

МЕТОД ДЛИТЕЛЬНОГО МОНИТОРИНГА БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АКСОНОВ НЕЙРОНАЛЬНОЙ СЕТИ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ КОРОТКИМИ ИМПУЛЬСАМИ ИК-ЛАЗЕРА

DOI: 10.17691/stm2020.12.6.03

УДК 004.32.26:576.535:621.373.826

Поступила 7.05.2020 г.

© **Я.И. Пигарева**, младший научный сотрудник лаборатории нейроинженерии НИИ нейронаук¹;
О.О. Антипова, лаборант лаборатории нейроинженерии НИИ нейронаук¹;
В.Н. Колпаков, младший научный сотрудник лаборатории нейроинженерии НИИ нейронаук¹;
О.В. Мартынова, инженер 2-й категории кафедры электродинамики радиофизического факультета¹;
А.А. Попова, аспирант кафедры электродинамики радиофизического факультета¹;
И.В. Мухина, д.б.н., профессор, зав. ЦНИЛ, зав. кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова²;
 профессор кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины¹;
А.С. Пимашкин, к.ф.-м.н., доцент кафедры нейротехнологий¹;
 научный сотрудник лаборатории нейроинженерии НИИ нейронаук¹;
В.А. Еськин, к.ф.-м.н., доцент кафедры электродинамики радиофизического факультета¹

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, проспект Гагарина, 23, Н. Новгород, 603950;

²Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Н. Новгород, 603005

Цель исследования — разработка метода длительной неинвазивной регистрации биоэлектрической активности изолированных аксонов нейрональной сети, вызванной стимуляцией короткими импульсами инфракрасного (ИК) лазера, и изучение влияния характеристик излучения на вероятность возникновения потенциалов действия на аксонах нейрональной культуры *in vitro*.

Материалы и методы. Гиппокампальные клетки эмбрионов мышей (E18) культивировали в микрофлюидных чипах из полидиметилсилоксана с микроканалами для обеспечения роста аксонов на расстояние до 800 мкм. Изучали электрофизиологическую активность нейрональной культуры, вызванную импульсами сфокусированного лазерного излучения в ИК-диапазоне. Оптическую стимуляцию проводили импульсным лазерным излучением с длинами волн 1907 и 2095 нм. Регистрацию электрофизиологической активности нейрональной культуры выполняли с помощью системы многоканальной регистрации (Multi Channel Systems, Германия).

Результаты. Разработанный оригинальный микрофлюидный чип и установленная оптическая стимуляция с использованием многоканальной системы регистрации позволили неинвазивно регистрировать потенциалы действия изолированных аксонов *in vitro*, вызванные импульсным ИК-излучением. Распространение потенциалов действия в аксонах обнаружилось с помощью внеклеточных микроэлектродов при облучении клеток лазером на длине волны 1907 нм с мощностью излучения 0,2–0,5 Вт для импульсов длительностью 6 мс и 0,5 Вт — для импульсов длительностью 10 мс. Показано, что мощность излучения прямо пропорциональна вероятности индукции импульсов в отростках клеток. При этом вероятность вызванного оптической стимуляцией ответа была выше при меньшей длительности оптического стимула. Также было обнаружено, что вероятность возбуждения импульсов обуславливалась локализацией излучения и была больше при облучении нейронов, чем при облучении непосредственно аксонов.

Заключение. Разработанный метод позволяет изолировать аксоны нейрональной культуры с помощью микрофлюидного чипа, стимулировать ИК-излучением культуру нейронов и неинвазивно регистрировать электрофизиологический сигнал аксонов. Предложенный подход позволяет изучать сетевые характеристики появления нейрональных ответов множества клеток на длительном (недели) отрезке времени. Метод может применяться как в фундаментальных исследованиях изучения принципов сигнализации в мозге, так и для разработки технологий неинвазивного нейроинтерфейса.

Ключевые слова: матрица микроэлектродов; внеклеточная электрофизиология; биоэлектрическая активность нейронов; культура нейронов гиппокампа; оптическая стимуляция нейронов; ИК-излучение; микрофлюидика.

Как цитировать: Pigareva Ya.I., Antipova O.O., Kolpakov V.N., Martynova O.V., Popova A.A., Mukhina I.V., Pimashkin A.S., Es'kin V.A. A method for recording the bioelectrical activity of neural axons upon stimulation with short pulses of infrared laser radiation. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(6): 21–28, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.6.03>

Для контактов: Пигарева Яна Игоревна, e-mail: pigareva@neuro.nnov.ru

A Method for Recording the Bioelectrical Activity of Neural Axons upon Stimulation with Short Pulses of Infrared Laser Radiation

Ya.I. Pigareva, Junior Researcher, Laboratory of Neuro-engineering, Research Institute of Neurosciences¹;

O.O. Antipova, Assistant, Laboratory of Neuro-engineering, Research Institute of Neurosciences¹;

V.N. Kolpakov, Junior Researcher, Laboratory of Neuro-engineering, Research Institute of Neurosciences¹;

O.V. Martynova, Engineer, Department of Electrodynamics, Faculty of Radiophysics¹;

