

УДК 535.33+57.086.8:577.175.82

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ СКАНИРУЮЩИЙ МОНИТОРИНГ
КАЛЬЦИЕВОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА
ПРИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ
МОДУЛЯТОРОВ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ**

© 2011 г.

Ю.Н. Захаров, А.В. Ершова, Я.И. Калинцева, И.В. Мухина

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

zhrv@rf.unn.ru

Поступила в редакцию 11.05.2011

Рассматривается задача выяснения механизмов кальциевой активности нейрональных тканей методом флуоресцентного анализа с применением нейротрансмиттеров и блокаторов постсинаптических рецепторов. Оптимизированы параметры записи динамики флуоресценции для адекватной интерпретации результатов изучения активности нейронов при долговременной регистрации сигналов. Показана ведущая роль химических механизмов запуска нейрональных кальциевых каскадов.

Ключевые слова: лазерная сканирующая микроскопия, флуоресцентный анализ, нейрон, нейротрансмиттер, пуринаргические рецепторы.

Введение

Кальциевые сигналы (импульсное превышение концентрации ионов кальция $[Ca^{2+}]_i$ над равновесным значением) наблюдаются как в нейронах, так и в астроцитах. В нейронах они связаны с высвобождением нейротрансмиттеров, синаптической пластичностью и электрической возбудимостью. Астроциты электрически невозбудимы, и кальциевые осцилляции в них возникают в ответ на химические или механические стимулы. Передача кальциевых сигналов в астроцитах может осуществляться путем диффузии инозитолтрифосфата по прямым межклеточным каналам или за счет диффузии по межклеточному пространству молекул аденозинтрифосфата (АТФ) или глутамата [1, 2]. Однако остается неясным вклад в генерацию Ca^{2+} сигналов данных механизмов при различных функциональных состояниях ткани мозга. Для визуализации Ca^{2+} сигналов применяются кальций-зависимые красители [3], молекулы которых заметно изменяют флуоресцентные свойства при связывании с ионами кальция. Это является основанием применения флуоресцентной микроскопии для анализа содержания кальция в клетках, так как по интенсивности флуоресценции можно судить о концентрации Ca^{2+} в исследуемом объеме. Однако наблюдение за флуоресцентными молекулами может усложнять фотообесцвечивание – процесс разрушения флуорофоров при облучении светом, вызываю-

щим флуоресценцию, что приводит со временем к значительной потере интенсивности флуоресценции. Контроль этого явления имеет решающее значение для успешного анализа кальциевой динамики. Целью работы являлось изучение влияния указанных выше нейротрансмиттеров на генерацию кальциевых сигналов нейронов и астроцитов переживающих срезов гиппокампа крыс путем введения различных концентраций АТФ. При этом важное значение имеет также обеспечение условий однозначной связи изменений интенсивности флуоресценции и концентрации Ca^{2+} .

Фотостойкость флуоресцентных индикаторов в условиях функционального мониторинга

С точки зрения нейроимиджинга светостойкость препаратов нейрональных тканей, нагруженных специфическими красителями, может быть охарактеризована относительным снижением интенсивности флуоресценции при постоянной интенсивности возбуждения и концентрации кальция. Это качество определяется как свойствами самого флуорофора, так и окружением и условиями возбуждения.

Обесцвечивание красителей под действием накачки обусловлено, в основном, их реакцией с кислородом. Реакции между флуорофорами и молекулярным кислородом надолго разрушают флуоресценцию и образуют разновидность сво-

бодного радикала синглетного кислорода, который к тому же может химически модифицировать другие молекулы в живых клетках. Степень фотообесцвечивания при этих взаимодействиях – это функция молекулярной концентрации кислорода и минимального расстояния между молекулами флуорофора, кислорода и другими клеточными компонентами. Обогащение кислородом – обязательное условие обеспечения жизнедеятельности биологической ткани. Однако как только количество диффундировавшего через мембрану клетки O_2 превышает усваиваемое в результате биологического окисления, начинается фотообесцвечивание красителя, имеющее необратимый характер. Поэтому пересыщение питательной среды карбогеном способствует быстрому фотообесцвечиванию, тогда как минимально жизненно-необходимая для клеток концентрация O_2 не оказывает сильного деструктивного влияния, если биологическое окисление, катализируемое цитохромоксидазой, идет в клетках быстрее фотоокисления красителя.

