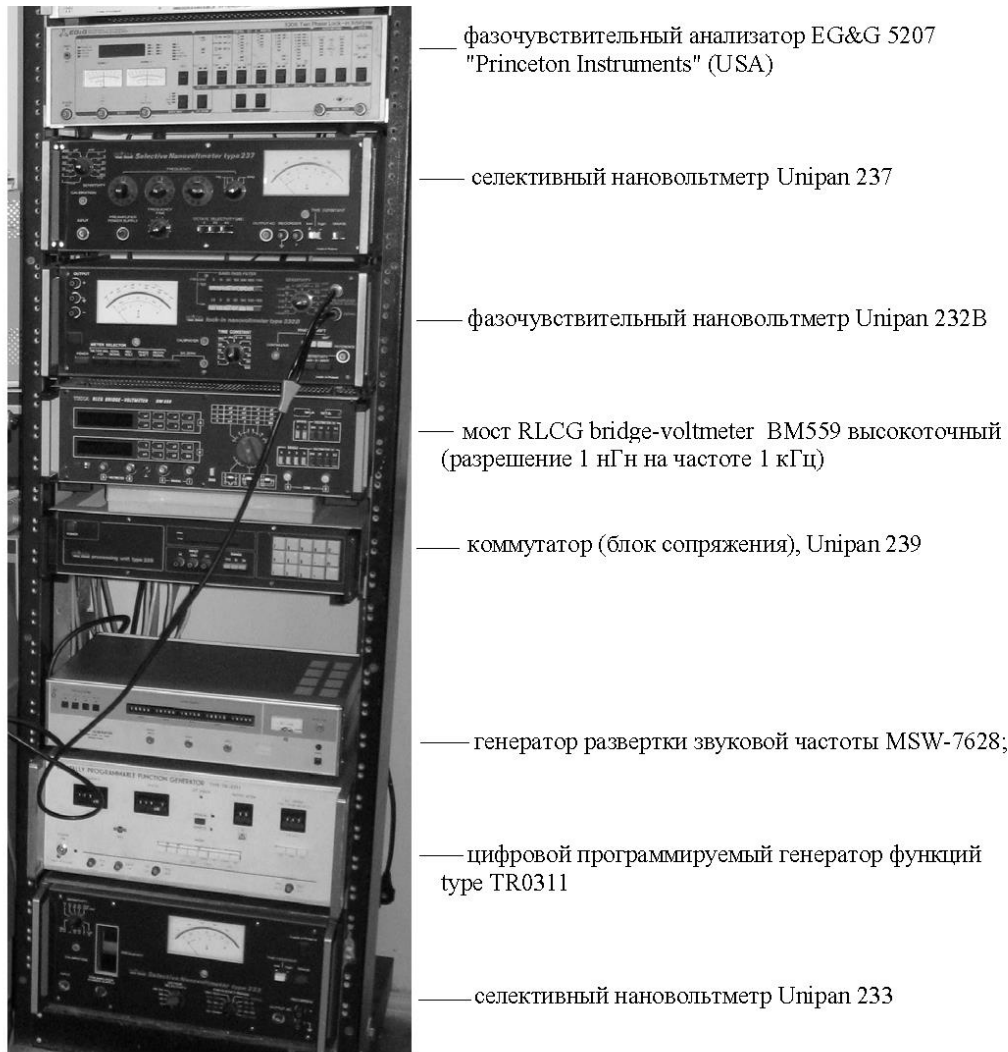
До последнего времени фазочувствительные нановольтметры, если и использовались в исследованиях с применением патч-клампа или технически им подобных, то исключительно во вспомогательных целях (Petrov, 2002, 2008; Nguyen et al., 2012), поэтому мы вынуждены были в компаративных целях внедрить в установку фазочувствительный анализатор (англ. «two phase lock-in analyzer») типа EC&G 5208 ("Princeton Instruments"), классически используемый в исследованиях на базе патч-клампа и смежных методов (Niles et al., 1988; Reid et al., 2007; Huang et al., 2013). Нами была собрана нановольтметрическая установка для реализации методов локальной фиксации потенциала (патч-кламп) на базе нескольких селективных нановольтметров с узкими полосами, одного фазочувствительного нановольтметра, фазочувствительного анализатора EC&G, генератора сигналов специальной формы (для внедрения возможности управления стимуляцией ткани) и вспомогательного оборудования. Впоследствии было обнаружено, что ряд из устройств не оптимален, либо не подходит по частотным характеристикам, вследствие чего установка была конфигурирована иным путем.

Также была использована система для микроскопии в патч-клампе; принципиальное отличие этой системы от широко распространенных аналогов состоит в том, что управление подводом стеклянного капилляра к клетке осуществляется не с использованием шаговых двигателей или пневматики на модуле установки капилляра, а контрнаправленным ему перемещением столика по осям X, Y, Z, что осуществляется с использованием шаговых двигателей при возможности контроля в специализированном программном обеспечении управляющей ЭВМ (конструктор системы – В.А. Оганесян) или манипуляции с помощью манипуляторов типа сайдстик/джойстик и т.п. аналогов.

В силу управляемости контакта столиком, а не блоком подачи капилляров на шаговых двигателях или пневматике, становится возможным создание на данной основе (при замене столика на пятиосный столик Е. Федорова) роботизированного патч-клампа, основанного на гибридации наших ранних конструкций (Нотченко и Градов, 2012; Notchenko and Gradov, 2013) с современным трендом в методах локальной фиксации потенциала – роботизацией патч-кламп-установок (Milligan et al., 2009; Estacion et al., 2010). До сих пор на практике не существовало роботизированных установок фазового патч-клампа, как и не было установок локальной фиксации потенциала (voltage clamp) с использованием нановольтметрической фазо-селективной техники.

\* Коллектор литературы по данному разделу – С.К. Панкратов, которому авторы выражают искренне благодарность за проделанную работу, равно как и за помощь в форматировании библиографии.





**Рис. 4.** Установка для реализации фазочувствительного патч-клампа. Стенд 1 из 2 (2013)

### 3. Результаты

Будучи основанной на фазочувствительных нановольтметрах, данная установка может быть также преобразована в установку векторметрического патч-клампа, так как, измеряя квадратурные составляющие первой гармоники и индицируя в таком случае действительную и мнимую составляющую комплексного напряжения, возможно получить много ценной информации и биофизической кинетике и биоэлектродинамике живой клетки (об этом подробнее рассказывается в работах, находящихся сейчас в печати). Наличие индикаторов, соответствующих действительной и мнимой составляющих, позволило бы определять составляющие, принимая за нуль некоторую известную фазу опорного сигнала (по которой происходит калибровка и разметка тайм-кода – см., напр., генераторы на рис. 1). В то же время, так как в патч-клампе для нужд наноинжиниринга и нанобиоэлектроники недавно также используются фазовые техники и фазовые детекторы (Zhao et al., 2008), применение селективных фазово-чувствительных нановольтметров в методах локальной фиксации потенциала для этих целей позволило бы внести новое «нано»-измерение, помимо пространственного в технологии voltage-clamp.

Таким образом, очевидны перспективы совершенствования данного подхода по технической части и масштабам времен, токовых параметров и частот, на которых этот подход может применяться (в частности, возможности усовершенствования лежат в области вариаций фазово-частотной и амплитудно-фазовой характеристики на гигаомном контакте (Malboubi and Jiang, 2014)). Повышение чувствительности в данной технологии достигается за счет использования нановольтметрического спецоборудования с фазовой и частотной селективностью.

На основе этого подхода предполагается также развитие векторметрического патч-клампа, при котором индицируются действительная и мнимая составляющая комплексного сигнала, что является полезной информацией для развития технологий нейроинтерфейсов и биомиметической электроники.

**Энергетические измерения с частотной дискриминацией или на отдельных диапазонах спектра.** Приведем ряд данных по тестированию программного обеспечения, благодаря которому реализуется возможность подобных измерений. В качестве исходного сигнала использовалась запись глутаминового рецептора, расположенная в сети в открытом доступе. Оцифровка данных графика производилась с использованием ПО «GRAPH2DIGIT» по яркости инвертированного изображения\*. В качестве средства измерения использовались алгоритмы получения энергетических спектров Прони со следующими компонентами:

- `Sine : Y=Ampl*sin(2*Pi*Freq*X+Phase)`
- `Sine, Exp Damped : Y=Ampl*exp(-k*X)*sin(2*Pi*Freq*X+Phase)`
- `Exponential : Y=Ampl*exp(-k*x)`

Вычисления производились в рамках комплексной экспоненциальной модели Прони порядка  $m$  с суммированием продуктов комплексных амплитуд  $h$  и комплексного же экспоненциального  $z$ :

$$y_k = \sum_{j=1}^m h_j z_j^{k-1}$$

$$h_j = A_j \exp(i\theta_j)$$

$$z_j^{k-1} = \exp[(\gamma_j + i2\pi\nu_j)(k-1)\delta t]$$

Здесь для указанных  $h$  и  $z$ ,  $A$  – комплексная амплитуда,  $\gamma$  – «демпфирующий фактор» (затухание),  $\nu$  – частота,  $\theta$  – фаза (в иных вычислениях обозначаемая как  $\varphi$ ). Производится разложение по затухающим синусоидам:

$$y(x) = Ae^{-kx} \sin(2\pi\nu x + \theta)$$

Здесь  $A$  – амплитуда,  $k$  – демпфирующий фактор (скорость экспоненциального затухания первого порядка),  $\nu$  – частота,  $\theta$  – фаза. Данная модель редуцирует незатухающие синусоиды ( $k=0$ ), а также экспоненциальные затухания с частотой, близкой к 0 и фазой  $\pi/2$ .

Ниже приведены:

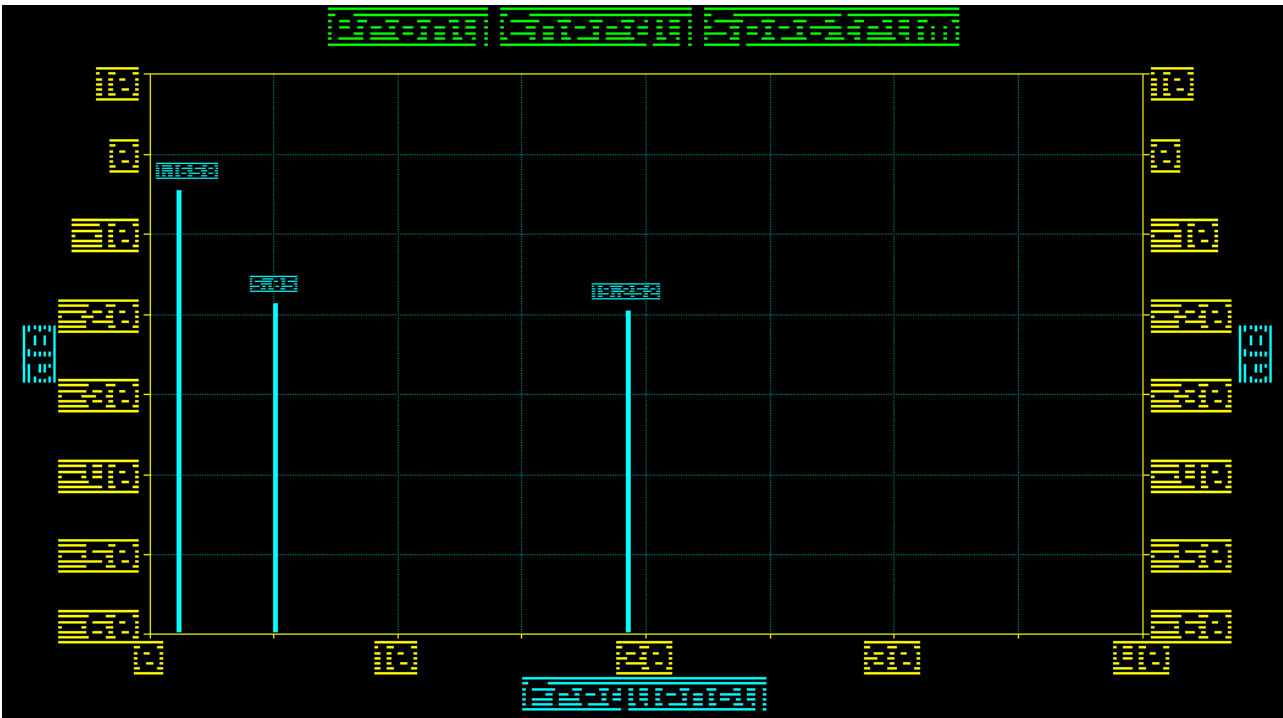
1) энергетические спектры Прони патч-кламп-регистраграммы глицинового рецептора в линейном (Рис. 5) и логарифмическом (Рис. 6) масштабе [алгоритм UNDAMPED];

2) энергетические спектры Прони патч-кламп-регистраграммы глицинового рецептора в линейном (Рис. 5) и логарифмическом (Рис. 6) масштабе [для UNDAMPED SVD NE];