A.A. Popova, PhD Student, Department of Electrodynamics, Faculty of Radiophysics¹;

I.V. Mukhina, DSc, Professor, Head of the Central Research Laboratory²;

Head of the Department of Normal Physiology named after N.Y. Belenkov²; Professor,

Department of Neurotechnology, Institute of Biology and Biomedicine¹;

A.S. Pimashkin, PhD, Associate Professor, Department of Neurotechnology¹;

Researcher, Laboratory of Neuro-engineering, Research Institute of Neurosciences¹;

V.A. Es'kin, PhD, Associate Professor, Department of Electrodynamics, Faculty of Radiophysics¹

¹National Research Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

²Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia

The aim of the study was to develop a method for long-term non-invasive recording of the bioelectrical activity induced in isolated neuronal axons irradiated with short infrared (IR) pulses and to study the effect of radiation on the occurrence of action potentials in axons of a neuron culture *in vitro*.

Materials and Methods. Hippocampal cells of mouse embryos (E18) were cultured in microfluidic chips made of polydimethylsiloxane and containing microchannels for axonal growth at a distance of up to 800 μm . We studied the electrophysiological activity of a neuronal culture induced by pulses of focused laser radiation in the IR range (1907 and 2095 nm). The electrophysiological activity of the neuronal culture was recorded using a multichannel recording system (Multi Channel Systems, Germany).

Results. The developed microfluidic chip and the optical stimulation system combined with the multichannel registration system made it possible to non-invasively record the action potentials caused by pulsed IR radiation in isolated neuronal axons *in vitro*. The propagation of action potentials in axons was detected using extracellular microelectrodes when the cells were irradiated with a laser at a wavelength of 1907 nm with a radiation power of 0.2–0.5 W for pulses with a duration of 6 ms and 0.5 W for pulses with a duration of 10 ms. It was shown that the radiation power positively correlated with the occurrence rate of axonal response. Moreover, the probability of a response evoked by optical stimulation increased at short optical pulses. In addition, we found that more responses could be evoked by irradiating the neuronal cell culture itself rather than the axon-containing microchannels.

Conclusion. The developed method makes it possible to isolate the axons growing from cultured neurons into a microfluidic chip, stimulate the neurons with infrared radiation, and non-invasively record the axonal spiking. The proposed approach allowed us to study the characteristics of neuronal responses in cell cultures over a long (weeks) period of time. The method can be used both in fundamental research into the brain signaling system and in the development of a non-invasive neuro-interface.

Key words: microelectrode array; extracellular electrophysiology; bioelectric activity of neurons; culture of hippocampal neurons; optical stimulation of neurons; IR radiation; microfluidics.

Введение

Восприятие информации о внешнем мире происходит с помощью сенсорных систем, в которых рецепторы преобразуют физико-химические сигналы в биоэлектрические импульсы нервных волокон для дальнейшей передачи в отделы головного мозга. Травма, прогрессирующие неврологические заболевания или возрастные изменения могут привести к нарушению путей восприятия и передачи информации. Восстановление утраченных сенсорных функций возможно благодаря использованию инвазивных сенсорных имплантатов. Примером могут служить успешно

используемые в медицине кохлеарные, вестибулярные и ретинальные имплантаты, которые выполняют электростимуляцию нервных волокон через имплантированные микроэлектроды. Однако такой подход обладает рядом недостатков: при длительном воздействии снижается точность/чувствительность мембраны клеток к стимуляции, кроме того, вживление микроэлектродов может вызвать образование глиального рубца.

В последние годы активно ведется разработка методов неинвазивного возбуждения сигналов сенсорных нейронов пучками электромагнитных волн оптического и инфракрасного (ИК) диапазонов частот. Их преимущества заключаются в отсутствии прямого

контакта источника стимулов и ткани, в высоком пространственном разрешении и отсутствии электрохимического воздействия на ткань.

Эксперименты показали, что лазерное ИК-излучение с длиной волны 1200–2200 нм может как возбуждать, так и подавлять нейронную активность. Так, стимуляция ИК-излучением искусственного липидного бислоя (на основе фосфолипидов), клеток млекопитающих и ооцитов вызывает деполяризацию мембран исследуемых клеток [1]. Сфокусированное излучение лазера ИК-диапазона на спиральные и вестибулярные ганглии *in vitro* приводит к возникновению потенциалов действия [2]. J.M. Саусе с соавт. [3, 4] показали, что импульсное ИК-излучение обладает способностью возбуждать и подавлять спонтанную нервную активность в мозге грызунов и приматов. Метод стимуляции нервов с помощью ИК-излучения был впервые продемонстрирован на седалищном нерве кролика [5], а затем исследован на предмет возможного клинического применения на периферической нервной системе [6, 7], ушной улитке [8] и сердце [9, 10]. Рассматриваются несколько механизмов воздействия ИК-излучения на клетки, основные из которых включают изменение электрической емкости мембраны вследствие локального нагрева окружающей жидкости при поглощении ИК-излучения [1, 11] и действие рецепторов, чувствительных к температуре [12, 13]. Поиск оптимальных оптических параметров и клеточных механизмов воздействия ИК-излучения на нейроны *in vivo* сложен непростой структурой нейронных сетей головного мозга и труднодоступностью для изучения отдельных клеток. Для этого чаще используют упрощенные модели *in vitro* диссоциированных нейрональных клеток, культивируемых на микроэлектродных матрицах (МЭМ). При поддержании благоприятных для роста условий клеточные культуры могут сохранять жизнеспособность более месяца.

