

## Визуализация колебательной динамики цитоплазмы в живой клетке методом оптической когерентной доплеровской томографии на примере плазмодия миксомицета *Physarum*

А.В.Быков, А.В.Приезжев, Я.Лаури, Р.Мюллыля

*Впервые методом оптической когерентной доплеровской томографии (ОКДТ) осуществлена визуализация колебательной амебоидной подвижности в тяжях плазмодия миксомицета *Physarum polycephalum* с регистрацией периодических радиальных сокращений тяжа и пространственно-временных распределений скорости потока цитоплазмы внутри него.*

**Ключевые слова:** оптическая когерентная доплеровская томография, цитоплазма, живая клетка, плазмодий.

Оптическая когерентная томография (ОКТ) и ее доплеровский вариант (ОКДТ) в настоящее время стремительно развиваются в плане как расширения функций и улучшения параметров экспериментальных установок, так и расширения области их применения [1]. Возможность визуализации с высокими пространственным и временным разрешениями структуры рассеивающих сред и направленных микропотоков в этих средах позволяет подробно исследовать структуру и функционирование микрососудистого звена системы кровообращения человека и животных, развитие эмбрионов, а также динамику подвижности крупных, сильно рассеивающих свет клеток.

В настоящей работе сообщается о первом применении метода ОКДТ для исследования функционирования сократительной системы плазмодия миксомицета *Physarum*, являющегося единым одноклеточным организмом. Наиболее близкая по тематике из опубликованных работ [2] посвящена визуализации течения цитоплазмы в амбах методом фазовой микроскопии.

Миксомицет *Physarum* в плазмодальной стадии жизненного цикла представляет собой изменяющуюся во времени систему почти цилиндрических трубочек (тяжей), соединяющих фронтальные зоны организма с его основным телом (см. [3]). Автоволновые изменения внутриклеточных градиентов давления вызывают челночные потоки внутренней зольобразной части цитоплазмы

(эндоплазмы) вдоль этих тяжей [4]. Типичный период колебаний у тяжей диаметром несколько сотен микрометров при комнатной температуре составляет около минуты.

Динамика сокращений стенки и направленных потоков эндоплазмы в плазмодии с точки зрения механизмов самоорганизации амебоидной подвижности изучалась многими авторами с использованием различных методов, включая лазерную доплеровскую микроскопию [5] и математическое моделирование [4]. Универсальность амебоидной подвижности состоит в том, что она является основой жизнедеятельности многих видов живых организмов – от амёб и лейкоцитов до фибробластов и раковых клеток.

Плазмодий культивировался по методу Кампа [6] и для проведения измерений высаживался на тонкий прозрачный слой агар-агара в чашке Петри. Измерения проводились на созданной в нашей лаборатории установке ОКДТ [7] (рис. 1), в которой источником излучения служит суперлюминесцентный диод (СЛД) с центральной длиной волны 840 нм, шириной спектра 50 нм и мощностью 6 мВт. Установка построена на основе интерферометра Майкельсона. В отличие от традиционной схемы ОКДТ опорное зеркало является неподвижным. Сканиру-

**А.В.Быков.** Международный учебно-научный лазерный центр МГУ им. М.В.Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; адрес в настоящее время: Optoelectronics and Measurement Techniques Laboratory, University of Oulu, Linnanmaa 90570 Oulu, Finland; e-mail: sasha5000@tut.by

**А.В.Приезжев.** Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, физический факультет, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; Международный учебно-научный лазерный центр МГУ им. М.В.Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; e-mail: avp2@mail.ru, avp2@phys.msu.ru

**J. Lauri, R. Myllylä.** Optoelectronics and Measurement Techniques Laboratory, University of Oulu, Linnanmaa 90570 Oulu, Finland; e-mail: risto.myllyla@ee.oulu.fi

Поступило в редакцию 1 декабря 2008 г., после доработки – 27 марта 2009 г.

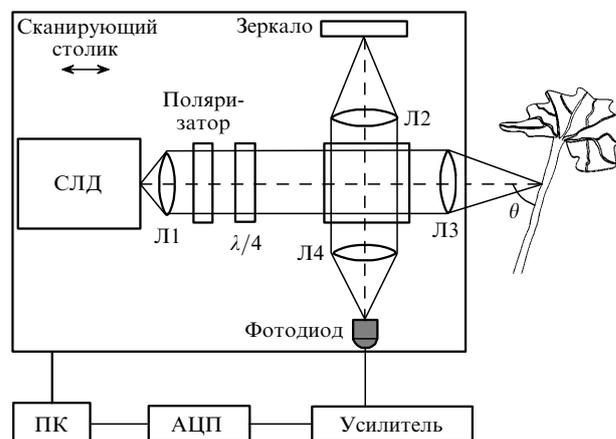


Рис. 1. Схема установки ОКДТ.

