

postbus 23  
3769 ZG soesterberg

kampweg 5  
3769 DE soesterberg

telefoon 03463 - 1444

rapport no. IZF I 1979-2

ex. no.

De konstruktie van bipolaire mikro-elektroden  
ten behoeve van intraretinaal onderzoek

J.W.A.M. Alferdinck

Voor metingen van zeer lokale elektrische verschijnselen in het apenetvlies is het van groot belang om over een goede kwaliteit bipolaire elektrode te beschikken. In dit rapport zijn de ervaringen bij de ontwikkeling daarvan beschreven. Dit werk is onderdeel van het projekt "Signaalverwerking in het distale deel van het netvlies van de primate", dat wordt uitgevoerd met financiële steun van de Nederlandse Organisatie voor Zuiver Wetenschappelijk Onderzoek ZWO.

# INHOUD

Blz.

Samenvatting

Summary

1	Inleiding	1
2	Bipolaire glas/zilververfelektroden	1
2.1	Fabrikagemethode	1
2.1.1	De glaselektrode	1
2.1.2	Het opbrengen van de zilververf	2
2.1.3	Isolatie	4
2.2	Impedantie van zilververfelektroden	5
2.3	Chloreren	6
2.3.1	Principe en doel	6
2.3.2	Bepaling chloreerparameters	7
2.4	Bipolaire eigenschappen	11
2.5	Bipolaire glas/zilververfelektroden in de praktijk	13
2.6	Konklusie	14
3	Bipolaire coaxiale glaselektroden	15
3.1	Fabrikagemethode	15
3.1.1	Het trekken van de elektroden	15
3.1.2	Het assembleren en vullen	17
3.2	De elektrische aansluiting	20
3.3	BCG-elektroden in de praktijk	22
3.4	Konklusie	23
4	Literatuurlijst	24

De konstruktie van bipolaire mikro-elektroden ten behoeve van intra-  
retinaal onderzoek

J.W.A.M. Alferdinck

Samenvatting

Dit rapport beschrijft de konstruktie van bipolaire mikro-elektroden die gebruikt worden voor intraretinale metingen bij de rhesusaap. Het betreft twee verschillende typen: een bipolaire glas/zilververf-elektrode en een bipolaire coaxiale glass-elektrode (BCG-elektrode). De BCG-elektrode bleek het best bruikbaar te zijn door een grotere elektrische stabiliteit, kleinere afmetingen en een kortere fabricage-tijd. De elektrische stabiliteit is verder verbeterd door het gebruik van calomelhalfcellen voor de vloeistof/metaal-overgang.

The construction of bipolar micro-electrodes for intraretinal research

Summary

This report describes the construction of bipolar micro-electrodes which are used for intraretinal measurements of the rhesus monkey. It concerns two different types: a bipolar glass/silverpaint-electrode and a bipolar coaxial glass-electrode (BCG-electrode). The BCG-electrode proves to be the most useful one because of better electrical stability, smaller dimensions and a shorter construction time. The electrical stability has been further improved by the use of calomelhalfcells for the liquid/metal-junction.

## 1. Inleiding

De bipolaire mikro-elektroden die in dit verslag beschreven worden, zijn bestemd voor een onderzoek naar retinale potentialen van de rhesusaap. De vraagstelling van het onderzoek betreft o.a. de beschrijving van responsie vs. intensiteitsfuncties en de invloed daarop van continue belichting. Daarnaast wordt de betekenis onderzocht van de "standing potential", die opgewekt wordt onder invloed van continue belichting van het netvlies.

In het onderzoek is het van belang, de verschillende componenten van de responsie op een lichtstimulus die hun origine vinden in verschillende celtypen, zo goed mogelijk van elkaar te scheiden. Door de responsies van twee zeer dicht bij elkaar gelegen elektroden van elkaar af te trekken kan wellicht een lokale responsie verkregen worden die afkomstig is van éénzelfde celtype. Met name wordt geprobeerd de potentialen van de receptoren te isoleren.

Hiervoor zijn 2 typen bipolaire elektroden ontwikkeld.

- a Een bipolaire glas/zilververfelektrode. Deze bestaat uit een klassieke glasmikro-elektrode waarop d.m.v. zilververf een tweede meetpunt is aangebracht op een vaste afstand ( $\pm 100 \mu\text{m}$ ) van de tip.
- b Een bipolaire elektrode die bestaat uit twee in elkaar geschoven glasmikro-elektroden. De tip van de binnenste elektrode steekt een vaste afstand uit de tip van de buitenste elektrode ( $\pm 50 \mu\text{m}$ ).

In het volgende zullen de fabrikagemethoden en de eigenschappen van beide typen elektroden worden besproken. Naar zal blijken is de tweede elektrode het meest succesrijk.

## 2. Bipolaire glas/zilververf-elektroden

### 2.1 Fabrikagemethode

#### 2.1.1 *De glaselektrode*

Er is uitgegaan van klassieke glas/mikro-elektroden. Deze worden getrokken op een Nastukelektrodetrekker (Nastuk, 1964). De gebruikte glasbuizen hebben een buitendiameter van 0.85 mm en een binnendiameter van 0.45 mm. Vóór het trekken van de elektroden worden de glasbuizen ontvet met een ontvettingsmiddel (RBS 25) in een ultrasoonreinigingsbad omdat ze na het trekken geverfd worden met zilververf. De door ons gebruikte elek-

troden hebben een tipdiameter van ca.  $1 \mu\text{m}$  en de impedantie is ca.  $5 \text{ M}\Omega$  wanneer de elektrode gevuld is met een 3 molair KCL-oplossing.

### 2.1.2 Het opbrengen van de zilververf

De eerste elektrode van de bipolaire elektrode wordt gevormd door de tip van de glas mikro-elektrode. De tweede elektrode wordt gevormd door verf<sup>1)</sup> op de glas mikro-elektrode aangebracht.

Het verven is het moeilijkst in de buurt van de tip. Tot op  $100 \mu\text{m}$  van de tip moet zilververf worden aangebracht (zie Fig. 1). Het verfproces wordt onder een microscoop uitgevoerd.

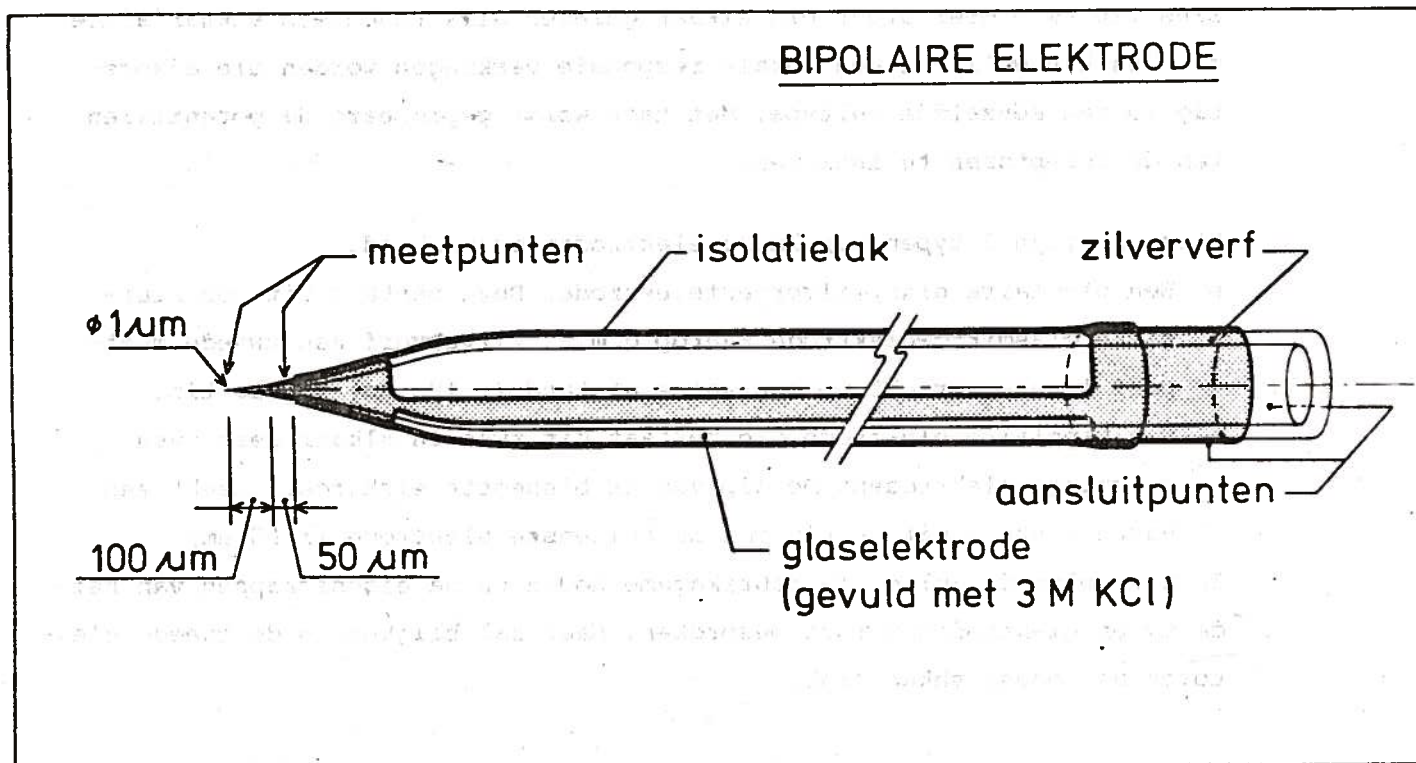


Fig. 1 Bipolaire glas/zilververfelektrode. Op een glaselektrode is een zilververflaag aangebracht tot op  $100 \mu\text{m}$  van de tip. Daaroverheen is isolatielak geverfd die bij de tip nog  $50 \mu\text{m}$  zilververf vrijlaat voor het elektrisch contact. De zilververf bij de tip is verbonden met een aansluitkontakt boven aan de schacht. Deze verbinding, d.m.v. een spoor zilververf, is zo smal mogelijk om de overspraak tussen de zilververf en de zoutoplossing in de elektrode zo klein mogelijk te houden.

1) Zilverpoeder in thinner-buthyl-acetaat. Verkrijgbaar bij van Reysen Elektronica, Schieweg 73, Delft.