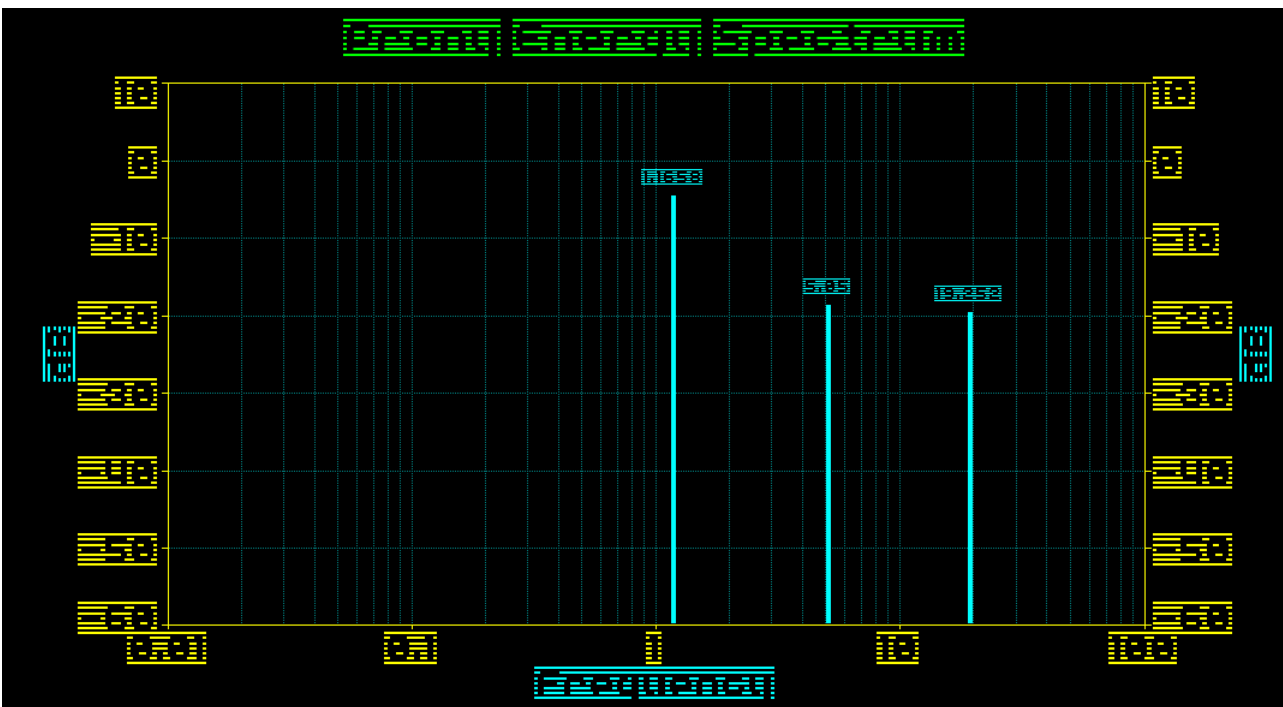
3) энергетические спектры Прони патч-кламп-регистраграммы глицинового рецептора в линейном (Рис. 5) и логарифмическом (Рис. 6) масштабе [для UNDAMPED SVD];

1) вспомогательные преобразования (Рис. 11) для реконструированной регистраграммы (Рис. 11-A): спектральное разложение матрицы {eigendecomposition} – на Рис. 11-B; её собственные вектора {eigenvectors} – на Рис. 11-C; преобразование Кархунена-Лоэва/Хотеллинга – на Рис. 11-D; Фурье-разложение – на Рис. 11-E; авторегрессионный (AR-) анализ – на Рис. 11-F, Рис. 11-G.

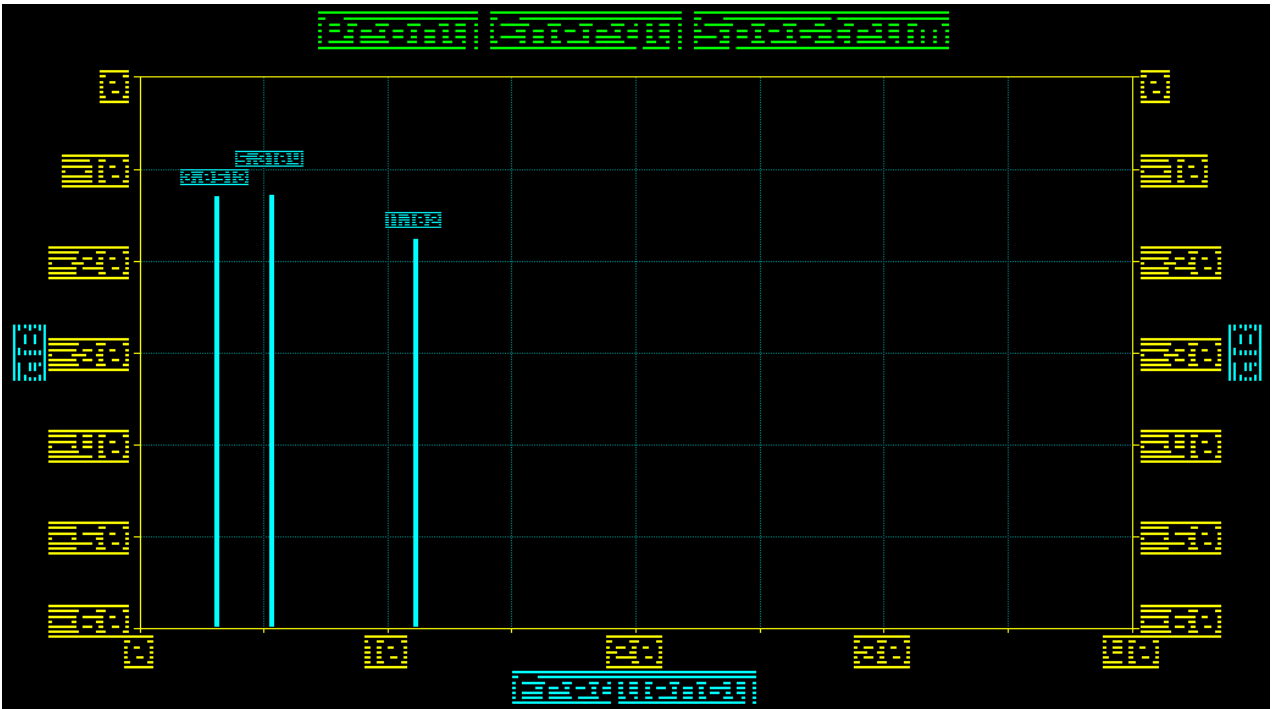
\* <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/ru/4/44/SCh-GlyR.jpg>



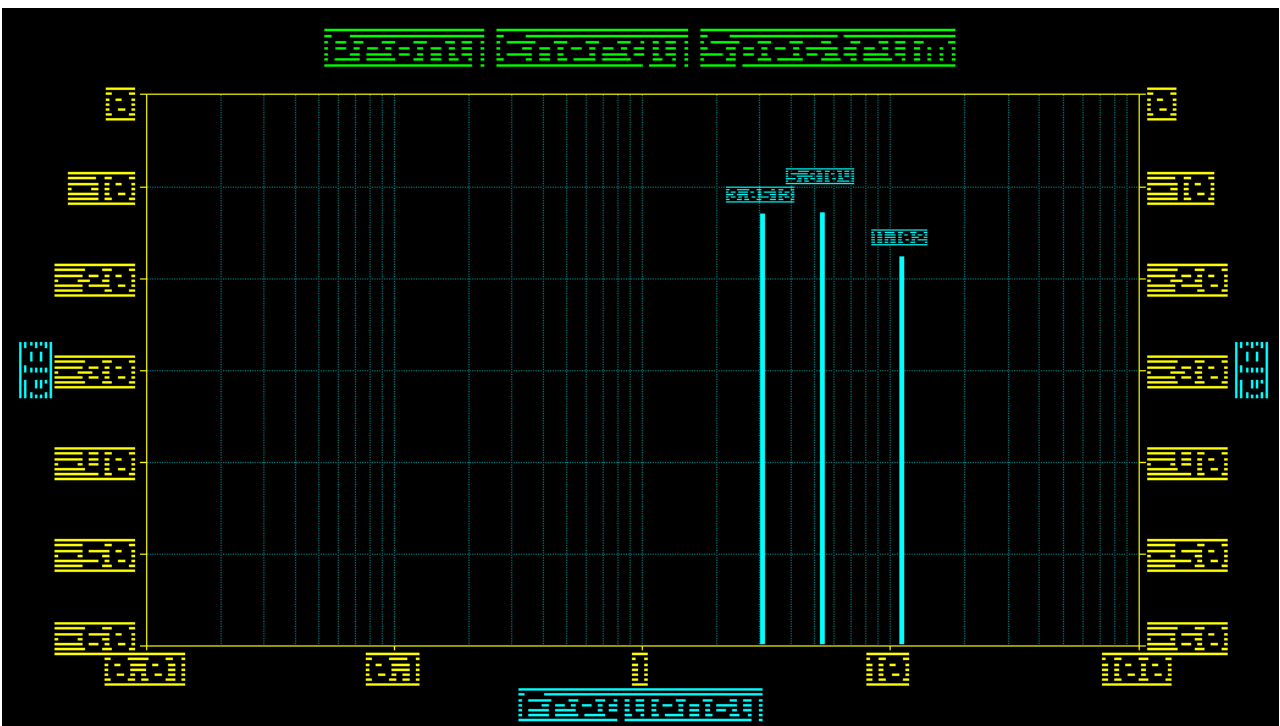
**Рис. 5.** Энергетический спектр Прони патч-кламп-регистраграммы глицинового рецептора, выполненный для тестирования программной части установки (Prony Energy Spectrum): 40-й порядок; 6 подпростр. (signal subspace); отношение сигнал/шум –  $S/N=300$ ; алгоритмика – Undamped; линейная шкала частот.



**Рис. 6.** Энергетический спектр Прони патч-кламп-регистраграммы глицинового рецептора, выполненный для тестирования программной части установки (Prony Energy Spectrum): 40-й порядок; 6 подпростр. (signal subspace); отношение сигнал/шум –  $S/N=300$ ; алгоритмика – Undamped; логарифмическая шкала частот.

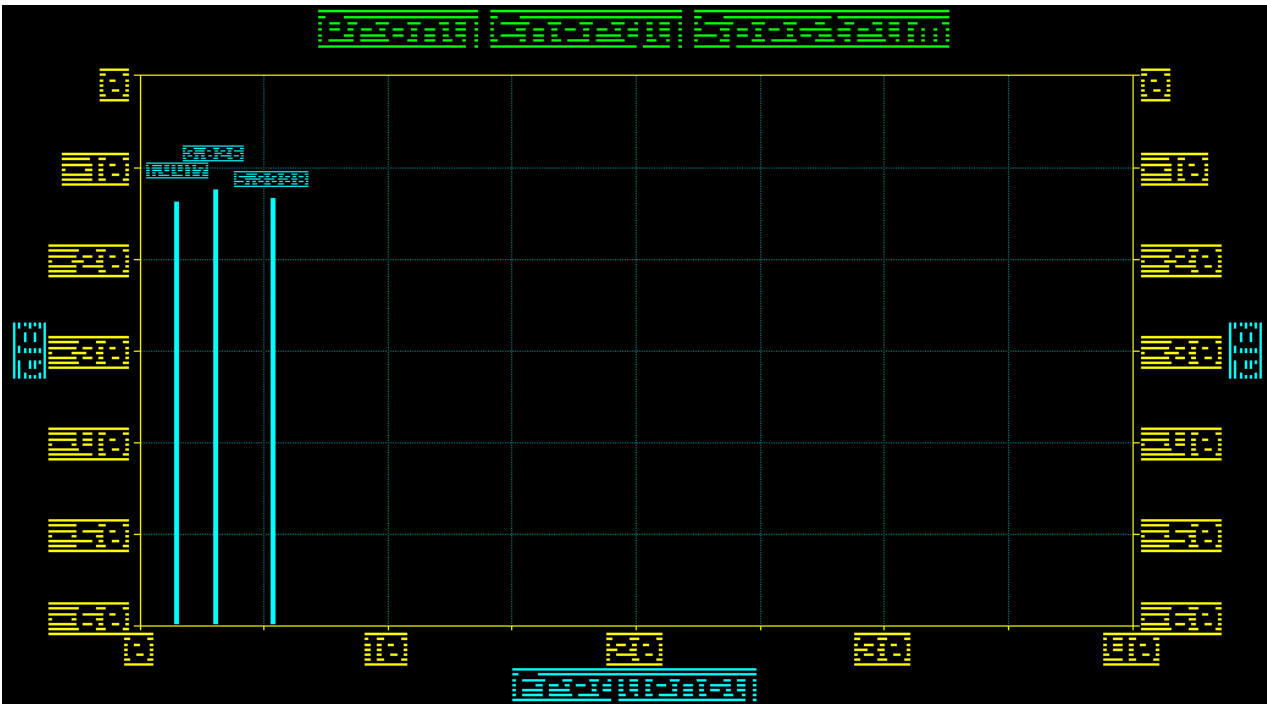


**Рис. 7.** Энергетический спектр Прони патч-кламп-регистраграммы глицинового рецептора, выполненный для тестирования программной части установки (Prony Energy Spectrum): 40-й порядок; 6 подпростр. (signal subspace); отношение сигнал/шум –  $S/N=300$ ; алгоритмика – Undamped Svd NE; линейная шкала частот.

