

## КЛЕТОЧНАЯ ДИНАМИКА В СВЕТЕ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ: ВЕЙВЛЕТ-АНАЛИЗ

Браже А. Р., Браже Н. А., Сосновцева О. В., Павлов А. Н., Мозекильде Э.,  
Максимов Г. В.

*Методом лазерной интерференционной микроскопии исследовали морфологию и внутриклеточную динамику эритроцитов, нейронов и тучных клеток. Показано, что существуют регулярные изменения оптических свойств клеток, отражающие кооперативные процессы в примембранной и центральной областях клеток. Нами установлено, что характерные частоты изменений показателя преломления отличаются для разных типов клеток и могут служить маркерами специфических клеточных процессов*

**Введение.** Последнее время особое внимание уделяется разработке новых неинвазивных методов исследования, позволяющих изучать клетки без их дополнительной модификации и повреждения целостности мембраны. Для глубокого понимания функционирования клетки и взаимосвязи процессов необходимо одновременно исследовать различные клеточные процессы, протекающие в разных компартментах и обладающие различными временными характеристиками. Большинство клеток прозрачны и в традиционной амплитудной микроскопии необходимо использовать контрастирующие или флуоресцентные зонды. При этом любые зонды модифицируют состояние клетки и влияют на клеточные процессы.

Показатель преломления (ПП) несет в себе дополнительную ценную информацию о клетке. Несмотря на то, что клетки, как правило, не очень эффективно поглощают свет, их органоиды имеют разные показатели преломления, в результате чего лучи света, проходящие через различные клеточные участки, по-разному меняют фазу. Идея об измерении возникающего фазового сдвига лежит в многих типов фазовой микроскопии (Bennet et al., 1951). Основными достоинствами фазовых микроскопий является то, что они позволяют исследовать прозрачные структуры клеток без окрашивания и, при определенных условиях, можно перейти предел разрешения Рэлея, что невозможно в амплитудной микроскопии. Возможность использовать ПП как неинвазивный зонд был впервые предложен авторами (Hill, Keupes, 1949), которые наблюдали изменение в светорассеянии при проведении возбуждения по нерву. Позднее Cohen (Cohen, 1969) обнаружил, что собственные оптические свойства нервных клеток зависят от потока ионов через плазматическую мембрану, а Stepnoski с соавторами (Stepnoski et al., 1991) показал, что интенсивность светорассеяния нейронами зависит от их мембранного потенциала. Сейчас известно, что собственные оптические свойства нейронов и изменения ПП зависят также от структуры цитоскелета, положения и движения органоидов (Haller, 2001).

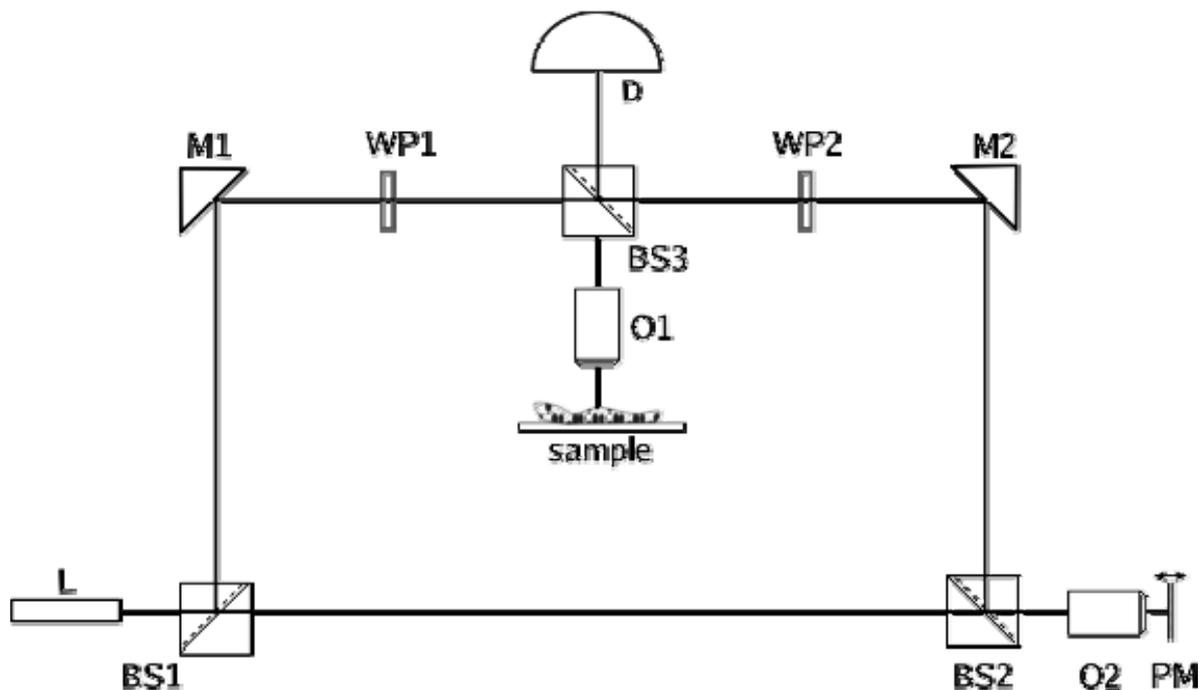
В клетках протекает множество процессов, обладающих различными временными характеристиками и локализованными в разных клеточных компартментах. При этом существует сложная система взаимодействия и взаимной регуляции процессов. Например, изменение мембранного потенциала у нейронов сопровождается изменением

