

БИОФИЗИКА

УДК 577.3

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ЦИТОПЛАЗМЫ НЕЙРОНА
МЕТОДОМ ДИНАМИЧЕСКОЙ ФАЗОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Т.А. Казакова, С.М. Новиков, Г.Г. Левин*, Г.В. Максимов

(кафедра биофизики; e-mail: brindikova@gmail.com)

С помощью лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) разработан подход для исследования состояния плазматической мембраны (ПМ) и примембранной области цитоплазмы (ПОЦ) нейрона (позвоночных и беспозвоночных животных). Обнаружены изменения состояния ПМ и ПОЦ нейронов в покое и при модификации функционального состояния нейрона (ацетилхолин). Разработана методика оценки кинетики изменений ПМ и ПОЦ в разных участках нейрона. Обнаружены регулярные процессы ПМ и ПОЦ, частота которых зависит от функционального состояния нейронов. Предполагается, что флуктуации зависят от изменений рельефа ПМ, перестройки примембранного цитоскелета и движения внутриклеточных везикул в ПОЦ нейрона.

Ключевые слова: лазерная интерференционная микроскопия, нейрон, мембранный потенциал, ацетилхолин.

Одним из важнейших объектов исследования, функционирование которого лежит в основе координации жизнедеятельности всех животных, включая человека, является нервная клетка, трансформация возбуждения между нейронами за счет генерации потенциалов действия и ритмическое возбуждение. Генерация потенциала действия (ПД) и ритмическое возбуждение (РВ) нервной клетки обусловлены как активацией потенциалозависимых каналов и транспортных АТФаз, так и изменениями физико-химических свойств плазматической мембраны (ПМ) (поверхностный заряд, вязкость), а также примембранной области цитоплазмы (ПОЦ). При РВ нервной клеткой запускаются динамические процессы в цитоплазме, приводящие к изменению объема клетки и состояния ПМ [1, 2].

Известно, что состояние ПМ нейрона (Retzius-нейрон пиявки) зависит от межклеточной концентрации медиаторов (ацетилхолина (АХ), серотонина (5-НТ), глутамата и др.) [3]. Важно, что изменения ПОЦ (экзоцитоз 5-НТ) сопровождаются слиянием внутриклеточных везикул с ПМ, изменением ее вязкости и уровня мембраносвязанного Ca^{2+} . Так, при экстраклеточном действии АХ на R-клетку наблюдается увеличение вязкости мембраны, что обусловлено активацией АХ-рецепторов, входом Ca^{2+} и активацией фосфолипаз. Таким образом, проведение РВ в нейронах напрямую приводит к изменению состояния как клеточной мембраны, так и примембранной цитоплазмы [4, 5].