De elektrode wordt m.b.v. een klemmetje op een objektglaasje bevestigd, dat op de mikroskooptafel ligt. In een druppelhouder (zie Fig. 2) die met een mikromanipulator bewogen kan worden, wordt een druppel zilververf aangebracht. De druppelhouder wordt nu vlak onder de tip van de elektrode gebracht en daarna omhooggedraaid. De elektrode wordt daardoor in de zilververfdruppel gebracht waarbij de tip echter nog ruim vrij van zilververf blijft.

Nu wordt de elektrode axiaal uit de druppelhouder getrokken, totdat de elektrode tot op de gewenste afstand van de tip met zilververf bedekt is. Vervolgens wordt de druppelhouder omlaag bewogen zodat de elektrode zich weer buiten de druppelhouder bevindt. De rest van het verfproces wordt zonder mikroskoop uitgevoerd. Om de elektrische aansluiting van het zilververfkontakt te maken, wordt een spoor zilververf aangebracht over de schacht die het zilververfkontakt verbindt met een aansluitvlak boven aan de schacht. Het aansluitvlak is eveneens van zilververf.

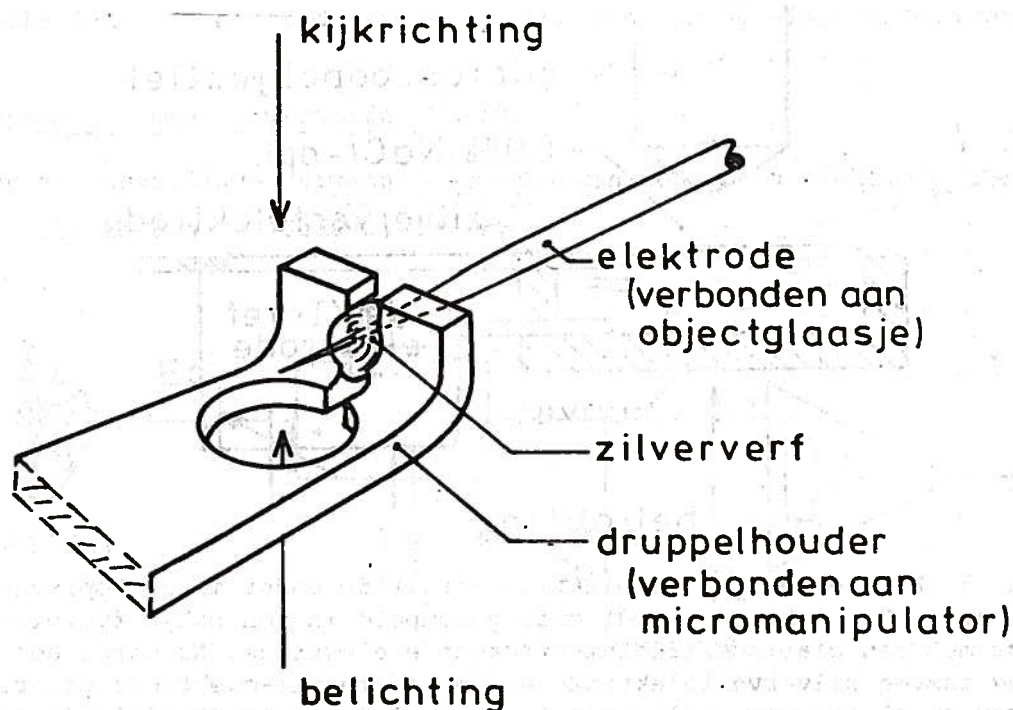


Fig. 2 De druppelhouder om onder mikroskopische observatie elektroden tot op korte afstand van de tip te verven. De druppelhouder met een druppel zilververf wordt onder de elektrode gebracht en omhoogbewogen zodat de elektrode in de spleet met zilververf komt. Dan wordt de elektrode axiaal-weggetrokken totdat het gewenste deel van de elektrode geverfd is.

Hét zilververfspoor moet zo smal mogelijk gehouden worden om de overspraak tussen de zilververf en de zoutoplossing in de glaselektrode zo klein mogelijk te houden. Na ca. 1 uur is de zilververf droog genoeg om van een isolatielaag voorzien te worden.

### 2.1.3 Isolatie

De elektrode wordt geïsoleerd met jachtlak (RJBBOL). In de buurt van de tip wordt de jachtlak net als de zilververf met de druppelhouder aangebracht. Bij de tip wordt een stukje zilververf van ca. 50  $\mu\text{m}$  lengte vrijgelaten. De rest van de elektrode wordt gelakt met een klein penseeltje waarbij bovenaan de schacht ca. 5 mm zilververf vrijgelaten wordt om de elektrische aansluiting te maken (zie Fig. 1).

Om de lak sneller te laten drogen wordt de elektrode 2 uur in een oven gelegd bij 80°C. Daarna wordt de isolatie op kwaliteit getest.

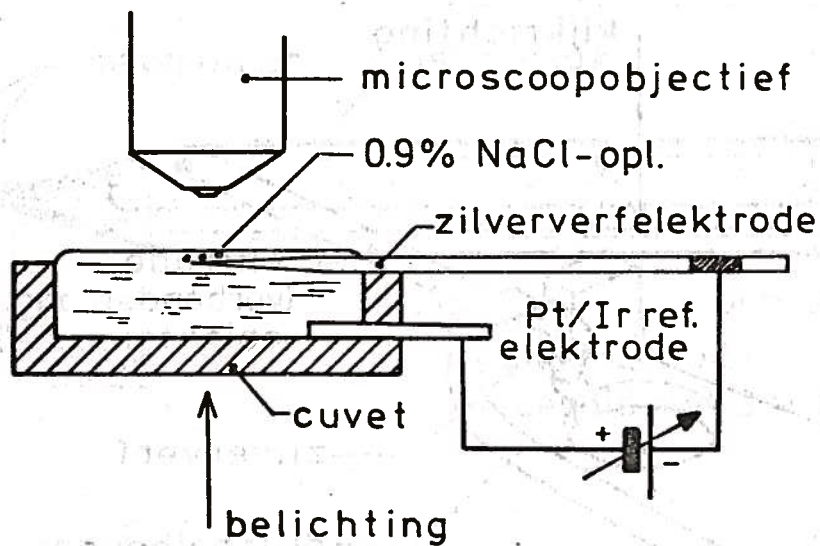


Fig. 3 Het testen van de elektrode-isolatie onder mikroskopische observatie. De elektrode wordt ondergedompeld in een bakje fysiologisch zout met een platinum/iridium-referentie elektrode. Nu wordt een spanning tussen zilververfelektrode en de referentie-elektrode gezet. Er mogen nu alleen maar belletjes van het kleine zilververfvlakje bij de tip komen. Als er belletjes door de isolatielaag komen, dan moet de isolatieprocedure herhaald worden.

Hiervoor wordt de elektrode ondergedompeld in een cuvet met een fysiologisch zout-oplossing (0,9% NaCl) waarin ook een platina-iridium referentie-elektrode is aangebracht (zie Fig. 3). Op de elektrode wordt een

elektrische spanning gezet die negatief is t.o.v. de platina-iridium elektrode. Deze spanning wordt langzaam opgevoerd waarbij de elektrodetip met een mikroskoop bekeken wordt. Bij een spanning van ongeveer 3 Volt verschijnen er  $H_2$ -belletjes op het vrijgebleven zilververfkraagje. Wanneer er op de isolatielak ook nog belletjes verschijnen is een isolatie niet goed en moet nogmaals gelakt worden. Gewoonlijk is 3 maal lakken nodig voor een goede isolatie.

Om te voorkomen dat tijdens deze isolatietest de zilververfelektrode spontaan gechloureerd wordt mag de spanningsbron niet op nul Volt gezet worden. Wanneer dit wel het geval is dan zal door de elektrodepotential van de zilververf en het Pt-Ir de zilververfelektrode ca. 50 mV positief t.o.v. de Pt-Ir-referentie-elektrode worden. Hierdoor wordt de elektrode in feite reeds een beetje gechloureerd (zie § 2.3). Dit is ongewenst omdat dan bij het latere cloureerproces reeds van een met onbekende chloererparameters gechloureerde elektrode zou worden uitgegaan. Tijdens het isolatietesten bleef de spanningsbron dan ook op minstens 0,5 Volt staan.

## 2.2 Impedantie van zilververfelektroden

Het vereenvoudigde vervangingsschema van een metaalelektrode ziet er uit als in Fig. 4 (Geddes, 1972).

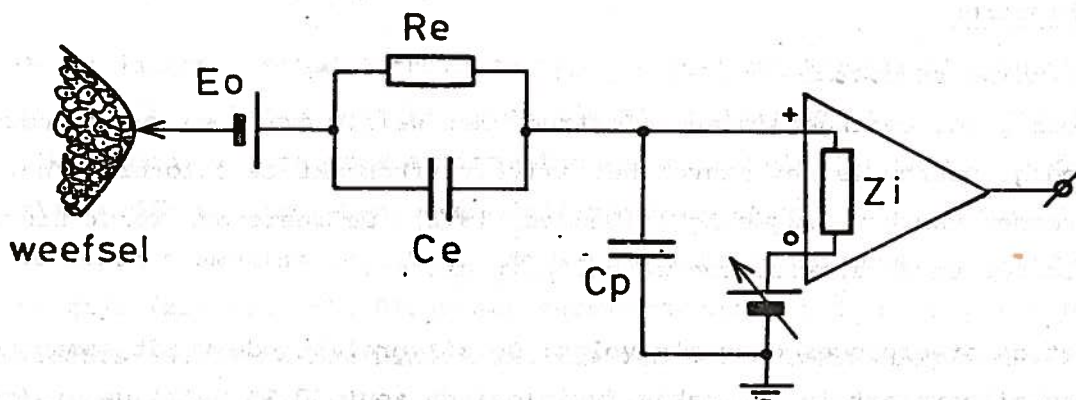


Fig. 4 Vereenvoudigd vervangingsschema van een metaalelektrode. Hierin is:  $E_o$  = elektrodepotential,  $C_e$  = capaciteit over de elektrische dubbellaag,  $R_e$  = weerstand over de elektrische dubbellaag,  $C_p$  = capaciteit van de elektrode en de aansluitdraden naar aarde,  $Z_i$  = ingangsimpedantie van de voorversterker.



