

УДК 57.033, 57.013

ЛОКАЛЬНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ ТОМОГРАФИЯ НЕРВНОЙ КЛЕТКИ

© 2023 г. Г.Г. Левин*, А.А. Самойленко*, Т.А. Казакова**,
Т.А. Маракуца***, Г.В. Максимов**, ***, #

*Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений,
Озерная ул., 46, Москва, 119361, Россия

**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/24, Москва, 119892, Россия

***Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»,
Ленинский просп., 4, Москва, 119049, Россия

#E-mail: gmaximov@mail.ru

Поступила в редакцию 12.10.2022 г.

После доработки 12.10.2022 г.

Принята к публикации 25.10.2022 г.

Представленная модификация метода локальной оптической томографии позволяет исследовать динамические процессы субклеточных структур нативных нервных клеток. Преимущество данного подхода заключается в том, что возможен анализ динамики распределения структур нейрона в интересующей точке или области внутри клетки без проведения полной реконструкции изображения клетки. Доказано, что появляется возможность определения размеров, интересующей области клетки и координат субклеточных структур для дальнейшего исследования их динамики. В данной модификации метод локальной томографии позволяет исследовать как клетки, так и клеточные структуры, так как не требует зондирования всего поля зрения. Локальное зондирование интересующей области при функционировании нервной клетки позволит, во-первых, сократить время регистрации данных для получения локальных томограмм и, во-вторых, исследовать одновременно динамику нескольких областей внутри клетки.

Ключевые слова: локальная оптическая томография, нейрон.

DOI: 10.31857/S0006302923010064, EDN: NZPZCQ

В настоящее время метод оптической фазовой микроскопии широко используется для исследования динамики различных процессов в клетке [1, 2]. С помощью оптической фазовой микроскопии были выявлены изменения показателя преломления в ходе функционирования клетки. Однако применение данного метода сопровождается рядом трудностей, связанных, в частности, с проблемой разрешения внутриклеточных структур клетки, чувствительностью и временным разрешением отдельного измерения. В связи с этим особое внимание уделяется разработке методик оптической томографии в фазовой и абсорбционной микроскопии. Однако эти исследования возможны для морфологического анализа отдельной клетки, которая полностью попадает в поле зрения прибора со всех направлений зондирования [3]. В настоящее время методы и алгоритмы традиционной оптической компьютерной томографии не распространяются на клетки более сложной формы, такие, например, как нервные

клетки, имеющие многочисленные отростки и внутриклеточные структуры (ядро, митохондрии и т.п.).

На наш взгляд, существует несколько ограничений, которые снижают эффективность томографических исследований подобных биологических объектов. Во-первых, особенности оптической схемы многокурсного зондирования нативной клетки позволяют исследовать объект только при ограниченном угле обзора [4]. Во-вторых, при некоторых ракурсах объекта (например, нервной клетки) размер превышает область зондирования и приводит к проблеме регистрации неполных проекций. Эти ограничения усложняют задачу реконструкции томограмм с использованием обратного преобразования Радона, доводя ее до некорректной, так как приводят к многочисленным артефактам в восстановленном изображении, компенсация которых существенно ухудшает пространственное разрешение метода. В-третьих, используемые алгоритмы реконструкции изображений, полученных с помощью оптической компьютерной томографии (ОКТ), учитывают только слабые дифракционные эф-

Сокращения: ОКТ — оптическая компьютерная томография, ОРХ — оптическая разность хода.

фекты для случая однократного рассеяния в приближении Борна или Рытова для уравнивания эйконала [5]. Очевидно, что в этих случаях градиенты показателя преломления внутри и на границе клетки должны быть малы, и в случае применения метода ОКТ для исследования нативной клетки эти условия не выполняются. Известно, что величина плотности клеточной мембраны существенно превышает плотность структур цитоплазмы и приводит к сильным дифракционным эффектам на краях клетки. Дифракцию света на мембране легко можно наблюдать на любом фазовом изображении клетки. При этом дифракционные искажения проекционных данных локализуются на границах клетки и внутренних ее органелл. Таким образом, использование нелокальных алгоритмов реконструкции ОКТ приводит к искажениям проекций и восстановлению изображения клетки.