В освобожденных от O_2 растворителях также с самого начала освещения идет обесцвечивание красителей в результате их необратимого фотогидрирования растворителем в отсутствие кислорода. Однако содержание в водном растворе красителей соединений, способных дегидрироваться, приостанавливает фотообесцвечивание в присутствии растворенного O_2 . Причина этого своеобразного поведения заключается в том, что первичная элементарная реакция состоит в дегидрировании субстрата фотоактивированными триплетными молекулами красителя D^T с образованием его полугидрированной формы HD' , с которой и реагирует O_2 , регенерируя краситель [4]. В клетках дегидрирование происходит при окислительном дезаминировании α -аминокислот по схеме

$D^T + RCHNH_2^+COO^- \rightarrow HD' + RCNH_2COO^-$,
и далее:

$RCNH_2^+COO^- + H_2O \rightarrow RCOCOO^- + NH_4$
и $HD' + O_2 \rightarrow D + HO_2$.

Поэтому, в принципе, подобрав поток подаваемого на препарат кислорода, можно достичь баланса гидрирования и регенерации красителя. Однако реально дезаминированные аминокислоты могут быть восполнены только с питанием клеток, поэтому такого баланса без избыточного окисления достичь весьма сложно из-за непостоянства концентрации аминокислот во времени.

Фотовыцветание может быть уменьшено ограничением промежутка времени облучения светом и понижением общей энергии возбуждения (интенсивности облучения). Однако эти

методы также уменьшают измеряемый сигнал флуоресценции по отношению к шуму. Также снижение эффекта фотовыцветания можно регулировать повышением концентрации флуорофора, но это увеличивает забуферивание кальциевой динамики красителем, кроме того, слишком высокая концентрация флуорофора, как и слишком низкая, снижает динамический диапазон концентраций визуализируемого Ca^{2+} .

Возможно, лучшей защитой от фотообесцвечивания является применение более устойчивых к разрушению флуорофоров в сочетании с разумным использованием доступных «антиисчезающих» реагентов, которые могут быть добавлены к физиологической среде клеточной культуры. А при имеющихся красителях – ограничение воздействия на флуорохром интенсивного освещения. Снижение суммарной энергии возбуждения светом хотя и не мешает фотообесцвечиванию, но уменьшает его скорость. Число циклов возбуждений и испусканий фотонов N_{em} является постоянной величиной для определенного флуорофора независимо от того, поставляется ли энергия возбуждения дискретными импульсами или путем непрерывного освещения [4]. Для различных красителей оно составляет от 10^4 (например, зеленый флуоресцентный белок GFP) до 10^8 (квантовые точки CdSe/ZnS).

За единицу времени одна молекула поглотит $dN_1 = j_\gamma \sigma$ фотонов, где σ – эффективное сечение поглощения молекулы, j_γ – поток фотонов – число фотонов в единицу времени через единицу площади:

$$j_\gamma = \frac{dN_\gamma}{dt ds} = \frac{I}{hv},$$

где I – интенсивность, hv энергия кванта возбуждающего света. За время t по всему освещаемому объему V все молекулы поглотят число фотонов, равное

$$N_t = \int_V \int_0^t N_1 n(t) ds dz dt = \\ = hv \sigma n(t) \int_0^t P_a n(t) dt,$$

где $n(t)$ – концентрация молекул красителя, P_a – мощность оптического возбуждения, l – толщина прокрашенного слоя. Для стационарного процесса распада красителя вследствие фотообесцвечивания число молекул красителя и их концентрация уменьшается с течением времени как

