

## ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ПАТТЕРНОВ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОН-ГЛИАЛЬНОЙ СЕТИ

© 2012 г. Ю. Н. Захаров\*, канд. физ.-мат. наук; Е. В. Митрошина\*\*, аспирантка;  
М. В. Ведунова\*\*, канд. биол. наук; С. А. Коротченко\*, аспирантка; Я. И. Калинин\*,  
аспирантка; А. В. Потанина\*, аспирантка; И. В. Мухина\*\*, доктор биол. наук

\* Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород

\*\* Нижегородская государственная медицинская академия, г. Нижний Новгород

E-mail: zhrv@rf.unn.ru

Показано наличие спонтанной сетевой активности в нейрон-глиальной сети в виде паттернов, имеющих одинаковый характер осцилляций, и синхронное переключение режимов генерации всех паттернов путем регистрации флуоресценции специфических индикаторов для визуализации динамики кальциевых осцилляций в клеточных культурах и переживающих срезах гиппокампа мозга.

*Ключевые слова:* оптика для медицины и биотехнологии, система визуализации, конфокальная микроскопия, нейрофизиология, нейрон, глия.

Коды OCIS: 170.0170, 170.0110, 170.1790, 170.2520, 170.5810, 170.5380, 170.1530.

Поступила в редакцию 07.04.2011.

Для исследования принципов структурно-функциональной организации клеточных сетей мозга и выявления взаимосвязей между механизмами, ответственными за когнитивные функции нервной системы, необходим многофакторный анализ различных показателей обмена в нервной ткани. Определение особенностей динамики метаболических процессов различных веществ в тканях мозга позволяет провести тонкий анализ активности как нейронов, так и глии. В формирующихся нейронных сетях эти процессы приводят к развитию межнейронных связей и генерации спонтанной сетевой электрической активности, которую можно зарегистрировать с помощью микроэлектродов, вводимых в клетки, или внеклеточным отведением потенциалов, используя мультиэлектродные матрицы [1].

Оптический имиджинг\* является наиболее информативным методом при измерениях пространственного распределения характеристик объекта исследования. Информацию об изменении концентрации конкретных ком-

\* Под этим термином понимается процесс сбора информации об объекте путем наблюдения и регистрации оптических изображений.

понентов биологических тканей может дать характер флуоресценции либо самих исследуемых элементов, если они обладают собственной флуоресценцией, либо связанных с ними специфических красителей. Динамика внутриклеточной концентрации ионов кальция (кальциевые осцилляции), определяемая по изменению интенсивности или спектра флуоресценции введенных в тела или отростки клеток кальциевых индикаторов, служит надежным показателем функциональной активности не только нейронных, но и глиальных сетей.

### Материалы и методы

Предметом изучения являлись нейрон-глиальные сети, образованные в культурах клеток и в переживающих срезах гиппокампа мозга мышей или крыс.

Диссоциированные культуры клеток выделяли из мозга 18-дневных (E18) эмбрионов мышей C57BL/6 и культивировали на мультиэлектродной матрице системы MED64 [1].

Для исследования спонтанной кальциевой активности нейронов и глии в переживающих

срезах гиппокампа крыс использовались поперечные срезы гиппокампа толщиной 350 мкм, которые получали из мозга самцов крыс линии Вистар возрастом 10–14 дней (P10–P14). После приготовления срезы перфузировались в постоянно карбогенизируемом растворе Рингера при температуре 36 °C [2].

Для исследований спонтанных кальциевых осцилляций, отражающих функциональное состояние кальциевого гомеостаза клеток, формирующих *in vitro* либо *in vivo* нейрон-глиальную сеть, использовался лазерный сканирующий микроскоп Zeiss LSM 510 NLO DuoScan. В качестве флуоресцентных зондов были выбраны специфический кальциевый краситель Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB1) [3] с константой диссоциации  $K_d = 170$  нМ, возбуждаемый линией излучения аргонового лазера  $\lambda = 488$  нм и  $\text{Ca}^{2+}$ -нечувствительный краситель Sulforhodamine 101 (SR101), возбуждаемый излучением гелий-неонового лазера  $\lambda = 543$  нм, селективно маркирующий глиальные клетки [4]. Эти длины волн близки к максимумам спектров поглощения соответствующих красителей. Излучение флуоресценции разделялось по каналам регистрации с помощью дихроичных зеркал и светофильтров с полосой пропускания 650–710 нм для выделения флуоресценции SR101 и 500–530 нм – для выделения флуоресценции OGB1.