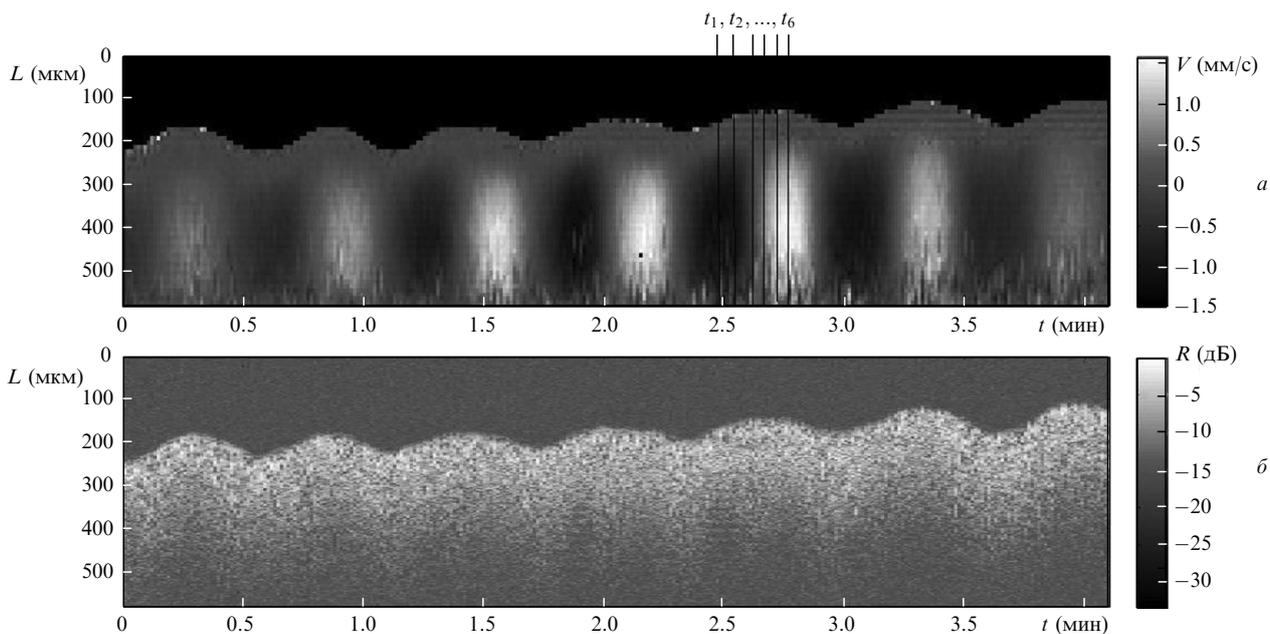


Рис.2. Пространственно-временное распределение скоростей течения потока эндоплазмы в тяже плазмодия миксомицета *Physarum*, зарегистрированное с помощью установки ОКДТ на временном интервале 4.1 мин (на уровне серого, соответствующего отсутствию потока, характерного в том числе для стенок тяжа, хорошо видны пульсации внешней границы стенки тяжа) (а) и временные пульсации внешней границы стенки тяжа, полученные при амплитудной регистрации интерференционного сигнала (б) (цветное изображение см. на сайте <http://www.quantum-electron.ru>).

рование по глубине осуществляется перемещением пьезоэлектрического столика с установленным на нем интерферометром. Скорость движения сканирующего столика составляет 1.6 мм/с, что соответствует несущей доплеровской частоте модуляции 3810 Гц.

При ориентации оси зондирующего пучка под некоторым углом к вектору скорости потока эндоплазмы (в нашем случае  $40^\circ$ ) система позволяет получать распределение доплеровских сдвигов частоты излучения, рассеянного назад по линии зондирования на движущихся в потоке оптических неоднородностях (ядрах, митохондриях и пр.), относительно несущей доплеровской частоты (в нашем случае 3810 Гц), определяемой скоростью сканирования. Пространственное разрешение измерений скорости вдоль линии зондирования определяется длиной когерентности зондирующего излучения (в нашем случае 6 мкм).

На рис.2,а показано полученное распределение скорости течения эндоплазмы в тяже плазмодия толщиной  $\sim 220$  мкм. По оси ординат отложена оптическая глубина  $L$  вдоль линии зондирования, а по оси абсцисс – время  $t$ . Значения скорости в разных точках линии зондирования и в разные моменты времени соответствуют разным уровням серого цвета. В связи с тем, что интерференционный сигнал на несущей частоте модуляции в процессе каждого скана начинает детектироваться от внешней стенки тяжа, радиальные пульсации этой стенки в точке зондирования хорошо отображаются на рисунке. Однако осуществление амплитудной регистрации интерференционного сигнала ОКДТ дополнительно к частотной позволяет повысить чёткость регистрации пульсаций (рис.2,б).