структуры цитоскелета, движением митохондрий и везикул. Очевидно, что взаимодействие процессов приводит к их взаимной модуляции. Таким образом, одновременное исследование нескольких клеточных процессов с последующим анализом их характерных времен и частот может помочь для понимания взаиморегуляции процессов. Наиболее перспективным методом исследования сложных сигналов является вейвлет-анализ, позволяющий установить характерные частоты регулярных процессов и обнаружить и изучить их модуляцию. Ранее мы показали, что нейроны обладают регулярными изменениями ПП в примембранной области с частотами 0,1, 0,2-0,5, 1-4 и 11, 17-20 Гц, которые в центральной области клетки также присутствуют, но менее выражены. Кроме того, мы обнаружили, что амплитуда и частота ритмов 1-4, 11, 17-20 Гц не постоянны, а меняются со временем, что указывает на их модуляцию под действием другим. более низкочастотных процессов (Sosnovtseva et al., 2005). В данной работе мы представляем результаты исследования морфологии и внутриклеточной динамики для нейронов, эритроцитов и тучных клеток.

**Метод лазерной интерференционной микроскопии.** Данная работа была выполнена на модуляционном интерференционном микроскопе МИМ 2.1, разработанным компанией «Лаборатории Амфора» ([www.amphoralabs.ru](http://www.amphoralabs.ru)) и являющемся модифицированным интерферометром Маха-Цандера (рис. 1) (Andreev, 2003; Andreev, 2005). В работе использовали лазер с длиной волны 532 нм и объектив с увеличением  $\times 20$  и числовой апертурой NA 0,15. Принцип работы прибора заключается в следующем: лазерный луч  $L$  делится на опорный (контрольный) и объектный лучи. Опорный луч отражается от контрольного зеркала и идет на детектор. объектный луч проходит через объект, помещенный в специальную камеру с зеркальным дном, отражается от зеркальной подложки, снова проходит через объект и тоже идет на детектор, где интерферирует с первым лучом. За счет разницы в показателях преломления среды и объекта между лучами возникает оптическая разность хода (ОРХ), которая выражается следующим образом:

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

где  $\varphi_0$  – начальная фаза луча,  $\varphi_{obj}$  – фаза луча, прошедшего через объект,  $\lambda$  – длина волны лазера,  $\Phi_0$  – постоянный фазовый сдвиг, который задается в начале эксперимента. В дальнейшем для краткости мы будем называть ОХР фазовой высотой. Значения фазовой высоты в каждой точке объекта формируют фазовое изображение объекта. Для всех клеток фазовое изображение зависит от геометрических размеров клетки и распределения показателя преломления. Если в течение эксперимента геометрические размеры клетки не меняются, то изменения фазовой высоты определяются только изменениями ПП. Таким образом, по фазовому изображению мы можем судить о распределении ПП в клетке, а по изменению фазовой высоты — о динамике ПП и, следовательно, внутриклеточных процессах. Анализ динамики фазовой высоты проводили с использованием метода вейвлет-анализа.