Регистрировались временные серии изображений поля флуоресценции красителей SR101 как глиального маркера и OGB1 как индикатора свободного кальция. Первичная обработка полученных изображений заключалась в сравнении и наложении изображений разных каналов регистрации для идентификации нейрональных и глиальных клеток и записи функции  $F(t)$  средней интенсивности флуоресценции OGB1 выделенной области поля (совпадающей, как правило, с телом или частью отростка клетки) от времени. Интенсивность флуоресценции показывала зависимость внутриклеточной концентрации ионов кальция от времени, свидетельствующую о метаболической активности клеток, связанных в сети определенной архитектуры. Выделение кальциевых осцилляций, полученных при помощи флуоресцентной конфокальной микроскопии, проводили с помощью оригинального программного пакета “Astroscanner” [5]. Анализировались временные характеристики функции  $F(t)$ . Для определения времени начала ( $t_{\text{start}}$ ) и конца ( $t_{\text{end}}$ ) осцилляции был взят по-

рог производной сигнала по времени в размере средней квадратичной ошибки распределения  $\partial F/\partial t$ . Отмечались также моменты времени достижения максимальной интенсивности флуоресценции ( $t_{\text{max}}$ ) для каждой осцилляции. Учитывались следующие параметры: длительность достижения максимума (длительность переднего фронта осцилляции), общая длительность осцилляции и интервалы между максимумами.

В связи с тем, что индикаторы с высокой афинностью, к которым относится OGB1, могут значительно исказить кинетику быстрых изменений концентрации свободных ионов кальция ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) [6], при интерпретации  $F(t)$  необходимо учитывать конечность скорости ассоциации и диссоциации ионов кальция с молекулами красителя.

Временное разрешение регистрации изменений  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  зависит как от скорости сканирования, так и от афинности индикатора –

$$\delta t = \delta t_{\text{дискр}} + \tau,$$

где  $\delta t_{\text{дискр}}$  – согласно теореме Котельникова определяется частотой дискретизации отсчетов ( $\delta t_{\text{дискр}} = 2/f_{\text{дискр}}$ ), в нашем случае  $f_{\text{дискр}}$  – это частота кадров;

$\tau$  – постоянная времени, характеризующая скорость переходных процессов, которая определяется постоянной времени ассоциации красителя ( $\tau_a$ ) со свободными ионами кальция (OGB1 +  $\text{Ca}^{2+}$ ) или постоянной времени диссоциации ( $\tau_d$ ) красителя со свободными ионами кальция ( $\text{Ca}^{2+}$  – OGB1).

При определении параметров кинетики кальциевых осцилляций учитывали следующие условия:

1) для переднего фронта осцилляции  $\delta t = \tau_d$  ( $\tau \ll \delta t_{\text{дискр}}$ ), ( $\delta t_{\text{дискр}} = 1/4$  при 8 кадр/с (время сканирования одного кадра – 125 мс) и  $\delta t_{\text{дискр}} = 1/2$  при 4 кадр/с);

2) для нисходящего фронта осцилляции  $\delta t = \tau_a$  (при  $K_d = 170$  нМ) скорость диссоциации порядка  $100 \text{ с}^{-1}$ , следовательно, если концентрация индикатора порядка 300 мкМ, то  $\tau_a \approx 1$  с.

Таким образом, выбирая область и размер поля сканирования, исходили из задачи определения конкретных параметров объекта исследования. Шаг сканирования выбирался таким образом, чтобы обеспечить необходимую частоту отсчетов функции  $F(t)$ , поскольку частота кадров записи временной серии изображений микроскопа LSM 510 связана обратным соотношением с количеством точек скани-

Параметры регистрации флуоресценции OGB1 и SR101 с помощью лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM 510 DuoScan в выбранных для иллюстрации первичных культурах и переживающих срезах гиппокампа

Параметр	День развития первичной культуры гиппокампа <i>in vitro</i> (DIV)			Срез гиппокампа, день постнатального развития
	11 DIV	18 DIV	23 DIV	P10
Поле, мкм	286,2×286,2	305,6×305,6	420,8×420,8	420,8×420,8
Кадр, точек	256×256	256×256	128×128	256×256
Частота кадров, 1/с	4	4	8	1
Длительность серии, мин	5	5	5	30
Оптический срез, мкм	2,4	10	6	26