В подобных системах на МЭМ в монослое нейрональных клеток было обнаружено подавление активности с помощью ИК-излучения [14]. Было также продемонстрировано возбуждение потенциалов действия на расстоянии до 200 мкм от области стимуляции ИК-излучением [15]. Однако до сих пор воздействие ИК-излучением применялось к гомогенным нейрональным культурам, в которых сложно выделить активность, распространяющуюся по аксонам. Кроме того, расстояние, на котором обнаруживался вызванный потенциал действия, составляло не более 200 мкм.

Целью данного исследования послужила разработка метода длительной неинвазивной регистрации вызванной биоэлектрической активности изолированных аксонов нейрональной сети при стимуляции их короткими импульсами ИК-лазера. Используя конструкции из полидиметилсилоксана (ПДМС), мы изолировали пучки аксонов в микроканалах длиной 800 мкм и с помощью методов электрофизиологии исследовали характеристики ИК-излучения, необходимые для возбуждения импульсов в изолированных аксонах.

Материалы и методы

Изготовление микрофлюидных чипов. Микрофлюидные чипы были изготовлены путем заливания жидкого ПДМС на мастер-форму с последующим затвердеванием. Методика изготовления микрофлюидных чипов была описана ранее [16]. Чип состоит из двух камер (длина — 2,7 мм, ширина — 0,5 мм) для культивирования нейрональных клеток, соединенных между собой 8 микроканалами длиной 0,8 мм. Чипы совмещались с предварительно очищенными МЭМ, включающими 60 электродов из TiN диаметром 30 мкм и расстоянием 200 мкм между ними (Multi Channel Systems, Германия), под микроскопом с использованием стереотаксиса так, чтобы микроэлектроды располагались в микроканалах и камерах (рис. 1).

Клеточная культура. Нейрональные клетки получали из гиппокампов эмбрионов мышей (E18) и помещали в камеры чипов ПДМС, совмещенных с микроэлектродными матрицами с начальной плотностью приблизительно ~7000–9000 кл./мм² [17]. Эвтаназию проводили путем смещения шейного отдела в соответствии с протоколом, одобренным Комитетом по биоэтике Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, в соответствии с Приказом №199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» (Россия, 2016) и Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского союза (22.09.2010 г.) о защите животных, используемых в научных целях. Клетки выращивали в культуральной питательной среде (Gibco 21103-049, Invitrogen, США) с биоактивной добавкой B27 (Gibco 17504-044, Invitrogen), глутамином (Thermo Fisher Scientific 25030-024, Invitrogen), фетальной сывороткой теленка (Gibco A3160801, Invitrogen) и гентамицином (PanReac AppliChem A1492,0005, AppliChem, Германия) при постоянных условиях: 37 °С, влажность — 100% с 5% содержанием CO₂ в воздухе в инкубаторе (SHELLAB 3552-2, Sheldon Manufacturing, Inc., США). Половину среды в чипе меняли на свежую каждые 2 дня. На 2–4-й день после посадки клеток в камеры аксоны прорастали в микроканалы микрофлюидного чипа. Для оценки роста аксонов использовали инвертированный микроскоп Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Германия). Регистрация роста аксонов в микроканалах производилась начиная со 2-го дня *in vitro*. Аксоны прорастали до конца микроканала длиной 800 мкм на 5–7-й день *in vitro*. Эксперименты проводились на культурах начиная с 3-й недели *in vitro* [18].

Регистрация биоэлектрической активности и электрическая стимуляция. Регистрацию электрофизиологической активности нейрональной культуры проводили с помощью системы многоканальной регистрации USB-MEA120-System (Multi Channel Systems) при частоте дискретизации 20 кГц. Электрическую стимуляцию нейрональной культуры выполняли начиная с 15-го дня развития последовательностью из