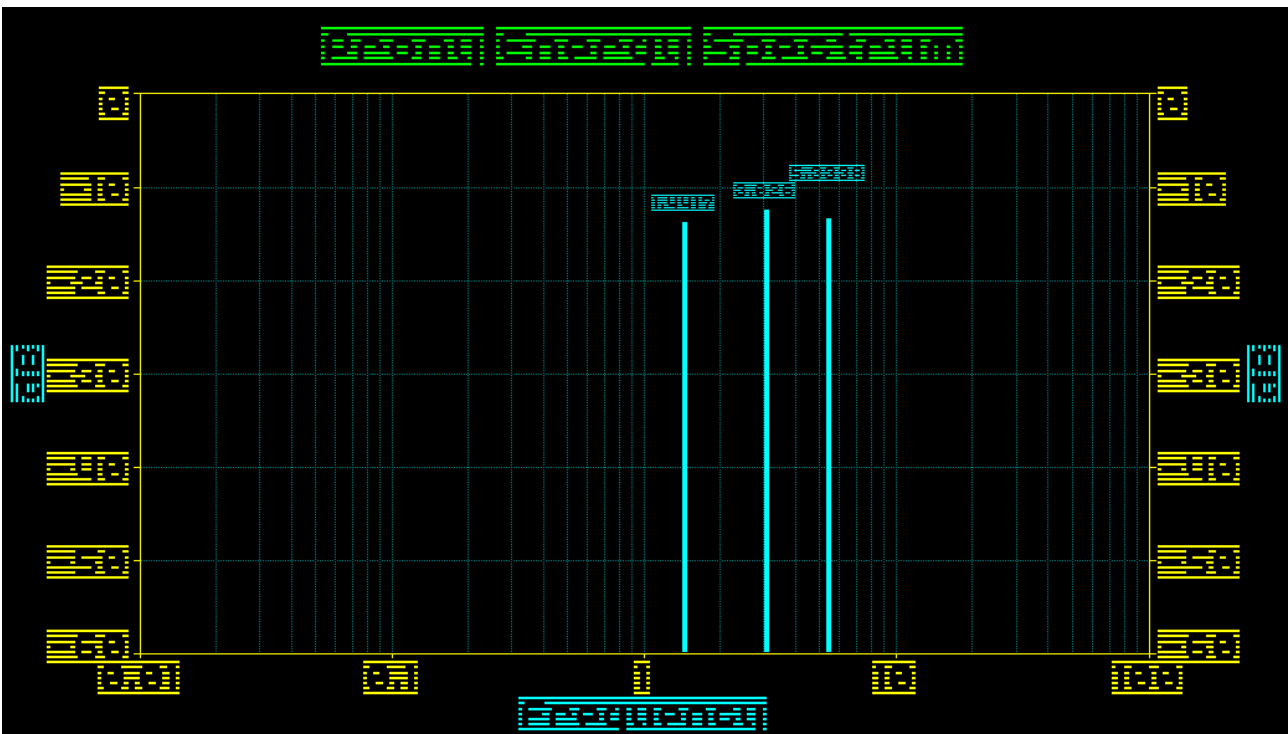


**Рис. 8.** Энергетический спектр Прони патч-кламп-регистраграммы глицинового рецептора, выполненный для тестирования программной части установки (Prony Energy Spectrum): 40-й порядок; 6 подпростр. (signal subspace); отношение сигнал/шум –  $S/N=300$ ; алгоритмика – Undamped Svd NE; логарифмическая шкала частот.

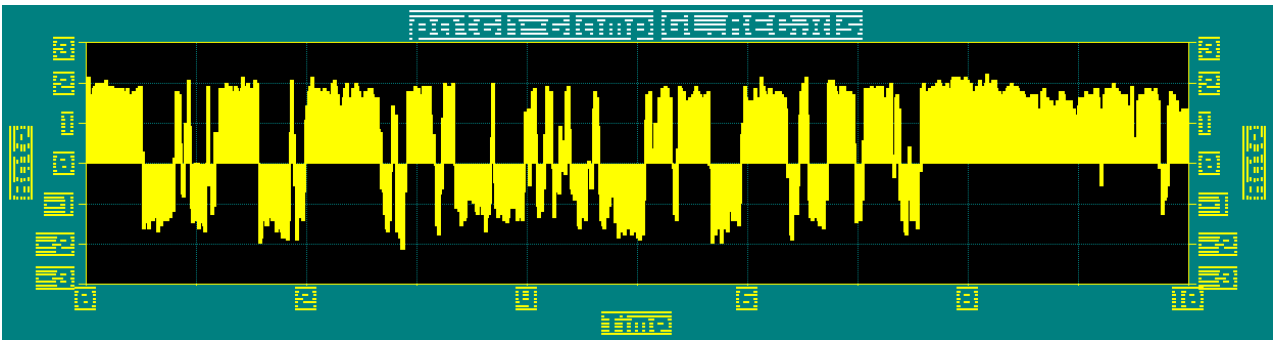




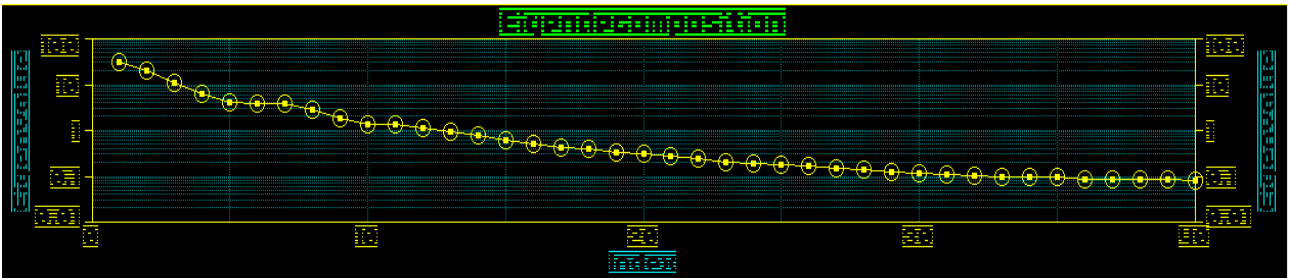
**Рис. 9.** Энергетический спектр Прони патч-кламп-регистраграммы глицинового рецептора, выполненный для тестирования программной части установки (Prony Energy Spectrum): 40-й порядок; 6 подпростр. (signal subspace); отношение сигнал/шум –  $S/N=300$ ; алгоритмика – Undamped Svd; линейная шкала частот.



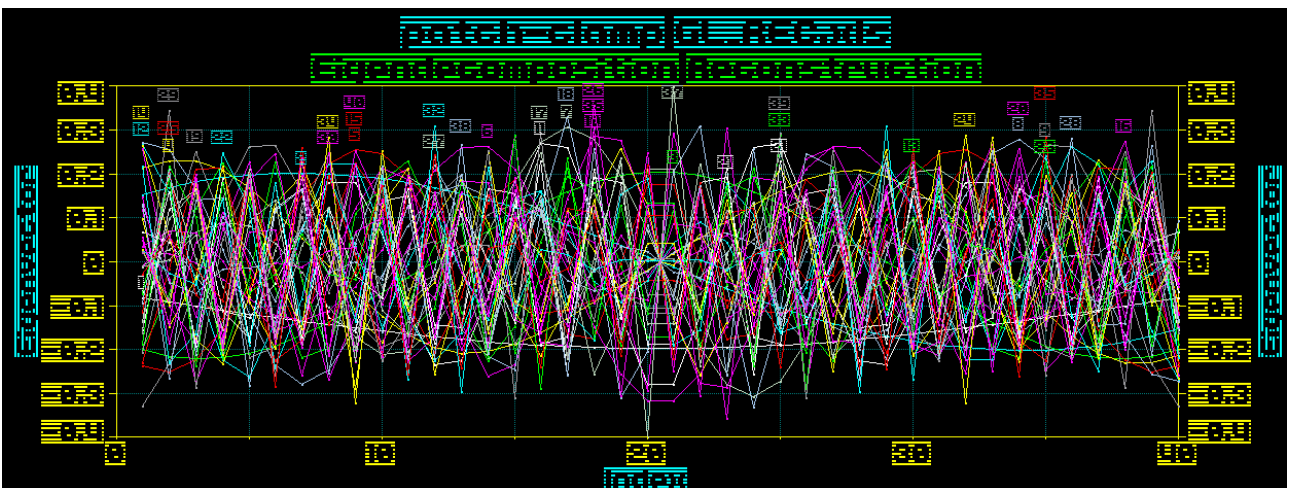
**Рис. 10.** Энергетический спектр Прони патч-кламп-регистраграммы глицинового рецептора, выполненный для тестирования программной части установки (Prony Energy Spectrum): 40-й порядок; 6 подпростр. (signal subspace); отношение сигнал/шум –  $S/N=300$ ; алгоритмика – Undamped Svd; логарифмическая шкала частот