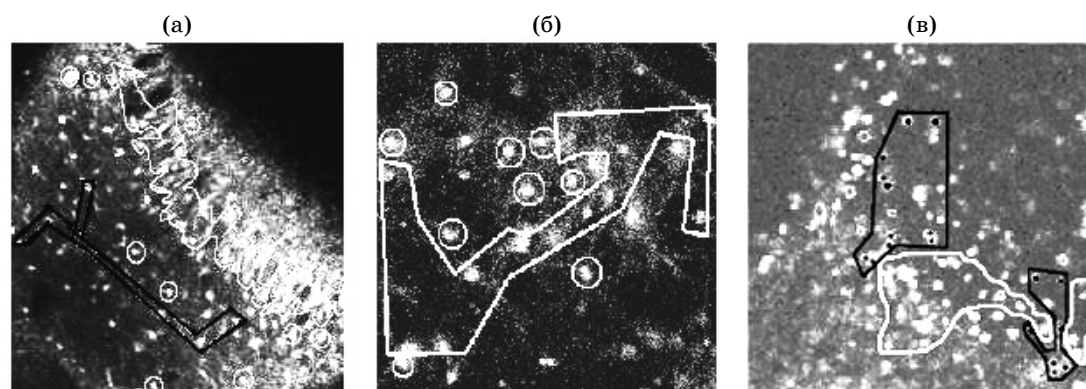
рования в кадре. Например, для обеспечения частоты кадров 4 кадр/с размерность сканирования поля 420 мкм × 420 мкм не должна превышать 256×256, для 8 кадр/с – 128×128.

Размер конфокальной диафрагмы определяет толщину сечения вблизи фокальной плоскости объектива (оптический срез), вносящего основной вклад в регистрируемую интенсивность изображения. Параметры регистрации выбранных для иллюстрации первичных культур и срезов гиппокампа сведены в таблицу.

## Результаты и их обсуждение

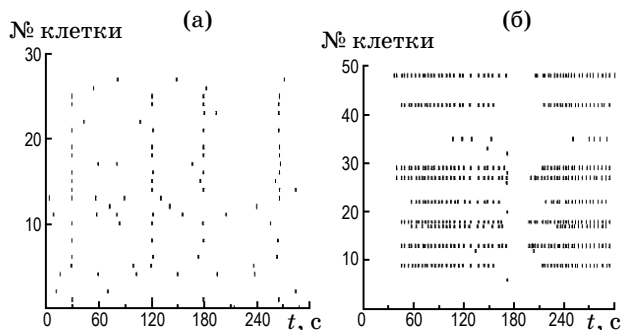
Экспериментальное исследование динамики концентрации ионов кальция (кальциевых

осцилляций) в клеточных ансамблях (функциональный мультиклеточный кальциевый имиджинг) позволило решить одну из ключевых методических задач нейробиологии – исследовать особенности морфофункциональной организации нейронной сети как в культуре, так и срезе гиппокампа, визуализируя активные нейронные сети по параметрам метаболической активности внутриклеточного кальция, очень медленной по сравнению с электрической активностью. В качестве примера на рис. 1 приведены три кадра временной серии динамики флуоресценции канала кальциевого индикатора, на которых выделены поля нейронов в культуре и срезе гиппокампа, функции  $F(t)$  которых подобны друг другу. Характерные

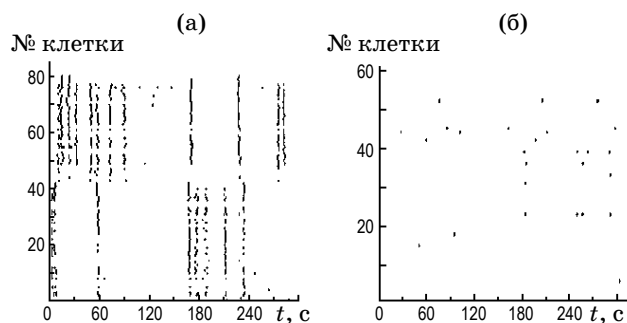


**Рис. 1.** Пример выделения областей клеток с различной кальциевой активностью. а – конфокальное изображение функциональной архитектуры нейронных сетей с маркированием активных клеток в срезе гиппокампа (P10); б – конфокальное изображение функциональной архитектуры нейронных сетей с маркированием активных клеток в первичной культуре гиппокампа (11 DIV); в – конфокальное изображение функциональной архитектуры нейронных сетей с маркированием активных клеток в первичной культуре гиппокампа (23 DIV).