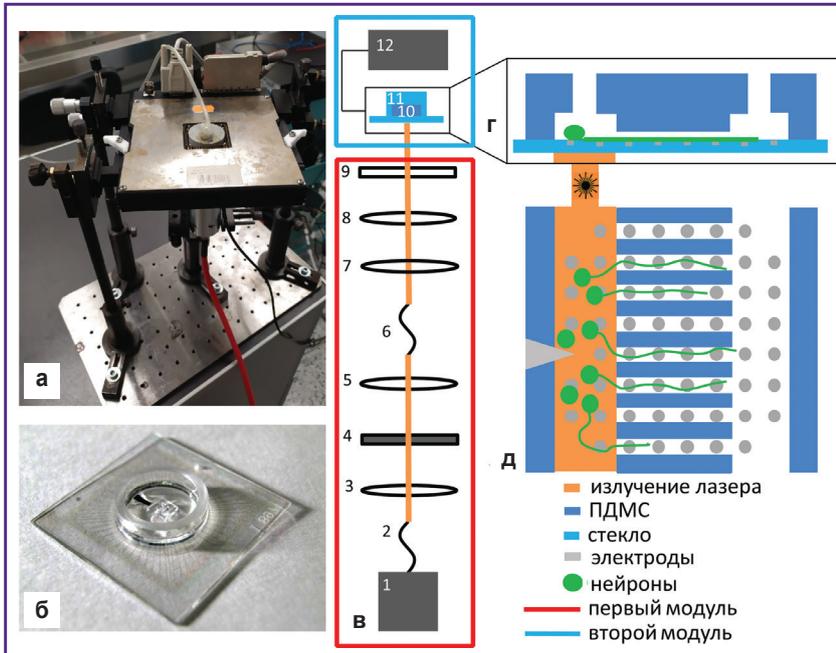


Рис. 1. Установка для оптической стимуляции и регистрации биоэлектрической активности изолированных аксонов нейрональной культуры:

а — фото коннектора системы многоканальной регистрации с установленной МЭМ; б — МЭМ, совмещенная с микрофлюидным чипом; в — схема системы оптической стимуляции и регистрации биоэлектрической активности: 1 — волоконный лазер; 2, 6 — оптоволокну; 3, 5, 7, 8 — круглые собирающие линзы; 4 — прерыватель; 9 — цилиндрическая собирающая линза; 10 — микрофлюидный чип; 11 — МЭМ; 12 — система многоканальной регистрации; г и д — схема микрофлюидного чипа на МЭМ, вид сбоку и сверху

30 бифазных импульсов (амплитуда потенциала — 800 мВ, длительность — 260 мкс на фазу, первая фаза — положительная) с межстимульным интервалом в 3 с. Стимулы подавали на 8 электродов, расположенных в микроканалах.

В работе исследовали только импульсы, распространяющиеся по аксонам стимулируемых клеток, синаптические ответы блокировали посредством добавления в камеры чипа антагониста AMPA-рецепторов CNQX (Tocris Bioscience, США) в концентрации 10 мкМ и ингибитора N-метил-D-аспартатных (NMDA) рецепторов (R)-CPP (Tocris Bioscience) в концентрации 10 мкМ.

Оптическая стимуляция. С целью регистрации сигналов, вызванных оптической стимуляцией, приложенной к культуре нейрональных клеток, была разработана система, состоящая из двух модулей: в первом происходила временная модуляция пучка электромагнитного излучения с заданными характеристиками, при помощи второго модуля осуществляли изменение формы пучка и его фокусировку на микроэлектродной матрице с культурой клеток. Первый модуль включал в себя непрерывный волоконный лазер, систему сферических собирающих линз и прерыватель; второй модуль состоял из конденсора, МЭМ с микрофлюидным чипом и многоканальной системы регистрации сигналов. Модули были соедине-

ны транспортным волокном (DILAS Diodenlaser, Германия) (рис. 1, в).

В качестве источника лазерного излучения использовали два лазера.

1. Непрерывный гольмиевый волоконный лазер (разработанный в лаборатории Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского) генерирует излучение на длине волны 2095 нм. Стимуляцию проводили сериями импульсов с длительностью 1, 3 или 6 мс. Интервалы между стимулами составляли 3 или 5 с, мощность излучения варьировалась в пределах 0,1–0,3 Вт. Непрерывное излучение преобразовывали в импульсное с помощью механического затвора, управляемого вручную.

2. Непрерывный тулиеый волоконный Tm-лазер ЛМТ-30А-01 (НТО «ИРЭ-Полюс», Россия) генерирует излучение на длине волны 1907 нм. Стимуляцию проводили импульсами длительностью 6 и 10 мс с интервалом между стимулами 5 с. Мощность излучения варьировалась в пределах 0,2–0,5 Вт. Для создания импульсного излучения использовали прерыватель

с компьютерным управлением («Авеста-Проект», Россия). Импульсно-периодический оптический сигнал, получаемый после прерывателя, сопровождался TTL-сигналом, генерируемым устройством в момент открытия. TTL-сигнал подавался на систему стимуляции и регистрации (Multi Channel Systems). Временная задержка между подачей TTL-сигнала и подачей лазерного излучения составляла около 10 мс.

На выходе из волокна излучение коллимировалось линзой в пучок диаметром 5 мм и далее шло на прерыватель. Таким образом непрерывное излучение преобразовывалось в импульсы с заданной длительностью. После прерывателя располагалась линза, фокусирующая излучение на вход транспортного волокна длиной 5 м, по которому излучение поступало на второй модуль. Во втором модуле волоконный выход был закреплен в конденсоре, состоящем из двух собирающих линз с фокусными расстояниями 50 и 40 мм, а также цилиндрической линзы с фокусным расстоянием 25 мм.