Современные методы решения обратных некорректных задач, использующие итерационные процедуры позволяют реконструировать изображение внутриклеточных структур в некотором приближении даже при неполных и неточных проекциях. Однако достоверность полученных изображений вызывает сомнения, а выводы о корреляции полученного изображения и реальных структур клетки необходимо делать с большой осторожностью. При этом теряется основное достоинство томографических методов исследования — высокая чувствительность к локальным изменениям плотности внутри объекта. В связи с этим можно выделить целый ряд задач, при которых не нужно строить трехмерное изображение всей клетки, а достаточно анализировать динамику локальных изменений ее структурных элементов.

В данной работе будут впервые представлены результаты исследования ОКТ нативной нервной клетки (нейрона). Известно, что морфология нейрона включает тело (сому) и ряда отростков (дендриты и аксон), по которым нервный импульс поступает на нейрон или передается на другую клетку. Известно, что в этих структурах нейрона происходят динамические процессы, которые связаны не только с периодическими изменениями мембранного электрического потенциала как в теле клетки, так и ее отростках, но и изменениями в цитоплазме клетки, связанными с перераспределением субклеточных структур цитоскелета (локализация митохондрий или внутриклеточных везикул, содержащих нейромедиаторы). Процесс возбуждения нейрона связан с деполяризацией плазматической мембраны (увеличение мембранного потенциала), что инициирует перераспределение цитоплазматический пулов везикул, вектор которого направлен из центра нервной клетки к плазматической мембране. После завершения деполяризации, везикулы

сливаются с плазматической мембраной (в течение нескольких минут) и молекулы медиатора диффундируют в экстраклеточную среду. Известно, что в крупной (60–80 мкм в диаметре) соме нейрона пиявки серотонин хранится в скоплениях везикул (диаметром 100 нм), а электрическая стимуляция (серия из десяти импульсов частотой 20 Гц) вызывает экзоцитоз (направленное перераспределение везикул от центра клетки к ее периферии) в течение 2–5 мин. С помощью электронных микроскопии установлено, что в состоянии покоя в нейроне скопления везикул локализованы далеко от плазматической мембраны, тогда как после стимуляции нейрона большая часть их перемещается и плотно прилегает к плазматической мембране клетки. В связи с этим, в настоящее время существует насущная задача микроскопического контроля за перераспределением скоплений везикул при функционировании нейрона [6].

Ранее, нами было доказано, что распределение оптической разницы хода (ОРХ) луча света в функционирующем нейроне меняется как во времени, так и в субклеточных структурах нейрона. Установлено, что ОРХ в каждой точке клетки определяется коэффициентом преломления компонентов цитоплазмы, их размерами и количеством, а, главное, зависит от их перераспределения субклеточных структур (везикул и митохондрия, ядро и т.д.). Доказано, что в состоянии покоя у нейрона величина стандартного отклонения ОРХ клетки (динамика распределения ОРХ) незначительно варьирует в околоядерной области и в области плазматической мембраны. Однако при активации ацетилхолиновых рецепторов нейрона и деполяризации мембраны выявлены существенные изменения величины стандартного отклонения ОРХ Retzius-нейрона (распределения ОРХ) [7].

В связи с этим мы считаем, что основным аспектом исследований морфологии и цитологии нейрона является анализ динамики внутриклеточных процессов нервной клетки. Мы предполагаем, что без использования специфических флуоресцентных маркеров структур нейрона локальная ОКТ позволит исследовать динамику трехмерной субклеточной структуры функционирующей нервной клетки.