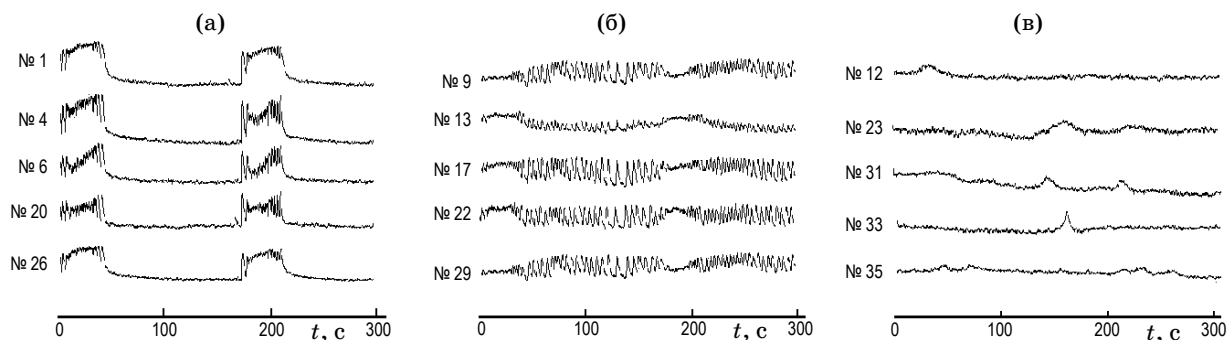
Белыми и черными линиями выделены нейроны, объединенные в различные функциональные сети со своим паттерном активности каждой сети, белыми окружностями – клетки, не входящие в сеть и имеющие иные паттерны.



**Рис. 2.** Растровые диаграммы распределения кальциевых осцилляций во времени различных клеток культуры гиппокампа в процессе развития на 11 DIV (а) и на 23 DIV (б). По оси ординат указан номер рассматриваемой клетки, по оси абсцисс – время в секундах. Моменты возникновения кальциевых осцилляций отмечены штрихами.



**Рис. 3.** Растровые диаграммы распределения кальциевых осцилляций во времени нейронов (а) и астроцитов (б) срезов гиппокампа (P10). По оси ординат указан номер рассматриваемой клетки, по оси абсцисс – время в секундах. Моменты возникновения кальциевых осцилляций отмечены штрихами.

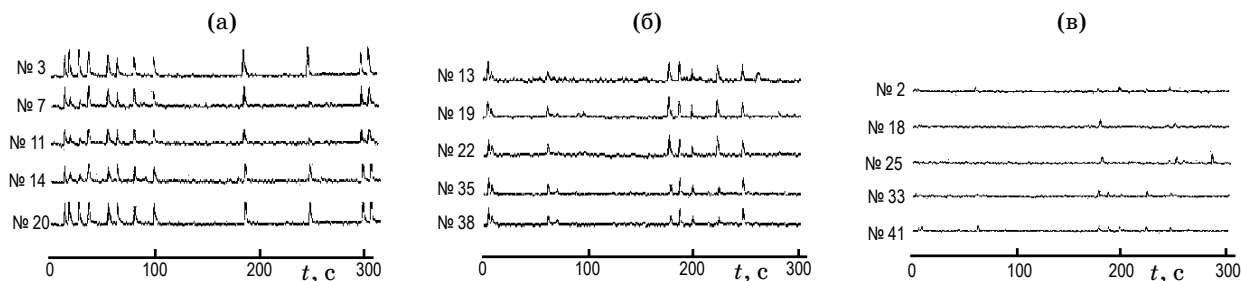


**Рис. 4.** Кинетика спонтанных кальциевых осцилляций нейронов, объединенных в различные функциональные сети (а, б) и астроцитов (в) в первичных культурах гиппокампа крыс (23 DIV). Каждый ряд на графиках представляет сигнал отдельной клетки, ось абсцисс – время.