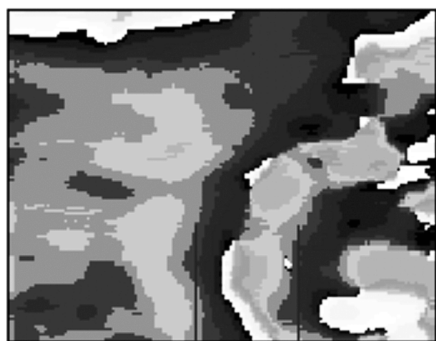
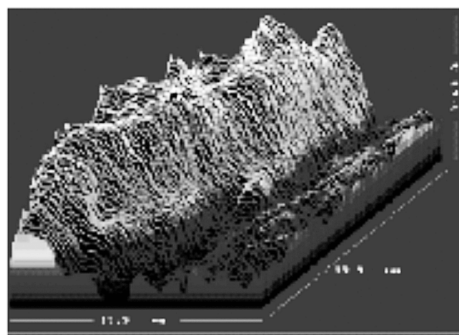
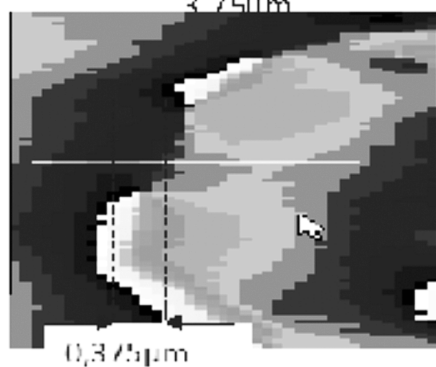
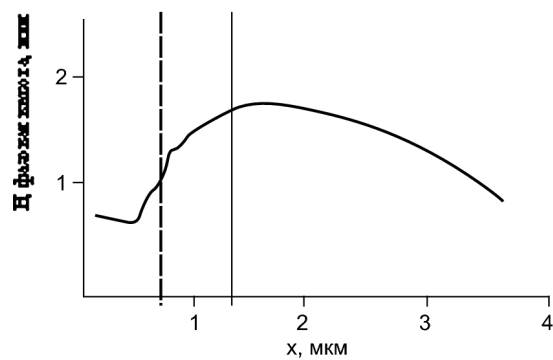
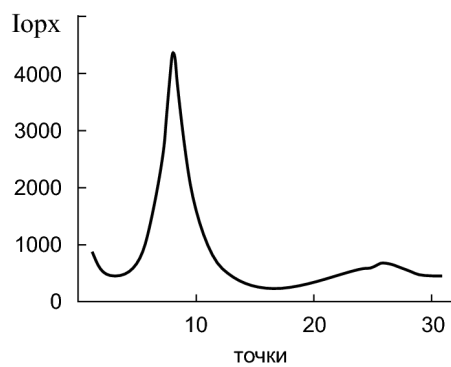
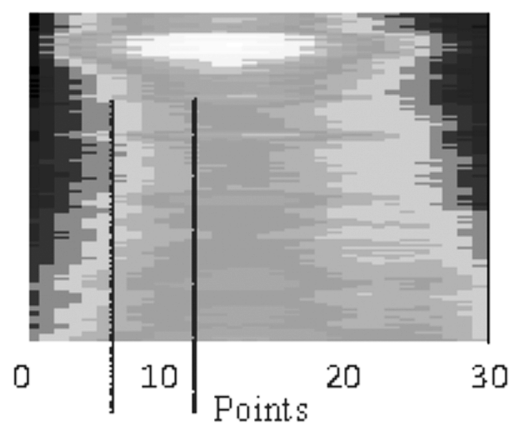
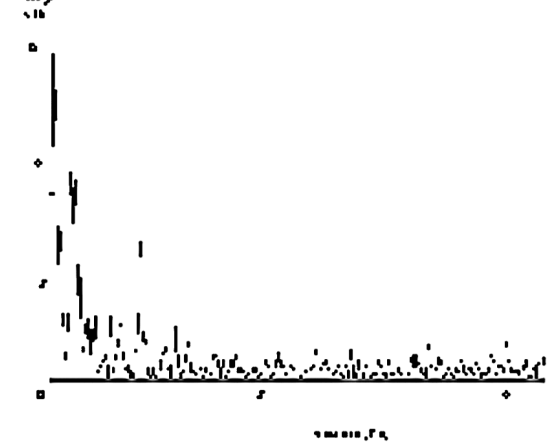
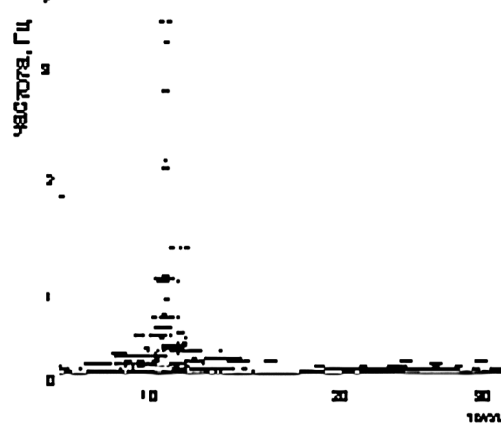
Специфика нервной клетки для исследования заключается в исключительной зависимости ее функционального состояния и клеточной динамики от метода исследования. Как правило, для изучения состояния ПМ и ПОЦ используются методы флуоресцентной и ЭПР-спектроскопии, что сопряжено с введением в клетку молекулярных зондов, нарушающих структуру клеточной мембраны и изменяющих состояние цитоплазмы. В наших исследованиях использовался метод лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ), позволяющий исследовать состояния ПМ и ПОЦ нейрона без изменения структуры и нарушения механизмов функционирования.

Цель настоящей работы заключалась в разработке подходов измерения оптических свойств мембраны и примембранной цитоплазмы при различном функциональном состоянии нейронов.