Hierin is:

$E_o$  = elektrodepotential

$C_e$  = capaciteit over elektrische dubbellaag

$R_e$  = lekweerstand in elektrische dubbellaag

$C_p$  = capaciteit van de elektrode en aansluitdraden naar aarde

$Z_i$  = ingangsimpedantie van de voorversterker ( $> 10^{11} \Omega$ ).

$R_e$  en  $C_e$  bepalen de impedantie van de elektrode. Over een groot frequentiegebied zijn  $R_e$  en de reactantie  $X_e$  en  $C_e$  evenredig met  $f^{-\alpha}$ , waarin  $f$  de frequentie is en  $\alpha$  een materiaalkonstante.

Nu geldt bij benadering dat  $R_e \approx X_e$  zodat voor de elektrode-impedantie ( $M\Omega$ ) geldt:

$$Z = \frac{K \cdot f^{\frac{(\alpha-1)}{(\alpha-1)}}}{a} \quad (1)$$

waarin  $K$  is een materiaalkonstante

$a$  is de oppervlakte van de elektrode in  $\mu m^2$ .

In de literatuur zijn voor zilver vermeld:

$K = 62600$  en  $\frac{(\alpha-1)}{(\alpha-1)} = -0,67$  (Geddes, 1972). Voor zilver/zilverchloride liggen de waarden voor  $\frac{(\alpha-1)}{(\alpha-1)}$ , in de buurt van  $-0,25$ , terwijl voor  $K$  varieert tussen  $600$  en  $11000$  (Geddes, 1967; Geddes, 1972; Getzel, 1976).

## 2.3 Chloreren

### 2.3.1 *Principe en doel*

Voor goede metingen is een elektrode met weinig drift en weerstandruis nodig. Daarom is het zinvol het zilververfcontact te chloreren, het aanbrengen van een laagje  $AgCl$  (Geddes, 1972). De weerstand wordt hierdoor kleiner en de elektrische stabiliteit groter.

Het chloreerproces gaat als volgt: De zilverelektrode wordt samen met een zilverplaat in een bakje fysiologisch zout ( $0,9\% NaCl$ ) gezet (zie Fig. 5). Met behulp van een stroombron wordt gedurende een bepaalde tijd een stroom door de elektrode gestuurd. Hierbij is de zilververfelektrode positief t.o.v. de zilverplaat. Op de zilververfelektrode slaat nu een laag  $AgCl$  neer die de impedantie zal verlagen en de elektrodepotential zal stabiliseren.

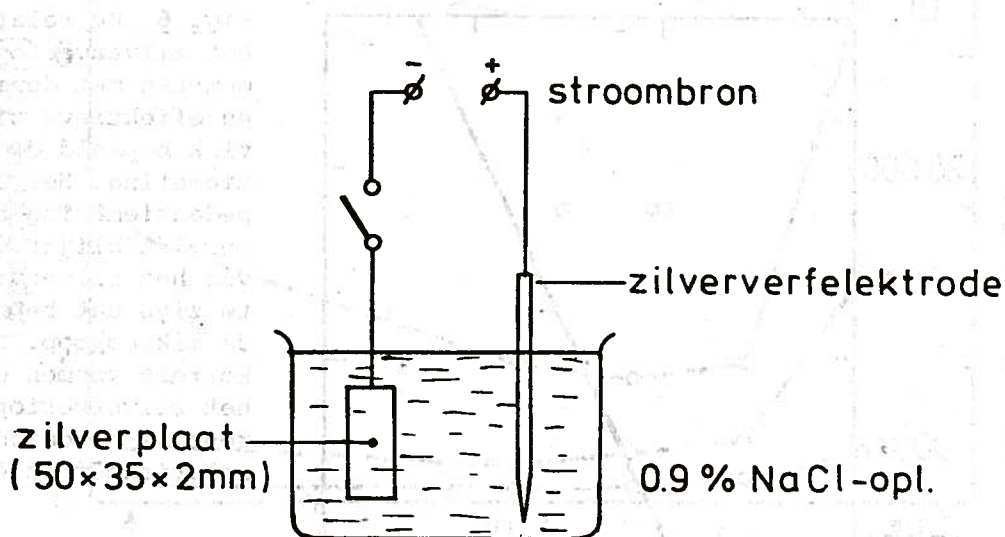


Fig. 5 Schema voor chloreren van zilververfelektroden. De zilververfelektrode staat samen met een zilverplaat in fysiologisch zout. Om de elektrode te chloreren wordt er een stroom door de elektrode gestuurd waarbij de elektrode positief is t.o.v. de zilverplaat.

### 2.3.2 Bepaling chloreerparameters

Het chloreerproces wordt bepaald door twee chloreerparameters, nl. de stroomdichtheid en de tijd. Het produkt van deze twee is een maat voor de hoeveelheid  $AgCl$  die op het zilver neerslaat.

Om de juiste stroomdichtheid te bepalen moet de oppervlakte van de elektrode bekend zijn. Deze kan redelijk nauwkeurig bepaald worden met een mikroskoop. Via de impedantiemeting en de formule (1) voor  $Z$  is de oppervlakte óók te berekenen. Gemiddeld bleek de oppervlakte, berekend m.b.v. de impedantiemeting ca. 5% van de met de mikroskoop gemeten oppervlakte te zijn (zie Fig. 6). Blijkbaar vertegenwoordigen de zilverdeeltjes slechts ca. 5% en het bindmiddel 95% van het zilververfoppervlak. In Fig. 6 staat het verband tussen deze twee oppervlaktemetingen aangegeven. De spreiding tussen de punten is tamelijk groot, waarschijnlijk doordat de dichtheid van de zilverkorrels in het bindmiddel erg varieert.

Om de juiste chloreerparameters te bepalen moet dus eerst de impedantie gemeten worden waaruit dan weer de effectieve oppervlakte van het zilverkontakt berekend wordt. Dit is gedaan met 6 zilververfelektroden. De

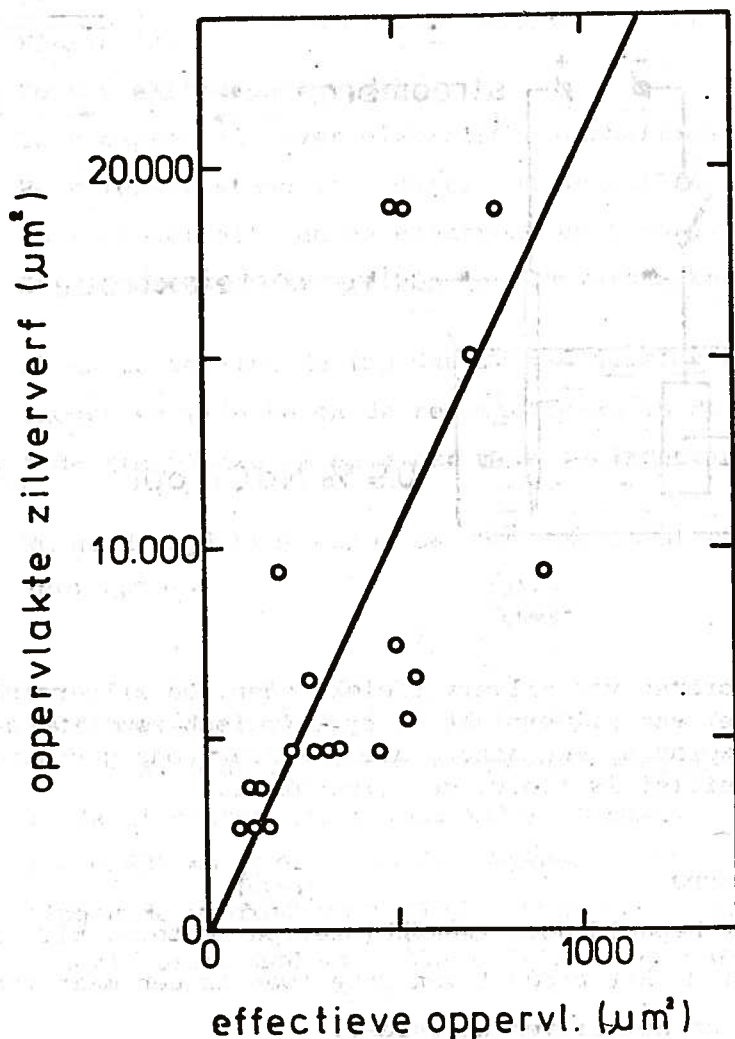


Fig. 6 De relatie tussen het zilververfoppervlak gemeten met de mikroskoop en effectieve zilveroppervlak bepaald door impedantiemeting. Het door de impedantiemeting bepaalde oppervlak blijkt gemiddeld 5% van het zilververfoppervlak te zijn dat bepaald is met de mikroskoop. De zilverkorrels vormen dus 5% van het zilververfoppervlak, de rest is bindmiddel. De correlatiecoëfficiënt = 0,66.

effectieve oppervlakte werd berekend uit de impedantiemeting van de ongechloreerde elektroden. Deze bleek te variëren tussen 4300 en 5600  $\mu\text{m}^2$ . Hierna zijn de elektroden gechloreerd met een chloreerstroombijhouding die steeds 0,1  $\mu\text{A}$  was. Elke elektrode is dus met een andere stroomdichtheid gechloreerd. Bij elke elektrode werd na een  $\text{AgCl}$ -neerslag van resp.  $10^{-2}$ ,  $2 \cdot 10^{-2}$ ,  $4 \cdot 10^{-2}$  en  $8 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{A} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-2}$  steeds de impedantie gemeten. In Fig. 7 staan de impedanties bij verschillende signaalfrequenties als functie van de berekende hoeveelheid neergeslagen  $\text{AgCl}$ . Voor  $\text{AgCl}$  hoeveelheden tussen  $10^{-3}$  en  $4 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{A} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-2}$  is de impedantieafname het grootst. Voor grotere hoeveelheden  $\text{AgCl}$  stijgt de impedantie weer. Dit komt goed overeen met de gegevens van Geddes (1972).