Микроэлектродная матрица с клеточной культурой в микрофлюидном чипе располагалась в горизонтально закрепленном коннекторе многоканальной системы регистрации сигналов. Конденсор был расположен вертикально под коннектором и фокусировал излуче-

ние на МЭМ через отверстие в нижней поверхности коннектора. Мощность излучения, подаваемого на МЭМ с физраствором, а также доля мощности, поглощаемой средой, определялись при помощи измерителя мощности лазера FieldMaxII-TO (Coherent, США) в непрерывном режиме без участия прерывателя.

С целью обеспечения стерильности и оптимальных условий для поддержания жизнеспособности клеточной культуры на МЭМ крепилась двухкомпонентная насадка из ПДМС, обеспечивающая подачу к культуре воздуха с 5% содержанием CO_2 .

Обработка данных. Для исследования вызванных электрической стимуляцией ответов строили распределение количества импульсов, зарегистрированных на электродах в микроканалах, после каждого стимула во временном окне от 2 до 50 мс с шагом 2 мс. Проводили сравнение распределений для ответов, полученных до и после блокировки синаптических ответов. Регистрируемые после блокировки вызванные импульсы составляли аксональный ответ, который в дальнейшем исследовали при оптической стимуляции.

Для вызванных оптической стимуляцией ответов было построено распределение количества импульсов после стимула (от 5 до 50 мс) в интервалах 2 мс. Два артефакта оптической стимуляции регистрировали на задержках 10 и 16–20 мс.

Вероятность возбуждения импульсов оптическим излучением оценивали для каждого электрода из 24 в микроканалах как отношение числа стимулов в интервале от 20 до 50 мс, вызывающих хотя бы один импульс на электроде, к общему числу стимулов. Затем определяли среднюю вероятность для всех 24 электродов.

Были проведены эксперименты по определению изменения вероятности возбуждения импульсов при разной мощности оптического излучения (3 эксперимента, 2 МЭМ), по оценке влияния локализации излучения (1 эксперимент) и длительности импульсов излучения (1 эксперимент) на вероятность возникновения импульса.

Статистика. Сравнение средней вероятности возбуждения импульсов при разной мощности излучения проводили с помощью Т-критерия Вилкоксона. Результаты представлены в виде $M \pm SD$, где M — среднее арифметическое, SD — стандартное отклонение. За критический уровень значимости принят $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучение аксона в микроканале. На 2-й день культивирования клеток отростки начали расти в микроканалы и на 7-й день достигали соседней камеры. Длина каналов составляла 800 мкм, что позволяло отделить аксоны от дендритов, длина которых в гиппокампе не превышает 400 мкм [19]. Малое поперечное сечение микроканалов не позволяло также проникать в них клеткам в микроканалы. В целом такой способ обеспечивал нахождение в каналах преимущественно

аксонов, что также подтверждалось регистрируемыми сигналами.

Начиная с 15-го дня развития культуры *in vitro* мы регистрировали спонтанную активность нейронов в камере в виде пачек импульсов с интервалами следования 2–10 с. Импульсы распространялись по аксонам, растущим в микроканалах. Были определены времена возникновения спонтанных импульсов на соседних электродах в микроканалах и оценена скорость распространения импульса вдоль аксонов, которая составила 361 ± 141 мм/с (7 каналов), что соответствует ранее определенной скорости распространения потенциалов действия по немиелинизированным аксонам в срезах гиппокампа — 380 мм/с [20].

Потенциалы действия в аксонах, вызванные электрическим стимулом. Через 2 нед культивирования нейрональных клеток *in vitro* проводили низкочастотную стимуляцию аксонов электродами в начале микроканалов. Каждый стимул вызывал потенциал действия, распространяющийся вдоль аксонов в микроканалах. Ответы включали аксональные импульсы, вызванные непосредственно изменением мембранного потенциала на аксоне, и импульсы, вызванные через синаптические контакты с другими нейронами. Для исследования только аксональных ответов мы заблокировали возбуждающие рецепторы, формирующие синаптическую передачу в нейрональной культуре (рис. 2). Аксональный ответ возникал на задержке до 15 мс (рис. 2, в).

Потенциалы действия в аксонах, вызванные оптическим стимулом. Для оптической стимуляции выбирались нейрональные культуры, электрическая стимуляция которых вызывала аксональный ответ в микроканалах. Оптическая стимуляция импульсами гольмиевого лазера с длиной волны 2095 нм при мощности излучения 0,1–0,3 Вт не вызывала потенциалов действия в культуре. На электродах, которые располагались в области засветки лазером, регистрировали артефакт стимуляции. При оптической стимуляции тулиевым лазером с длиной волны 1907 нм на электродах в области засветки регистрировали два артефакта стимуляции. Первый артефакт возникал на задержке, равной задержке между подачей TTL-сигнала и оптического излучения, второй — на задержке, равной длительности оптического импульса относительно первого артефакта. На аксонах в микроканалах регистрировали потенциалы действия, вызванные оптическими стимулами. При этом на электродах, расположенных в камере с клетками, потенциалы действия не наблюдались. Импульсы отмечали при мощности излучения, превышающей 0,2 Вт (рис. 3, а). Увеличение мощности излучения приводило к увеличению вероятности возникновения импульса (рис. 3, б). Количество микроканалов, на электродах которых обнаруживались ответы, варьировало от 1 до 8 пропорционально мощности излучения. Вероятность возникновения вызванного потенциала действия на электродах в каналах составляла $10 \pm 9\%$ при мощности 0,2 Вт,