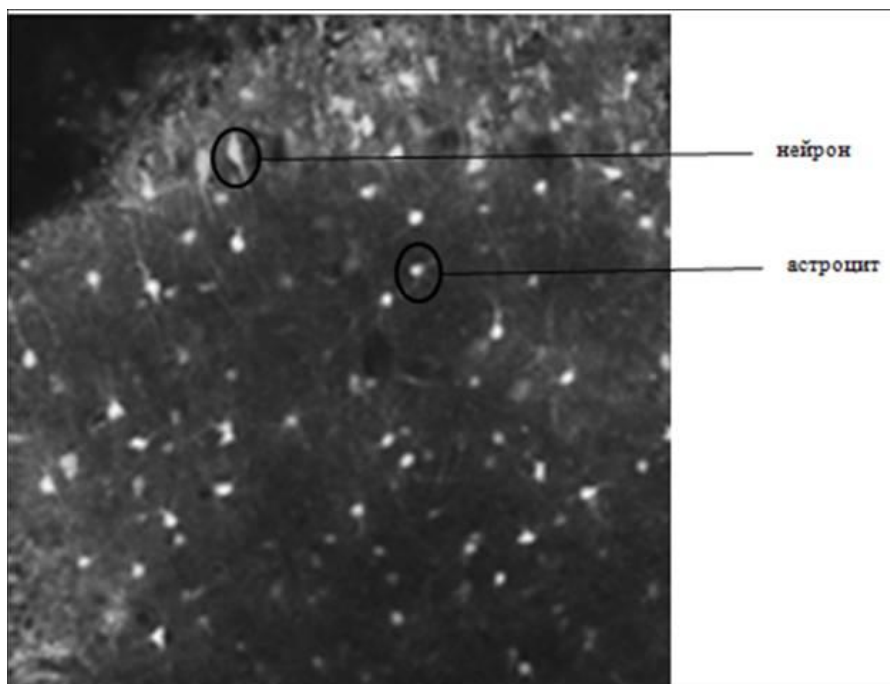


Рис. 1. Функциональная идентификация нейронов (Oregon Green 488 ВАРТА-1 АМ) и астроцитов (двойное окрашивание Oregon Green 488 ВАРТА-1 АМ и Sulforhodamine 101) поля СА3 среза гиппокампа крыс

$$N(t) = N_0 e^{-t/T},$$

$$n(t) = n_0 e^{-t/T}.$$

Тогда число молекул красителя уменьшится на $N_0 - N(t) = N_i/N_{em}$ штук.

Для флуоресцентной микроскопии всё чаще применяются лазерные сканирующие микроскопы. Учитывая в этом случае импульсный характер освещения каждой точки изображения в течение времени τ_{ij} с частотой кадров f_f , $P_a = P\tau_{ij}f_f$ (P – мощность лазерного излучения под объективом микроскопа):

$$\frac{N_0 N_{em}}{n_0} = \frac{P\tau_{ij}f_f}{h\nu} \sigma l \left(-\frac{t_\Sigma}{\ln p_\%} \right),$$

и окончательно:

$$t_\Sigma P\tau_{ij}f_f = -\ln p_\% V N_{em} \frac{h\nu}{l\sigma},$$

где t_Σ – общее время записи, $p_\%$ – доля оставшегося красителя (не разрушенного вследствие фотовыцветания).

Исходя из того, что при прочих равных условиях интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации красителя, и нужно согласовать интенсивность возбуждения, а в случае лазерной сканирующей микроскопии, также длительность и скважность облучения каждого элемента наблюдаемого поля, с общим

необходимым временем записи и незаметным в конкретных условиях (уровень шума регистрации, стохастичные кальциевые колебания) снижением сигнала.

Динамика изменения внутриклеточной концентрации кальция клеток гиппокампа крыс

Методом лазерной сканирующей конфокальной флуоресцентной микроскопии были получены серии изображений поля СА3 гиппокампа крыс возрастом 14 дней для проведения исследований кальциевой активности (рис. 1). Были использованы поперечные срезы гиппокампа толщиной 350 мкм. Сразу после извлечения мозг помещался в постоянно карбогенизируемый раствор нормального Рингера (рН 7.4; осмолярность 295 мОсм), и все дальнейшие операции по его препарированию проводились при охлаждении. Приготовленные срезы были инкубированы с двумя красителями: Ca^{2+} индикатором Oregon Green-488 ВАРТА-1 АМ (OGB-1) [3] и астроцитарным маркером Sulforhodamine 101 (SR101) [5]. Записи Ca^{2+} активности клеток в срезе гиппокампа проводились при температуре перфузии $+23^\circ C$ и $+35^\circ C$. В работе был использован лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Carl Zeiss LSM 510 DuoScan. Записи динамики флуоресценции

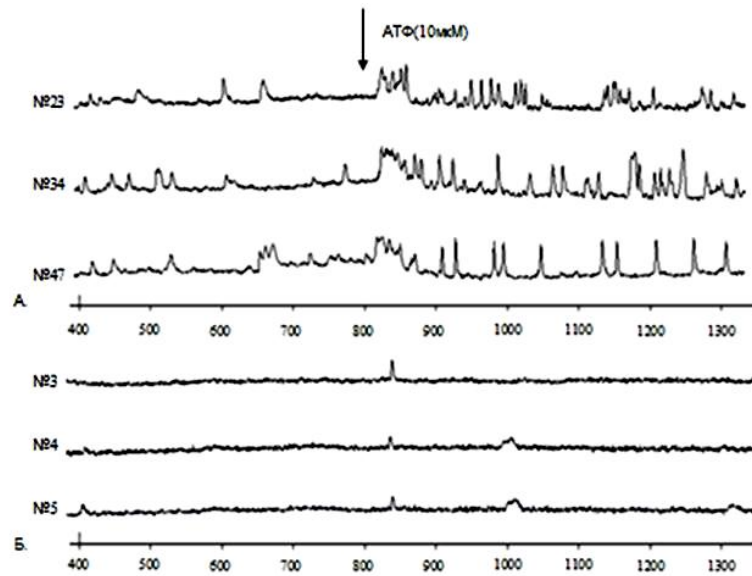


Рис. 2. Запись кальциевых сигналов нейронов (А) и астроцитов (Б) в срезах гиппокампа крыс. По оси ординат указана интенсивность флуоресценции, по оси абсцисс – время (с)