Цель работы заключалась в том, чтобы с помощью метода локальной оптической томографии разработать методологию анализа динамических процессов в нейроне (в интересующей точке или области без проведения полной реконструкции всего сечения клетки). Для реализации предлагаемой методологии были получены 3D-изображения нейрона, реконструированные методом локальной дифференциальной томографии, определены координаты и дана характеристика

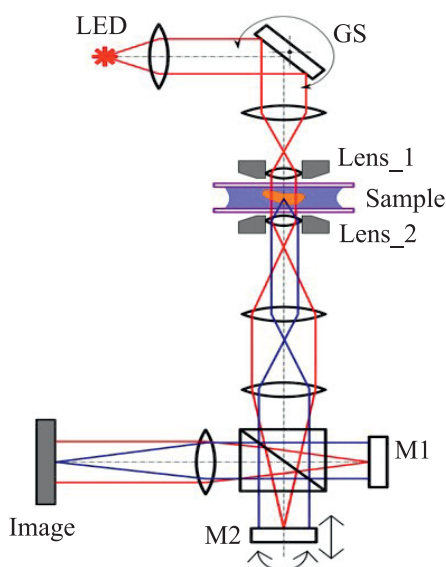


Рис. 1. Схема сдвигового интерференционного микротомографа. Описание рисунка представлено в тексте.

трехмерной структуры отдельных субклеточных структур в заданных точках 3D-изображения клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование первичной культуры гранулярных клеток мозжечка крысы. Для приготовления первичной культуры гранулярных клеток мозжечка использовали двух-четырёхсуточных крыс линии Wistar Kyoto. Декапитацию осуществляли в соответствии с этическими требованиями по работе с животными. После декапитации животных все процедуры с клетками производили в стерильных условиях. Извлеченные мозжечки промывали в холодном бескальциевом и безмагние-вом растворе Хенкса (Gibco, США) с 0.04% NaNHCO_3 , очищали от сосудов, пленок, ствола мозга и других тканей, измельчали, после чего клеточную суспензию помещали на 15 мин в 0.05%-й трипсин с 0.02% ЭДТА при 37°C (Gibco, США). После инкубации клетки на 2–3 мин помещали в 2–3 мл бычьей сыворотки для остановки реакции, а затем двукратно отмывали трипсин стандартным раствором Хенкса с феноловым красным (Gibco, США), и культуральной средой MEM (Minimal Essential Medium, Gibco, США). Клетки диспергировали в свежей среде MEM до получения однородной суспензии, которую центрифугировали 2 мин при 3000 об/мин. Далее осажденные клетки ресуспендировали в среде NBM (Neurobasal Medium, Gibco, США), содержащей 2% Supplement B-27 (Gibco, США), 0.5 мМ GlutaMax (Gibco, США), 100 Ед/мл пенициллин/стрептомицин (Gibco, США) и 20 мМ KCl (Sigma, США). Под-

счет нейронов проводили в камере Горяева (концентрация нейронов обычно составляла $(1.0\text{--}3.5)\cdot 10^6$ клеток/мл), затем переносили 100–150 мкл клеточной суспензии в чашки Петри, преинкубированные с полиорнитином (Sigma, США) для улучшения адгезии клеток на поверхности чашек Петри. Культивирование осуществляли в среде NBM в течение пяти-семи суток в CO_2 -инкубаторе при 37°C, 5% CO_2 и относительной влажности 98%.

Оптическая локальная дифференциальная томография. Подробное описание экспериментальной установки было представлено в работе [8]. Можно выделить следующие основные характеристики используемого микротомографа. Источником света служил низкокогерентный светодиод, что позволило снизить шумы получаемых изображений; проекции (с разных углов) получали за счет освещения через широкоапертурный объектив. Фазовые изображения получали с помощью сдвигового интерферометра (рис. 1). Источником излучения служил коллимированный линзой (1) точечный светодиод (LED) с размером площадки 80 мкм. Использование светодиода по сравнению с лазером позволяет избавиться от спекл-шумов. Образец (Sample) помещали между двумя покровными стеклами и освещали параллельным лучом света (под разными углами) через широкоапертурный объектив (Lens_1). Наклон луча меняли за счет поворота зеркала (GS) с помощью гальвосканера. Такой способ сканирования лучом позволяет использовать фиксированные объективы и предметный столик, что существенно упрощает конструкцию установки. Диапазон сканирования в нашей установке составил $\sim \pm 60^\circ$.

