

Визуализация потенциала действия методом голографической микроскопии

Ю. Н. Захаров, В. В. Дуденкова

Гарвардский университет, Бостон, США

Для исследования возможности голографической регистрации изменений, связанных с сигнальной активностью в телах и отростках возбудимых клеток. Были зарегистрированы серии голограмм с временем экспонирования 0,2 мс, и временем между кадрами 0,62 мс в нативном состоянии клеточных культур и после аппликации хлорида калия, что стимулирует непрерывную генерацию потенциалов действия. Предложенный способ голографической регистрации, показал возможность детектирования и визуализации изменений, связанных с сигнальной активностью в телах и отростках возбудимых клеток.

Ключевые слова: Фазовая цифровая голографическая микроскопия, нейрология, потенциал действия.

Цитирование: **Захаров, Ю. Н.** Визуализация потенциала действия методом голографической микроскопии / Ю. Н. Захаров, В. В. Дуденкова // HOLOEXPO 2023: 20-я Международная конференция по голографии и прикладным оптическим технологиям : Тезисы докладов. — СПб.: Изд-во СПбГЭТУ «ЛЭТИ», 2023. — С. 371–374.

Введение

В нервных волокнах сигналы передаются с помощью потенциалов действия, которые представляют собой быстрые изменения мембранного потенциала, быстро распространяющиеся вдоль мембраны нервного волокна [1]. Потенциал действия (ПД) является физиологической основой нервного импульса. Движущееся по нервам возбуждение представляет собой нервные импульсы, а не потенциалы действия. Но в физиологической литературе в качестве синонима для нервного импульса принято использовать также и термин "потенциал действия", хотя потенциал действия — это только электрический компонент нервного импульса, характеризующий изменения электрического заряда (потенциала) на локальном участке мембраны во время прохождения через него нервного импульса. Нервный импульс - это сложный структурно-электро-химический процесс, распространяющийся по мембране нейрона в виде бегущей волны изменений в состоянии мембраны. Она включает в себя структурные изменения (открытие и закрытие мембранных ионных каналов), химические (изменяющиеся трансмембранные потоки ионов) и электрические (изменения электрического потенциала мембраны: деполяризацию, позитивную поляризацию и реполяризацию). На данный момент, потенциалы действия регистрируются с помощью микроэлектродов вводимых в клетку, поэтому такие методы, с одной стороны, не могут считаться неинвазивными, с другой – способны регистрировать ПД лишь в весьма ограниченном количестве точек, что не позволяет использовать их для наблюдения распространения сигналов по сети нейронов. Для исследования возможности голографической регистрации изменений, связанных с сигнальной активностью в телах и

отростках возбудимых клеток, были использованы первичные культуры нейрональных клеток гиппокампа мышей на пятнадцатом и двадцать втором дне культивирования в нейробазальной среде.

1. Условия регистрации и оборудование

Генерация и распространение потенциалов действия происходит за время порядка единиц миллисекунд, что требует для голографической записи этих процессов регистрирующих камер со временем экспозиции не более 1 мс и частотой кадров порядка килогерц.

Цифровая внеосевая голографическая установка была построена на базе прямого конфокального лазерного сканирующего микроскопа и оснащена скоростной КМОП камерой [2].

2. Результаты

Были зарегистрированы серии голограмм (Рис. 1) из 200 кадров с временем экспонирования 0,2 мс, и временем между кадрами 0,62 мс в нативном состоянии клеточных культур и после аппликации хлорида калия до концентрации в нейробазальной среде 60 mM, что стимулирует непрерывную генерацию потенциалов действия.

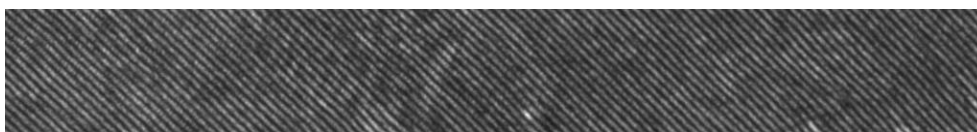


Рис. 1. Пример регистрируемой на CMOS камеру голограммы нейрональной клетки с отростком

В нативном состоянии ни на одной из 25 голограмм, записанных в произвольные моменты времени, не оказались зарегистрированными достаточные изменения, коррелирующие по своим временным параметрам с нервными импульсами. Это говорит о том, что в таком состоянии генерация ПД происходит достаточно редко.