Материалы и методы

Объектом исследования служили выделенные нейроны из сегментных ганглиев пиявки (*Herudo medicinalis*) и культура нейронов из спинного мозга эмбрионов мыши. Нейроны помещали в герметичную камеру и инкубировали в растворе (среда-1): 115 мМ NaCl; 4 мМ KCl; 1 мМ CaCl_2 , 1 мМ MgCl_2 , pH 7,4 при комнатной температуре [4]. Перед экспериментом проводились измерения флуктуаций фазовой высоты (ФВ) на подложке, а затем — измерения самого объекта. В связи с задачей исследования в ряде экспериментов производили замену среды-1 на рас-

* Всероссийский НИИ оптико-физических измерений.

a*б**в**г**д**е**ж**з*

твор (среда-2): 80 mM NaCl; 50 mM KCl; 1 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂, pH 7,4, при комнатной температуре или раствор (среда-3), содержащий среду-1 и 10⁻¹⁰ M ацетилхолин, а также раствор (среда-4), содержащий среду-1 и 10⁻⁴ M тетраэтиламмоний. Для нейронов мыши раствор содержал: буфер HEPES pH 7,4; 137 mM NaCl; 5,35 mM KCl; 2,2 mM KH₂PO₄; 16,6 mM glucose; 9,8 mM HEPES [6].

Исследования оптических свойств мембраны и примембранной цитоплазмы при различном функциональном состоянии нейронов проводили методом ЛИМ [7, 8]. В экспериментах использовались специальные герметичные термостатируемые камеры, в которых осуществлялась перфузия раствора, без изменения положения объекта. В качестве источника излучения использовали He-Ne лазер (633 нм, 1,5 мВт.). Линейно-периодическая модуляция фазы опорной волны осуществлялась зеркалом с помощью пьезопреобразователя (частота 1 КГц). Для регистрации интерференционного сигнала и его аналого-цифрового преобразования использовался координатночувствительный фотоприемник-диссектор (устройство, состоящее из фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), отклоняющих катушек и электронного блока). Величина фазовой высоты, соответствующая измеряемой оптической плотности (в нм), регистрировалась с чувствительностью 0,5 нм, периодичность выборки и скорость ввода изображения определялись частотой модуляции 1 КГц (или 0,9 мс на пикс).

Принцип действия ЛИМ основан на измерении локальных фаз света, отраженного объектом [9]. Лазерный луч разделяется на два, один из которых, проходя через клетку, отражается от зеркальной подложки, на которой находится клетка (отраженный луч). Другой луч является контрольным и не проходит через объект, а отражается от зеркала пьезопреобразователя (опорный луч). Рассеянный объектом луч в плоскости фотоприемника интерферирует с опорным лучом и создает в фотоприемнике распределение фототоков, что формирует интерференционную картину (фазовое изображение объекта). При построении фазового изображения сигнал нормировался по длине волны, определялась величина оптической разности хода (ОРХ) двух лучей, иначе называемая фазовой высотой (Ф):

$$\Phi = \frac{(\varphi_0 - \varphi_{obj}) \lambda}{2\pi} \quad (1)$$

где φ_0 — начальная фаза, рад, φ_{obj} — сдвиг фазы объектом, рад, λ — длина волны источника, нм.

В общем случае фазовая высота Φ в каждой точке объекта связана с его геометрическими размерами (толщиной), z [9].

$$\Phi(x, y) = \int_0^{z_{\max}} (n(x, y, z) - n_1) dz, \quad (2)$$

где n_1 — показатель преломления буферного раствора, величина которого постоянна, $n(x, y, z)$ — величина показателя преломления в точке клетки с координатами x, y высотой z , $z_{\max}$ — верхний предел интегрирования, выбирается выше верхней точки объекта.

Таким образом, фазовое изображение клетки представляет собой распределение фазового сдвига в различных областях объекта, а значение фазовой высоты в каждой точке (i) представляет собой сумму высот различных оптических сред (z), где n — коэффициенты преломления соответствующей среды [10]:

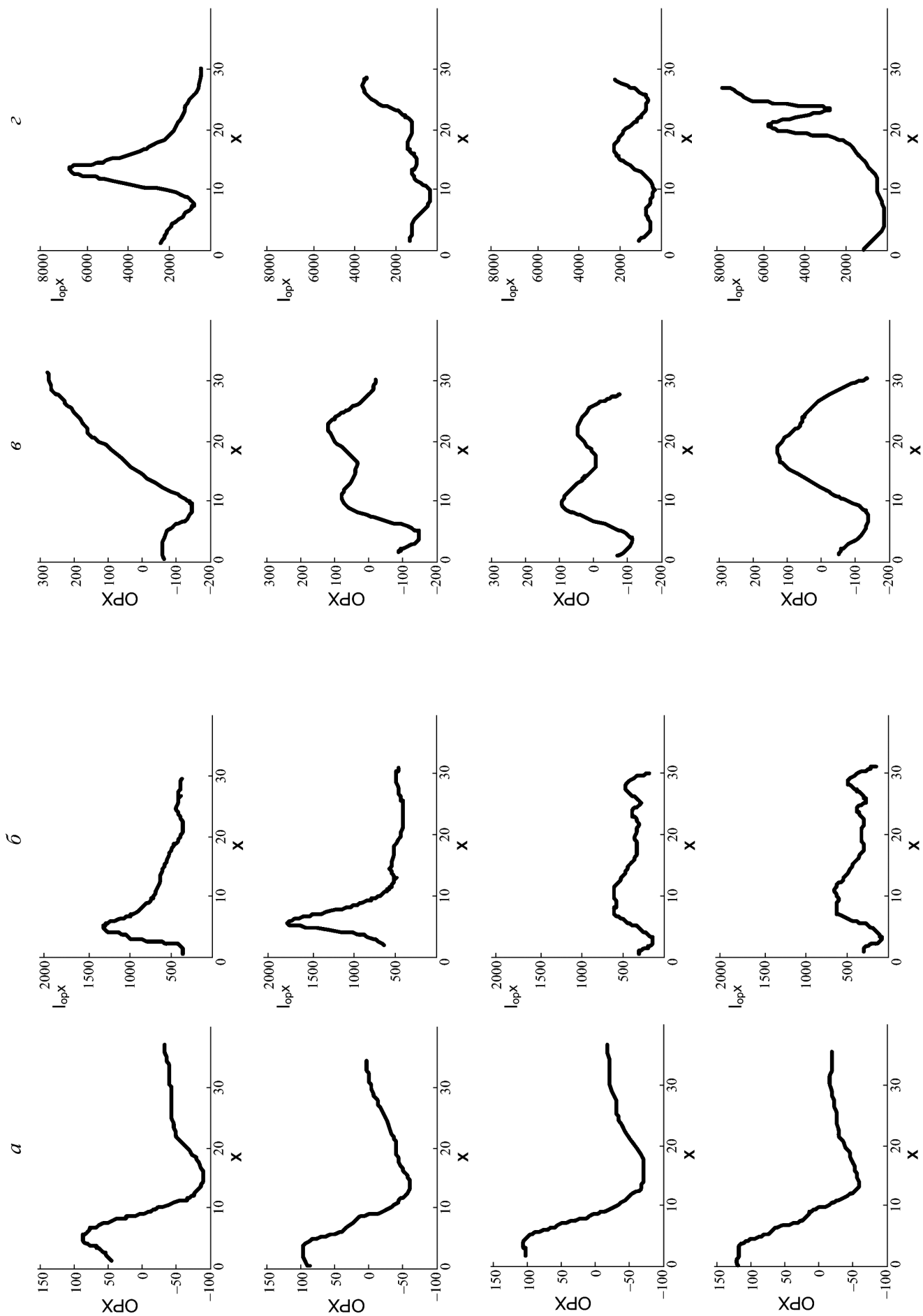
$$\Phi_i = (n_1^i z_1^i + n_2^i z_2^i + \dots + n_n^i z_n^i) - n_1 z. \quad (3)$$

Результаты и обсуждение

Полученное с помощью ЛИМ изображение нейрона представляет собой фазовый портрет или профиль объекта (рис. 1, а). Исходя из полученных значений фазовой высоты объекта формируется трехмерное изображение клетки (рис. 1, б). Установлено, что фазовое изображение клетки характеризуется рельефом, связанным с неравномерным распределением структур с различным коэффициентом преломления в цитоплазме клетки (лизосомы, митохондрии, ядро и т.д.) или остатками тканей и других клеток на поверхности клеточной мембраны (для сохранения нативного состояния плазматической мембраны при выделении клеток проназу не использовали).