Изображение клетки получали с помощью объектива Lens_2, идентичного объективу Lens_1. Далее изображение попадало в сдвиговый интерферометр, состоящий из зеркал (M1) и (M2) и светоделительного кубика 50/50 между ними. Сдвиг изображений получали благодаря наклону одного из зеркал. Для реализации алгоритма фазовых шагов одно из зеркал смещалось с помощью пьезоэлемента. Изображение формировали на светочувствительной матрице (Image) с помощью системы линз. Восстановление фазовых изображений производили методом интерферометрии фазовых шагов. В результате каждая полученная проекция представляла собой изображение, аналогичное изображению, полученному в дифференциальном интерференционно-контрастном микроскопе, но с численными значениями, соответствующими производной фазы.

Для калибровки томографа использовали стеклянные сферы размером 5 мкм, что позволило определить размер вокселя в восстановленном изображении (0.1 мкм^3). Время регистрации полного набора проекций составляло 8–10 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности локальной дифференциальной томографии. Локальные алгоритмы томографии отличаются тем, что для восстановления функции в какой-то конкретной точке внутри объекта не требуется измерять поле, прошедшее через весь объект. Достаточно знать значение поля только в небольшой области вокруг выбранной точки. Локальные алгоритмы достаточно широко используются в технических приложениях томографии, так как обладают высокой чувствительностью к изменениям внутренней структуры объекта. Так, например, при исследовании быстропротекающих процессов, аэро- и гидротоков, процессов горения использовались методы томографической аналоговой интерферометрии в оптическом диапазоне, которые позволили визуализировать изображения сечений этих процессов в реальном времени [9]. При этом использовались локальные алгоритмы обратного суммирования, которые позволяли получать некоторые приближения томограмм. Локальный алгоритм синтеза томограмм из дифференциальных проекций нашел применение в рентгеновской томографической дефектоскопии [10]. Ранее в нашей работе [8] были представлены результаты теоретических исследований и математическое моделирование локальных алгоритмов томографии.

Отметим, что изображения, восстановленные по указанным выше алгоритмам локальной томографии, не являются истинными томограммами. Но эти изображения визуально воспринимаются как более четкие, с выраженными границами неоднородностей объекта и инородных включений в нем, что позволяет очень точно определить координаты локализации этих структур внутри клетки. Другой особенностью локальных алгоритмов по дифференциальным проекциям является их высокая чувствительность к изменениям внутри объекта, что делает их перспективными для исследования динамики внутриклеточных процессов [11].

Оптическая томография и 3D-изображение нейрона. Для анализа ОКТ-изображения нативного нейрона использовали программу 3D Slicer, которая позволяла получить и исследовать произвольно ориентированные срезы клетки, строить модели поверхности из меток изображений и аппаратно-ускоренный объемный рендеринг (3D-изображение).

На рис. 2 представлено оптическое изображение нейрона (2D-проекция), на котором отмечены границы нервной клетки (сoma — тело нейрона) и ее отростков (дендриты и аксон).

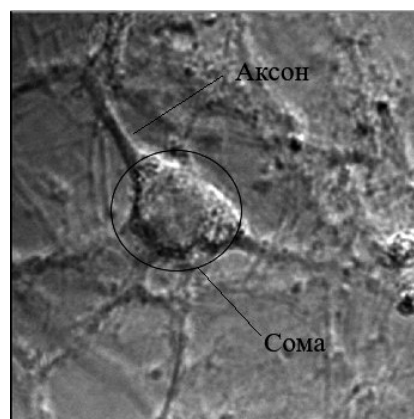


Рис. 2. Изображение нейрона, полученное с помощью оптического микроскопа (2D-проекция), на котором отмечены границы нервной клетки (сомы — тела нейрона) и ее отростков (дендритов).