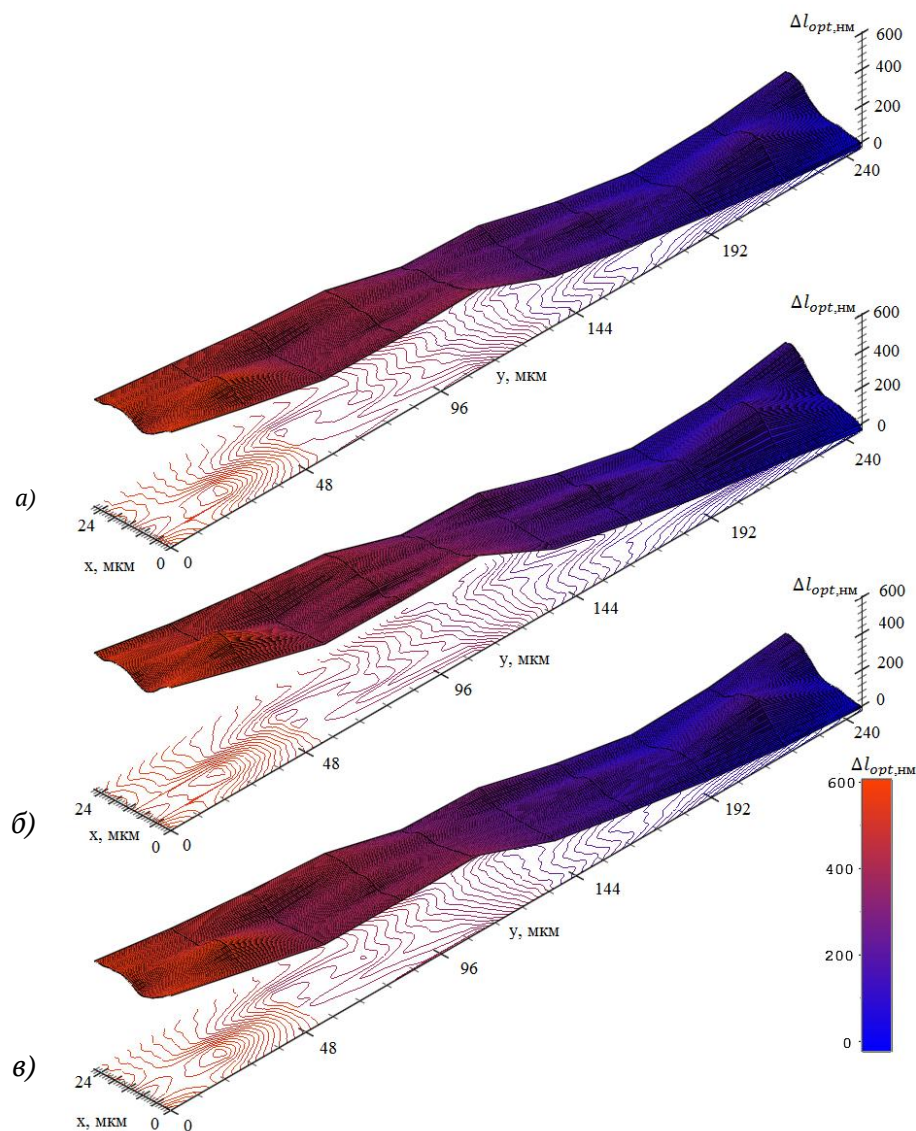


Рис. 2. Восстановленные фазовые портреты клетки с отростком:

а – начало измерений, б - 40-я мс записи, в- 124-я мс записи.

Здесь x, y – пространственные координаты в микрометрах, Δl_{opt} – в нанометрах

На фазовых портретах (Рис. 2), восстановленных с голограмм клеток с отростками после действия КС1, наблюдались изменения ОДП сигнальной волны на участках аксонов. Увеличение ОДП на 20 нм за время 1,5 – 2 мс 2 – 3 раза в течение временных серий длительностью 124 мс сопоставимо с временными характеристиками КС1-стимулированных потенциалов действия, проводимых аксонами гиппокампа мозга мышей. В одной из культур на двадцать втором дне культивирования в нейробазальной среде через полчаса после аппликации КС1 было зафиксировано резкое увеличение ОДП в аксоне примерно в 6 раз. После скачкообразного появления сигнала, величина амплитуды плавно снижалась в течение 100 мс. После чего ОДП приблизилась к первоначальным значениям.

Заключение

Таким образом, предложенный способ голографической регистрации, показал возможность детектирования и визуализации изменений, связанных с сигнальной активностью в телах и отростках возбудимых клеток, на примере действия KCl на первичные культуры нейрональных клеток гиппокампа мышей.

Благодарность

Авторы благодарны сотрудникам Центральной научно-исследовательской лаборатории Приволжского исследовательского медицинского университета, предоставившим образцы.

Список источников

- [1] **Barnett, M. W.** The action potential /M. W. Barnett, P. M. Larkman // Practical Neurology — 2007. — V. 7. — P. 192-197.
- [2] **Дуденкова, В. В.** Совершенствование многоканальных систем оптической микроскопии при использовании цифровой голографии / В. В. Дуденкова, М. С. Муравьева, А. И. Рыбников // Сборник трудов 10-й Международной конференции «ГолоЭкспо-2013» Голография. Наука и практика. — Москва, 2013 — С. 222.

Action potential detection by holographic microscopy

Yu. N. Zakharov, V. V. Dudenkova

Harvard University, Boston, USA

To study the possibility of holographic recording of changes associated with signaling activity in the bodies and processes of excitable cells, primary cultures of neuronal cells were used. A series of holograms were recorded with an exposure time of 0.2 ms, and framerates of 1600 fps in the native state of cell cultures and after the application of potassium chloride, which stimulates the continuous generation of action potentials. The proposed method of holographic registration showed the possibility of detecting and visualizing changes associated with signaling activity in the bodies and processes of excitable cells.

Keywords: Digital holographic microscopy, Neuroscience, Action potential.