In Fig. 8 staat de impedantiereductie aangegeven als functie van de chloreertijd en de stroomdichtheid. Behalve de konklusie die uit Fig. 7 is

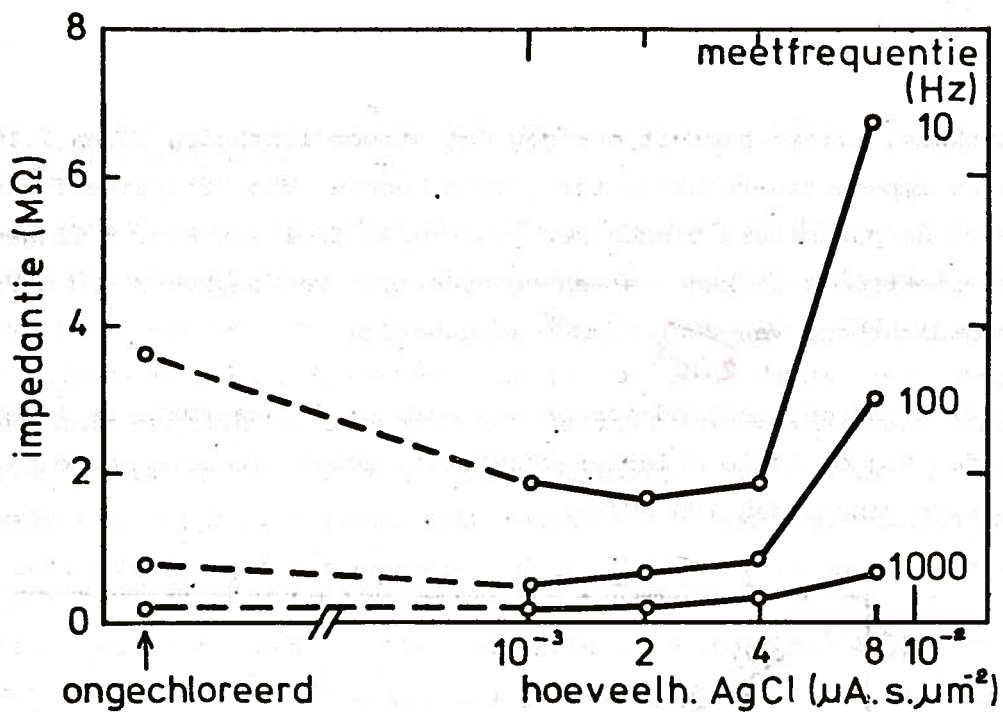


Fig. 7 De elektrode-impedantie als functie van de hoeveelheid opgebrachte zilverchloride. Voor hoeveelheden AgCl tussen  $10^{-3}$  en  $4 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{A}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{m}^2$  is de impedantie het kleinst.

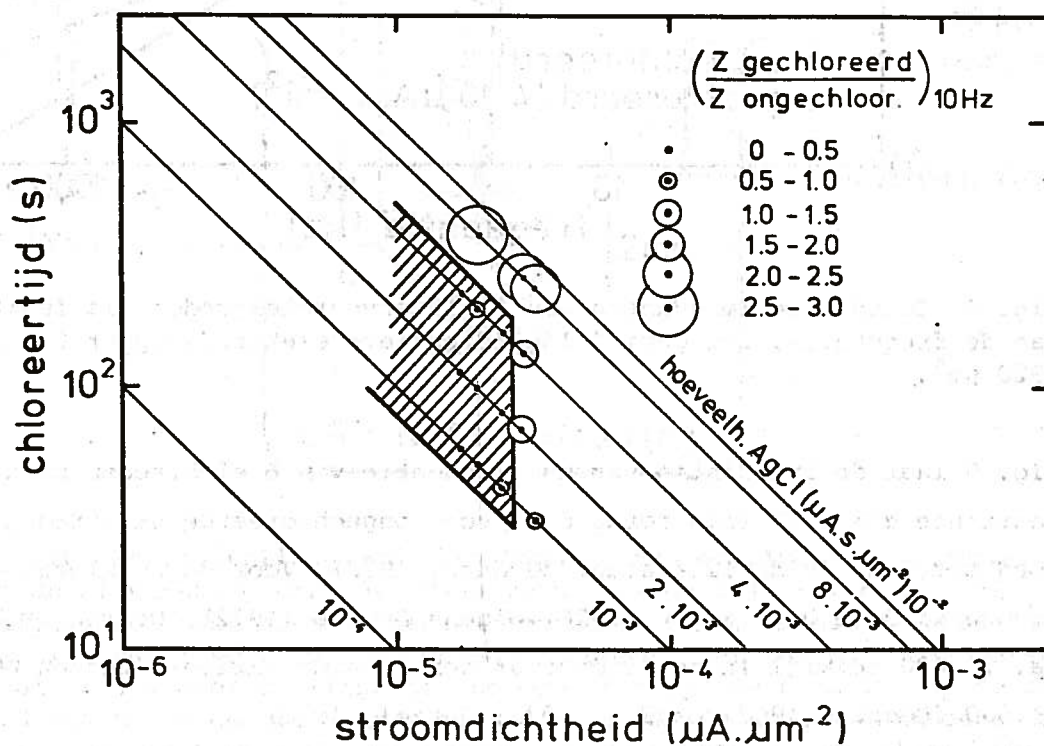


Fig. 8 De relatie tussen chloreertijd, stroomdichtheid en impedantieafname bij een meetfrequentie van 10 Hz. Uit deze figuur blijkt dat de chloreerparameters binnen het gearceerde deel van de grafiek moeten liggen.

getrokken, blijkt hieruit ook nog dat stroomdichtheden boven  $2 \cdot 10^{-5} \mu\text{A} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-2}$  minder impedantie-reduktie tot gevolg hebben. Voor zilververf elektroden moeten de parameters binnen het gearceerde deel van Fig. 8 liggen. Bij onze elektrodefabrikage is een chloreertijd van ongeveer 100 s en een stroomdichtheid van  $200 \mu\text{A} \cdot \mu\text{m}^{-2}$  aangehouden.

$2 \cdot 10^{-5}$

De drift van de elektrodepotential werd minder naarmate de impedantie daalde. Bij optimale chloreer-kondities, zoals hierboven genoemd, was de drift minder dan 100  $\mu\text{V}/\text{uur}$ .

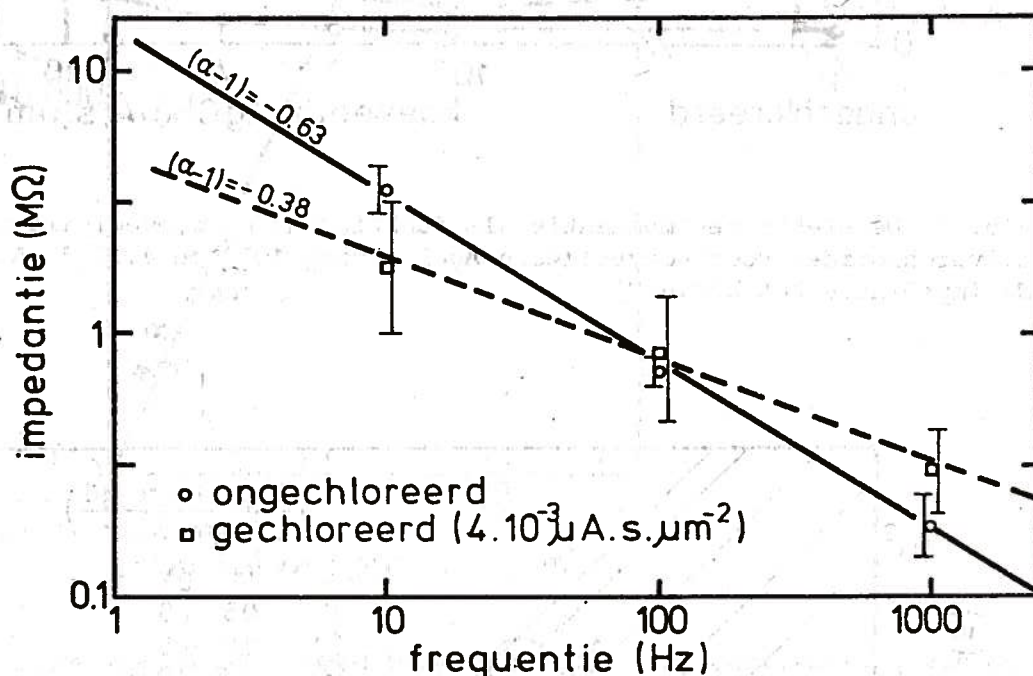


Fig. 9 Gemiddelde impedantie van 6 zilververfelektroden als functie van de frequentie. Het gemiddelde effectieve elektrode-oppervlak is  $3920 \mu\text{m}^2$ .

Fig. 9 laat de impedantie versus frequentie van 6 elektroden zien. De konstante  $\alpha = 0,37$  (zie formule 1) voor ongechloreerde elektroden klopt goed met 0,33 in de literatuur (Geddes, 1972). Voor de gechloreerde elektroden is deze 0,62 i.p.v. 0,76 volgens Geddes (1972). De faktor K is ca. 25.000 terwijl in de literatuur deze waarde varieert tussen 600 en 11.000 (Geddes, 1967; Geddes, 1972; Getzel, 1976). De spreiding in de impedantie is erg groot (50%).

## 2.4 Bipolaire eigenschappen

Een nadeel van een bipolaire zilververfelektrode is dat het zilveroppervlak relatief groot is. De spanning die met het zilverkontakt gemeten wordt zal een gemiddelde zijn van de spanningsverdeling over het hele zilveroppervlak. Echter hoe kleiner de oppervlakte, hoe groter de impedantie is. Doordat maar + 5% van de zilververfoppervlakte meedoet aan de geleiding ligt dit bij zilververfelektroden ongeveer 20 x zo ongunstig als bij b.v. zuivere zilverelektroden. Voor onze doeleinden bleek een zilververflengte van ongeveer 50  $\mu\text{m}$  (8  $\text{M}\Omega$ ) een redelijk kompromis.