трансформации 2D-изображения в 3D-изображение с помощью программы 3D Slicer были получены изображения клетки в трех проекциях: горизонтальная (вид сверху) (рис. 3в), профильная (вид спереди, сагиттальная) (рис. 3г) и фронтальная (сбоку) (рис. 3а), а также объемный рендеринг (трехмерный набор данных, где каждая ячейка определяет плотность в этой точке) (рис. 3б).

Так, область ядра нейрона представлена как в горизонтальной проекции (рис. 3в), так и в объемном рендеринге (рис. 3б).

Выделение и характеристика отдельных слоев трехмерной структуры в заданных точках 3D-изображения нейрона. Следующая процедура анализа полученных изображений заключалась в выделении отдельных слоев трехмерной структуры нейрона в заданных точках изображения (рис. 4а,б). Для случая, когда первая структура нейрона была выбрана на уровне -18 мкм, далее с шагом 2 мкм были получены следующие срезы изображения субклеточных структур: область верхнего среза изображения нейрона (рис. 4в; выделена темно-серым цветом) — в области -10.7 мкм, а нижний слой нейрона (рис. 4; выделен светло-серым цветом) — 24 мкм. На следующем этапе анализа изображения с помощью опции инструмента «линейка» были получены размеры высот нейрона (13.28 мкм) и его ядра (8.169 мкм).

В связи с задачей исследования анализировали ОКТ-изображения отростков нейрона и их срезы (рис. 4в).

Отметим, что локальная ОКТ позволила получить изображения слоев (срезы): цитоскелет, ядро, органеллы вокруг ядра (рис. 5а). Очевидно,