При анализе изображения выбирали участок сканирования клетки (скан-линия 3,75 мкм), включающий в себя примембранную цитоплазму, участок мембраны и участок экстраклеточной среды, прилегающий к мембране (рис. 1, а—г). Фазовое изображение нейрона получали каждые 64—65 с (рис. 2, а). Установлено, что максимальное значение фазовой высоты наблюдается именно в примембранной области нейрона (рис. 1, г). Фазовое изображение нейрона меняется во времени и зависит от состояния клетки (рис. 3, в). Изменения фазовой высоты в области цитоплазмы нейрона связаны с изменениями

Рис. 1. Фазовые изображения, получаемые при работе методом ЛИМ. а — фазовый портрет участка клетки (справа) и линия по которой проводилось сканирование; б — трехмерное восстановление профиля клетки; в — увеличенное фазовое изображение линии сканирования; г — фазовый профиль по линии сканирования; д — ($I_{\text{орх}}$) пунктирными линиями обозначен участок на фазовом профиле клетки, соответствующий наиболее интенсивным изменениям профиля; е — сканирование выбранного участка во времени, пунктирными линиями обозначен участок на фазовом профиле клетки, соответствующий наиболее интенсивным изменениям профиля; ж — Фурье-анализ в выбранных точках, выделяются характерные частоты флуктуаций фазового профиля; з — распределение частот по всей линии сканирования



ми коэффициента преломления отдельных компонентов цитоплазмы клетки и, вероятно, зависят от мембранного потенциала, структуры примембранного слоя, цитоскелета, а также движения внутриклеточных везикул.

Установлено, что изменения фазового профиля нейрона не связаны с увеличением или уменьшением объема клетки (рис. 2), так как при этом смещения фазового профиля в экстраклеточную область не наблюдается. Однако при активации АХ-рецепторов (инкубация нейронов в среде с ацетилхолином) наблюдалось смещение фазового профиля в экстраклеточную область (рис. 3), что, по-видимому, свидетельствует об увеличении объема клетки или изменении складчатости рельефа мембраны нейрона.

В процессе анализа фазовых изображений регистрировали участки с максимальными амплитудами изменений ОРХ ($I_{орх}$, рис. 2 и 3). Установлено, что кинетика изменения $I_{орх}$ может быть разной (т.е. максимум $I_{орх}$ может смещаться вдоль сечения клетки, при этом может происходить уширение кривой $I_{орх}$ и появление дополнительных максимумов). Эти явления наиболее выражены при действии на клетку ацетилхолина (рис. 1, в—з).

При исследовании характера изменений фазового профиля (рис. 1, е) были выявлены регулярные изменения фазового профиля во времени в каждой точке с максимальным $I_{орх}$. Установлено, что в контроле изменения фазового профиля осуществляются с разной частотой, а при изменении функционального состояния нейрона меняется и частота изменений фазового профиля и $I_{орх}$.

Итак, в примембранной области цитоплазмы (менее 370 нм) нами выявлена локальная область с максимальной динамикой изменений высоты фазового профиля. При действии на клетку ацетилхолина эта область смещалась, что связано с изменениями объема клетки или складчатости мембраны нейрона.

С помощью фурье-анализа было установлено, что регулярные изменения высоты фазового профиля (ФП) связаны только с примембранной областью цитоплазмы, а в цитоплазме отсутствуют. Характерные флуктуации высоты фазового профиля в ПОЦ нейрона варьировали в интервале от 0,3 до 15 Гц. Наиболее вероятными были изменения в области 0,3—3 Гц, 4—6 Гц, 8—10 Гц и 13—15 Гц, а также в диапазоне частот от 0,3 до 3,0 Гц. Отметим, что

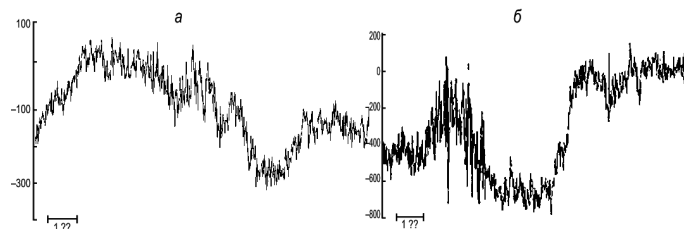


Рис. 3. Изменение высоты фазового профиля во времени в области с наибольшей $I_{орх}$ (в одной точке из линии сканирования) в контроле (а) и после добавления ацетилхолина (б). Видны регулярные изменения высоты фазового профиля. Стрелкой указан момент добавления ацетилхолина (АХ) в систему. Видно, что амплитуда колебаний профиля значительно больше, чем в контроле, особенно большая амплитуда сразу после добавления АХ

область частот, обусловленных “шумом” прибора, находится в диапазоне от 0 до 0,5 Гц.