**Рис. 1.** Схема модифицированного интерферометра Маха-Цандера. L — лазер, BS - светоделительные пластины, O — объективы, PM — модуляционная пластина, M — зеркала, D — детектор

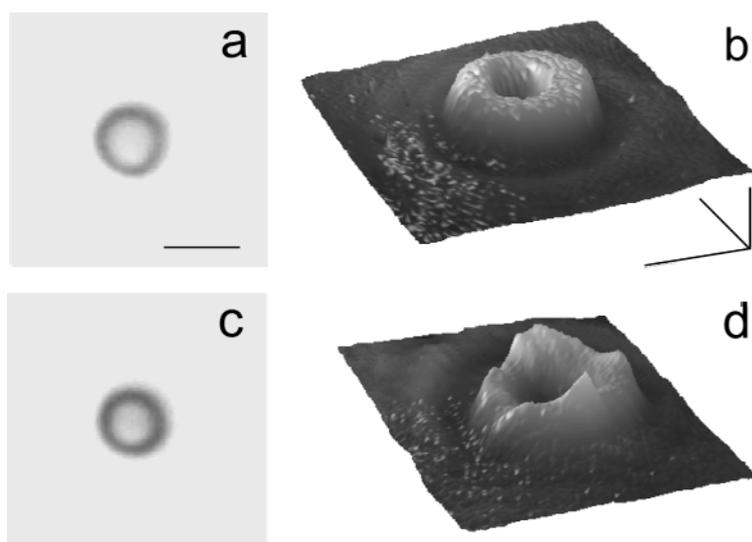
**Метод вейвлет-анализа** в приложении к данным интерференционной микроскопии подробно описан в работах (Sosnovtseva et al., 2005, Brazhe et al., 2006). Преимущества вейвлет-анализа перед Фурье-анализом подробно описаны в работах (Kaiser, 1994; Daubechies, 1992) Нами была разработана программа iWand, с использованием которой осуществляли анализ данных и изучение модуляции выделенных ритмов (<http://iwand.sf.net>). Для анализа динамики ПП на клетке выбирали скан-линию из 8 точек, в каждой из которых последовательно измерялась ОРХ. Интервал между измерениями в одной точке скан-линии составлял 16 мс. Вейвлет-анализ проводили в диапазоне частот 0,08-30 Гц. В данной статье представлены результаты анализа динамики ПП в точках, лежащих не дальше, чем 1 мкм от края клетки.

**Объекты исследования.** В качестве объектов исследования использовали эритроциты здоровых доноров, а также пациентов с недостаточностью кровообращения (НК), класс NYHA II в стадии декомпенсации; нейроны из сегментарных ганглиев медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* и тучные клетки белых беспородных крыс. Нейроны выделяли из ганглиев механическим способом, надрывая соединительнотканную капсулу стеклянной иглой и слегка надавливая сверху на ганглий. Состав физиологических растворов для исследуемых клеток, а также подробная методика выделения клеток описаны в работе (Brazhe et al., 2006). Выделенные клетки помещали в каплю раствора в специальную камеру на зеркальную подложку, камеру герметично закрывали и заполняли соответствующим физиологическим раствором. Время экспериментов не превышало 1 час. Для исследуемых типов клеток не было выявлено повреждающее действие лазера. Мощность лазера, приходящаяся на клетку, составляла не более 1 мВт.

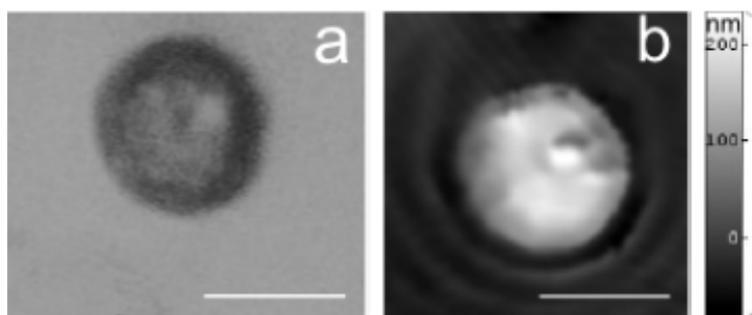
**Фазовые изображения клеток.** На рис. 2 представлены фотографии и фазовые изображения эритроцитов из крови здорового донора (a, b) и пациента с недостаточно-

стью кровообращения. Видно, что эритроцит здорового донора обладает нормальной дискоидной формой, четко просматривающейся на фазовом изображении (рис. 2 а, b). Такая формы связана, во-первых, с дискоидной формой клетки и, во-вторых, с равномерным распределением гемоглобина и, следовательно, показателя преломления. Фазовое изображение эритроцита пациента с НК, напротив, имеет не гладкую тороидную форму, а «шероховатую» с выростами и выпуклостями (рис. 2 с, d). Очень важно то, что очевидная разница между эритроцитами, легко заметная по фазовым изображениям, не видна на обычных фотографиях в отраженном свете.

