

Особенности исследования изолированного нейрона методом лазерной интерференционной микроскопии

А.И.Юсипович, С.М.Новиков, Т.А.Казакова, Л.А.Ерохова,
Н.А.Браже, Г.Л.Лазарев, Г.В.Максимов

*Обсуждаются актуальные аспекты использования при исследовании нервных клеток нового метода – лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ). На примере изолированных нейронов прудовика *Lymnaea stagnalis* показаны особенности отображения нейронов при помощи метода ЛИМ. Проведен сравнительный анализ изображений клетки и субклеточных структур нейрона с помощью интерференционной микроскопии, обычной микроскопии в проходящем свете и конфокальной микроскопии. Обсуждаются различные аспекты применения ЛИМ для изучения латеральных размеров и внутренней структуры цитоплазмы и органелл нейрона в цитологии и клеточной физиологии.*

Ключевые слова: лазерная интерференционная микроскопия, нейрон, цитоплазма.

1. Введение

Современная лазерная интерферометрия широко используется для исследования динамики формы и клеточной структуры биологических объектов [1–7]. Известно, что в технике она применяется для определения структуры рельефа поверхности материала, позволяя исследовать индивидуальную морфологию рельефа при высоком уровне разрешения [8, 9]. Возможность получения изображений с помощью разработанных на основе профилометров биологических микроскопов, в которых источником света является маломощное лазерное излучение, основана на изменении оптической плотности биологического объекта; величину этого изменения можно определять количественно [1–3, 5–7, 10–12]. В настоящее время лазерная интерференционная микроскопия (ЛИМ) применяется в биологии для оценки изменений как отдельной клетки (изменения ее объема и формы), так и субклеточных органелл (изменение объема, формы и движение субклеточных органелл, актомиозиновых комплексов цитоплазмы) [1, 3, 5–7, 10–12]. Однако возможности этого метода явно не реализованы при исследовании функционирующих нервных клеток. Специфика данного объекта заключается в исключительной зависимости функционального состояния и клеточной динамики от метода исследования. Известны многочисленные артефакты, инициируемые в клетках при использовании зондовой флуоресцентной и конфокальной микроскопии, а также микроэлектродной техники. Ранее с помощью ЛИМ нами были исследованы динамические изменения оптической плотности плазматической мембраны мие-

линового нервного волокна при генерации и ритмическом возбуждении, а также изолированного нейрона при действии нейротрансмиттеров [1, 2, 4, 7, 10, 11].

В настоящей работе проведен детальный анализ возможностей использования ЛИМ для исследования клеточной динамики функционирующего нейрона и получения «фазового» изображения целой клетки и ее субклеточной структуры (цитоплазматические гранулы).

2. Лазерная интерференционная микроскопия

Известно, что с помощью ЛИМ исследуют распределение изменения фазы оптической плотности объекта. Принцип работы ЛИМ основан на измерении локальных фаз отраженной объектом световой волны [13]. В результате наложения отраженной волны и волны от опорного зеркала получают интерференционную картину объекта. Далее осуществляется нормировка сигнала по длине волны и, таким образом, определяется разность оптического пути двух волн или фазовая высота (толщина) Φ объекта в данной точке:

$$\Phi = \frac{\varphi_0 - \varphi_{\text{obj}}}{2\pi} \frac{\lambda}{2} - \Phi_0, \quad (1)$$

где φ_0 – начальная фаза (рад); φ_{obj} – сдвиг фазы объектом (рад); λ – длина волны излучения (нм); Φ_0 – постоянный сдвиг, определяемый выбором начальной точки отсчета фазы (нм).

Таким образом, фазовый портрет клетки представляет собой распределение фазового сдвига в различных областях объекта; полученные значения фазового сдвига используются для построения объемного (трехмерного) изображения клетки.