Обращает на себя внимание высокая чёткость визуализации распределения скорости потока и поперек тяжа, и во времени. Полученная картина позволяет реконструировать временную динамику потока как на оси, так и

на различных расстояниях от стенки. Для примера на рис.3 представлена временная зависимость осевой скорости  $V_{\max}$ . Хорошо просматривается низкочастотная модуляция колебаний скорости, которая ранее также была зарегистрирована методом ЛДМ [4]. Эта модуляция отражает распределенный и автоколебательный характер сократительной активности плазмодия [3].

На рис.4 представлены несколько мгновенных радиальных распределений (профилей) скорости потока эндоплазмы, полученных путем реконструкции исходного изображения в сечениях  $t_1 - t_6$  (рис.2,а). Видно, что полученные профили достаточно хорошо аппроксимируются квадратичными парабололами. Это означает, что не-newтоновские свойства эндоплазмы в тяжах такого размера проявляются незначительно.

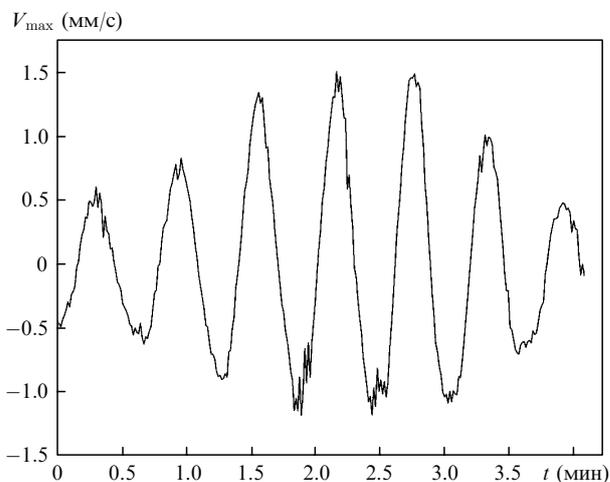


Рис.3. Временная зависимость осевой скорости  $V_{\max}$  с хорошо выраженной низкочастотной модуляцией колебаний скорости, отражающей распределенный и автоколебательный характер сократительной активности плазмодия.

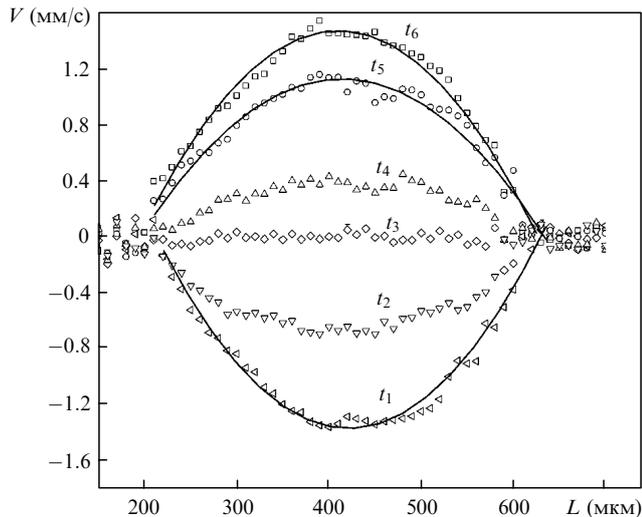


Рис.4. Мгновенные радиальные распределения (профили) скорости потока эндоплазмы в тяжё плазмодия миксомицета *Physarum*, полученные в сечениях  $t_1 - t_6$  (см. рис.2).

Сравнивая информативность данных, полученных методами ОКДТ и ЛДМ, можно сделать заключение о значительном преимуществе первого метода и о его перспективности для дальнейших исследований амебодной подвижности.

Работа выполнена при совместной поддержке РФФИ и Академии Финляндии (грант № 08-02-91760\_АФ), а также GETA Graduate School (Финляндия) и Infotech Oulu (Финляндия). Авторы благодарны Ю.М.Романовскому за полезные обсуждения и С.И. Бейлиной за предоставление склеротий плазмодия и консультации по его культивированию.

1. Vouma В.Е., Tearney G.J. (Eds). *Handbook on Optical Coherence Tomography* (New York, Basel: Marcel Dekker, 2002).
2. Choma М.А., Ellerbee А.К., Yazdanfar S., Izatt J.A. *J. Biomed Opt.*, **11** (2), 024014 (2006).
3. <http://en.wikipedia.org/wiki/Physarum>.
4. Романовский Ю.М., Теплов В.А. *УФН*, **165** (5), 555 (1995).
5. Приезжев А.В., Евдокимов М.В., Романовский Ю.М. *Квантовая электроника*, **8** (12), 2600 (1981).
6. Camp W.G. *Bull. Torrey Bot. Club*, **36**, 205 (1936).
7. Lauri J. et al. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **6863**, 68630F (2008).