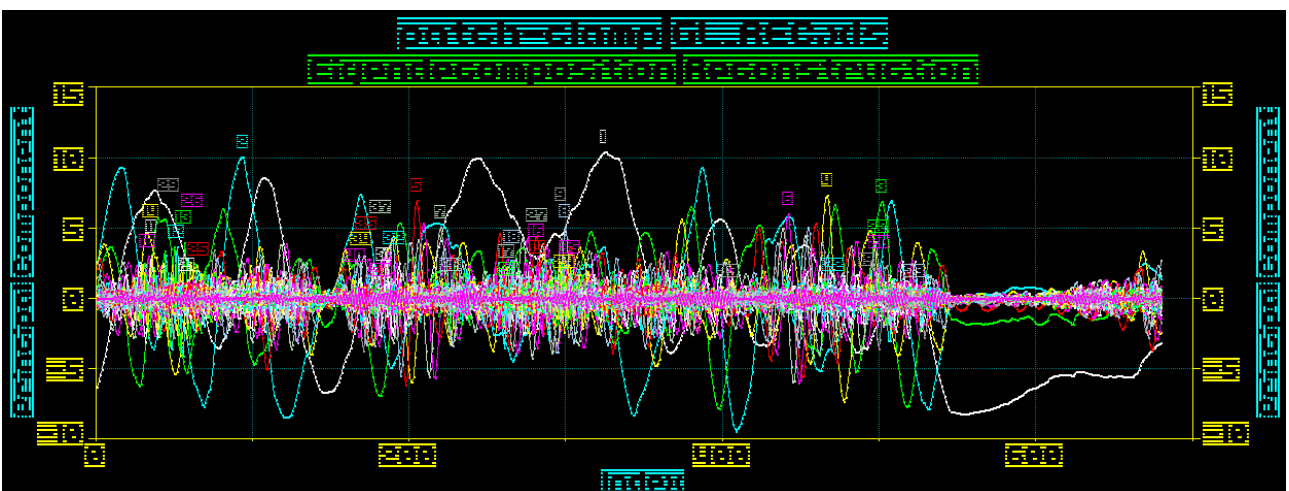
A) Data Registogramm



B) Eigendecomposition

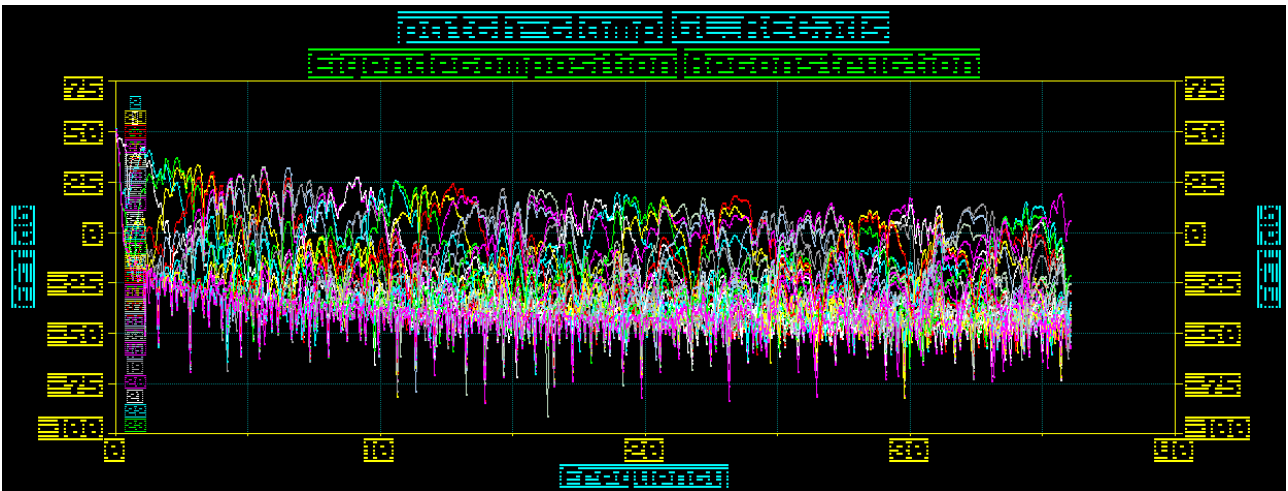


C) Eigenvectors

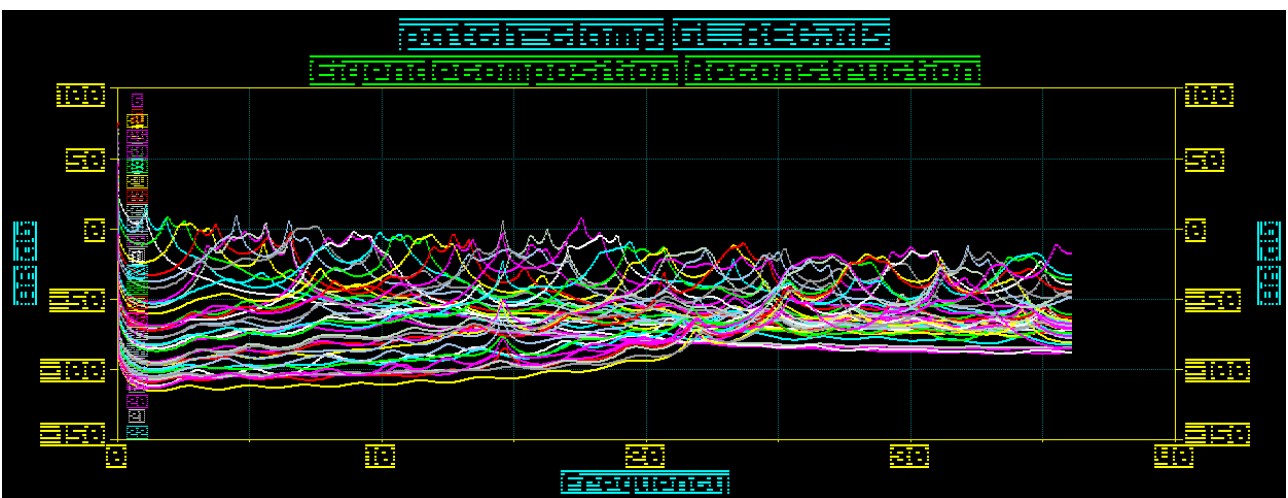


D) Principal Components

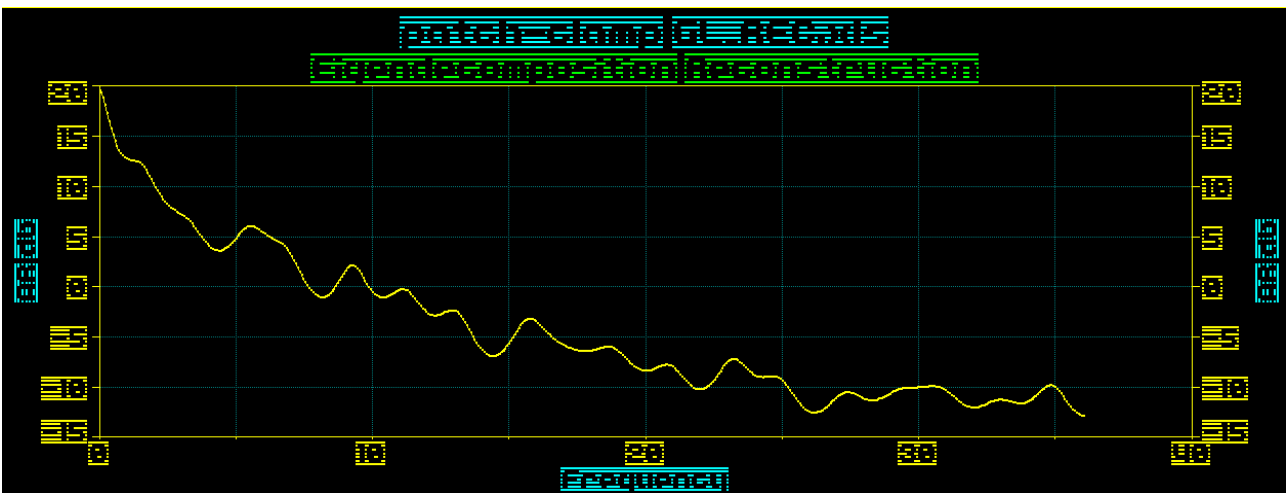
Рис. 11. Вспомогательные преобразования регистрограммы (начало иллюстрации)



E) FFT comp



F) Autoregressive comp



G) Autoregression (AR) for AR Comp.

**Рис. 11.** Вспомогательные преобразования регистрограммы (завершение иллюстрации)

Следует указать на различия данных UNDAMPED-алгоритмов, базирующихся на неких модификациях метода наименьших квадратов Прони в стандартном UNDAMPED-режиме и наиболее робастного при больших массивах данных в режиме UNDAMPED SVD NE (где SVD

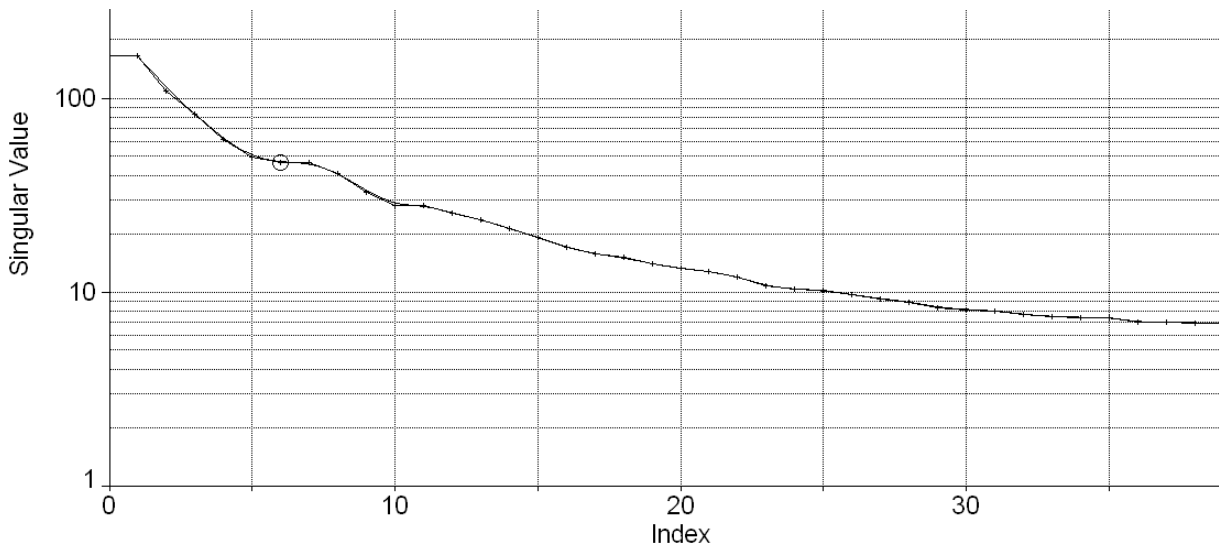
– Singular Value Decomposition; SVD для рассматриваемого массива данных приведен на [Рис. 12](#)). Для заданного порядка и сигнального подпространства, оцененные частоты идентичны в авторегрессионных спектрах ([Рис. 11](#)) и SVD. Процедура UNDAMPED SVD включает в себя отображение корней сигнала в единичную окружность (что нужно для обеспечения нулевых коэффициентов демпфирования, затухания), выполнение комплексной аппроксимации по методу наименьших квадратов с использованием данных модифицированных комплексных экспоненциальных коэффициентов. Алгоритм линейной синусоидальной подгонки AR SVD FB в данном случае непосредственно выполняет функцию наименьших квадратов в методе Прони.

Метод спектрального разложение матриц {eigendecomposition} на собственные вектора {eigenvectors}, продемонстрированный на [Рис. 11-B](#) и [Рис. 11-C](#), может быть реализован также с выдачей данных в численной форме, как это показано в листинге ниже, где программным путем вычленены порядок/размерность данных (40) и количество собственных мод (также 40), а также собственные значения для всех индексов, показанных по ординате на [Рис. 11-B](#) и [Рис. 11-C](#) (это можно рассматривать как разновидность методов векторметрического патч-кламп, аннотированного выше):

```
Eigendecomposition Analysis
Date: May 6, 2017
Data: patch-clamp GL_REC.xls
X: Time
Y: Rate
Data Source:
Data Size: 719
Algorithm: CovM FB
Order (Embedding Dimension): 40
Maximum Eigenmodes Retained: 40
Reconstruction Eigenmodes: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 ...
Reconstruction rl: 1
```

```
EigenValues
Idx EigenValue EigenVal % Component rl
1 26.800302457 32.227443621 0.4053712037
2 17.598920571 21.162754465 0.3210554180
3 9.6859866625 11.647427845 0.1764997096
4 5.5736404044 6.7023192065 0.1165115760
5 3.5806128815 4.3056976672 0.0734877502
6 3.2392720504 3.8952343000 0.0662690382
7 3.2249954723 3.8780666722 0.0646152782
8 2.4730187381 2.9738124069 0.0523211315
9 1.5996861951 1.9236274198 0.0335022880
10 1.1763038507 1.4145088881 0.0236470914
11 1.1732301122 1.4108127085 0.0229542403
12 0.9788332037 1.1770498463 0.0208829762
13 0.8273108674 0.9948437851 0.0160780743
14 0.6806889614 0.8185305059 0.0136147253
15 0.5378003049 0.6467064703 0.0106430417
16 0.4356928312 0.5239219287 0.0087800250
17 0.3671884300 0.4415451820 0.0070730701
18 0.3381598410 0.4066382172 0.0072355173
19 0.2888727768 0.3473703755 0.0062028022
20 0.2615234255 0.3144826990 0.0052988711
21 0.2430513587 0.2922699836 0.0047602293
22 0.2128540766 0.2559576619 0.0043752687
23 0.1711258253 0.2057793152 0.0034156797
24 0.1598426961 0.1922113187 0.0033424603
25 0.1541202789 0.1853300950 0.0029206496
26 0.1402454641 0.1686455888 0.0030478335
27 0.1272004516 0.1529589224 0.0024848376
28 0.1178663465 0.1417346332 0.0024785033
29 0.1035514921 0.1245209781 0.0022357453
30 0.0979268121 0.1177572836 0.0019660330
```





**Рис. 12.** Результаты SVD (Singular Value Decomposition) для патч-кламп-регистраграммы

Собственные векторы могут быть также табулированы и ранжированы по индексам, как это показано на листинге, приводимом далее:

Indx	Index	Evec 1	Evec 2	Evec 3	Evec 4	Evec 5	Evec 6	Evec 7
1	1.00000000	-0.0826001	0.15358327	-0.1994520	0.21263298	-0.2374841	0.02016869	-0.0098992
2	2.00000000	-0.0920887	0.16956527	-0.2148717	0.23063595	-0.2518779	0.01927239	0.02922398
3	3.00000000	-0.1011040	0.18249338	-0.2214098	0.22972278	-0.2237064	-0.0021641	0.06692128
4	4.00000000	-0.1101563	0.19199432	-0.2191191	0.20848319	-0.1547754	-0.0405994	0.08822968
5	5.00000000	-0.1192102	0.19813810	-0.2089983	0.16864792	-0.0576108	-0.0855539	0.08173597
6	6.00000000	-0.1277546	0.20125897	-0.1913724	0.11562036	0.05048878	-0.1216970	0.04200724
7	7.00000000	-0.1359074	0.20172142	-0.1675526	0.05451773	0.14985127	-0.1342469	-0.0243509
8	8.00000000	-0.1436457	0.19978131	-0.1387214	-0.0088994	0.22229154	-0.1129198	-0.1023470
9	9.00000000	-0.1510836	0.19553591	-0.1062544	-0.0697427	0.25571474	-0.0561215	-0.1710559
10	10.00000000	-0.1581470	0.18892925	-0.0714094	-0.1234989	0.24527419	0.02835835	-0.2101570
11	11.00000000	-0.1648199	0.17985238	-0.0354748	-0.1668088	0.19561420	0.12379645	-0.2045309
12	12.00000000	-0.1708845	0.16870264	0.00071625	-0.1957428	0.11953573	0.20834455	-0.1491645
13	13.00000000	-0.1766291	0.15567746	0.03601772	-0.2080028	0.03401268	0.26005063	-0.0519881
14	14.00000000	-0.1819410	0.14058838	0.06986350	-0.2042936	-0.0420112	0.26279413	0.06732398
15	15.00000000	-0.1865482	0.12346771	0.10195198	-0.1877070	-0.0947215	0.21132461	0.18406573
16	16.00000000	-0.1903511	0.10439465	0.13174822	-0.1612362	-0.1169715	0.11215189	0.27113778
17	17.00000000	-0.1933070	0.08347808	0.15843253	-0.1280750	-0.1101815	-0.0166171	0.30634156
18	18.00000000	-0.1953422	0.06106930	0.18048482	-0.0915441	-0.0859520	-0.1486390	0.28002262
19	19.00000000	-0.1967107	0.03728750	0.19605419	-0.0539533	-0.0588844	-0.2562378	0.19491160
20	20.00000000	-0.1973426	0.01259614	0.20420875	-0.0176603	-0.0417996	-0.3162728	0.06987986
21	21.00000000	-0.1973426	-0.0125961	0.20420875	0.01766033	-0.0417996	-0.3162728	-0.0698799
22	22.00000000	-0.1967107	-0.0372875	0.19605419	0.05395331	-0.0588844	-0.2562378	-0.1949116
23	23.00000000	-0.1953422	-0.0610693	0.18048482	0.09154415	-0.0859520	-0.1486390	-0.2800226
24	24.00000000	-0.1933070	-0.0834781	0.15843253	0.12807504	-0.1101815	-0.0166171	-0.3063416
25	25.00000000	-0.1903511	-0.1043946	0.13174822	0.16123619	-0.1169715	0.11215189	-0.2711378
26	26.00000000	-0.1865482	-0.1234677	0.10195198	0.18770700	-0.0947215	0.21132461	-0.1840657
27	27.00000000	-0.1819410	-0.1405884	0.06986350	0.20429364	-0.0420112	0.26279413	-0.0673240
28	28.00000000	-0.1766291	-0.1556775	0.03601772	0.20800284	0.03401268	0.26005063	0.05198808
29	29.00000000	-0.1708845	-0.1687026	0.00071625	0.19574276	0.11953573	0.20834455	0.14916455
30	30.00000000	-0.1648199	-0.1798524	-0.0354748	0.16680878	0.19561420	0.12379645	0.20453093
31	31.00000000	-0.1581470	-0.1889293	-0.0714094	0.12349886	0.24527419	0.02835835	0.21015703
32	32.00000000	-0.1510836	-0.1955359	-0.1062544	0.06974271	0.25571474	-0.0561215	0.17105595
33	33.00000000	-0.1436457	-0.1997813	-0.1387214	0.00889936	0.22229154	-0.1129198	0.10234700
34	34.00000000	-0.1359074	-0.2017214	-0.1675526	-0.0545177	0.14985127	-0.1342469	0.02435087
35	35.00000000	-0.1277546	-0.2012590	-0.1913724	-0.1156204	0.05048878	-0.1216970	-0.0420072