Om een idee te krijgen waar het effectieve meetpunt van het zilververfkontakt ligt is een meetopstelling gemaakt. De opstelling bestaat

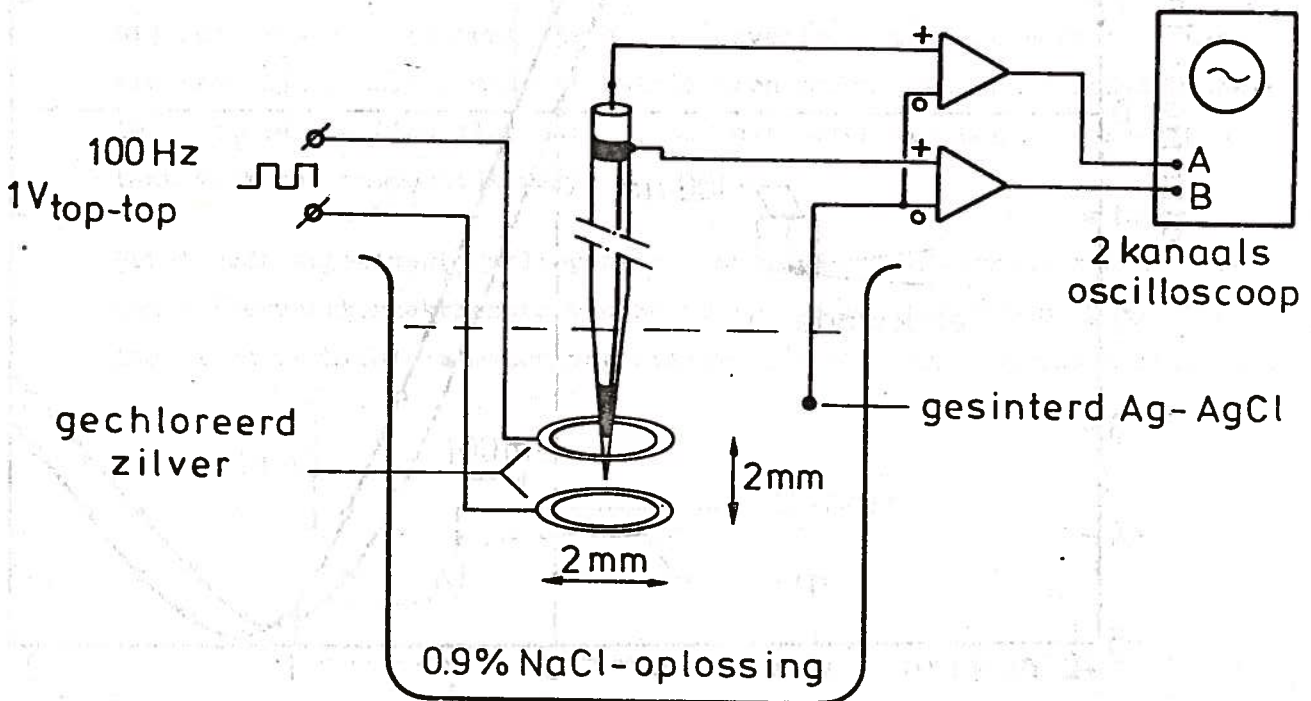


Fig. 10 Meetopstelling voor het bepalen van de bipolaire eigenschappen van de zilververfelektrode. Twee gechloreerde zilverringetjes zijn in fysiologisch zout boven elkaar gemonteerd. Op de ringetjes wordt een blokspanning van 1 Volt top-top en 100 Hz gezet. Met een mikromanipulator wordt de elektrode door de ringetjes bewogen terwijl de spanning op de twee elektrodekontakten gemeten wordt als functie van de plaats. Uit deze functie is te bepalen hoever de meetpunten van de elektrode van elkaar liggen.

uit 2 gechloreerde zilverringetjes van  $\varnothing$  2 mm, die 2 mm boven elkaar gemonteerd zijn en het geheel is ondergedompeld in een fysiologische zoutoplossing (zie Fig. 10). Op de twee ringetjes wordt een blokspanning van

100 Hz/1 Volt top-top gezet. Nu wordt de zilververfelektrode met een mikromanipulator door de twee ringetjes bewogen, terwijl de spanning op de zilververfelektrode en de tip beide t.o.v. een referentie-elektrode gemeten wordt als functie van de plaats van de tip. De meetresultaten staan in Fig. 11 voor een elektrode met een zilververfkontaktlengte van

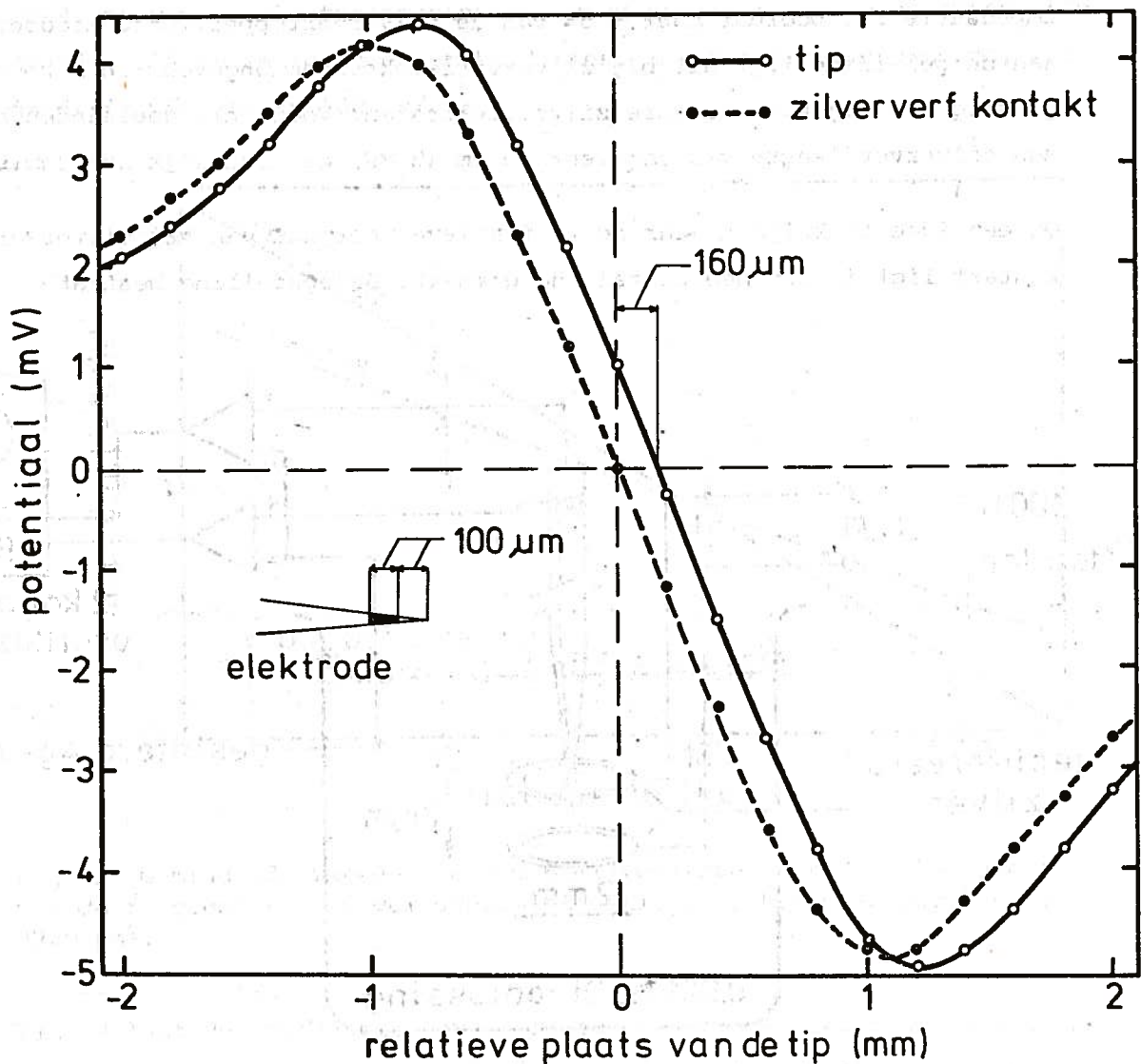


Fig. 11 De spanning op de tip en het zilververfkontakt als functie van de plaats, gemeten met de meetopstelling uit Fig. 10. De afstand tussen tip en zilververfkontakt is 100 μm terwijl het zilververfkontakt zelf ook 100 μm lang is. De spanning op tip en zilververf wordt nul op plaatsen die 160 μm uit elkaar liggen.

100 μm en een afstand van 100 μm tot de tip. De plaats waar de tippotentiaal nul is, wordt afstand nul genoemd. Het is te zien, dat wanneer de

tip op + 160  $\mu$ m is, de potentiaal op het zilververfkontakt juist nul is. De konklusie is dus dat voor deze elektrode het schijnbare meetpunt voor het zilververfkontakt op 160  $\mu$ m van de tip ligt. Het ligt niet in het midden van het zilververfkontakt. Dit komt waarschijnlijk doordat het zilververfkontakt naar de tip toe kleiner in diameter wordt.

## 2.5 Bipolaire glas/zilververfelektroden in de praktijk

Er zijn 2 intraretinale experimenten gedaan met bipolaire glas/zilververfelektroden. De bipolaire elektrode werd met de tip en het zilververfkontakt in het netvlies van een rhesusaap geplaatst. De spanningsresponsies op lichtflitsen werden op de tip en het zilververfkontakt gemeten t.o.v. een in de ooghoek geplaatste nul-elektrode. De nul-elektrode was een gesinterd Ag/AgCl-bolletje.

Bij het eerste experiment was de zilververfelektrode in eerste instantie redelijk stabiel, maar na enkele uren meten, kwamen er zodanig snelle en grote spanningsfluctuaties, dat het meten met het zilververfkontakt volkomen onmogelijk werd.

Het tweede experiment verliep beter. Er werd een elektrode gebruikt met een zilververfkontaktlengte van 50  $\mu$ m op 120  $\mu$ m van de tip. Zoals Fig. 12 laat zien is bipolair meten met zilververfelektroden inderdaad mogelijk.