В ходе исследования биологические объекты (изолированные нервные клетки) размещались на зеркальной подложке, от которой отражался проходящий через клетку свет. В результате фиксировался двойной сдвиг фазы луча когерентного источника света в каждой точке объекта, а с помощью дополнительной волны от того же источника формировалось интерференционное изображение клетки. Иными словами, с помощью ЛИМ реги-

А.И.Юсипович, Т.А.Казакова, Л.А.Ерохова, Н.А.Браже, Г.В.Максимов. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, биологический факультет, Россия, 119992 Москва, Воробьевы горы; e-mail: maxim@biophys.msu.ru
С.М.Новиков. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119992 Москва, Воробьевы горы; e-mail: serj@tls.msk.ru
Г.Л.Лазарев. ООО «Лаборатории "Амфора"», Россия, 123557 Москва, Пресненский вал, 176, офис 701; e-mail: grisha@amphoralabs.ru

стрировалось отражение от различных участков зеркальной подложки, на которой был локализован полупрозрачный биологический объект. Распределение оптической плотности биологического объекта (распределение фазы отраженной от объекта волны, «фазовая высота») находится по формуле

$$\Phi(x, y) = \int_0^{z_{\max}} [n(x, y, z) - n_1] dz - \Phi_0, \quad (2)$$

где n_1 – показатель преломления буферного раствора, величина которого постоянна; $n(x, y, z)$ – показатель преломления в точке клетки с координатами x, y и высотой z ; z_{\max} – верхний предел интегрирования.

Очевидно, что в суммарное фазовое изображение целой клетки (площадь клетки, умноженная на фазовую высоту объекта) вносят вклад изменения как объема и формы клетки, так и показателя преломления плазматической мембраны, субклеточных структур и цитоплазмы. Следовательно, фазовая высота в данной точке представляет собой сумму высот z_i различных оптических сред в данной точке, умноженных на соответствующие коэффициенты преломления n_i^m , минус соответствующее произведение коэффициента преломления и высоты буферного раствора:

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

Очевидно, что соотношение оптических сред с различными коэффициентами преломления (плазматическая мембрана, молекулярные комплексы цитоплазмы, ядро, митохондрии, хлоропласт и т. д.) в каждой точке клетки различно. При этом суммарное изменение оптической плотности в точке не зависит от того, в какой последовательности луч проходит через различные среды. Следовательно, даже зная величину коэффициента преломления света для каждой субклеточной структуры, достаточно сложно в общем случае оценить истинную высоту объекта в данной точке по ее фазовой высоте. Таким образом, поскольку термин «фазовая высота», принятый при описании изменения оптической плотности биологических объектов [1, 2, 4–7, 10–12, 14], часто не отражает реальной ситуации и может быть использован только для оценки данного параметра в каждой точке биологического объекта, правильнее говорить о *толщине* объекта в каждой точке. Недостатком ЛИМ при исследовании биологических объектов является отсутствие возможности реконструкции их трехмерного рельефа; при этом можно регистрировать количественное изменение оптической плотности, что в случае однородных объектов с известным показателем преломления, например эритроцитов, позволяет оценивать их объем.

Биологические объекты – это малые бесцветные полупрозрачные мало контрастные образования. Для получения информации об их строении или функционировании при помощи оптических микроскопов приходится прибегать к дополнительному контрастированию. Как правило, это приводит к модификации объектов, например в результате их окрашивания различными красителями. Данные вещества способны не только повышать разрешение метода, но также оказывать дополнительное воздействие на функциональное состояние биологического объекта (например, флуоресцентные зонды стимулируют фотозависимое разрушение клетки). Применение фа-

зово-контрастных методов значительно улучшает контрастирование биологических клеток без дополнительной модификации образца, что позволяет получать более корректную информацию о процессах, проходящих в клетках. Метод ЛИМ, помимо повышения контраста образцов, дает возможность количественно оценить изменение оптической плотности, а следовательно, получить не только качественную, но и количественную информацию об изменении состояния клеток.