**Фазовые Фурье-спектральные (FFT) измерения с частотным разрешением либо частотной дискриминацией в анализе регистраграмм.** При этом, возможно, дополнительно к методу Прони, вычисляющему в данном случае распределение энергии

(или относительной мощности в дБ) на отдельных частотных линиях/полосах, получить полное описание Фурье-спектра с указанием статистически важнейших пиков с указанием значений фазы для этих пиков. Вычисление фазы возможно как для частотного анализа как такового (режим FREQUENCY ANALYSIS), так и для субоптимального фитирования (режим SINE COMPONENT FIT), но невозможно для интерполированных данных (INTERPOLATED SPECTRAL PEAKS), как это показано в листинге ниже:

#### Fourier Frequency Spectrum

Data: patch-clamp GL\_REC.xls

X: Time

Y: Rate

Data Source:

Date: May 6, 2017

Algorithm: Best Exact N

Data Size: 719

FFT Size: 719 (719)

SSA Power: 1756.389

MSA Power: 2.442822

TISA Power: 24.36074

Signal Count: 4

#### Interpolated Spectral Peaks

Frequency	dB
0.3042264249	43.433445902
1.0034773027	48.415309418
1.2491668585	45.755826176
1.9086457085	43.710618741

#### Frequency Analysis

Frequency	Amplitude	Phase	Power	%
0.30422642	0.41541343	3.19191596	0.86045809	15.7294310
1.00347730	0.73278205	0.16789574	2.67743108	48.9442402
1.24916686	0.45492913	2.80992484	1.03194403	18.8642453
1.90864571	0.42497798	3.21863125	0.90053689	16.4620834
			5.47037009	100.000000

#### Sine Component Fit (Suboptimal)

Frequency	Amplitude	Phase	Power	%
0.30422642	0.42932546	3.03843694	0.90885513	15.9651833
1.00347730	0.76394508	0.10212896	2.90783667	51.0798081
1.24916686	0.44264964	2.89151025	0.97926483	17.2020183
1.90864571	0.42446488	3.02844089	0.89677554	15.7529902
			5.69273217	100.000000

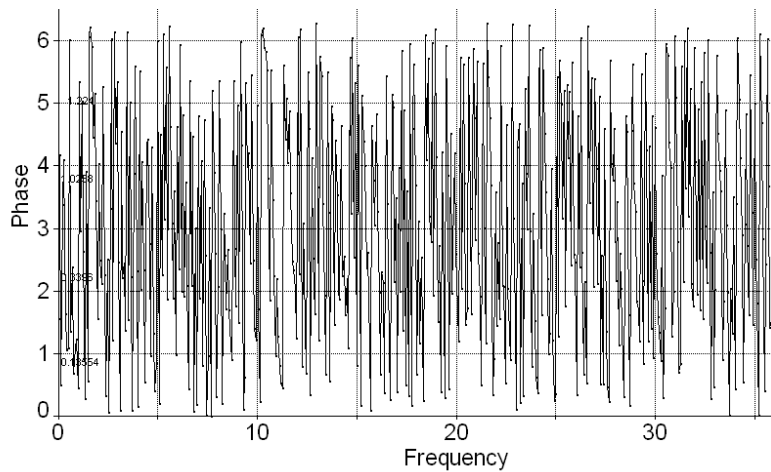
К сожалению, режимы вычисления энергетических спектров не предусматривают ни фазовой, ни иной дополнительной по дескрипторам визуализации, кроме мощностной либо энергетической (дБ). Однако, как можно видеть в формулах, описывающих преобразование, приведенных выше, фаза присутствует. Поэтому было принято решение извлекать данные о фазе из спектральных измерений FFT, с помощью которых получают данные, показанные на листинге выше. Режим полной выдачи (FFT DATA SUMMARY) выдает одновременно семь параметров спектра патч-кламп-машинограмм: частоту (Frequency), магнитуду (Magnitude), амплитуду (Amplitude), длину волны (Wavelength), фазу (Phase), относительную мощность (dB), спектральную плотность мощности (PSD), вычисленную с использованием интеграла квадрата амплитуды по времени (PSD TISA – по аббревиатурам «Power Spectrum Density» и «Time-Integral Squared Amplitude»). Пример данного листинга приведен ниже:

Chnl	Frequency	Magnitude	Amplitude	Wavelength	Phase	dB Norm	PSD TISA
0	0.00000000	457.821430	0.63674747	0.00000000	1.57079633	0.00000000	4.04327332
1	0.10027700	284.209270	0.79056821	9.97237603	2.28634388	-4.1411576	3.11635797
2	0.20055401	106.260842	0.29557953	4.98618801	4.08266886	-12.686457	0.43562958
3	0.30083101	148.922947	0.41425020	3.32412534	3.26246081	-9.7546899	0.85564596
4	0.40110802	85.6508766	0.23825000	2.49309401	1.12945856	-14.559286	0.28303131
5	0.50138502	65.6340792	0.18257046	1.99447521	1.10166675	-16.871334	0.16619948
6	0.60166203	13.4386079	0.03738138	1.66206267	3.01076838	-30.646837	0.00696754
7	0.70193903	116.099069	0.32294595	1.42462515	2.45063635	-11.917348	0.52002993
8	0.80221604	75.6327992	0.21038331	1.24654700	0.39777893	-15.639719	0.22069435
9	0.90249304	90.7540191	0.25244512	1.10804178	1.22012845	-14.056605	0.31776246
10	1.00277005	263.417895	0.73273406	0.99723760	0.15861612	-4.8010169	2.67708037
11	1.10304705	114.565256	0.31867943	0.90657964	4.11166400	-12.032864	0.50638020
12	1.20332406	146.938990	0.40873154	0.83103134	4.83295657	-9.8711813	0.83299992
13	1.30360106	135.299156	0.37635370	0.76710585	1.37152249	-10.588021	0.70625419
14	1.40387807	14.1616995	0.03939277	0.71231257	4.36416323	-30.191615	0.00773752
15	1.50415507	58.3373763	0.16227365	0.66482507	0.35026998	-17.894984	0.13129998
16	1.60443208	28.5358856	0.07937659	0.62327350	5.65451640	-24.106095	0.03141619
17	1.70470908	121.613674	0.33828560	0.58661035	5.61820787	-11.514274	0.57060513
18	1.80498609	27.7899128	0.07730157	0.55402089	4.84834025	-24.336179	0.02979513
19	1.90526309	152.439722	0.42403261	0.52486190	3.32788304	-9.5519594	0.89653481
20	2.00554010	24.1952280	0.06730244	0.49861880	0.41436574	-25.539328	0.02258553
21	2.10581710	21.3110663	0.05927974	0.47487505	2.46454329	-26.641819	0.01752190
22	2.20609411	67.8983135	0.18886874	0.45328982	1.34095605	-16.576743	0.17786432
23	2.30637111	118.484740	0.32958203	0.43358157	2.80590891	-11.740674	0.54162126
24	2.40664812	85.3270498	0.23734923	0.41551567	6.27694132	-14.592188	0.28089520
25	2.50692512	96.2052220	0.26760841	0.39889504	0.94003278	-13.549949	0.35708216
26	2.60720213	29.9854112	0.08340865	0.38355292	3.17216793	-23.675722	0.03468893
27	2.70747913	25.2175938	0.07014630	0.36934726	2.18314886	-25.179849	0.02453455
28	2.80775614	97.2930303	0.27063430	0.35615629	0.02851128	-13.452288	0.36520299
29	2.90803314	2.88231077	0.00801755	0.34387504	3.64608532	-44.019106	0.00032052
30	3.00831015	46.3706173	0.12898642	0.33241253	3.40234801	-19.889065	0.08295768
31	3.10858715	58.0316829	0.16142332	0.32168955	6.16404617	-17.940619	0.12992753
32	3.20886416	73.7533192	0.20515527	0.31163675	3.21824907	-15.858291	0.20986209
33	3.30914116	29.5512200	0.08220089	0.30219321	2.46011405	-23.802414	0.03369160
34	3.40941817	43.6081684	0.12130228	0.29330518	1.11589322	-20.422565	0.07336798
35	3.50969517	33.6193174	0.09351688	0.28492503	2.21189190	-22.682145	0.04360624

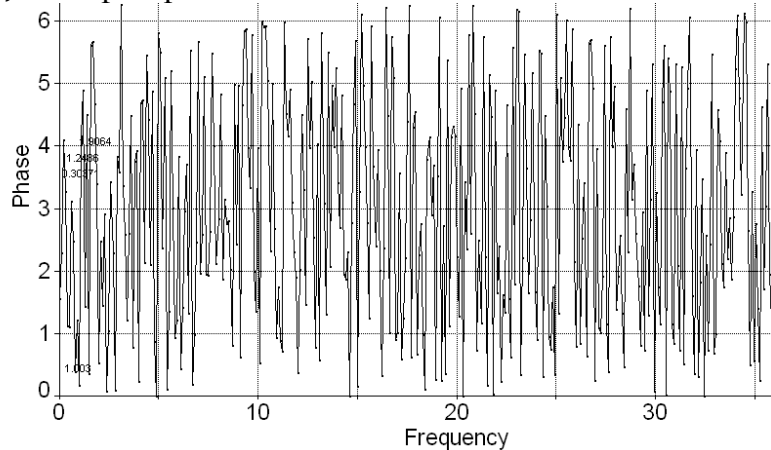
Поэтому извлечение данных о фазе экстрагированием (автоматизированным путем) данных 5-6 столбца с соотношением фреймов фазовых данных фреймам данных о мощности – последним двум столбцам или результатам PES (Prony Energy Spectrum) не представляет, по существу, какого-либо труда. Единственной очевидной проблемой является различие вида и численных данных фазового спектра при изменении характера спектрального окна либо в случае изменения типа преобразования.

Рассмотрим эту проблему более подробно, приведя графические примеры:

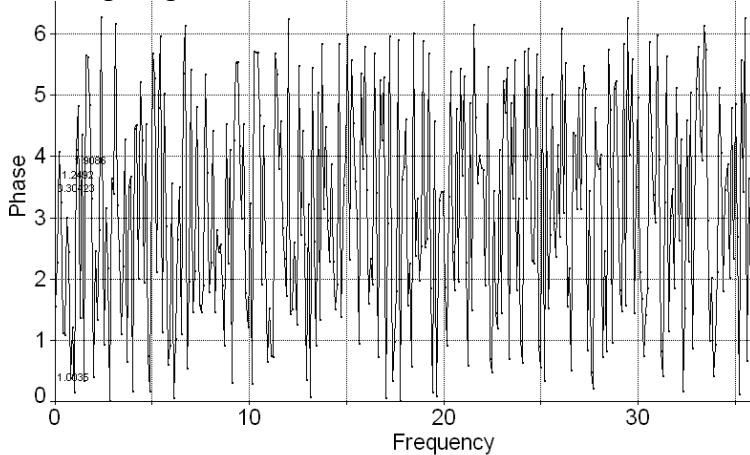
I. На Рис. 13 приведены три типа фазовых спектров, получаемых при разных типах преобразований: А) FFT RADIX 2 – простейший алгоритм, применяемый в БПФ по основанию 2 (в целом ряде Кули-Тьюки-подобных алгоритмов, в том числе – с прореживанием по времени); В) PRIME FACTOR – алгоритм БПФ Гуда-Томаса (также аббревируется как PFA), связанный с вложенным алгоритмом PFA FFT Винограда (Winograd FFT algorithm); С) CHIRP-Z – дискретное преобразование Фурье, осуществляемое, как правило, с использованием алгоритма Блустейна (в котором данное преобразование выражается свертка, также как и в алгоритмике Ридера); MIXED RADIX – преобразование Фурье по смешанному основанию, т.е. в смешанной системе счисления.