Обнаруженные изменения высоты фазового профиля нейрона в покое могут быть связаны с регулярными изменениями вязкости самой ПМ или подвижности связанных с ней цитоплазматических структур, а также различных процессов в ПОЦ (циклозис) [11]. При изменениях функционального состояния нейрона (действие АХ) вероятность проявления флуктуаций фазового профиля возрастала в области частот: 0,5—0,7 Гц; 0,9—1,0 Гц; 1,3—1,5 Гц; 1,7—2,1 Гц; 2,3—2,5 Гц и 2,9—3,0 Гц. При этом выявлено снижение вероятности флуктуаций на частотах 0,8; 1,2; 1,6; 2,2; 2,7 Гц.

Для культуры нейронов из спинного мозга эмбрионов мыши были обнаружены следующие характерные частоты флуктуаций фазового профиля нейрона: 0,4—0,8 Гц; 1,4—1,8 Гц, а также 2,4—2,6 Гц (рис. 4). Важно, что частоты 0,4—0,6, а также 1,6 Гц коррелируют с частотой биоэлектрической активности этих нейронов. При изменениях функционального состояния нейронов мыши, вызванной ацетилхолином, увеличилось число регулярных процессов: росла вероятность появления процессов с частотами 0,6 и 1,8 Гц. Снизилась вероятность появления регулярных изменений с частотами 1,6 и 2,4 Гц. Анализ результатов, полученных в ходе исследования изменений, вызванных действием АХ, на двух типах клеток (нейронов позвоночных и беспозвоночных) свидетельствует, что вероятность проявления флуктуаций с частотами 0,6 и 1,8 Гц для обоих типов нейронов возрастает, а процессов с частотой 1,6 Гц,

Рис. 2. Правая часть графика: линия сканирования захватывает участок экстраклеточного пространства. а — изменение фазового профиля Retzius-нейрона по линии сканирования; б — изменение интенсивности изменений ОРХ ($I_{орх}$) при нормальном функционировании нейрона.

Левая часть графика: линия сканирования захватывает мембрану нейрона и участок примембранной цитоплазмы. а — незначительные изменения рельефа фазового профиля без смещения по оси x; б — флуктуации ($I_{орх}$), соответствующие области мембраны и примембранной цитоплазмы; в — изменение фазового профиля Rz-клетки по линии сканирования; г — интенсивности изменений ОРХ ($I_{орх}$) при инкубации с раствором ацетилхолина (мембрана и участок примембранной цитоплазмы — правая часть графика, экстраклеточная среда — левая). Изменения рельефа фазового профиля со смещением вдоль оси x (в), свидетельствуют об изменении объема нейрона. Флуктуации ($I_{орх}$) со сдвигом вдоль оси x (г), свидетельствуют о смещении области максимальных изменений фазового профиля в различные участки клетки