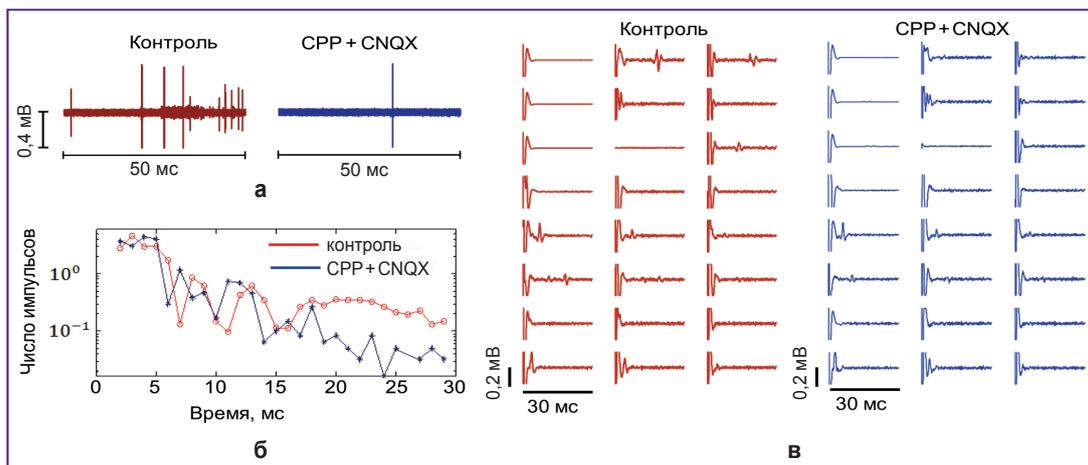


Рис. 2. Биоэлектрическая активность, зарегистрированная на аксонах в микроканалах, до (слева) и после (справа) добавления блокаторов синаптической передачи — CPP — 10 мкМ, CNQX — 10 мкМ:

а — пример спонтанной активности, зарегистрированной на одном электроде; частота импульсов уменьшается после добавления блокаторов синаптической передачи; **б** — гистограмма вызванной активности, зарегистрированной на всех электродах в микроканалах во временном окне 2–30 мс после предъявления электрического стимула; красная линия соответствует контрольным условиям, синяя — условиям в присутствии блокаторов синаптической передачи; прямой ответ вызывается на задержках меньше 15 мс и сохраняется после добавления блокаторов; синаптический ответ, возникающий на временных задержках больших 15 мс, отсутствует при добавлении блокаторов; **в** — пример активности, вызванной низкочастотной электрической стимуляцией, зарегистрированной в 8 микроканалах; после добавления блокаторов регистрируются только прямые ответы, распространяющиеся по аксонам

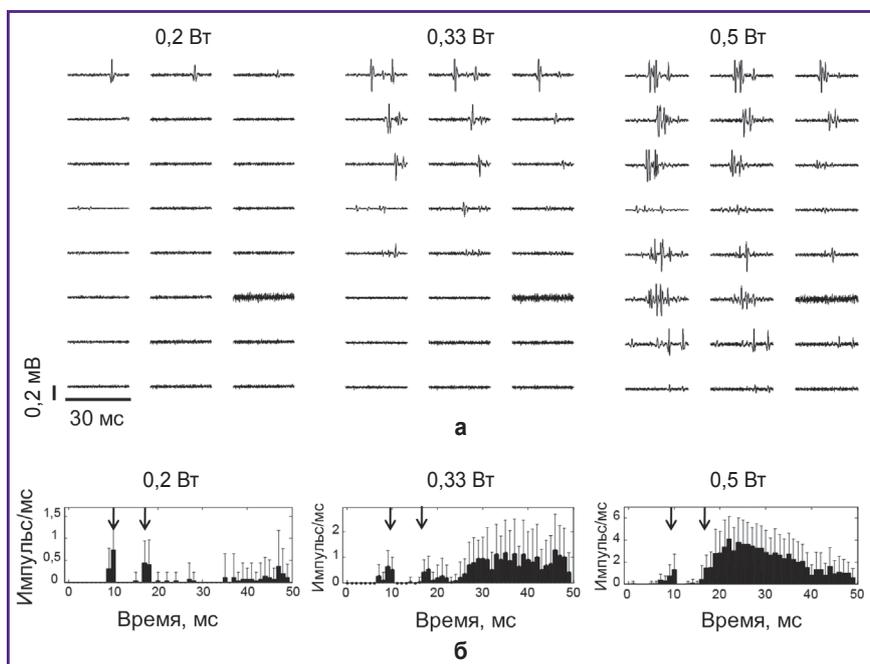


Рис. 3. Биоэлектрическая активность, зарегистрированная на аксонах в микроканалах, вызванная оптической импульсной стимуляцией:

а — пример активности, вызванной оптической стимуляцией, зарегистрированной в 8 микроканалах при разной мощности излучения; увеличение мощности излучения приводит к увеличению частоты импульсов в ответе; **б** — гистограммы вызванной активности, зарегистрированной на всех электродах в микроканалах во временном окне 50 мс после предъявления электрического стимула; стрелками обозначены артефакты оптической стимуляции, соответствующие началу и окончанию импульса

33±6% — при мощности 0,33 Вт и 59±15% — при мощности 0,5 Вт (3 эксперимента, 2 МЭМ). Различия выявлены между средними вероятностями при мощностях излучения 0,2 и 0,33 Вт и при мощностях излучения 0,33 и 0,5 Вт (Т-критерий Вилкоксона, $p < 0,05$).