Очевидно, что разрешающая способность метода ЛИМ также в значительной степени определяет круг объектов биологического исследования. В настоящее время с помощью его различных модификаций с высокой точностью разрешены исследуют профили фаз различных небологических объектов. Показано, что для однородных, хорошо отражающих свет объектов достигаемые разрешения составляют менее 0.5 нм по вертикали и 10–100 нм по горизонтали, т. е. значительно превышают классический предел разрешения для световых микроскопов [8, 9, 15]. Однако из-за низкой отражающей способности образца способность луча отражаться от поверхности значительно ухудшается, что в свою очередь приводит к ухудшению разрешающей способности прибора, которая начинает зависеть от свойств самого объекта. Тем не менее можно утверждать, что разрешающая способность метода ЛИМ при исследовании биологических объектов не хуже, чем у оптических микроскопов, разрешение которых определяется критерием Рэлея [16]:

$$D = \frac{0.61\lambda}{NA}, \quad (4)$$

где D – коэффициент латерального разрешения между двумя точками; λ – длина волны лазера; NA – апертура объектива. Насколько разрешение изображений биологических объектов, получаемых методом ЛИМ, лучше, чем получаемых при помощи традиционных микроскопов, на практике оценить достаточно сложно, поскольку оно зависит от свойств самого объекта и может изменяться в каждом конкретном случае

При исследовании биологических объектов, как правило, используются лазеры с длиной волны $\lambda = 450 - 700$ нм (при этом красные лазеры более распространены из-за способности меньше повреждать клетки; синие и зеленые лазеры обладают более агрессивным воздействием). Итак, если в методе ЛИМ используется источник света с $\lambda = 480$ нм и иммерсионным объективом с апертурой 1.4, то горизонтальное разрешение составляет не более 200 нм. При этом глубина резкости изображения T при использовании метода ЛИМ определяется так же, как и для оптических микроскопов [16]:

$$T = \frac{n\lambda}{(NA)^2}, \quad (5)$$

где n – показатель преломления иммерсии (для сухих объективов $n = 1$).

Таким образом, для ЛИМ с источником когерентного излучения с $\lambda = 480$ нм и апертурой объектива 1.4 глубина резкости составляет около 250 нм. При использовании объектива с большой апертурой повышается горизонтальное разрешение объекта, однако снижается глубина резкости и, следовательно, возможность реализации объемного изображения объекта с относительно

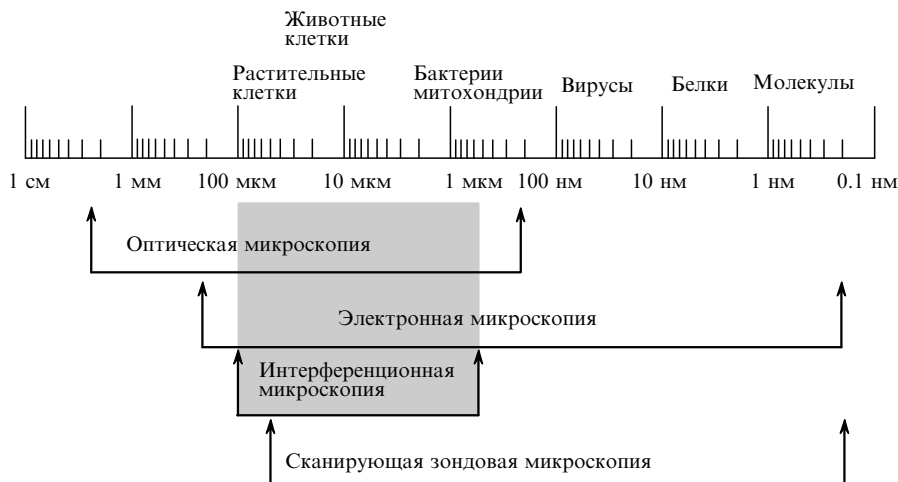


Рис.1. Области применения различных методов микроскопии при исследовании биологических объектов.