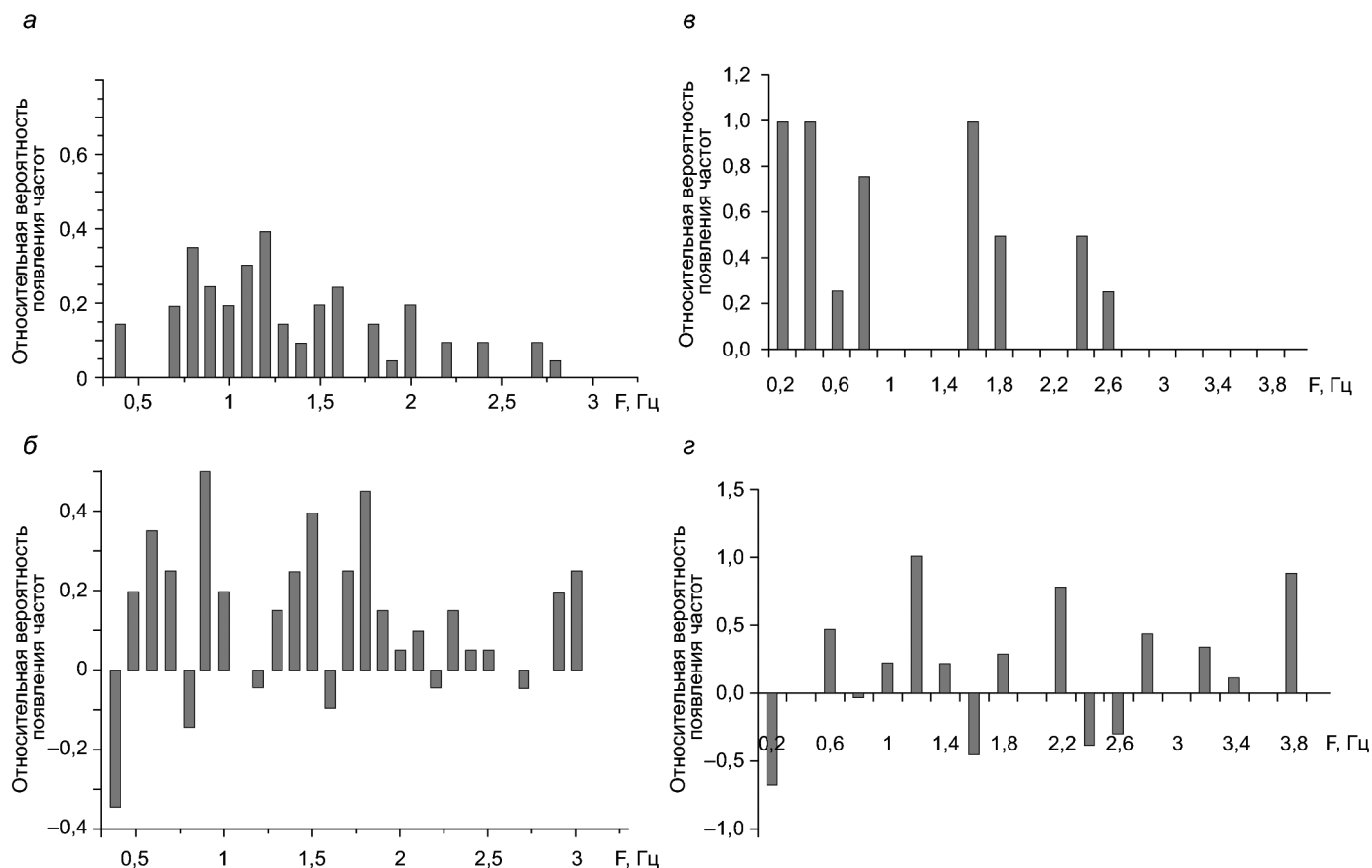


Рис. 4. Характерные частоты изменений высоты фазового профиля мембраны нейрона пиявки (а) и мыши (в) в контроле и при действии ацетилхолина (б, г соответственно) (разностная гистограмма)

характерных для функционирования нейронов в нормальном состоянии, снижается.

Итак, нами разработан подход для оценки состояния ПМ и ПОЦ нейронов позвоночных и беспозвоночных с применением метода лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ). Обнаружены изменения состояния ПМ и ПОЦ нейронов в покое и при модификации функционального состояния клетки с помощью нейромедиаторов (ацетилхолин). Разработана методика оценки интенсивности

этих изменений в разных участках нейрона и проведена оценка состояния ПМ и ПОЦ нейронов во времени. Обнаружены регулярные процессы ПМ и ПОЦ, частота которых зависит от функционального состояния нейрона. Вероятно, эти флуктуации обусловлены изменениями рельефа мембраны при перестройке примембранного цитоскелета и движении внутриклеточных везикул в примембранной области цитоплазмы нейрона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Salanki J. Neuro biology of anvertebrates. Budapest, 1973. P. 252.
2. Monnier A.M.S.R. Soc. Science Biol. Ses. Fial. 1933. Vol. 114. P. 1295—1297.
3. De Robertis E. Ultrastructure and cytochemistry of the synaptic region // Science. 1967. Vol. 156. N 3777. P. 907—914.
4. Ревин В.В., Максимов Г.В., Раденович Ч.Н. Физиология и биофизика мембранных процессов. Саранск: Мордовский ГУ, 1995. 96 с.
5. Chatterjee S, Brindikova T.A, Maksimov G.V, Revn V.V. Investigation of the role of acetylcholine in regulation of axon and Schwann cell interaction during nerve excitation // Eur. Biophys. J. 2000. Vol. 29. N 4—5. P. 353.
6. Naciff J.M., Behbehani M.M., Kaetzel M.A., Dedman J.R. Annexin VI modulates Ca^{2+} and K^{+} conductances of spinal cord and dorsal root ganglion neurons // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1996. Vol. 271. P. 2004—2015.
7. Tychinsky V.P., Yagudzinsky L.S., Leterrier J.-F., Odenso-Leterrier M., Weiss D.G. Real-time measurements of mitochondrial activity using the dynamic phase microscope method // Eur. J. Cell Biol. 1999. Vol. 58. N 3. P. 107—116.
8. Тычинский В.П., Куфаль Г.Э., Одинцов А.А., Вышинская Т.В. Измерения субмикронных структур на лазерном фазовом микроскопе "Эйрискан" // Квантовая электроника. 1997. Т. 27. С. 8.
9. Bennet A.H., Osterberg H., Jupnik H., Richards O.W. Phase microscopy. Principles and applications. N.Y.: John Wiley and Sons, Inc., 1951. 320 p.