Мы считаем, что негладкая форма эритроцита пациента с НК связана с изменениями в структуре цитоскелета и перераспределением гемоглобина в цитоплазме и подмембранных областях. Отчасти эти изменения могут быть вызваны патологическими процессами в эритроцитах. Подтверждениями этого могут служить данные о том, что при НК изменяются вязкость плазматической мембраны эритроцитов и свойства гемоглобина (Rodnenkov, 2005). Другое возможное объяснение это то, что мы наблюдаем начальную стадию перехода дискоцита в эхиноцит.



**Рис. 2.** Фотографии эритроцитов в отраженном свете (а, с) и их фазовые изображения (b, d). а, b — эритроцит здорового донора, с, d — эритроцит пациента с НК. Горизонтальная черта на рис. а и черточки, показывающие оси X, Y равны 10 мкм, черточка оси Z равна 100 нм

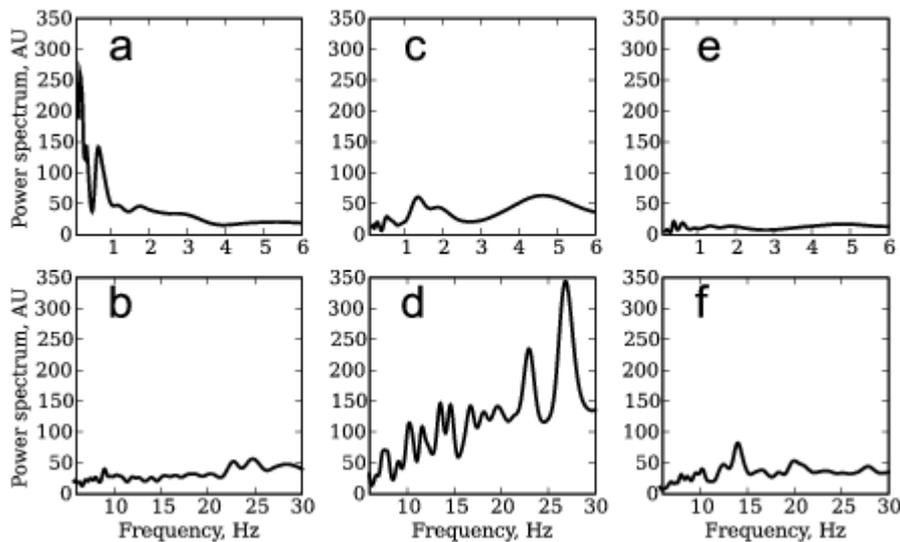


**Рис. 3.** Фотография тучной клетки в отраженном свете (а) и ее фазовое изображение (b). горизонтальные масштабирующие черточки равны 10 мкм. Черно-белая шкала показывает значения фазовой высоты, нм

На рис 3 приведены фотография тучной клетки в отраженном свете (а) и ее фазовое изображение (b). Тучные клетки имеют три основных компартмента: цитоплазму, ядро с несколькими ядрышками, а также крупные везикулы (до 1 мкм в диаметре) с медиаторами (Yen, 1994). Эти структуры только угадываются на фотографии (рис. 3 а), однако они значительно более выражены на фазовом изображении (рис. 3 b). Большое ядро (светло-серое) хорошо отличается от цитоплазмы (темно-серая область), и в области ядра можно видеть маленькие ядрышки (белые и темные «бугорки» на фоне ядра в положении 2:00). Несколько экзоцитозных везикул видны как маленькие «холмики» около ядра.

**Характерные частоты в динамике показателя преломления.** Поскольку разные типы клеток отличаются по свойствам и характерным процессам, то естественно ожидать, что они также будут отличаться и по динамике показателя преломления. Следующие примеры мы приводим, чтобы сравнить динамику ПП у возбудимых клеток (нейронов) и невозбудимых клеток (эритроцитов и тучных клеток). В нейронах наиболее активные процессы протекают на плазматической мембране и в примембранной области, поэтому можно ожидать, что в изменения ПП наибольший вклад будут вносить именно эти процессы. Тучные клетки обладают очень активным экзоцитозом, а эритроциты представляют собой довольно простые клетки, с плотной сеткой подмембранного цитоскелета и компактно упакованным гемоглобином. Исследование динамики ПП в различных областях клеток позволяет получить информацию о пространственно разделенных процессах. Поскольку на краю клеток отношение объемов мембрана/цитоплазма выше, чем в цитоплазматической области клеток, то исследуя динамику ПП в примембранной области, можно говорить о том, что динамика ПП, в основном, определяется примембранными и мембранными процессами.