большим изменением оптической плотности. В случае, когда фазовая высота объекта превышает глубину резкости, при регистрации изменений фазовой высоты возникают скачки, связанные с переходом на следующую интерференционную полосу. При угле наклона падающего света менее 30° восстановление истинного профиля оптического рельефа, превышающего $\lambda/2$, возможно, но весьма трудоемко и не обеспечивает полного восстановления объемного изображения объекта.

При помощи метода ЛИМ можно исследовать растительные и животные клетки, а также бактерии и некоторые выделенные органеллы, например митохондрии (рис.1). Для исследования этих объектов используют и другие методы микроскопии, однако в сравнении с ними метод ЛИМ обладает следующими достоинствами:

- позволяет исследовать немодифицированные биологические объекты в функциональном состоянии;
- позволяет в нативных, функциональных условиях оценить распределение фазовой высоты (толщины) клетки и ее органелл, получить объемное изображение объекта, а также оценить его реальные размеры;
- разрешение лазерных интерференционных микроскопов лучше, чем традиционных оптических микроскопов;
- изменение оптической плотности объекта в каждой точке характеризует не только наружный рельеф объекта, но также состояние цитоплазмы и ее органелл (см. формулы (2), (3));
- исследование динамики локальных изменений оптической плотности в различных областях клетки позволяет выявить регулярные изменения оптической плотности клеточной структуры и оценить частоту регулярных процессов как во всей клетке, так и на ее отдельных участках (органеллах) [4, 8–10].

3. Экспериментальная часть

В ходе проведенного исследования для получения фазовых изображений нервной клетки использовался микроскоп МИМ-2.1 («Амфора», РФ), представляющий собой модифицированный микроинтерферометр Линника с разделенными оптическими трактами предметного и объектного плеч, в качестве эталонного объекта используется лазерное зеркало. В опорном плече микроскопа, идентичном объектному, находится зеркало, закреплен-

ное на пьезоэлементе и совершающее регулярное движение, обеспечивая модуляции интенсивности интерференционной картины на фотоприемнике. Для каждого элемента фотоприемника методом «временных интервалов» регистрируется фаза интерференционной картины, что повышает точность ее измерений в сравнении с другими методами. Анализ изменения интенсивности интерференционной картины в каждой точке позволяет определить сдвиг фазы, обусловленный вариациями оптических параметров объекта. Результат измерения фиксируется в виде распределения в плоскости изображения сдвигов фазы отраженного от объекта излучения. Объект освещается квазиплоской волной, падающей нормально.

Для анализа изменений фазы применяется программное обеспечение MIMsoft[®], позволяющее оценить фазовый сдвиг с точностью до 0.01 нм. Для снижения воздействия внешних факторов использовалась как механическая система, так и оптический канал компенсации неустойчивости конструкции. Источником излучения в МИМ-2.1 служил термостабилизированный одномодовый высококогерентный (длина когерентности свыше 10 м) лазер с $\lambda = 532$ нм и мощностью 40 мВт (мощность излучения на объекте составляла 2 мВт) [8, 9, 15]. При измерениях использовался объектив $27\times$ с апертурой 0.15. Обработка результатов осуществлялась по формуле (1).

Объектом исследования служили изолированные нейроны прудовика *Lymnaea stagnalis*. Для исследования отбирали клетки диаметром 20–50 мкм. Изолированные нейроны помещали на отражающую подложку (алюминиевое зеркало с покрытием из Al_2O_3), заполненную раствором, содержащим 50 мМ NaCl, 1.5 мМ KCl, 4 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$ и 11 мМ HEPES при pH 7.5). Измеренный с помощью рефрактометра ИРФ-454 БМ показатель преломления раствора на линии D при температуре 18–22 °С составлял 1.335. В ходе исследования полученное методом ЛИМ изображение нейрона сопоставляли с изображением, полученным с помощью конфокального микроскопа Axioscope FS2mot, оснащенного системой LSM 510* (Zeiss, Germany). В этих экспериментах для возбуждения флуоресценции использовали аргоновый лазер с $\lambda = 488$ нм, а флуоресценцию клеточных структур регистрировали при $\lambda = 505$ нм. В работе использовали объектив Achromplan $40\times$ с численной апертурой 0.8 и конфокальной апертурой 108 мкм. Как правило, для получения 2D-изображений нейрона осуществляли