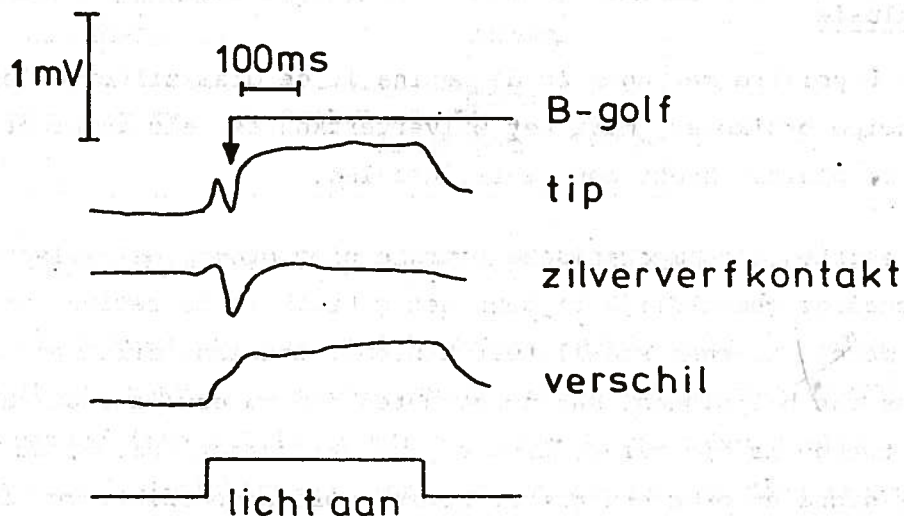


Fig. 12 Intraretinale lichtresponsies gemeten met een bipolaire zilververfelektrode in de fovea van een rhesusapeog. Op de twee meetpunten worden verschillende signalen gemeten t.o.v. een referentie-elektrode in de ooghoek. Het verschil geeft aan wat er vlak bij beide meetpunten gebeurt. Signalen van ver weg zijn evensterk op beide meetpunten en dragen niet of weinig bij tot het verschil, met name de B-golf.



Een mogelijke oorzaak van het mislukken van het eerste experiment is, dat door het bewegen van de elektrode door het netvlies de AgCl van het zilver is gesleten. Volgens eerdere berekeningen komen de zilverkorrels maar op 5% van het zilveroppervlak boven het bindmiddel uit. Op deze korrels zal zich bij het chloreren een bolletje AgCl afzetten dat er waarschijnlijk gemakkelijk af te stoten is. In Fig. 13 is weergegeven hoe het gechloreerde zilververfoppervlak er uit zou kunnen zien. Dit in tegenstelling met AgCl op een puur zilveroppervlak waar de AgCl veel homogener verdeeld zal zijn.

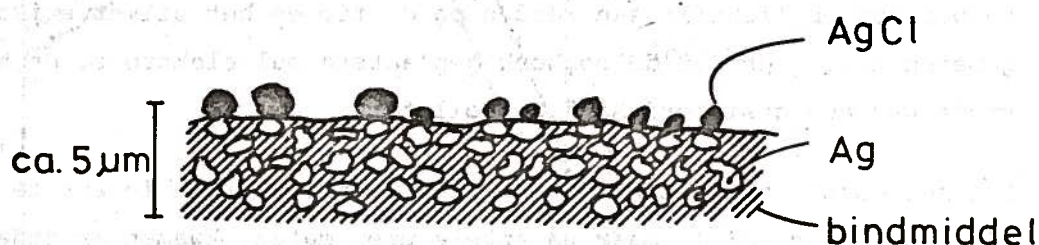


Fig. 13 Veronderstelde doorsnede van het zilververfoppervlak. Doordat het zilver maar hier en daar boven het bindmiddel uitkomt zal bij het chloreren een bolletje AgCl op het zilver gevormd worden. Hierdoor kan de AgCl-laag gemakkelijk van de onderlaag afschuiven bij het inbrengen van de elektrode in het netvlies.

## 2.6 Konklusie

Voor bipolaire metingen in de retina is de glas/zilververfelektrode in principe bruikbaar, maar het zilververfcontact als referentiepunt vlakbij de glastip heeft een aantal nadelen.

Ten eerste is de mechanische sterkte niet groot. Het zilververfcontact beschadigt gemakkelijk tijdens het gebruik in de retina, met als gevolg dat de elektrische stabiliteit afneemt. Langzame drift en snelle fluctuaties van het signaal maken het meten dan na een paar uur al onmogelijk. Ten tweede is dit referentiemeetpunt vrij groot (ca. 50 μm lang), waardoor signalen over een groter gebied worden opgepikt. Ten derde is de fabricage moeilijk en tijdrovend. Door de grote spreiding in de effectieve oppervlak is de chloreerprocedure nogal omslachtig. Het totale uitvalpercentage tijdens het gehele proces is dan ook erg hoog (70%).

Daar uit een enkele geslaagde meting bleek dat door bipolair meten iets wat op een kegeltjesreceptor-potentiaal leek geïsoleerd kon worden, leek het zaak een betere bipolaire elektrode te ontwikkelen. Dit heeft geleid tot de dubbele (coaxiale) mikropipet-elektrode, die in het volgende beschreven zal worden.

### 3. Bipolaire coaxiale glaselektroden

#### 3.1 Fabrikagemethode

##### 3.1.1 *Het trekken van de elektroden*

De bipolaire coaxiale glaselektrode (BCG-elektrode) bestaat uit twee in elkaar geschoven glas mikro-elektroden. De tip van de binnenste elektrode (ca.  $1 \mu\text{m}$ ) steekt ca.  $50 \mu\text{m}$  buiten de tip van de buitenste elektrode (ca.  $10 \mu\text{m}$ ) zodat er twee meetpunten ontstaan,  $50 \mu\text{m}$  van elkaar (zie Fig. 14).

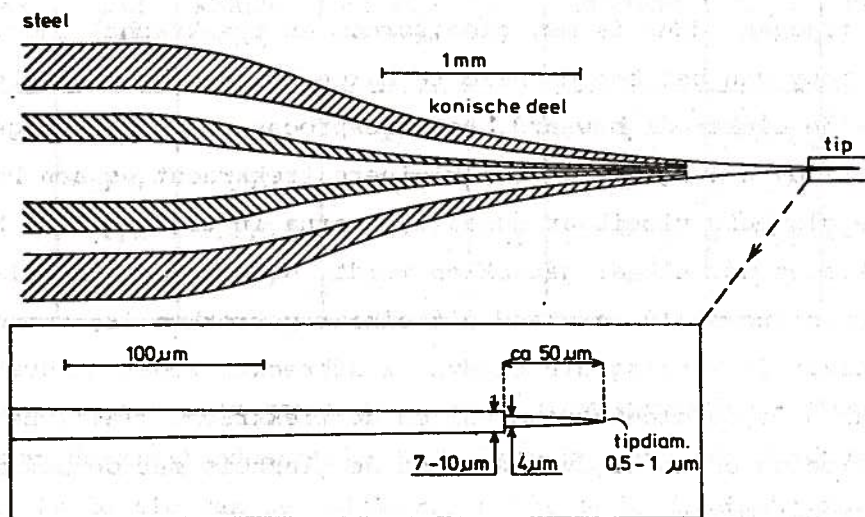


Fig. 14 Bipolaire coaxiale glaselektrode (BCG-elektrode).

*De trekker.* Deze mikro-elektroden worden getrokken op een elektrodentrekker die gebouwd is naar het voorbeeld van Siegenbeek (1976). De Nastuk-trekker (zie 2.1.1) is minder geschikt voor het trekken van de pipetten voor BCG-elektroden omdat de trekkracht van deze trekker niet klein genoeg gemaakt kan worden. Deze minimale kracht is het gewicht van de trekspoelkern. De trekkracht van de "Siegenbeektrekker" daarentegen is in te stellen van 0 - 13 N. Verbeteringen van het oorspronkelijke ontwerp zijn o.a. de vermindering van de wrijving in het systeem

(nu 0,7 N) en de vergroting van de maximale kracht (nu 13 N). Aangezien de verdere ontwikkeling nog gaande is zal over de trekker in een later stadium uitgebreid verslag worden gedaan. Er zal hier slechts een summiere beschrijving worden gegeven.

In deze trekker wordt een glasbuisje vertikaal ingespannen in twee, op sleden gemonteerde, spantangetjes. Midden tussen de spantangetjes zit een gloeispiraaltje om het buisje. De gloeispiraal is gewikkeld van kanthaldraad<sup>1)</sup> met een diameter van 0,5 mm en heeft 2 windingen met een binnendiameter van 1,75 mm (ohmse weerstand = 0,45  $\Omega$ ). Na verhitting van het glas worden de spantangetjes door een elektromagneet symmetrisch uit elkaar getrokken, en zo ontstaan in principe twee glaselektroden met een fijn puntje.

Het trekproces is verdeeld in 4 tijdvakken en wordt door een komputer (PDP 11/03) bestuurd. Via een beeldscherm terminal worden de parameters voor elk tijdvak (duur in ms, gloeistroom en trekkracht) ingevoerd. Door een hard copy van het beeldscherm te maken blijven de parameters van een bepaalde elektrode bewaard. Het trekproces heeft het volgende verloop: In tijdvak 1 wordt bij een kleinere trekkracht en een hoge gloeistroom de glasbuis vloeibaar gemaakt, waarna in tijdvak 2 de buis met grotere kracht uit elkaar getrokken wordt. Wanneer de glasbuis over de van te voren ingestelde afstand uit elkaar getrokken is, treedt een mikroschakelaar in werking die tijdvak 2 afbreekt, zodat tijdvak 3 begint. In tijdvak 3 is de gloeistroom nul en de trekkracht klein. Het glas zal nu wat afkoelen en in tijdvak 4 wordt de glasbuis met de maximale kracht uit elkaar getrokken.

*De elektrode.* De buitenste elektrode wordt getrokken uit een glasbuis met een buitendiameter van 1,3 mm en een binnendiameter van 0,85 mm. De binnenste elektrode wordt gemaakt van buis met een buitendiameter van 0,60 mm en een binnendiameter van 0,36 mm. De glassoort is DURAN 50 van het fabriek Schott.

Om de binnenelektrode 50  $\mu$ m te kunnen laten uitsteken buiten de buiten-elektrode en kleine tipdiameters te houden, moet aan de tipvorm speciale

1) Verkrijgbaar bij: Ingenieursbureau Kracht, Koningsplein 36, Den Haag.

eisen gesteld worden. De binnenelektrodetip moet lang en slank zijn en de buitenelektrodetip moet kort zijn omdat de opening van de buitenelektrodetip anders afgesloten zou kunnen worden door de binnenelektrodetip vóórdat deze 50  $\mu\text{m}$  uitsteekt. Verder mag de buitenelektrode tot op ca. 300  $\mu\text{m}$  van de tip niet dikker zijn dan ca. 20  $\mu\text{m}$  om het netvlies dat ca. 250  $\mu\text{m}$  dik is niet teveel te beschadigen (zie Fig. 14). In Tabel I zijn de parameters vermeld om de binnen- en buitenelektrode te trekken die aan de hierboven genoemde eisen voldoen.