На рис. 4 а, b приведены спектры мощности изменений ПП в примембранной области нейрона. В низкочастотной области можно видеть несколько четких ритмов в области около 0.1, 0.2-0.4, 1 и 2-3 Гц (рис. 4 а). Структура высокочастотной области менее четкая, однако в ней присутствует группа частот около 10 и 20-25 Гц (рис. 4 b). Мы связываем низкие частоты (до 3 Гц) с процессами, протекающими на плазматической мембране, а высокие частоты — с цитоплазматическими процессами. Наше предположение подтверждается результатами других экспериментов и литературными данными. Прежде всего, низкие частоты значительно более выражены на краю клетки, а высокочастотные ритмы — в центре клетки (Brazhe, 2006). Во-вторых, существуют данные независимых экспериментов о существовании регулярных процессов в нейронах. Так, Szucs с соавторами (Szucs et al., 1999) обнаружили регулярные изменения мембранного потенциала нейронов, зависящие от активности  $Ca^{2+}$ -каналов. Другая группа показала, что изолированные нейроны беспозвоночных обладают спонтанной электрической активностью с частотами 1, 1,5-3 Гц (Schutt, 2000). Наше предположение о происхождении частот в области около 20 Гц согласуется с экспериментальными данными (Landonne, Cohen, 1969), в которых было показано, что движение везикул в нейронах приводит к светорассеянию с частотами в области 8-40 Гц.



**Рис. 4.** Спектры мощности, полученные при помощи вейвлет-преобразования для низкочастотной области (а, с, е) и высокочастотной области (b, d, f) динамики показателя преломления в примембранных областях нейрона (а, b), тучной клетки (с, d) и эритроцита (е, f). По осям ординат — плотность спектральной мощности, уд. ед., по осям абсцисс — частота, Гц

Структура спектров мощности динамики ПП в примембранной области тучных клеток существенно отличается от спектров мощности нейронов (рис. 4 с, d). Ритмы около 1-2 Гц шире, а частоты в области 0,1-0,4 Гц, обладающие наибольшей мощностью у нейронов, у тучных клеток отсутствуют. Кроме того, появляется новый ритм в области 4-6 Гц. Самым главным отличием от нейронов является наличие мощных частот в области 24 и 26 Гц (рис. 4 d). Известно, что для тучных клеток самым активным процессом является экзоцитоз (Dvorak, 1991). В связи с этим, мы предполагаем, что частоты 24-26 Гц связаны с транспортом везикул и их экзоцитозом.

Спектры мощности динамики ПП в примембранной области эритроцитов полностью отличаются от соответствующих спектров мощности нейронов и тучных клеток (рис. 4 е, f). Мы считаем, что отсутствие выраженных ритмов связано с жестким подмембранным цитоскелетом и плотной упаковкой гемоглобина, препятствующим существенным изменениям ПП.

**Заключение.** Мы показали, что метод лазерной интерференционной микроскопии может быть успешно применен для неинвазивных исследований клеток различных типов: изучения морфологии клеток и динамики внутриклеточных процессов. поскольку метод дает информацию о пространственном распределении показателя преломления, то он является очень чувствительным к любым, даже незначительным изменениям компартиментализации клеток. Так, мы показали, что эритроциты пациентов с недостаточностью кровообращения, неотличающиеся от эритроцитов здоровых доноров, по фазовым изображениям показывают существенные различия. Для тучных клеток по фазовым изображениям можно судить о компартиментализации клеток и наличии экзоцитозных везикул. Таким образом, фазовые изображения несут дополнительную важную информацию о состоянии клеток и могут быть использованы для мониторинга клеток и ранней диагностики. Кроме перечисленных преимуществ интерференционной микро-

скопии в визуализации клеток, ее наибольшее достоинство заключается в возможности исследовать динамику кооперативных внутриклеточных процессов, разделенных в пространстве и обладающих различными временными характеристиками. Наш подход показывает, что регистрация динамики ПП в различных участках клетки позволяет получать информацию о процессах, протекающих на мембране и примембранной областях, цитоплазме и ядре клетки (Sosnovtseva et al., 2005; Brazhe et al., 2006). Впервые мы показали, что характерные частоты динамики ПП отличаются для нейронов, эритроцитов и тучных клеток.