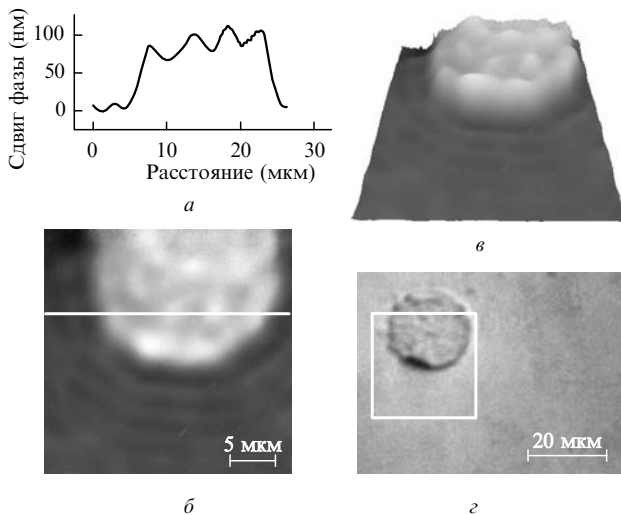


Рис.2. Изолированный нейрон прудовика *Lymnaea stagnalis* – профиль изменения фазовой высоты (а), фазовое изображение нейрона (б), объемное фазовое изображение нейрона (в) и изображение нейрона, полученное с помощью световой микроскопии (г).

четыре повторных сканирования по каждой линии и обрабатывали изображение с помощью программы Zeiss LSM Image Browser.

4. Результаты и обсуждение

На рис.2 приведено типичное фазовое изображение нейрона прудовика. Отметим, что латеральные размеры нейронов, полученные методом ЛИМ и другими методами, как правило, совпадают.

Рассмотрим более подробно особенности отображения биологических объектов при помощи ЛИМ. Как уже упоминалось, фазовая высота представляет собой сумму

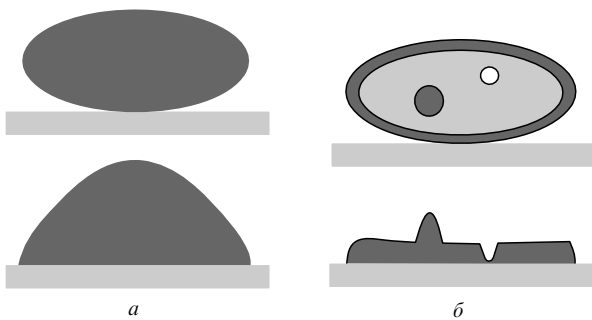


Рис.3. Поперечные сечения реальных биологических объектов сферической формы (вверху) с однородным (а) или неоднородным (б) содержанием, а также их фазовые портреты (внизу).

фазовых высот z различных оптических сред, через которые проходит луч света в данной точке, умноженную на соответствующие коэффициенты преломления n (3). Это обстоятельство значительно затрудняет возможность получения трехмерного рельефа из измеренного изменения оптической плотности (фазовой высоты) объекта. Менее всего различия между истинным трехмерным рельефом и объемным фазовым изображением заметны при отображении однородных клеток сферической или цилиндрической формы (рис.3,а).