A) Тип преобразования: FFT RADIX 2



B) Тип преобразования: PRIME FACTOR



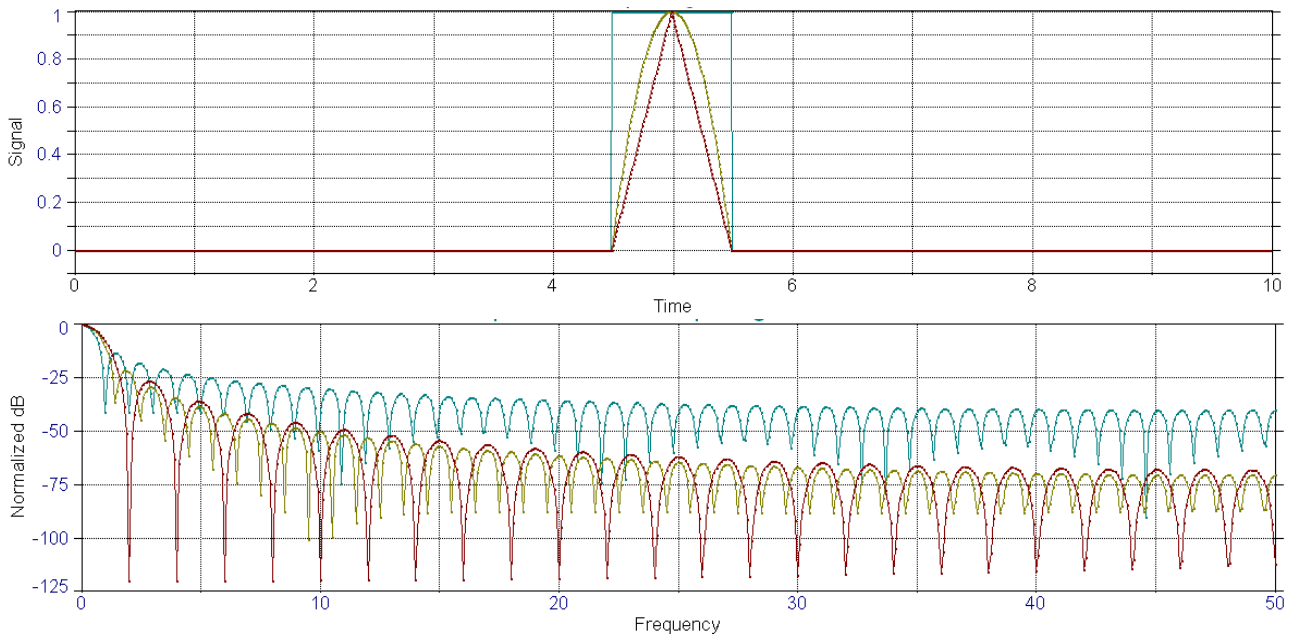
C) Типы преобразования: CHIRP-Z и MIXED RADIX

**Рис. 13.** Изменение формы вычисляемого фазового спектра при изменении типа преобразования

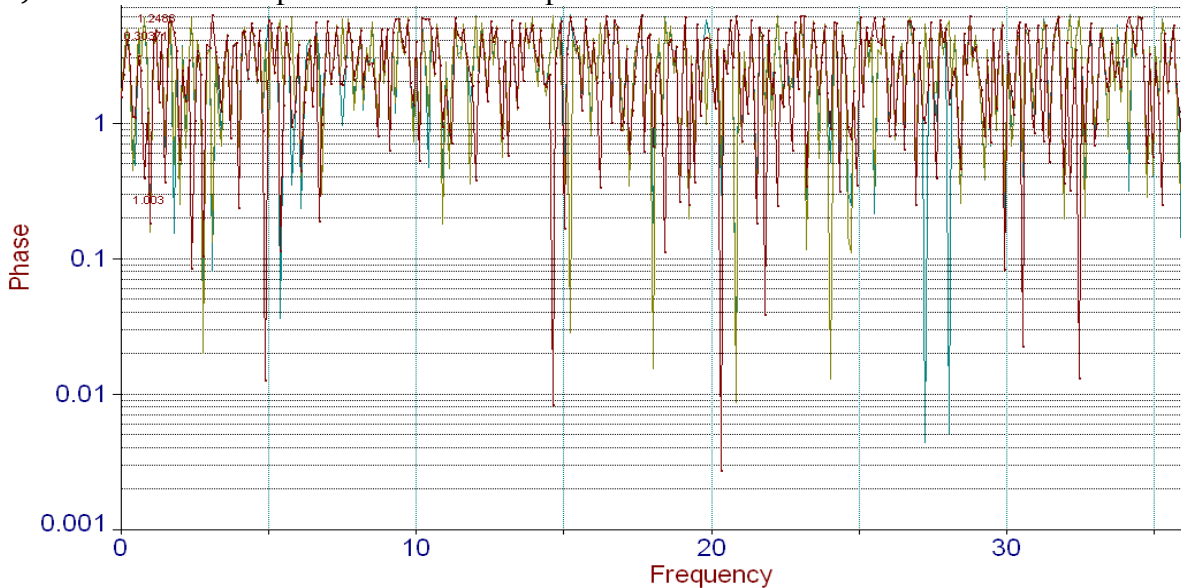
II. На [Рис. 14-A](#) приведены три примера изменения спектра сигнала при изменении окон (весовых функций в спектральных оценках): контроль – без окна (синий), окно Уэлша (желтый), окно Бартлетта (красный). На [Рис. 14-B](#) приведено прямое сравнение результатов использования этих окон (как весовых коэффициентов) в ходе вычисления фазового спектра в логарифмическом представлении фазовой оси. Можно видеть, что изменение весовых функций в спектральных оценках не может не отражаться на форме спектра распределения фаз патч-кламп-сигнала. Более того, наблюдается смещение пиков на фазовом логарифмическом спектре и появление новых пиков в случае несовпадения типов окон.



Поэтому в любых диагностических методах, основанных на «фазовой патч-кламп-спектроскопии» и синхронном детектировании (lock-in) необходимо применять один тип окон во всей выборке регистрограмм, которые планируется взаимно сравнивать между собой, или подвергать единым математическим преобразованиям для решения задач медицинской аналитики и клеточной фармакологии.



А) Изменение спектрального отклика при изменении типа окна.



В) Примеры фазового спектра реального патч-кламп-сигнала при разных окнах.

**Рис. 14.** Изменение формы вычисляемого фазового спектра при изменении

#### 4. Обсуждение

Данное направление работ находится в тренде исследований, ведущихся авторами по инициативному направлению «Разработка методов и установок патч-кламп-спектроскопии / патч-кламп-спектрометрии». В настоящей статье описана одна из наиболее ранних работ в данном направлении. Впервые о направлении и его применимости в клеточной диагностике в биомедицине заявлено было в кратких сообщениях в 2015 г. (Градов, 2015), но ряд работ, «столбнящих позиции» в биомедицинском направлении последовал также в 2016 г. (Градов, 2016). В конце 2016 года были достигнуты первые успехи в совмещении дескрипторов патч-кламп-диагностики и ряда методов спектроскопии, доступных в оснащенных клиниках либо в экспериментальных условиях (Градов, Орехов, 2016). Однако теоретические достижения и

продвижения в экспериментальной программе публикуются на несколько лет позже начала работ – текущая работа была начата в 2013 году и проводилась совместно с представителями Отдела исследований мозга ИЦН РАН и Отдела динамики химических и биологических процессов ИХФ РАН. Последние годы работа ведется в безвозмездном (заявки на гранты не подавались) формате, поскольку отсутствие штатных единиц не позволяет говорить о каких-либо сроках прогресса в настоящем направлении. Публикация настоящего материала могла бы быть отложена на годы вперед до улучшения ситуации, однако ближайшие перспективы реорганизации быв. институтов РАН, в которых до последнего времени работали участники данных добровольных НИР (слияние и сокращение штата), заставило авторов пересмотреть стратегию и предпочесть публикацию и депонирование в текущем году всего накопленного материала, который только может быть опубликован в подтверждение верности концепции, в том числе – рабочих материалов и листингов, а также технических заделов биологических работ, продолжение которых для прикладных биомедицинских направлений находится под вопросом. В условиях, когда на весь коллектив с трудом удается достать одну полную ставку, а инфраструктура не обеспечивает минимально стерильных условий работы для клеточных и тканевых работ, культур клеток – о динамичном продвижении тематики речь, увы, идти не может. Поэтому авторы призывают рассматривать настоящий материал не как индикатор и критерий абсолютного качества труда коллектива авторов, но как полезный для развития на будущее концепт, демонстрирующий инициальные возможности развития данной тематики как в техническом, так и в биомедицинском ключе. Первый автор настоящей работы хотел бы не усложнять чрезмерно статью математическими подробностями, чтобы материал мог быть воспринят медиками и биологами без вычислительно-математического бэкграунда; по этой причине он старался упростить текст и лишь вскользь упоминать о специфике, посему он просит прощения, если эта адаптация в какой-то мере не удалась (впрочем, и не могла до известной меры удалась – ввиду междисциплинарности тематики и подходов в ней).

## 5. Заключение

Итого – предложены, описаны, рассмотрены и реализуемы следующие конструктивно-алгоритмические нововведения, которые могут быть использованы в диагностике на уровне одиночных клеток и их ионных каналов:

- a) селективно-нановольтметрический патч-кламп с разделением по частоте;
- b) фазо-селективный синхронно-детектирующий «патч-кламп-спектрометр»;
- c) логарифмический по фазе патч-кламп-спектр ( $\lg[\varphi]$ - $\omega$ -patch-clamp spectrum);
- d) патч-кламп с установлением энергии в отдельных полосах (спектр Прони);
- e) дифференциальная мультиалгоритмическая патч-кламп-спектроскопия на базе энергетических спектров Прони в линейных и логарифмических координатах;
- f) патч-кламп-автоматика для нейроэлектробиологического чипа с частотным дискриминатором;
- g) гибридная патч-кламп-спектрометрия в действительной и мнимой области;
- h) векторметрический патч-кламп и его аналог на собственных векторах матриц;
- i) компаративная мультиалгоритмическая фазовая патч-кламп-спектроскопия;
- j) фазовая патч-кламп-спектроскопия с разными весовыми окнами спектральных оценок.

О некоторых (большинстве) из данных технологий пойдёт речь в ближайших работах, если тому не воспрепятствуют не зависящие от авторов форсмажорные обстоятельства.

## References

Александров, Градов, 2014 – Александров П.Л., Градов О.В. (2014). Конвенционные патч-кламп-автоматы с обратной связью для многофакторных лабораторий на чипе с использованием интерфейсов вычислительных машин реального времени. *Биотехносфера*, 3(33): 13-17.

Градов, 2015 – Градов О. В. (2015). "Многофакторная патч-кламп-спектроскопия" как метод анализа процессов сигнализации и регуляции клеточных функций ионными каналами. *Цитология*, 57(9): 625–626.

Градов, 2015 – Градов О.В. (2015). Патч-кламп-спектроскопия как потенциальный инструмент диагностирования в молекулярной онкологии и анализе активности ионных каналов как вероятных молекулярных мишеней. *Успехи молекулярной онкологии*, 2(4): 66.

Градов, 2016 – Градов О.В. (2016). Радиоавтографически-детектирующий локальный патч-кламп как метод онкоцитологического анализа. *Евразийский онкологический журнал*, 4(2): 637.

Градов, 2016 – Градов О.В. (2016). Количественная оценка воздействия неорганических элементов на клетки рака толстой кишки путем анализа отклика ионных каналов методами патч-кламп-спектроскопии в реальном времени // Сборник тезисов III Конгресса ОСОК (19 – 21 октября 2016 г.). ФГБУ Российский онкологический научный центр им.Н.Н.Блохина МЗ РФ, Москва, 2016. [Электронный ресурс] <https://osf.io/preprints/agrxiv/68brq>.

Градов, 2016 – Градов О.В. (2016). Многофакторная патч-кламп-спектроскопия как метод микробиологической диагностики и анализа эффективности антимикробной терапии. URL: <http://istina.msu.ru/conferences/presentations/33750562/> [Электронный ресурс]. [http://istina.msu.ru/media/conferences/conferencepresentation/555/db3/33750562/МКАТ\\_XVI\\_II.pdf](http://istina.msu.ru/media/conferences/conferencepresentation/555/db3/33750562/МКАТ_XVI_II.pdf) [Электронный ресурс].

Градов, Орехов, 2016 – Градов О.В., Орехов Ф.К. (2016). Корреляционная патч-кламп-спектрометрия ионных каналов – сочетание спектрального анализа электрофизиологического отклика канала в нежестком реальном времени и методов спектроскопии ионных каналов как координационных (комплексных) структур. *Биомедицинская инженерия и электроника*, 2(13): 5–28.

Нотченко, Градов, 2012 – Нотченко А.В., Градов О.В. (2012). Пятиосная роботизированная лазерная система и алгоритм цифровой обработки выходных данных для регистрации и морфотопологической идентификации клеточно-тканевых структур в гистоморфогенезе. *Журнал радиоэлектроники*, Вып. 1-2012 (статья 14): 1-33.

Ситдикова и др. 2011 – Ситдикова Г.Ф., Хазипов Р.Н., Hermann A. (2011). *Структура функции ионных каналов возбудимой клетки*. Изд. Каз. Универс., Казань, 96 с.

Alberti et al., 2014 – Alberti M., Snakenborg D., Lopacinska J.M., Dufva M., Kutter J.P. (2014). Impedance spectra of patch clamp scenarios for single cells immobilized on a lab-on-a-chip. *Microfluidics and Nanofluidics*, 7(2): 263-274.

Alexandrov, Gradov, 2014 – Alexandrov P.L., Gradov O.V. (2014). Conventional Patch-Clamp Techniques For Multi-channel Lab-On-A-Chip Signal Registration Using Real Time Target Machine Interfaces and in situ Real-Time Digital Signal Processing and Modeling. *X RGC on Biomedical Engineering (SPS Electrotech. Univers., University build. №5, Sec.: Processing and Analysis of Biomedical Signals And Data)*; [Электронный ресурс]; DOI: 10.13140/2.1.4025.1528, 4 p.

Aneva et al., 1994 – Aneva Z., Nesheva D., Levi Z. (1994). Optical spectra of doped Bi<sub>12</sub>TiO<sub>20</sub> crystals. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 6(50): 11167-11175.

Autrata et al., 1983 – Autrata R., Schauer P., Kvapil J., Kvapil J. (1983). A single crystal of YAlO<sub>3</sub>: Ce<sup>3+</sup> as a fast scintillator in SEM. *Scanning*, 5(2): 91–96.

Avakyants et al., 2005 – Avakyants L.P., Bokov P.Yu., Chervyakov A.V. (2005). Computerized setup for double-monochromator photoreflectance spectroscopy. *Technical Physics*, 50(10): 1316-1318.

Bamann et al., 2008 – Bamann C., Kirsch T., Nagel G., Bamberg E. (2008). Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function. *Journ. Mol. Biol.*, 375(3): 686-694.