Далее мы исследовали влияние длительности им-

пульсов оптического излучения на вероятность возникновения импульсов на аксонах. С этой целью мы сравнили минимальные мощности излучения, необходимые для возникновения потенциалов действия на аксонах в микроканалах. Для импульсов длительностью 6 мс данная мощность составила 0,2 Вт, для импульсов дли-

тельностью 10 мс — 0,5 Вт. Вызванные импульсы наблюдались в 8 каналах при стимуляции импульсами длительностью 6 мс (вероятность возникновения импульсов — $75\pm 3\%$ для 24 электродов) и только в одном канале — при стимуляции импульсами длительностью 10 мс (вероятность возникновения импульсов — $5\pm 13\%$ для 24 электродов). В дальнейших экспериментах длительность импульсов выбиралась равной 6 мс.

Затем было исследовано влияние локализации облучения на возникновение импульсов на аксонах в микроканалах. Для этого сравнивали вероятность возникновения импульсов при облучении камеры с нейронами и микроканалов при мощности излучения от 0,2 до 0,5 Вт. При стимуляции нейронов в камере импульсы возникали как минимум в 3 микроканалах, а число каналов, в которых регистрировались ответы, увеличивалось с возрастанием мощности излучения и достигло шести при мощности 0,5 Вт (вероятность возникновения импульсов — $58\pm 3\%$). Стимуляция аксонов в микроканалах вызывала ответ в 2 микроканалах при мощности излучения 0,5 Вт (вероятность возникновения импульсов — $22\pm 2\%$).

Для выявления природы вызываемых оптической стимуляцией ответов в культуру добавляли блокатор натриевых каналов тетродотоксин. Установлено, что блокировка проведения импульсов приводит к невозможности вызвать ответ в нейрональной культуре.

Таким образом, продемонстрирован новый метод индукции потенциалов действия импульсным ИК-излучением культур нейрональных клеток на изолированных аксонах в микроканалах микрофлюидного чипа. Ранее [15] было показано, что в гомогенных культурах клеток, культивируемых на МЭМ, импульс лазера также может вызывать потенциал действия, зарегистрированный только на одном соседнем электроде — на аксоне предположительно одной клетки. Мы регистрировали потенциалы действия аксонов, проросших в микроканалы, с помощью электродов МЭМ вне области облучения. При подаче импульса лазера на тела клеток ответный потенциал действия наблюдали вдоль канала каждые 200 мкм на расстоянии до 800 мкм. При добавлении блокатора натриевых каналов импульсы в нейрональной культуре не возбуждались, что подтверждает нейрональную природу вызванного ответа.

Мощность излучения (0,2–0,5 Вт) и длина волны (1907 нм) ИК-импульсов, вызывающих потенциалы действия, были схожи с характеристиками излучения в исследованиях, проведенных на ганглионарных клетках сетчатки и клетках вестибулярного ганглия (0,2 Вт; 1875 нм), а также культурах кортикальных нейронов (0,6 Вт; 1940 нм) [12, 15]. Установлено, что мощность излучения прямо пропорциональна вероятности индукции импульсов в отростках клеток (3 эксперимента, 2 МЭМ) (см. рис. 3). При этом вероятность вызванного оптической стимуляцией ответа была выше при меньшей длительности оптического стимула (6 мс по сравнению с 10 мс). Обнаружено также,

что вероятность возбуждения импульсов обуславливалась локализацией излучения и была больше при облучении нейронов, чем при облучении непосредственно аксонов.

Заключение

Продемонстрирована возможность неинвазивного возбуждения импульсов в нейрональной культуре с помощью оптической стимуляции. С этой целью были разработаны микрофлюидный чип для изоляции аксонов нейронов в микроканалах и установка оптической стимуляции, совмещенная с коммерческой системой многоканальной регистрации внеклеточной активности. Новый метод позволяет неинвазивно изучать характеристики потенциалов действия, распространяющихся по аксонам на расстояние до 800 мкм, в течение нескольких дней или месяцев. Метод может применяться как в фундаментальных исследованиях изучения принципов сигнализации в мозге, так и для разработки технологий неинвазивного нейроинтерфейса.

Финансирование исследования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№18-72-10046).