При отображении объектов другой формы возникают трудности. Известно, что субклеточные структуры клетки не однородны: цитоплазма имеет меньшую плотность и, следовательно, меньший коэффициент преломления, чем мембрана, ядро или другие органеллы (митохондрии). Кроме того, клеточные вакуоли заполнены жидкостью, коэффициент преломления которой приблизительно равен коэффициенту преломления воды, или более плотными веществами. Очевидно, что все эти особенности сказываются на суммарной оптической плотности в каждой точке объекта. В данном случае на фазовом изображении объекта цитоплазматические структуры с низким коэффициентом преломления будут выглядеть как впадины (например, вакуоли, заполненные жидкостью), а клеточные органеллы, имеющие высокий коэффициент преломления, – как выступы (ядро, митохондрии и т. д.) (рис.3,б). В связи с более низкой плотностью цитоплазмы фазовая высота в любой точке объекта будет меньше, чем на участке клетки, имеющем такую же реальную высоту, но низкий коэффициент преломления.

Для проверки вышесказанного мы сравнивали изображения нейрона, полученные методами обычной световой, лазерной интерференционной и конфокальной микроскопии (рис.4). Известно, что в нейронах прудовика находится множество плотных гранул, содержащих пигмент – каротин [17]. О наличии в гранулах каротина свидетельствуют их спектры поглощения (рис.5). На полученном с помощью световой микроскопии изображении нейрона (рис.4,а) можно выделить более плотные участки, которые соответствуют бугоркам, выявленным при исследовании нейрона с помощью метода ЛИМ (рис.4,б), и флуоресцирующим областям цитоплазмы клетки, выявленным при исследовании с помощью конфокальной микроскопии (рис.4,в). Внутриклеточные гранулы обладают большей оптической плотностью, чем цитоплазма, поэтому фазовое изображение нейрона не является конусообразным (рис.3,а) и имеет увеличенную суммарную фазовую высоту по краям клетки (см. рис.2). Таким образом, проведенное с помощью ЛИМ исследо-

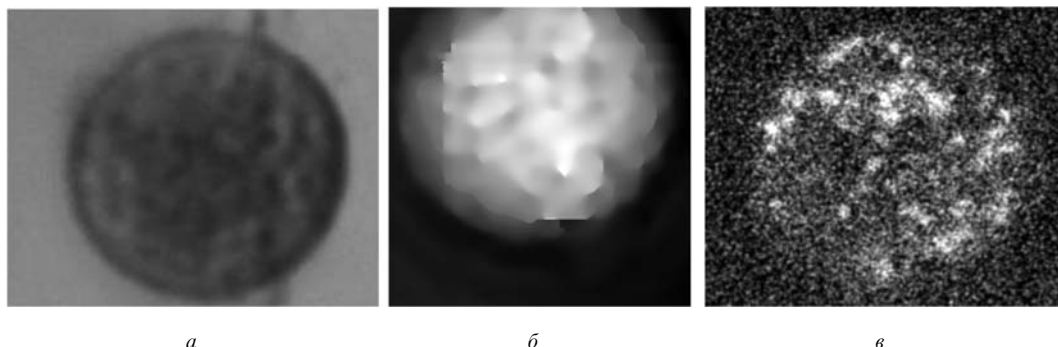


Рис.4. Изображения нейрона, полученные с помощью световой (а), лазерной интерференционной (б) и конфокальной (в) микроскопии.

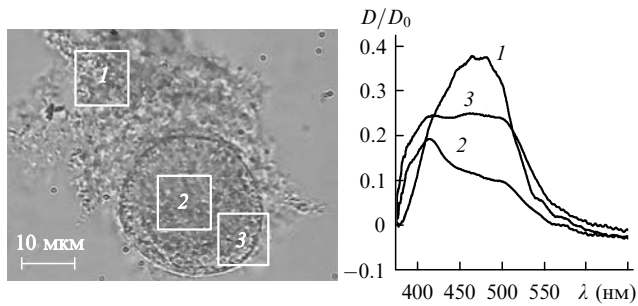


Рис.5. Распределение цитоплазматических гранул, содержащих каротин:

1 – спектры поглощения каротина в гранулах вне клетки; 2 – спектры поглощения компонентов цитоплазмы; 3 – спектры поглощения каротина в гранулах в клетке.