Tabel I Trekparameters van de binnen- en de buitenelektrode. Het tijdvak 2 wordt beëindigd wanneer de glasbuis over een instelbare afstand l uit elkaar is getrokken. In de tabel is de gemiddelde daarvoor gebruikte tijd aangegeven.

BINNENELEKTRODE			
l = 2,2 mm			
Tijdvak	tijd (s)	kracht (N)	gloeistroom (A)
1	5,0	2,4	5,7
2	$\pm 0,9$	3,2	5,7
3	1,2	1,9	0
4	2,0	10,0	0

BUITENELEKTRODE			
l = 1,6 mm			
Tijdvak	tijd (s)	kracht (N)	gloeistroom (A)
1	10,0	1,3	6,0
2	$\pm 1,7$	2,4	6,0
3	1,0	1,3	0
4	2,0	10,0	0

Deze parameters zijn gevonden door ze systematisch te variëren en de vorm van de elektrodeschacht te beoordelen. Na het trekken van de elektroden is de tip van de buitenelektrode te klein om de binnenelektrode er door te kunnen schuiven. Daarom wordt onder de mikroskoop de buitenelektrode tegen een stuk metaal of glas geduwd tot er zoveel glas van de tip gebroken is dat deze een diameter van 7 à 10  $\mu\text{m}$  heeft. Ook de tip van de binnenelektrode wordt, indien nodig, afgebroken tot deze 0,5 - 1,0  $\mu\text{m}$  is, omdat voor de huidige metingen (zie Inleiding) geen kleinere tipdiameter nodig is, zodat de weerstand laag blijft en dus ook de ruis. Bovendien kan de binnenelektrode dan zonder veel moeite gevuld worden.

### 3.1.2 Het assembleren en vullen

Voordat de binnenelektroden in de buitenelektrode geschoven wordt moet een lange dunne naald (30G, diameter 0,30 mm) een druppeltje fysiologische

zout-oplossing (0,9% NaCl) voor in de schacht van de buitenelektrode worden gebracht. Zonder dit druppeltje gaat de tip van de binnenelektrode aan de binnenkant van de buitenelektrode plakken, zodra deze in het tapse deel van de buitenelektrode komt. Vanwege dit druppeltje fysiologisch zout-oplossing in de buitenelektrode moet de binnenelektrode gevuld worden voordat deze in de buitenelektrode geschoven wordt. De binnenelektrode zou anders vanuit de tip gedeeltelijk gevuld worden met fysiologisch zout waardoor verder vullen met een dunne naald onmogelijk wordt omdat er dan altijd een luchtbel in de schacht blijft. De binnenelektrode wordt gevuld met een 3 M KCL of NaCl-oplossing en heeft een weerstand tussen 8 en 15 M $\Omega$ .

Nu wordt de binnenelektrode in de buitenelektrode geschoven totdat de binnenelektrodetip zich net in het tapse deel van de buitenelektrode bevindt. Deze handeling is bij voldoende licht met de hand uit te voeren. Hierna wordt onder de mikroskoop de binnenelektrode met een mikromanipulator zover geduwd dat deze ca. 50  $\mu$ m uit de buitenelektrodetip steekt (zie Fig. 14). De binnenelektrode steekt aan de achterkant ca. 2 cm uit. Om de twee elektroden t.o.v. elkaar te fixeren wordt nu een druppeltje kontaktlijm (CYANOLIT) op het eind van de buitenelektrode gelegd. De lijm zal nu tussen de buiten- en binnenelektrode kruipen en deze aan elkaar hechten waarbij tussen de twee elektroden voldoende ruimte overblijft voor de zout-oplossing waarmee de buitenelektrode gevuld wordt.

Voor de elektrische aansluiting van de buitenelektrode met een zoutbrug (zie 3.2) en voor verdere fixering van binnen- en buitenelektrode wordt op het eind van de elektrode en perspex kapje gelijmd (Fig. 15). Dit kapje bestaat uit een nauwsluitend cilindertje met een roestvrij stalen buisje (deel van 19 G injektienaald) en een afsluitschijfje. Het cilindertje wordt eerst op het uiteinde van de buitenelektrode gelijmd met sneldrogende epoxylijm (ARALDITE RAPID). Daarna wordt het afsluitschijfje over de uitstekende achterkant van de binnenelektrode geschoven en op het cilindertje gelijmd zodat de buitenelektrode afgesloten is met uitzondering van het stalen buisje voor de elektrische aansluiting. Na enkele uren is de lijm droog. Er moet met een tweedelig afsluitsysteem gewerkt worden omdat de twee glasbuisjes aan het eind van de elektrode niet concentrisch zijn doordat de binnenelektrode aan één kant tegen de binnenkant van de buitenelektrode is gelijmd met de kontaktlijm.

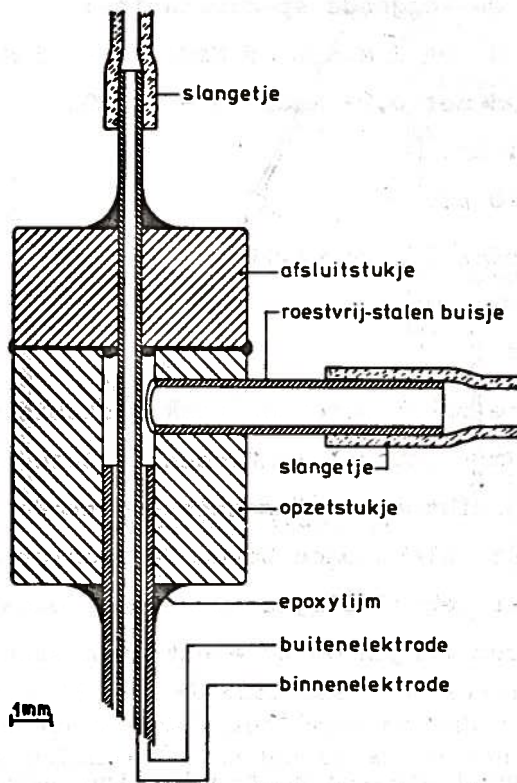


Fig. 15 De afsluiting van de bovenkant van de BCG-elektrode met een perspex kapje om de elektrische verbinding met de buitenelektrode (via het roestvrij stalen buisje) te maken. Tevens dient het kapje voor een betere fixatie van binnen- en buitenelektrode.

Een tweede functie van het perspex kapje is het beter fixeren van de buiten- en binnenelektrode t.o.v. elkaar. Het is namelijk gebleken dat de kontaktlijm die tussen de twee glasbuisjes zit na enkele uren door de zout-oplossing is aangetast en kan loslaten.

De buitenelektrode wordt gevuld met fysiologisch zout-oplossing. Niet met 3 M NaCl of KCl zoals de binnenelektrode, omdat de buitenelektrode door de relatief grote tipopening zou kunnen lekken en hoge zoutconcentraties de retinale fysiologie zouden kunnen beïnvloeden. De geassembleerde BCG-elektrode met reeds gevulde binnenelektrode ondergedompeld in een afgesloten fles die gevuld is met een fysiologisch zout-oplossing. Met een waterstraalpompe wordt de luchtdruk boven de vloeistofspiegel omlaag gebracht. Hierdoor ontsnapt de lucht uit de buitenelektrode via het stalen buisje. Als vervolgens de druk weer normaal gemaakt wordt, vult de buitenelektrode zich met de fysiologisch zout-oplossing. Er blijft echter meestal een klein luchtbelletje onder in de tip zitten. Door het afzuigproces enkele malen te herhalen kan deze laatste lucht uit de elektrode gewerkt worden, waarin de BCG-elektrode klaar is voor elektrische aansluiting.

Samengevat heeft de BCG-elektrode de volgende specificaties:

Tipweerstand binnenelektrode gevuld met 3 M.KCL of NaCl: 8 - 15 M $\Omega$ .

Tipweerstand buitenelektrode gevuld met 0,9% NaCl: 5 - 10 M $\Omega$ .

Tipdiameter binnenelektrode: ca. 1  $\mu$ m.

Tipdiameter buitenelektrode: ca. 10  $\mu$ m.

Afstand tussen de 2 tips: ca. 50  $\mu$ m.

### 3.2 De elektrische aansluiting

Om stabiele DC-metingen mogelijk te maken wordt de vaak onstabiele zout-oplossing/metaal overgang gemaakt met calomelelektroden<sup>1)</sup>. Deze elektroden worden in de elektrochemie gebruikt als referentie-elektroden, o.a. bij pH-metingen. Wij prefereren deze elektroden boven de gechloreerde zilverdraadjes (Ag/AgCl is een zeer gebruikelijke elektrode) omdat die erg kwetsbaar zijn en veel onderhoud vergen om ze elektrisch stabiel te houden.

Met zoutbruggen en slangetjes, gevuld met een zout-oplossing, worden de calomelelektroden elektrisch verbonden met de BCG-elektrode (zie Fig. 16). De zoutbruggen zijn gemaakt door een tot 80°C verhitte oplossing van 3 M KCL met 30% agar<sup>2)</sup> in een slangetje ( $\varnothing$  3 mm) te spuiten. Na afkoeling is de oplossing niet langer vloeibaar en is een elektrische geleider ontstaan zonder metaal. Om het aansluiten en loskoppelen van de BCG-elektrode te vergemakkelijken worden de zoutbruggen op de zijkant van plastic injectiespuiten aangesloten, die gevuld zijn met een 3 M KCL- of een fysiologisch zout-oplossing voor resp. binnen- en buitenelektrode. De injectiespuiten zijn d.m.v. met zout-oplossing gevulde slangetjes verbonden met de BCG-elektrode. De zout-oplossingen in de injectiespuiten dienen als buffervoorraad omdat tijdens het aansluiten van de BCG-elektrode de lucht uit de slangetjes gespoten moet worden om een goede verbinding te maken met de zout-oplossingen in de BCG-elektrode.

De nul-elektrode bestaat uit een injectiespuit gevuld met methylcellulose (Methocel) waarin ook een zoutbrug is aangebracht. De spuit, waarop een stukje zachte slang zit, wordt in een druppel methylcellulose

1) Merk: Schott, type B281; verkrijgbaar bij TAMSON in Zoetermeer.

2) Verkrijgbaar bij: Brocacef, Utrecht onder de naam Agarose.