10. Вишняков Г.Н., Левин Г.Г. Томографический микроскоп Линника для исследования оптически прозрачных объектов // Измерительная техника. 1998. № 10. С. 18—22.

11. Юсипович А.И., Новиков С.М., Казакова Т.А., Ерохова Л.А., Бразе Н.А., Лазарев Г.Л., Максимов Г.В. Особенности исследования изолированного нейрона методом лазерной интерференционной микроскопии // Квант. электроника. 2006. № 36. С. 874—878.

12. Камия Н. Движение протоплазмы. М.: Иностранная литература, 1962. 676 с.

13. Brazhe A.R., Brazhe N.A., Rodionova N.N., Yusipovich A.I., Ignatyev P.S., Maksimov G.V., Mosekilde E., Sosnovtseva O.V. Non-invasive study of nerve fibres using laser interference microscopy // Philos. Transact. Math. Phys. Eng. Sci. 2008. Vol. 366. N 1880. P. 3463—3481.

14. Brazhe A.R., Brazhe N.A., Maksimov G.V., Ignatyev P.S., Rubin A.B., Mosekilde E., Sosnovtseva O.V. Phase-modulation laser interference microscopy: an advance in cell imaging and dynamics study // J. Biomed. Opt. 2008. Vol. 13. N 3. P. 034004.

15. Brazhe N.A., Brazhe A.R., Pavlov A.N., Erokhova L.A., Yusipovich A.I., Maksimov G.V., Mosekilde E., Sosnovtseva O.V. Unraveling cell processes: interference imaging interwoven with data analysis // J. Biol. Phys. 2006. Vol. 32. N 3—4. P. 191—208.

16. Chizh B.A., Headley P.M., Paton J.F. Coupling of sympathetic and somatic motor outflows from the spinal cord in a perfused preparation of adult mouse in vitro // J. Physiol. 1998. Vol. 508. N 3. P. 907—918.

Поступила в редакцию
21.02.13

USING THE DYNAMIC PHASE MICROSCOPY FOR NEURON CYTOPLASM STUDIES

T.A. Kazakova, S.M. Novikov, G.G. Levin, G.V. Maksimov

Using laser interference microscopy (LIM) an approach to study the state of the plasma membrane (PM) and cytoplasmic-membrane region neuron (vertebrates and invertebrates) was developed. The changes of the PM and neurons cytoplasm state at rest and during the modification of the functioning (a neurotransmitter, acetylcholine) was studied. The method for evaluation of the kinetics of changes in PM and neurons cytoplasm in different parts of the cell was elaborate. Regular PM and neurons cytoplasm processes, the frequency of which depends on the functional state of the neurons was found. It was suggested that the fluctuations depend on the PM relief changes, the restructuring of cytoskeleton-membrane and movement of intracellular vesicles in neurons cytoplasm.

Key words: *laser interference microscopy, neuron, membrane potentiation, acetylcholine.*

Сведения об авторах

Казакова Татьяна Александровна — инженер кафедры биофизики биологического факультета МГУ. E-mail: brindikova@gmail.com

Новиков Сергей Михайлович — науч. сотр. центра совместных исследований Технологического парка де Сан-Себастьян.

Левин Геннадий Генрихович — докт. физ.-хим. наук, проф. НИИ ОФИ.

Максимов Георгий Владимирович — докт. биол. наук, проф. кафедры биофизики биологического факультета МГУ, зав. кафедрой биологического факультета МГК имени Огарева (Саранск). E-mail: gmaximov@mail.ru