вание изображения нейронов подтвердило предположение о том, что более плотные участки внутри клетки соответствуют гранулам, содержащим пигмент.

5. Заключение

Итак, при использовании лазерной интерференционной микроскопии можно получить изображение нейрона, обладающее по сравнению с изображением, полученным с помощью световой микроскопии, рядом дополнительных характеристик. Можно получить объемное изображение нейронов и распределение субклеточных структур, а также оценить их вертикальные размеры, что недоступно большинству других микроскопических методов. Кроме того, лазерная микроинтерферометрия позволяет исследовать нейрон без дополнительного контрастирования изображения клетки с помощью красителей, а значит, не нарушать координированное функционирование клетки. Сказанное свидетельствует о том, что метод ЛИМ может использоваться для исследования изменений латеральных размеров и объема клетки с од-

народной структурой цитоплазмы и субклеточного рельефа цитоплазмы и органелл клеток с гетерогенной структурой цитоплазмы в условиях функционирования нейрона.

Авторы благодарны ООО «Лаборатории "Амфора"» за предоставление микроскопа МИМ-2.1.

1. Brazhe N.A., Erokhova L.A., Churin A.A., Maksimov G.V. *J. Biological Phys.*, **31**, 533 (2005).
2. Ерохова Л.А., Новиков С.М., Лазарев Г.Л., Казакова Т.А., Орлов Д.А., Индукаев К.В., Максимов Г.В. *Бюл. эксп. биол. и мед.*, **140**, 237 (2005).
3. Левин Г.Г., Булыгин Ф.В., Вишняков Г.Н. *Цитология*, **47**, 348 (2005).
4. Sosnovtseva O.V., Pavlov A.N., Brazhe N.A., Brazhe A.R., Erokhova L.A., Maksimov G.V., Mosekilde E. *Phys. Rev. Lett.*, **94**, 218103 (2005).
5. Тычинский В.П., Вайсс Д., Вышенская Т.В., Ягужинский Л.С., Никандров С.Л. *Биофизика*, **45**, 870 (2000).
6. Tychinsky V., Kretushev A., Vyshenskaja T. *Eur. Biophys. J.*, **33**, 700 (2004).
7. Tychinsky V.P., Kretushev A.V., Vyshenskaya T.V., Tikhonov A.N. *Biochim. Biophys. Acta*, **1708**, 362 (2005).
8. Andreev V., Indukaev K. *J. Russ. Laser Res.*, **26**, 380 (2005).
9. Andreev V., Indukaev K., Ioselev O., Legkii A., Lazarev G., Orlov D. *J. Russ. Laser Res.*, **26**, 394 (2005).
10. Максимов Г.В., Никандров С.Л., Лазарева Е.С., Тычинский В.П., Рубин А.Б. *Бюл. эксп. биол. и мед.*, **131**, 539 (2001).
11. Максимов Г.В., Никандров С.Л., Лазарева Е.С., Тычинский В.П. *Биофизика*, **47**, 345 (2002).
12. Tychinsky V.P., Kretushev A.V., Vyshenskaya T.V., Tikhonov A.N. *Biochim. Biophys. Acta*, **1665**, 57 (2004).
13. Коломыйцев Ю.В. *Интерферометры* (Л.: Машиностроение, 1976).
14. Ukhanov A.A., Tychinskii V.P. *Med. Tekhn.*, **4**, 9 (1996).
15. Andreev V.A., Indukaev K.V. *J. Russ. Laser Res.*, **24**, 220 (2003).
16. Brandon D., Kaplan W.D. *Microstructural Characterization of Materials* (Chichester, West Sussex, UK: John Wiley&Sons LTD, 1999).
17. Ерохова Л.А., Браже Н.А., Максимов Г.В., Рубин А.Б. *Докл. РАН*, **402**, 233 (2005).