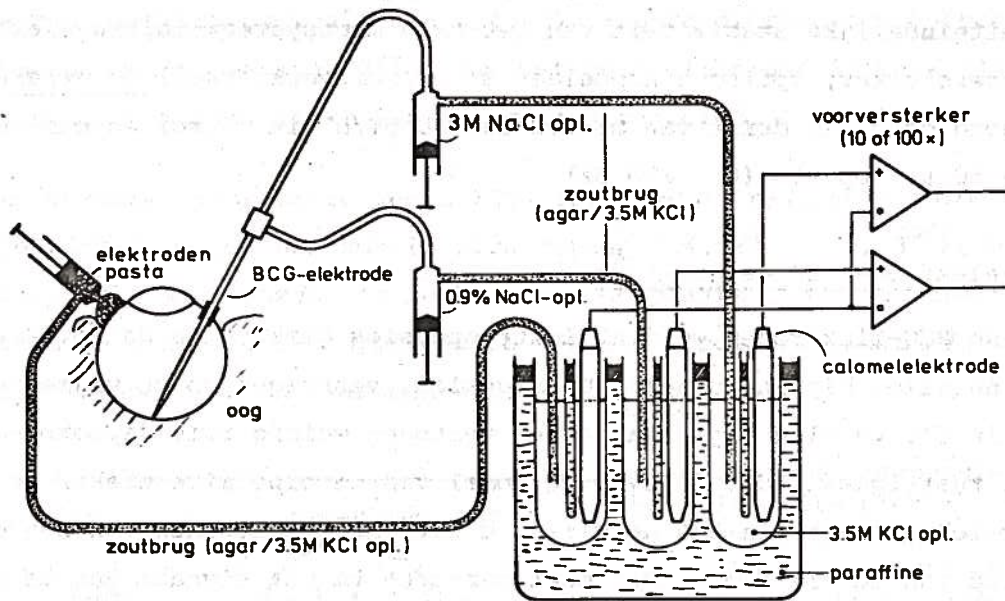


Fig. 16 De elektrische aansluiting van de BCG-elektrode via zoutbruggen en calomelektroden om een minimale drift te verkrijgen ( $< 50 \mu\text{V/h}$ ). De calomelektroden staan in een bak met paraffine om de temperatuur van de calomelektroden gelijk te houden.

gezet die in de ooghoek is gespoten. Dit is de meest stabiele aarding gebleken. Een gesinterde Ag/AgCl-elektrode voldoet ook als aardelektrode.

De 3 uiteinden van deze zoutbruggen staan ieder voor zich in een U-buis die gevuld is met een bijna verzadigde KCl-oplossing. In het andere been van de U-buizen staan 3 calomelektroden. De 3 U-buizen staan samen in een glazen pot die gevuld is met vloeibare paraffine om de temperaturen van de calomelektroden gelijk te houden. De elektrodepotential is namelijk vrij sterk afhankelijk van de temperatuur ( $0,7 \text{ mV}/^{\circ}\text{C}$ ). De paraffine is als vloeistof gekozen op grond van de lage diëlektrische konstante ( $\epsilon = 1,5$ ). Door deze lage diëlektrische konstante is ook de overspraakkapaciteit tussen de calomelektroden laag (ca.  $10 \text{ pF}$ ). Bij water ( $\epsilon = 80$ ) is de overspraakkapaciteit tussen de calomelektroden ca.  $250 \text{ pF}$ . Echter, deze resterende overspraakkapaciteit, tezamen met die van de BCG-elektrode zelf blijft een storende faktor bij de metingen. Hoe de overspraak berekend is en weggeregeld kan worden, zal in een volgend verslag beschreven worden.



De uiteindelijke stabiliteit van het hele meetsysteem (mikro-elektrode, voorversterker, optische koppelaar en filter/versterker) is gekarakteriseerd door een drift van minder dan  $50 \mu\text{V}/\text{h}$  (in vitro) en een ruis van  $20 - 50 \mu\text{V}$  top-top ( $0 - 200 \text{ Hz}$ ).

### 3.3 BCG-elektroden in de praktijk

Met de BCG-elektroden worden lichtresponsies gemeten in de fovea van het netvlies bij rhesusapen. De signalen, verkregen op de wijze, beschreven in dit verslag zijn stabiel en vertonen weinig ruis (spoorbreedte v.h. rustsignaal  $20 - 50 \mu\text{V}$ ). Het doel van de bipolaire elektrode is het zeer lokaal meten in het netvlies, d.w.z. het verkleinen van het oppikgebied van de elektrode. Dit moet gebeuren om het signaal van de kegeltjes te kunnen isoleren. De B-golf, die buiten de fovea gegenereerd wordt en die sterk aanwezig is in het signaal van een enkele elektrode, zou bij deze afleidtechniek sterk onderdrukt moet worden.

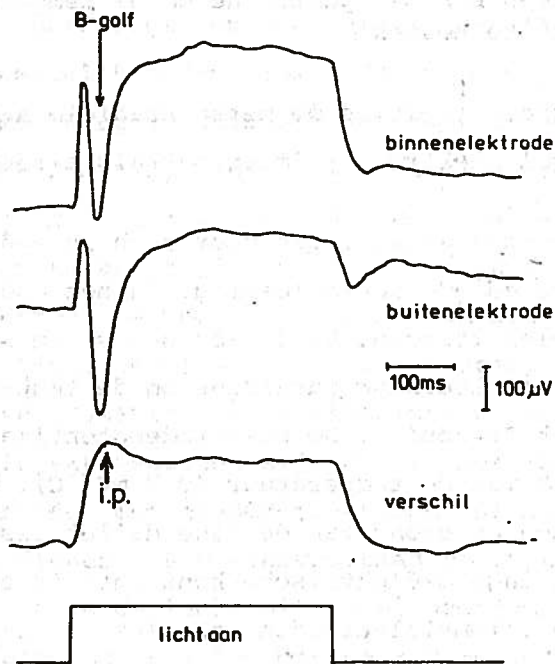


Fig. 17 Intraretinale lichtresponsies gemeten met een BCG-elektrode in de fovea van een rhesusaap t.o.v. een referentie-elektrode in de ooghoek. Beide signalen vertonen een grote B-golf die niet aanwezig is in het bipolaire of verschilsignaal dat veel lijkt op een receptorrespons (vergelijk Fig. 12).

In Fig. 17 wordt het resultaat gedemonstreerd. De bovenste 2 signalen geven de flitsresponsen, geregistreerd op de binnen- en de buitenelektrode (gemiddelde responsen van 30 flitsen van  $400 \text{ ms}$ ). Beide signalen vertonen een grote B-golf, die *niet* aanwezig is in het derde spoor, het bipolaire of verschilsignaal. Deze derde golfvorm lijkt bovendien erg op

de receptorrespons zoals die bij vele lagere diersoorten intracellulair gemeten wordt. De konklusie, dat met deze elektrode de kegeltjesrespons geïsoleerd wordt, lijkt dan ook gerechtvaardigd.

Een verdere illustratie geeft Fig. 18, waar de responsie (hoogte initiële piek i.p.) op een smalle lichtstreep (ca. 80  $\mu\text{m}$ ,  $0,3^\circ$  breed op het netvlies) is uitgezet als functie van de plaats t.o.v. de elektrode (afstand in graden). Het oppikgebied van een bipolaire elektrode ( $\bullet$ ) is ca. 3,5x kleiner dan dat van een enkele elektrode (o).

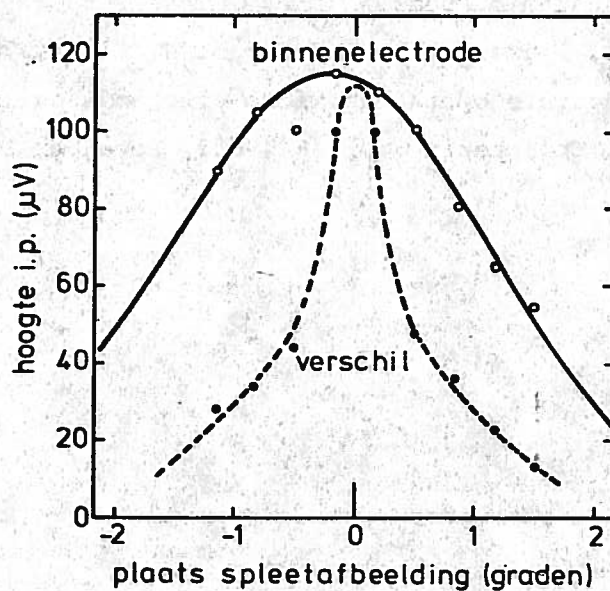


Fig. 18 Responsie (hoogte initiële piek i.p.) op een smalle lichtpleet ( $0,3^\circ$ ) als functie van de plaats t.o.v. de elektrode. Het oppikgebied van het verschilsignaal ( $\bullet$ ) is ca. 3,5x zo klein als dat van een enkele elektrode ( $1^\circ \approx$  ca. 270  $\mu\text{m}$  op het netvlies).

### 3.4 Konklusie

De bipolaire meetmethode beantwoordt aan de gestelde verwachtingen (zie Fig. 17 en 18). In vergelijking met de glas/zilververfelektrode komt de BCG-elektrode er aanzienlijk beter af. De voordelen t.o.v. de glas/zilververfelektroden zijn:

- a De fabricage is niet zo omslachtig en tijdrovend.
- b De tip van de buitenelektrode is veel kleiner.
- c De elektrische stabiliteit is veel beter.

4. Literatuurlijst

- Geddes, L.A. and Baker, L.E. (1967). Chlorided silver electrodes.  
Medical Research Engineering, Vol. 6: pp. 33-34.
- Geddes, L.A. (1972). Electrodes and measurement of bioelectric events.  
New York: Wiley.
- Getzel, W.A. and Webster, J.G. (1976). Minimizing silver-silverchloride  
electrode impedance. IEEE Trans. Biomed. Eng. (Commun.), pp. 87-88,  
January 1976.
- Nastuk, W.L. (1964). Physical techniques in biological research, Volume V,  
New York and London: Academic Press.
- Siegenbeek van Heukelom, J., Dijkstra, K. and Ingen, H. van (1976).  
A versatile and reproducible operating micro-electrode puller.  
Medical and Biological Engineering, pp. 644-652, November 1976.