Мы считаем, что визуализация клеток и исследование динамики клеточных процессов с использованием интерференционной микроскопии и вейвлет-анализа является перспективным подходом к неинвазивным клеточным исследованиям и изучению взаимосвязи различных клеточных процессов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bennet A. H., Jupnik H., Osterberg H., Richards O. W. New yourk: John Willey & Sons, Inc.; London: Chapman & Hall, Ltd. 1951.
2. Hill, D.K., Keynes, R.D. // Opacity Changes in Stimulated Nerve. Journal of Physiology (London). 1949. V. 108. P. 278-281.
3. Cohen, L. B., Keynes, R. D., Hille, B. // Light scattering and birefringence changes during nerve activity. Nature. 1968. V. 218. P. 438-441.
4. Stepnoski, R. A., LaPorta, A. Raccuia-Behling, F., Blonder, J. E., Slusher, R. E., Kleinfeld, D. // Noninvasive detection of changes in membrane potential in cultured neurons by light scattering. 1991. Proceedings of National Academy of Science USA. V. 88. P. 9382-9386.
5. Haller, M., Mironov, S. L., Richter, D. W. // Intrinsic optic signals in respiratory brain stem regions of mice: neurotransmitters, neuromodulators, and metabolic stress. Journal of Neurophysiology. 2001. V. 86. P. 412-421.
6. Sosnovtseva, O. V., Pavlov, A. N., Brazhe, N. A., Brazhe, A. R., Erokhova, L. A., Maksimov, G. V., Mosekilde, E. // Interference microscopy under double-wavelet analysis: a novel approach to studying cell dynamics. Physical Review Letters. 2005. V. 94. 218103-1-4.
7. Andreev, V. A., Indukaev, K. V. // The problem of subrayleigh resolution in interference microscopy. Journal of Russian Laser Research. 2003. V. 24. P. 220-236.
8. Andreev, V. A., Indukaev, K. V. // Phase modulation microscope MIM-2.1 for measurements of surface microrelief. General principles of design and operation. Journal of Russian Laser Research. 2005. V. 26. P. 380-393.
9. 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. Journal of Biological Physics. 2006. V. 32. P. 191-208.
10. Kaiser, G. A Friendly Guide to Wavelets. Boston: Birkhauser, 1994.
11. Daubechies, I. Ten Lectures on Wavelets. Philadelphia: S.I.A.M, 1992.
12. Rodnenkov, O. V., Luneva, O. G., Ulyanova, N. A., Maksimov, G. V., Rubin, A.B., Orlov, S. N., Chazov, E. I. // Erythrocyte membrane fluidity and haemoglobin haemoporphyrin conformation: features revealed in patients with heart failure. International Journal Pathophysiology. 2005. V. 11. P. 209-213.
13. Yen, A., Mathieu-Costello, O., Gigli, I. & Barrett, K. E. // Inhibition of mast cell mediator secretion induced by protoporphyrin plus long-wave ultraviolet light: a morphometric and ultrastructural analysis. Journal of Allergy Clinical Immunology. 1994. V. 93. P. 909-918.

14. Szucs, A., Molnar, G., S-Rozsa, K. // Periodic and oscillatory firing patterns in identified nerve cells of *Lymnaea stagnalis* L. *Acta Biologica Hungarica*. 1999. V. 50. P. 269-278.
15. Schutt, A., Bullock, T. H., Basar, E. // Odor input generates 1.5 Hz and 3 Hz spectral peaks in the *Helix* pedal ganglion. *Brain Research* .2000. V. 879. P. 73-87.
16. Landowne, D., Cohen, L.B. // Changes in light scattering during synaptic activity in the electric organ of the skate *Raia erinacea*. *The Biological Bulletin*. 1969. V. 137. P. 407-408.
17. Dvorak, A. M. *Basophil and Mast Cell Degranulation and Recovery*. New York, N.Y.: Plenum Press, 1991.

## **CELLULAR DYNAMICS IN THE LIGHT OF INTERFERENCE MICROSCOPY: WAVELET-ANALYSIS**

**Brazhe A. R., Brazhe N. A., Sosnovtseva O. V., Pavlov A. N., Mosekilde E.,  
Maksimov G. V.**

*Laser interference microscopy was used to study morphology and intracellular dynamics of erythrocytes, neurons and mast cells. We have found that changes of the local refractive index (RI) of cells have regular components that relate to the cooperative processes in the cellular submembrane and centre regions. We have shown that characteristic frequencies of RI dynamics differ for various cell types and can be used as markers of specific cellular processes*