Barbu et al., 1995 – Barbu A., Bratu I., Borodi Gh. (1995). Photoacoustic and X-ray investigations of Ni<sub>100-x</sub>Cu<sub>x</sub> alloys. *Materials Letters*, Vol. 24, Issue 4, pp. 231–233 (1995)

Bashkuev et al., 2003 – Bashkuev Yu.B., Khaptanov V.B., Khankharaev A.V. (2003). Analysis of Propagation Conditions of ELF Radio Waves on the “Zeus”–Transbaikalia Path. *Radiophysics and Quantum Electronics*. 46(12): 909-917.

Bazzone et al., 2013 – Bazzone A., Costa W.S., Braner M., Călinescu O., Hatahet L., Fendler K. (2013). Introduction to solid supported membrane based electrophysiology. *Journ. Vis. Exp.*, [Электронный ресурс]. DOI: 10.3791/50230.

Bierzynski and Jasny, 1975 – Bierzynski A., Jasny J. (1975). High accuracy spectrofluorimeter for determination of relative quantum yields within a broad range of optical densities. *Journal of Photochemistry*, 3(6): 431–439.

Bletskan et al., 2006 – Bletskan D.I., Kabatsii V.M., Kranichets M., Frolova V.V., Gule E.G. (2006). Photoconductivity and photoluminescence of PbGa<sub>2</sub>Se<sub>4</sub> crystals. *Chalcogenide Letters*, 3(12): 125-132.

Bletskan et al., 2010 – Bletskan D.I., Kabatsii V.N., Kranjčec M. (2010). Photoelectric properties of ordered-vacancy Ga<sub>2</sub>Se<sub>3</sub> single crystals. *Inorganic Materials*, 46(12): 1290-1295.

Brueggemann et al., 2004 – Brueggemann A., George M., Klau M., Beckler M., Steindl J., Behrends J.C., Fertig N. (2004). Ion channel drug discovery and research: the automated Nano-Patch-Clamp technology. *Curr. Dr. Disc. Techn.*, 1: 91-96.

Bryushinin et al., 1999 – Bryushinin M.A., Dubrovsky G.B., Sokolov I.A. (1999). Non-steady-state photocurrents in SnS<sub>2</sub> crystals. *Applied Physics B*, 68(5): 871-875.

Bunzarov et al., 2008 – Bunzarov Z., Dimov T., Petkova P., Iliev I. (2008). Optical Properties of Crystal Water in MgSO<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O Single Crystals. *AIP Conf. Proc.*, 1162: 210-214.

Ceriani and Mammano, 2013 – Ceriani F., Mammano F. (2013). A rapid and sensitive assay of intercellular coupling by voltage imaging of gap junction networks. *Cell Communication and Signaling*, 11(78): 1-11.

Colquhoun and Hawkes, 2009 – Colquhoun D., Hawkes A.G. The Principles of the Stochastic Interpretation of Ion-Channel Mechanisms [Chapter 18]. In: *Single-Channel Recording* (Ed. by B. Sakmann, E. Neher), 2009, Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp. 397-478.

Cywiński and Damm, 1983 – Cywiński R., Damm J.Z. (1983). Effect of oxygen impurities on recombination luminescence in some alkali halide crystals. *Crystal Research and Technology*, 18(12): 1561–1566.

Debus et al., 1995 – Debus K., Hartmann J., Kilic G., Lindau M. (1995). Influence of conductance changes on patch clamp capacitance measurements using a lock-in amplifier and limitations of the phase tracking technique. *Biophys. Journ.*, 69(6): 2808-2822.

del Castillo and Katz, 1957 – del Castillo J., Katz B. (1957). Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proc. Roy. Soc. Lond. B: Biol. Sci.*, 146(924): 369-381.

Dempster, 2001 – Dempster J. (2001). *The Laboratory Computer: A Practical Guide for Physiologists and Neuroscientists*. Academic Press, London, San Diego, 2001, 354 p.

Du et al., 2000 – Du J., Haak L.L., Phillips-Tansey E., Russell J.T., McBain C.J. (2000) Frequency-dependent regulation of rat hippocampal somato-dendritic excitability by the K<sup>+</sup> channel subunit Kv2.1. *Journ. Physiol.*, 522(1): 19-31.

Elhamdani et al., 2006 – Elhamdani A., Azizi F., Artalejo C.R. (2006). Double patch-clamp reveals that transient fusion (kiss-and-run) is a major mechanism of secretion in calf adrenal chromaffin cells: high calcium shifts the mechanism from kiss-and-run to complete fusion. *Journ. Neurosci.*, 26(11): 3030-3036.

Estacion et al., 2010 – Estacion M., Choi J.S., Eastman E.M., Lin Z., Li Y., Tyrrell L., Yang Y., Dib-Hajj S.D., Waxman S.G. (2010). Can robots patch-clamp as well as humans? Characterization of a novel sodium channel mutation. *Journ. Physiol.*, 588(11): 1915-1927.

Georgobiani et al., 1984 – Georgobiani A.N., Gruzintsev A.N., Ilyukhina Z.P., Tezlevan V.E., Tiginyanu I.M. (1984). Photoconductivity and non-equilibrium carrier recombination in CdIn<sub>2</sub>S<sub>4</sub> single crystals. *Physica Status Solidi (A)*, 82(1): 207–212.

Ghimpu et al., 2005 – Ghimpu L., Ursaki V.V., Potlog T., Tiginyanu I.M. (2005). Photoluminescence study of CdTe/CdS solar cells grown from a source with Cu residual impurity. *Semiconductor Science and Technology*, 20(11): 1127-1131.

Gillis, 2000 – Gillis K.D. (2000). Admittance-based measurement of membrane capacitance using the EPC-9 patch-clamp amplifier. *Pflügers Archiv*, 2000, 439(5): 655-664.

Gotszalk and Lisowski, 1987 – Gotszalk R., Lisowski M. (1987). Mutual inductance bridge for the measurement of superconducting transition temperatures and magnetic susceptibility. *Rev. Sci. Instrum.*, 58(9): 1771-1772.

Gulyaev, 1957 – Gulyaev P.I. (1957). Oscillographic method for measurement of functional lability and refractory phase of nerves. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 44: 145-148.



Hájek and Ošťádal I., 1984 – Hájek Z., Ošťádal I. (1984). Electrical properties of discontinuous thin platinum films and the  $\tau$ -spectroscopy. *Czechoslovak Journal of Physics B*, 34(2): 138-145.

Hermann et al., 2010 – Hermann A., Sitdikova G.F., Weiger T.M. (2010). Gase als zelluläre Signalstoffe. *Biologie i.u. Zeit*, 3: 185-193.

Horák and Schauer, 2006 – Horák P., Schauer P. (2006). Cathodoluminescence as a method for the study of degradation of polysilanes. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 252(2): 303–307.

Hoshiko, 1978 – Hoshiko T. (1978). Power density spectra of frog skin potential, current and admittance functions during patch clamp. *Journal of Membrane Biology*, 40: 121-134.

Huang et al., 2013 – Huang H., Bae C., Sachs F., Suchyna T.M. (2013). Caveolae regulation of mechanosensitive channel function in myotubes. *PLoS One.*, 8(E72894): 1-15.

Hutcheon et al., 1996 – Hutcheon B., Miura R.M., Puil E. (1996). Models of subthreshold membrane resonance in neocortical neurons. *Journ. Neurophysiol.*, 76(2): 698-714.

Hutcheon et al., 1996 – Hutcheon B., Miura R.M., Puil E. (1996). Subthreshold membrane resonance in neocortical neurons. *Journ. Neurophys.*, 76(2): 683-697.

Ilyin et al., 2005 – Ilyin V.I., Hodges D.D., Whitemore E.R., Carter R.B., Cai S.X., Woodward R.M. (2005). V102862 (Co 102862): a potent, broad-spectrum state-dependent blocker of mammalian voltage-gated sodium channels. *Br. Journ. Pharmacol.*, 144(6): 801-812.

Ivanov et al., 2012 – Ivanov V.Yu., Mukhin A.A., Glushkov V.V., Balbashov A.M. (2013). Spontaneous reorientation of the electric polarization in  $\text{Eu}_{1-x}\text{Ho}_x\text{MnO}_3$  multiferroics. *JETP Letters*, 97(1): 28-33.

Johnson et al., 2002 – Johnson S.L., Thomas M.V., Kros C.J. (2002). Membrane capacitance measurement using patch clamp with integrated self-balancing lock-in amplifier. *Pflugers Arch. | Eur. Journ. Physiol.*, 02 – Vol. 443, No. 4 – pp. 653-663.

Joshi and Fernandez, 1988 – Joshi C., Fernandez J.M. (1988). Capacitance measurements. An analysis of the phase detector technique used to study exocytosis and endocytosis. *Biophys. Journ.*, 53(6): 885–892.

Kaestner, 1999 – Kaestner L., Bollensdorff C., Bernhardt I. (1999). Non-selective voltage-activated cation channel in the human red blood cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1417(1): 9–15.

Kawata, 2013 – Kawata S. (2013). Plasmonics for nanoimaging and nanospectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, 67(2): 117-125.

Klyachko et al., 2008 – Klyachko V., Zhang Z., Jackson M. (2008). Low-Noise Recording of Single-Vesicle Capacitance Steps in Cell-Attached Patches. *Methods in Molecular Biology*, 440: 283-295.

Krasiński et al., 1974 – Krasiński J., Chudzyński S., Majewski W., Głódź M. (1974). Experimental dependence of two-photon absorption efficiency on statistical properties of laser light. *Optics Communications*, 12(3): 304–306.

Lehnert and Gijs, 2000 – Lehnert T., Gijs M.A.M. (2000). Nano Patch-Clamp Device. *Top Nano 21, 1st Annual Report*, Bern, Switzerland, 2000. [Электронный ресурс]. URL: <http://infoscience.epfl.ch/record/55976>

Lehnert and Gijs, 2001 – Lehnert T., Gijs M.A.M. (2001). Nano Patch-Clamp Device. *Top Nano 21, 2nd annual report*, 2001. [Электронный ресурс]. URL: <http://infoscience.epfl.ch/record/55968>

Lehnert and Gijs, 2003 – Lehnert T., Gijs M.A.M. (2003). Nano Patch-Clamp Device. *The International Nano Conference 2003 – TopNano 21, 4th Annual Report*, St.Gallen, Switzerland, 2003. [Электронный ресурс]. URL: <http://infoscience.epfl.ch/record/55926>

Lehnert et al., 2002 – Lehnert T., Gijs M.A.M., Netzer R. (2002). Nano Patch-Clamp Device. *TopNano 21, 3rd Annual Report*, Bern, Switzerland, 2002. [Электронный ресурс]. URL: <http://infoscience.epfl.ch/record/55945>

Lehnert et al., 2002 – Lehnert T., Netzer R., Bischoff U., Gijs M.A.M. (2002).  $\text{SiO}_2$  nozzle array-based patch-clamp microsystem. *Micro Total Analysis Systems (Proc.  $\mu\text{TAS}$ )*, 1: 28-30.

Lyubchenko, 2013 – Lyubchenko Y.L. (2013). Nanoimaging methods for biomedicine. *Methods*, 60(2): 111-112.

[Malboubi et al., 2014](#) – Malboubi M., Jiang K. (2014). *Gigaseal Formation in Patch Clamping: With Applications of Nanotechnology*. Springer, Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 2014, 108 p.

[Marmarelis et al., 1999](#) – Marmarelis V.Z., Juusola M., French A.S. (1999). Principal Dynamic Mode Analysis of Nonlinear Transduction in a Spider Mechanoreceptor. *Annals of Biomedical Engineering*, 27(3): 391-402.

[Masterov et al., 1997](#) – Masterov V.F., Prikhod'ko A.V., Kon'kov O.I., Terukov E.I. (1997). Millimeter microwave study of the superconducting properties of the Cu-C system. *Physics of the Solid State*, 39(5): 722-723.

[Mayer et al., 2004](#) – Mayer M., Terrettaz S., Giovangrandi L., Stora T., Vogel H. (2004). Functional analysis of ion channels: Planar patch clamp and impedance spectroscopy of tethered lipid membranes (Ed by J. Cooper, T. Cass), pp. 153-184. In: *Biosensors – A practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, New York, 2004. 268 p.

[Milligan et al., 2009](#) – Milligan C.J., Li J., Sukumar P., Majeed Y., Dallas M.L., English A., Emery P., Porter K.E., Smith A.M., McFadzean I., Beccano-Kelly D., Bahnasi Y., Cheong A., Naylor J., Zeng F., Liu X., Gamper N., Jiang L.H., Pearson H.A., Peers C., Robertson B., Beech D.J. (2009). Robotic multiwell planar patch-clamp for native and primary mammalian cells. *Nat. Protoc.*, 4(2): 244-255.

[Misiewicz et al., 1989](#) – Misiewicz J., Gumieny Z., Cywiński R., Mugeński E. (1989). The Luminescence of Zn<sub>3</sub>P<sub>2</sub> in the 0.84 to 1.1 μm Wavelength Range. *Physica Status Solidi (A)*, 111(2): K249–K252.

[Mugeński and Cywiński, 1984](#) – Mugeński E., Cywiński R. (1984). Low-Temperature Photoluminescence of the Aggregate Centres in Eu<sup>2+</sup>-Doped KCl Crystals. *Physica Status Solidi (B)*, 125(1): 381–386.

[NanoCellBiology, 2014](#) – *NanoCellBiology* (Ed. by B.Jena, D. Taatjes). CRC Press – Taylor & Francis, Boca Raton, 396 p., 2014.

[Nedbal et al., 1986](#) – Nedbal L., Setlíková E., Masojídek J., Setlík I. (1986). The nature of photoinhibition in isolated thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 848(1): 108–119.

[Neef et al., 2007](#) – Neef A., Heinemann C., Moser T. (2007). Measurements of membrane patch capacitance using a software-based lock-in system. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*, 454(2): 335-344.