велись в режиме полного кадра (поле зрения 420x420 мкм), с цифровым разрешением 256x256 пикселей и частотой кадров 1 Гц. Флуоресценция индикаторов регистрировалась в диапазонах 500–530 нм (OGB-1) и 650–710 нм (SR101). Интенсивность флуоресценции показывала зависимость внутриклеточной концентрации ионов кальция от времени, свидетельствующую о метаболической активности клеток. Соблюдение условий отсутствия фотообесцвечивания красителя позволило измерять параметры и сравнивать характер осцилляций на протяжении длительного времени (порядка часа для выбранного поля зрения). Было показано, что при комнатной температуре частота спонтанных кальциевых осцилляций в срезе гиппокампа составляла 0.003 ± 0.001 Гц. В условиях перфузии среза при температуре $+35^\circ\text{C}$ спонтанные кальциевые осцилляции нейронов поля СА3 гиппокампа крыс происходят значительно чаще. Частота $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигналов – 0.09 ± 0.06 Гц, длительность каждой осцилляции – 10.1 ± 2.16 с. Было выдвинуто предположение, что увеличение частоты спонтанных кальциевых сигналов в нейронах связано с активацией и ускорением обменных процессов в клетках и повышением выброса в синаптическую щель нейротрансмиттеров, стимулирующих появление спонтанных изменений $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нейронах. Среди веществ, способных вызвать временное изменение внутриклеточного кальция, наиболее изученными являются глутамат и АТФ.

Для изучения роли каждого из предполагаемых нейротрансмиттеров избирательно блокировалось действие каждого из них, а также возможность возникновения деполяризации клеточной мембраны. При исключении действия глутамата выяснилось, что генерация нейронами $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигналов продолжается с той же частотой, следовательно, повышение частоты спонтанных $[\text{Ca}^{2+}]_i$ осцилляций обусловлено не выбросом в среду повышенного количества глутамата. Для проверки гипотезы о роли АТФ в увеличении кальциевой активности нейронов добавили в перфузат АТФ в концентрациях 10 мкМ и 20 мкМ, что вызвало дозозависимое повышение частоты нейрональных $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигналов (рис. 2а, рис. 3) практически одновременно во всех клетках. Через некоторый промежуток времени после реакции нейронов на введение АТФ в астроцитах также практически одновременно были зарегистрированы кратковременные всплески $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 2б).

Так как добавление АТФ увеличивало частоту $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигналов, мы решили проверить, взаимодействие с какими именно рецепторами запускает этот процесс. Для этого в перфузат на фоне блокаторов глутаматных рецепторов был добавлен антагонист семейства ионотропных пуриnergических рецепторов АТФ (20 мкМ TNP-АТФ) [6]. Введение в перфузат блокатора TNP-АТФ не оказало никакого действия на частоту возникновения спонтанных $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигналов.