примеры динамики кальциевой активности нейронных сетей приведены на растровых диаграммах (рис. 2 и 3).

Анализ результатов экспериментов с диссоциированной культурой гиппокампа показал, что медленные одиночные (порядка 5–12 с) и сверхмедленные комплексные (40–44 с) спонтанные кальциевые осцилляции в нейронах и клетках глии (рис. 4) возникали лишь в культурах клеток с развитой системой отростков. На 10–11-й день развития *in vitro* (10DIV–11DIV) в диссоциированной культуре гиппокампа выявлены как отдельные клетки, генерирующие различные паттерны кальциевых осцилляций, так и отдельные области с клетками, имеющими одинаковые паттерны кальциевой активности (рис. 16). На определенной стадии развития

(14–18 DIV) кальциевые осцилляции нейронов синхронизовались между собой и представляли паттерны со сложными картинками кальциевых осцилляций (рис. 1в), что свидетельствовало о вовлечении в функциональные сети большого числа нейронов. В определенные моменты времени различные по активности нейронные сети синхронизовались, взаимодействуя друг с другом и изменяя при этом собственный спонтанный ритм. В отличие от нейронов, как на 11 DIV, так и на 23 DIV в культуре гиппокампа не было выявлено образование спонтанной сетевой активности астроцитов по данным оптической визуализации динамики внутриклеточного кальция.



**Рис. 5.** Кинетика спонтанных кальциевых осцилляций нейронов (а, б) и астроцитов (в) в переживающих срезах гиппокампа крыс (P10). Каждый ряд на графиках представляет сигнал отдельной клетки, ось абсцисс – время.

При анализе результатов экспериментов на переживающих срезах гиппокампа крыс (P10–P14), так же как и в культуре гиппокампа, были выявлены спонтанная синхронная активность нейронов и асинхронная активность клеток глии (рис. 1а, 3, 5).

### Выводы

- Длительные (порядка нескольких секунд) спонтанные кальциевые импульсы в нейронах и клетках глии возникали лишь в культурах клеток с развитой системой отростков, формирующих морфологически развитые сети.

- На определенной стадии развития кальциевые осцилляции нейронов синхронизовались между собой и представляли паттерны с определенными картинами кальциевых осцилляций.

- Нейронную сеть морфофункционально связанных клеток можно выявить путем оптического имиджинга кальциевой активности в диссоциированной культуре и срезе гиппокампа и разделения общей спонтанной активности клеток на области, имеющие аналогичные паттерны синхронно работающих клеток (клеток, проявляющих активность одного определенного вида).

- О наличии общей сети (связи между областями с различными паттернами) свидетельствует одновременность переключения режимов генерации кальциевых импульсов в различных паттернах метаболической активности нейронов.

- Глиальные клетки демонстрируют спонтанные кальциевые осцилляции, не коррелированные во времени между собой и с осцилляциями нейрональной сети.

\* \* \* \* \*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Мухина И.В., Казанцев В.Б., Хаспеков Л.Г., Захаров Ю.Н., Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Коротченко С.А., Корягина Е.А. Мультиэлектродные матрицы – новые возможности в исследовании пластичности нейрональной сети // *Современные технологии в медицине*. 2009. № 1. С. 8–15.
2. Калинцева Я.И., Потанина А.В., Пимашкин А.С., Мухина И.В., Казанцев В.Б., Захаров Ю.Н., Семьянов А.В. Спонтанная и вызванная глутаматом кальциевая астроцитарная активность в переживающих срезах гиппокампа крыс // *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2011. № 2. С. 13–15.
3. Paredes M., Etzler J.C., Watts L.T., Zheng W., Lechleiter J.D. Chemical calcium indicators // *Methods*. 2008. V. 46. P. 143–151.
4. Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Kerr J.N., Heimchen F. Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo // *Nat. methods*. 2004. V. 1. P. 31–37.
5. Пимашкин А.С., Лебединский А.А., Семьянов А.В. Использование математических моделей для определения достоверности различий параметров в динамических биологических системах // *Вестник ННГУ. Биология*. 2010. № 2. С. 51–59.
6. Mulligan S.J., MacViar B.A. Monitoring Intracellular Ca<sup>2+</sup> in Brain Slices with Fluorescent Indicators // *Voltage-Gated Calcium Channels: Eurecan.com and Kluwer Academic/Plenum Publishers*. 2005.