[Neher and Steinbach, 1978](#) – Neher E., Steinbach J.H. (1978). Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *Journ. Physiol.*, 277: 153–176.

[Nesheva et al., 1994](#) – Nesheva D., Arsova D., Levi Z. (1994). Band and subband absorption of Se/CdSe amorphous multilayers. *Philosophical Magazine Part B*, 70(2): 205-213.

[Nesheva et al., 1995](#) – Nesheva D., Vateva E., Levi Z., Arsova D. (1995). Interface and structural disorder changes in Se/CdSe multilayers. *Philosophical Magazine Part B*, 72(1): 67-73.

[Nesheva et al., 1995](#) – Nesheva D., Aneva Z., Levi Z. (1995). B<sub>12</sub>SiO<sub>20</sub> monocrystals doped with transition metals. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 56(2): 241–250.

[Nguyen et al., 2012](#) – Nguyen T.D., Deshmukh N., Nagaraj J.M., Kramer T., Purohit P.K., Berry M.J., McAlpine M.C. (2012). Piezoelectric nanoribbons for monitoring cellular deformations. *Nature Nanotechnology*, 7: 587–593.

[Niles et al., 1988](#) – Niles W.D., Levis R.A., Cohen F.S. (1988). Planar bilayer membranes made from phospholipid monolayers form by a thinning process. *Biophys. Journ.*, 53(3): 327-335.

[Notchenko and Gradov, 2013](#) – Notchenko A.V., Gradov O.V. (2013). A Five-Axis Arm-Manipulator Laser System & an Algorithm for Digital Processing of Output Data for Recording and Morpho-Topological Identification of Cells and Tissue Structures. *Visualization, Image Processing & Computation in Biomedicine*. 2(1): DOI: 10.1615/VisualizImageProcComputatBiomed.2013005967

[Nowak et al., 1984](#) – Nowak M., Łoś S., Kończak S. (1984). Refractive index of silicon oxide surface films determined by polarization method of photomagnetolectric investigation. *Surface Science*, 140(2): 446–454.

[Olapinski et al., 2008](#) – Olapinski M., Manus S., Fertig N., Simmel F.C. (2008). Probing whole cell currents in high-frequency electrical fields: Identification of thermal effects. *Biosensors and Bioelectronics*, 23: 872–878.

**Pan and Fox, 2000** – Pan C.-Y., Fox A.P. (2000). Rundown of Secretion After Depletion of Intracellular Calcium Stores in Bovine Adrenal Chromaffin Cells. *Journal of Neurochemistry*, 75(3): 1132–1139.

**Pavluch and Eckertová, 1985** – Pavluch J., Eckertová L. (1985). A new appearance potential spectrometer. *Czechoslovak Journal of Physics B*, 35(6): 630-642.

**Petkova et al., 2007** – Petkova P.N., Dimov T.N., Iliev I.A. (2007). Faraday effect and  $\lambda$ -modulation absorption spectra of GaP. *Journal of Physics: Conference Series*, 92(012069): 1-4.

**Petkova et al., 2010** – Petkova P.N., Dimov T.N., Iliev I.A. (2010). Linear dichroism in optical spectra of Co-ions in CdS. *Optical Materials*, 32(9): 909–912.

**Petrov, 2002** – Petrov A.G. (2002). Flexoelectricity of model and living membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1561: 1-25.

**Petrov, 2008** – Petrov A.G. (2008). Flexoelectricity: A Universal Sensoric Mechanism in Biomembranes and in Chem.-Biosensors. In: *Functionalized Nanoscale Materials, Devices and Systems – NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics*, 87-100.

**Pfleger et al., 1990** – Pfleger J., Kminek I., Nešpůrek S., Prasad P.N. (1990). Electrical, photoelectrical and nonlinear optical properties of a new form of soluble polyacetylene. *Synthetic Metals*, 37(1–3): 255–261.

**Radeva et al., 2009** – Radeva E., Kolentsov K., Yourukova L., Zhechev D., Dimova E. (2009). Optical and photoluminescent properties of plasma polymer films used in electroluminescent display structures. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 70(1): 169–172.

**Reid et al., 2007** – Reid B., Nuccitelli R., Zhao M. (2007). Non-invasive measurement of bioelectric currents with a vibrating probe. *Nat. Protoc.*, 2(3): 661-669.

**Resink et al., 2014** – Resink S.G., Hondebrink E., Steenbergen W. (2014). Towards acousto-optic tissue imaging with nanosecond laser pulses. *Opt. Express.*, 22(3): 3564-3571.

**Rostami, 2004** – Rostami K.R. (2004). A Hall Microscope for Visualizing the Magnetic States of Objects. *Instruments and Experimental Techniques*, 47(6): 809-816.

**Ryskin et al., 1983** – Ryskin M.E., Shub B.R., Pavliček J., Knor Z. (1983). Deactivation of singlet oxygen O<sub>2</sub><sup>\*</sup>(<sup>1</sup>Δg) on gold surfaces. *Chemical Physics Letters*, 99(2): 140–143.

**Schickinger et al., 2013** – Schickinger S., Bruns T., Wittig R., Weber P., Wagner M., Schneckenburger H. (2013). Nanosecond ratio imaging of redox states in tumor cell spheroids using light sheet-based fluorescence microscopy. *Journ. Biomed Opt.*, 18(12): 126007-1 -126007-5.

**Schiermeier, 2002** – Schiermeier Q. (2002). Ukrainian science: DIY, Kiev style. *Nature*, 416(6882): 675-676.

**Schröder et al., 2005** – Schröder I., Harlfinger P., Huth T., Hansen U.P. (2005). A Subsequent Fit of Time Series and Amplitude Histogram of Patch-Clamp Records Reveals Rate Constants up to 1 per Microsecond. *Journal of Membrane Biology*, 203(2): 83-99.

**Sergeev et al., 2011** – Sergeev V.A., Frolov I.V., Shirokov A.A., Shcherbatyuk Yu.N. (2011). Probability characteristics of electrical noise in heterojunction light-emitting diodes. *Semiconductors*, 45(13): 1670-1675.

**Single-Channel Recording** – *Single-Channel Recording* (Ed. by: B. Sakmann, E. Neher). Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 2009, 700 p.

**Sitdikova et al., 2010** – Sitdikova G.F., Weiger T.M., Hermann A. (2010). Hydrogen sulphide increases calcium-activated potassium (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells. *Pflügers Arch. – Eur. Journ. Physiol.*, 459: 389-397.

**Solsona et al. 1998** – Solsona C., Innocenti B., Fernandez J.M. (1998). Regulation of Exocytotic Fusion by Cell Inflation. *Biophys. Journ.*, 74: 1061–1073.

**Stacewicz, 1981** – Stacewicz T. (1981). Ionization of sodium vapour by intense laser light tuned to 3S → 3P transition. *Optics Communications*, 35(2): 239–241.

**Stacewicz and Krasiński, 1981** – Stacewicz T., Krasiński J. (1981). Investigations of ionization of sodium vapour by resonant laser light. *Optics Communications*, 39(1–2): 35–40.

**Strek et al., 1987** – Strek W., Mugeński E., Cywiński R., Hamuza J., Jeżowska-Trzebiatowska B., Maghrawy H. (1987). Spectroscopic properties of the Eu<sup>3+</sup> ion in the {(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>4</sub>N}<sub>3</sub>Eu(NCS)<sub>6</sub> crystal. *Journal of Molecular Structure*, 159(3–4): 207–215.

**Takahashi et al., 1999** – Takahashi S., Santos-Sacchi J., Takahashi S., Santos-Sacchi J. (1999). Distortion Component Analysis of Outer Hair Cell Motility-Related Gating Charge. *Journal of Membrane Biology*, 169(3): 199-207.



Thompson et al., 2001 – Thompson R.E., Lindau M., Webb W.W. (2001). Robust, high-resolution, whole cell patch-clamp capacitance measurements using square wave stimulation. *Biophys. Journ.*, 81(2): 937–948.

Ulasevich et al., 2013 – Ulasevich A.L., Gorelik A.V., Kouzmouk A.A., Starovoitov V.S. (2013). A miniaturized prototype of resonant banana-shaped photoacoustic cell for gas sensing. *Infrared Physics & Technology*, 60: 174–182.

Uvarov and Kornilovich, 2010 – Uvarov E.I., Kornilovich A.A. (2010). Microwave method for contactless determination of charge carrier concentration and Hall resistance in semiconductor nanostructures. *2010 International Conference and Seminar on Micro/Nanotechnologies and Electron Devices (EDM)*, 185 – 187.

Wandrol and Horák, 2007 – Wandrol P., Horák P. (2007). Problems of the YAP:Ce Scintillator Use in Detectors of Signal Electrons in SEM. *Microscopy and Microanalysis*, 13(Suppl. S03): 84-85.

Weckström et al., 1992 – Weckström M., Kouvalainen E., Juusola M. (1992). Measurement of cell impedance in frequency domain using discontinuous current clamp and white-noise-modulated current injection. *Pflügers Archiv*, 421(5): 469-472.

Woolf et al., 2010 – Woolf N.J., Priel A., Tuszynski J.A. (2010). *Nanoneuroscience*. Springer, Heidelberg, Dordrecht, London, New York, 279 p. 2010.

Yakubovich et al., 2009 – Yakubovich D., Rishal I., Dessauer C.W., Dascal N. (2009). Amplitude Histogram-Based Method of Analysis of Patch Clamp Recordings that Involve Extreme Changes in Channel Activity Levels. *Journal of Molecular Neuroscience*, 37(3): 201-211.

Yan et al., 2002 – Yan Z.Q., Liu S.M., Li J., Wang Y., Gao L., Xie R.G., Xue W.N., Zhang G.L., Zhu J.L., Gao G.D. (2002). Membrane resonance and its ionic mechanisms in rat subthalamic nucleus neurons. *Neur. Lett.*, 506(1): 160-165.

Yankelevich et al., 1992 – Yankelevich Y.B., Barengolz Y.A., Khaskelberg M.B., Wolfengaut J.J., Davydov V.N. (1992). Analysis of formed insulator thin films in non-heated cathodes. *Vacuum*, 43(5-7): 609–612.

Yin and Lovinger, 2006 – Yin H.H., Lovinger D.M. (2006). Frequency-specific and D2 receptor-mediated inhibition of glutamate release by retrograde endocannabinoid signaling. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 103(21): 8251–8256.

Zaretskii et al., 1988 – Zaretskii A.V., Petrenko V.F., Chesnakov V.A. (1988). The protonic conductivity of heavily KOH-doped ice. *Physica Status Solidi (A)*, 109(2): 373–381.

Zhao et al., 2008 – Zhao Y., Inayat S., Dikin D.A., Singer J.H., Ruoff R.S., Troy J.B. (2008). Patch clamp technique: review of the current state of the art and potential contributions from nanoengineering. *Proc. IMECHE*, 222: 1-11, Part N [Journ. Nanoengineering and Nanosystems – JNN149]. URL: <http://www.osti.gov/eprints/topicpages/documents/record/341/2286963.html>

Zhechev et al., 1998 – Zhechev D., Atanassova S. (1998). Optogalvanic Diagnostic of Conical Bottom Hollow Cathode Discharge. Enhancement of the Optogalvanic Signal. *Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication*, 31(3): 615-620.

Zhechev and Todorov, 1997 – Zhechev D., Todorov G. (1997). On the peak-like light induced galvanic responses in a hollow cathode discharge. *Optics Communications*, 136(3–4): 227–230.

Zierler, 1992 – Zierler K. (1992). Simplified method for setting the phase angle used in capacitance measurements in studies of exocytosis. *Biophys. Journ.*, 63(2): 854-856.

Zimmermann et al., 2008. – Zimmermann D., Kiesel M., Terpitz U., Zhou A., Reuss R., Kraus J., Schenk W.A., Bamberg E., Sukhorukov V.L. (2008). A Combined Patch-Clamp and Electrorotation Study of the Voltage- and Frequency-Dependent Membrane Capacitance Caused by Structurally Dissimilar Lipophilic Anions. *Journal of Membrane Biology*, 221(20): 107-121.

Zimmermann et al., 1983 – Zimmermann H., Boyn R., Nagel N. (1983). Photoinduced absorption spectra of ZnS: Fe crystals. *Physica Status Solidi (B)*, 117(1): 229–239.

## **Фазочувствительные спектральные нановольтметрические методы локальной фиксации потенциала с частотной дискриминацией – регистрация активности одиночных ионных каналов в координатах «частота-фаза» для нужд клеточной биомедицины**

Евгений Денисович Адамович <sup>a</sup>, Павел Леонидович Александров <sup>a</sup>,  
Олег Валерьевич Градов <sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Институт Энергетических Проблем Химической Физики РАН, Российская Федерация

**Аннотация.** В работе рассматривается новый эффективный способ регистрации активности ионных каналов в условиях высокого зашумления и асинхронной/стохастической работы каналов, физически обеспечиваемый селективностью по фазе и регистрацией в узком диапазоне характеристических частот. Повышение чувствительности достигается за счет использования технологий с фазовой и частотной селективностью. На основе этого подхода предполагается также развитие «векторметрического патч-клампа», при котором индицируются действительная и мнимая составляющая комплексного сигнала.

**Ключевые слова:** локальная фиксация потенциала, частотный дискриминатор, ионные каналы, селективный нановольтметр, векторметр, комплексный сигнал.

---

\* Корреспондирующий автор  
Адреса электронной почты: [o.v.gradov@gmail.com](mailto:o.v.gradov@gmail.com) (О.В. Градов)