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

1. Shapiro M.G., Homma K., Villarreal S., Richter C.P., Bezanilla F. Infrared light excites cells by changing their electrical capacitance. *Nat Commun* 2012; 3: 736, <https://doi.org/10.1038/ncomms1742>.
2. Lumberras V., Bas E., Gupta C., Rajguru S.M. Pulsed infrared radiation excites cultured neonatal spiral and vestibular ganglion neurons by modulating mitochondrial calcium cycling. *J Neurophysiol* 2014; 112(6): 1246–1255, <https://doi.org/10.1152/jn.00253.2014>.
3. Cayce J.M., Friedman R.M., Jansen E.D., Mahavaden-Jansen A., Roe A.W. Pulsed infrared light alters neural activity in rat somatosensory cortex in vivo. *Neuroimage* 2011; 57(1): 155–166, <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.03.084>.
4. Cayce J.M., Friedman R.M., Chen G., Jansen E.D., Mahavaden-Jansen A., Roe A.W. Infrared neural stimulation of primary visual cortex in non-human primates. *Neuroimage* 2014; 84: 181–190, <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.08.040>.
5. Wells J., Kao C., Jansen E.D., Konrad P., Mahadevan-Jansen A. Application of infrared light for in vivo neural stimulation. *J Biomed Opt* 2005; 10(6): 064003, <https://doi.org/10.1117/1.2121772>.
6. Wells J., Kao C., Konrad P., Milner T., Kim J., Mahadevan-Jansen A., Jansen E.D. Biophysical mechanisms of transient optical stimulation of peripheral nerve. *Biophys J* 2007; 93(7): 2567–2580, <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.104786>.
7. McCaughey R.G., Chlebicki C., Wong B.J.F. Novel wavelengths for laser nerve stimulation. *Lasers Surg Med* 2010; 42(1): 69–75, <https://doi.org/10.1002/lsm.20856>.
8. Izzo A.D., Richter C.P., Jansen E.D., Walsh J.T. Jr.

- Laser stimulation of the auditory nerve. *Lasers Surg Med* 2006; 38(8): 745–753, <https://doi.org/10.1002/lsm.20358>.
9. Jenkins M.W., Duke A.R., Gu S., Chiel H.J., Fujioka H., Watanabe M., Jansen E.D., Rollins A.M. Optical pacing of the embryonic heart. *Nat Photonics* 2010; 4: 623–626, <https://doi.org/10.1038/nphoton.2010.166>.
10. Wang Y.T., Rollins A.M., Jenkins M.W. Infrared inhibition of embryonic hearts. *J Biomed Opt* 2016; 21(6): 60505, <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.6.060505>.
11. Richter C.P., Matic A.I., Wells J.D., Jansen E.D., Walsh J.T. Jr. Neural stimulation with optical radiation. *Laser Photon Rev* 2011; 5(1): 68–80, <https://doi.org/10.1002/lpor.200900044>.
12. Albert E.S., Bec J.M., Desmadril G., Chekroud K., Travo C., Gaboyard S., Bardin F., Marc I., Dumas M., Lenaers G., Hamel C., Muller A., Chabbert C. TRPV4 channels mediate the infrared laser-evoked response in sensory neurons. *J Neurophysiol* 2012; 107(12): 3227–3234, <https://doi.org/10.1152/jn.00424.2011>.
13. Fekete Z., Horváth Á.C., Zátanyi A. Infrared neuromodulation: a neuroengineering perspective. *J Neural Eng* 2020; 17(5): 051003, <https://doi.org/10.1088/1741-2552/abb3b2>.
14. Xia Q., Nyberg T. Inhibition of cortical neural networks using infrared laser. *J Biophotonics* 2019; 12(7): e201800403, <https://doi.org/10.1002/jbio.201800403>.
15. Xia Q.L., Wang M.Q., Jiang B., Hu N., Wu X.Y., Hou W.S., Nyberg T. Infrared laser pulses excite action potentials in primary cortex neurons in vitro. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2019; 2019: 5184–5187, <https://doi.org/10.1109/EMBC.2019.8856712>.
16. Gladkov A., Pigareva Y., Kutkina D., Kolpakov V., Bukatin A., Mukhina I., Kazantsev V., Pimashkin A. Design of cultured neuron networks in vitro with predefined connectivity using asymmetric microfluidic channels. *Sci Rep* 2017; 7(1): 15625, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15506-2>.
17. Gladkov A.A., Kolpakov V.N., Pigareva Y.I., Bukatin A.S., Kazantsev V.B., Mukhina I.V., Pimashkin A.S. Study of stimulus-induced plasticity in neural networks cultured in microfluidic chips. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(4): 15–24, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.4.02>.
18. Pimashkin A., Gladkov A., Mukhina I., Kazantsev V. Adaptive enhancement of learning protocol in hippocampal cultured networks grown on multielectrode arrays. *Front Neural Circuits* 2013; 7: 87, <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00087>.
19. Taylor A.M., Blurton-Jones M., Rhee S.W., Cribbs D.H., Cotman C.W., Jeon N.L. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Methods* 2005; 2(8): 599–605, <https://doi.org/10.1038/nmeth777>.
20. Meeks J.P., Mennerick S. Action potential initiation and propagation in CA3 pyramidal axons. *J Neurophysiol* 2007; 97(5): 3460–3472, <https://doi.org/10.1152/jn.01288.2006>.