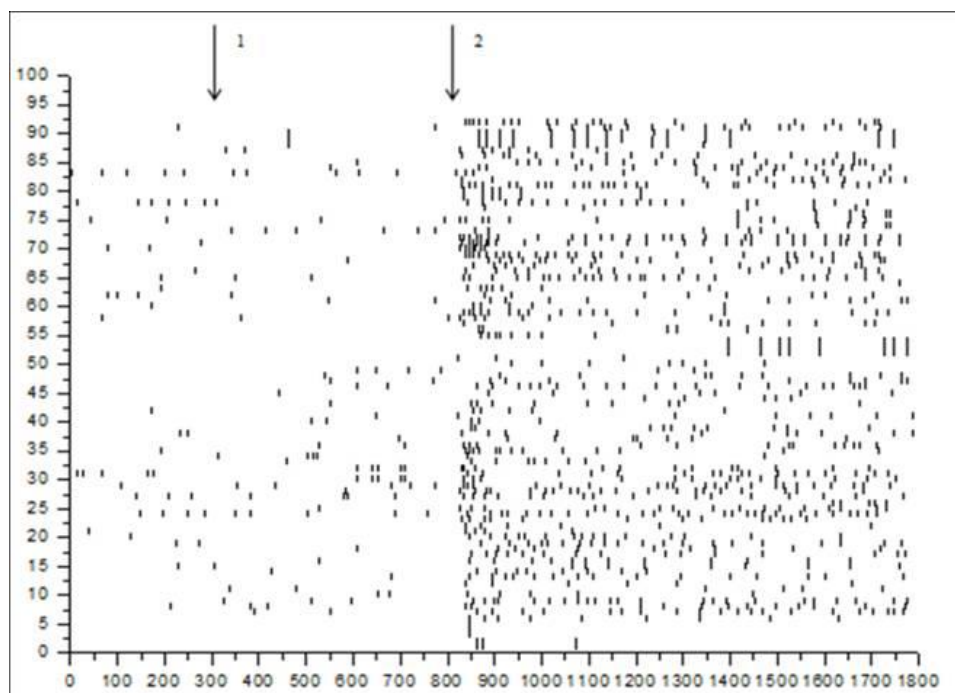


Рис. 3. Растровая диаграмма распределения кальциевых сигналов клеток среза гиппокампа крысы во времени. По оси ординат указан номер рассматриваемой клетки: 1–8 – астроциты, 9–45 – интернейроны, 46–69 – пирамидальные нейроны; по оси абсцисс – время, с. Моменты возникновения кальциевых осцилляций отмечены точками. Добавление веществ на диаграмме отмечено стрелками. 1 – блокатор натриевых каналов (ТТХ 10 мкМ), 2 – АТФ (10 мкМ)

Таким образом, молекулы АТФ играют ведущую роль в клеточной сигнализации гиппокампа, регуляции нейрон–астроцитарных взаимодействий в центральной нервной системе. Показано, что добавление блокаторов Na^+ -каналов, рецепторов глутамата и ионотропных пуриnergических рецепторов второго типа не влияло на возникновение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигналов в клетках, а добавление АТФ существенно увеличивало их частоту. Поэтому нами был сделан вывод, что возникновение спонтанных $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигналов в нейронах и астроцитах гиппокампа зависит от стимуляции метаболитических пуриnergических рецепторов второго типа.

Выводы

1. Условия возбуждения красителей во флуоресцентной микроскопии должны выбираться, исходя из допустимого уровня степени фотообесцвечивания красителей и продолжительности измерений.

2. Добиваясь минимизации фотовыжигания красителя, мы тем самым минимизируем токсичность действия этого красителя на живую ткань.

3. Частота спонтанных $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигналов в клетках поля СА3 среза гиппокампа определя-

ется температурой их содержания и концентрацией АТФ в межклеточной среде.

4. Возникновение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигналов в нейронах при повышении скорости метаболизма не зависит от активности рецепторов глутамата и от активности ионотропных пуриnergических рецепторов.

Работа выполнена при поддержке аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала Высшей школы» 2.1.1./6223.

Список литературы

1. Bowser D.N., Khakh B.S. // *J. Gen. Physiol.* 2007. V. 129. № 6. P. 485–491.
2. Kawamura M., Gachet C., Inoue K., Kato F. // *J. of Neuroscience.* 2004. V. 24. № 48. P. 10835–10845.
3. Fluorescent calcium indicators for *in vivo* imaging of neuronal networks // *BioProbes.* 2007. V. 54. October. P. 26–27.
4. Теренин А.Н. Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений. Л.: Наука, 1967. 616 с.
5. Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Kerr J.N., Heimchen F. // *Nat. Methods.* 2004. № 1. P. 31–37.
6. Domercq M., Brambilla L., Pilati E., et.al. // *J. of Biological Chemistry.* 2006. V. 281. № 41. P. 30684–30696.

**FLUORESCENCE SCANNING MONITORING OF CALCIUM ACTIVITY
IN HIPPOCAMPAL NEURONS UNDER THE INFLUENCE
OF SYNAPTIC TRANSMISSION MODULATORS**

Yu.N. Zakharov, A.V. Ershova, Ya.I. Kalitseva, I.V. Mukhina

The problem of calcium activity mechanisms in neuronal tissue is considered using fluorescence analysis with application of neurotransmitters and blockers of postsynaptic receptors. Parameters of fluorescence dynamics in long-term signal recording have been optimized to interpret adequately the results of the neuronal activity studies. The leading role of chemical mechanisms to trigger neuron calcium cascades has been shown.

Keywords: laser scanning microscopy, fluorescence analysis, neuron, neurotransmitter, purinergic receptors.