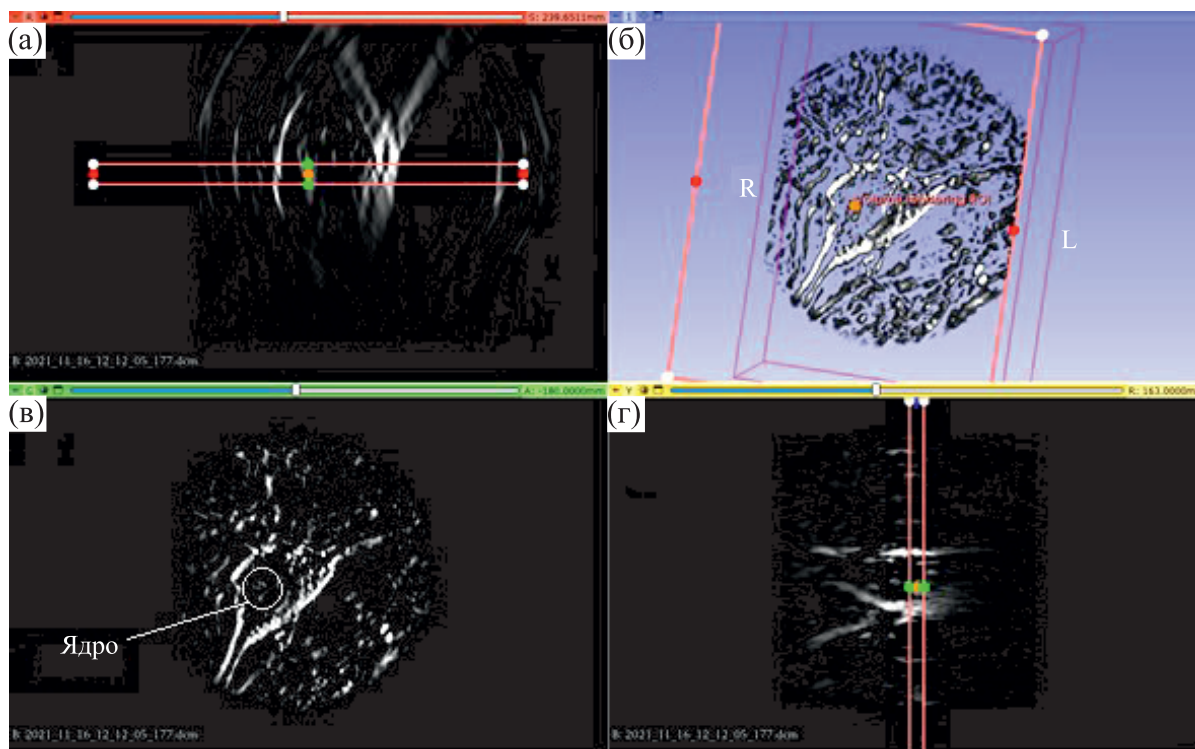


Рис. 3. Проекция нейрона, полученная с помощью программы 3D Slicer: (а) — фронтальная (вид сбоку), (б) — объемный рендеринг, (в) — горизонтальная (вид сверху), (г) — профильная (вид спереди, сагиттальная).

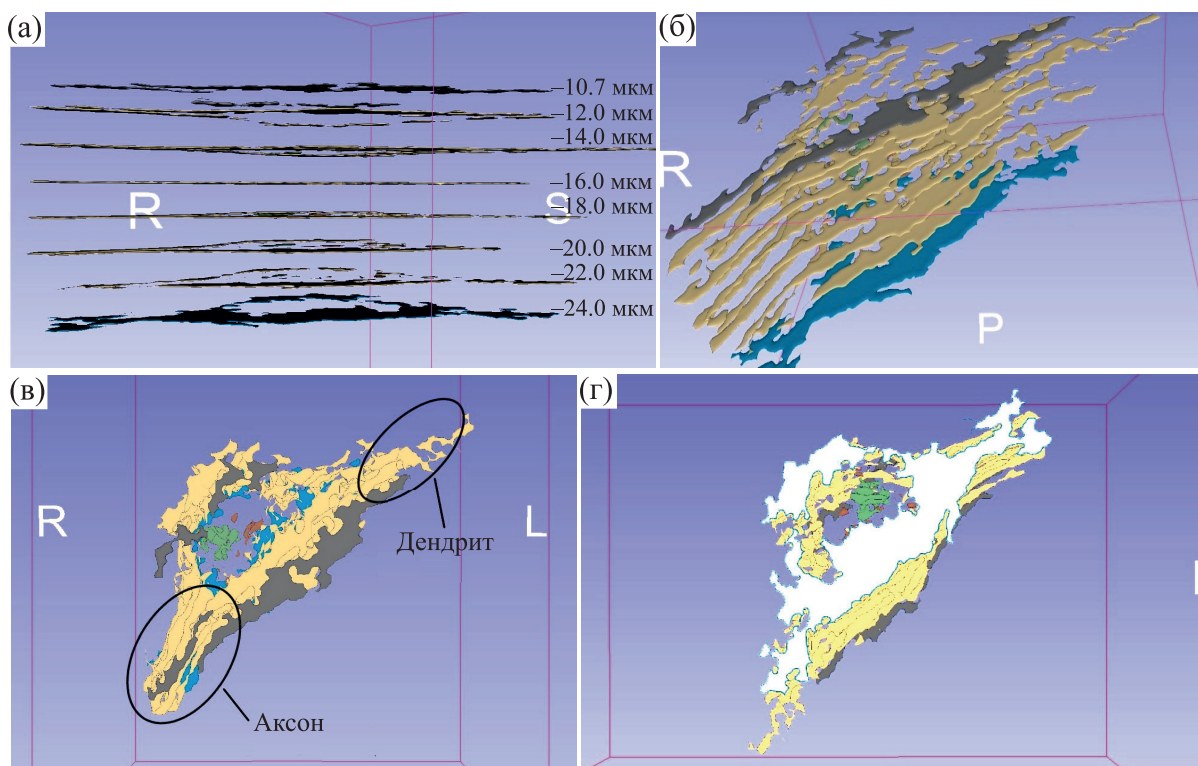


Рис. 4. Срезы нейрона: (а) — срезы (слои) с указанной размерностью в мкм, (б) — срез (слой) под углом, (в) — темно-серым цветом выделен верхний слой нейрона, ОКТ-изображения отростков нейрона (аксон и дендрит), (г) — светло-серым цветом выделен нижний слой.

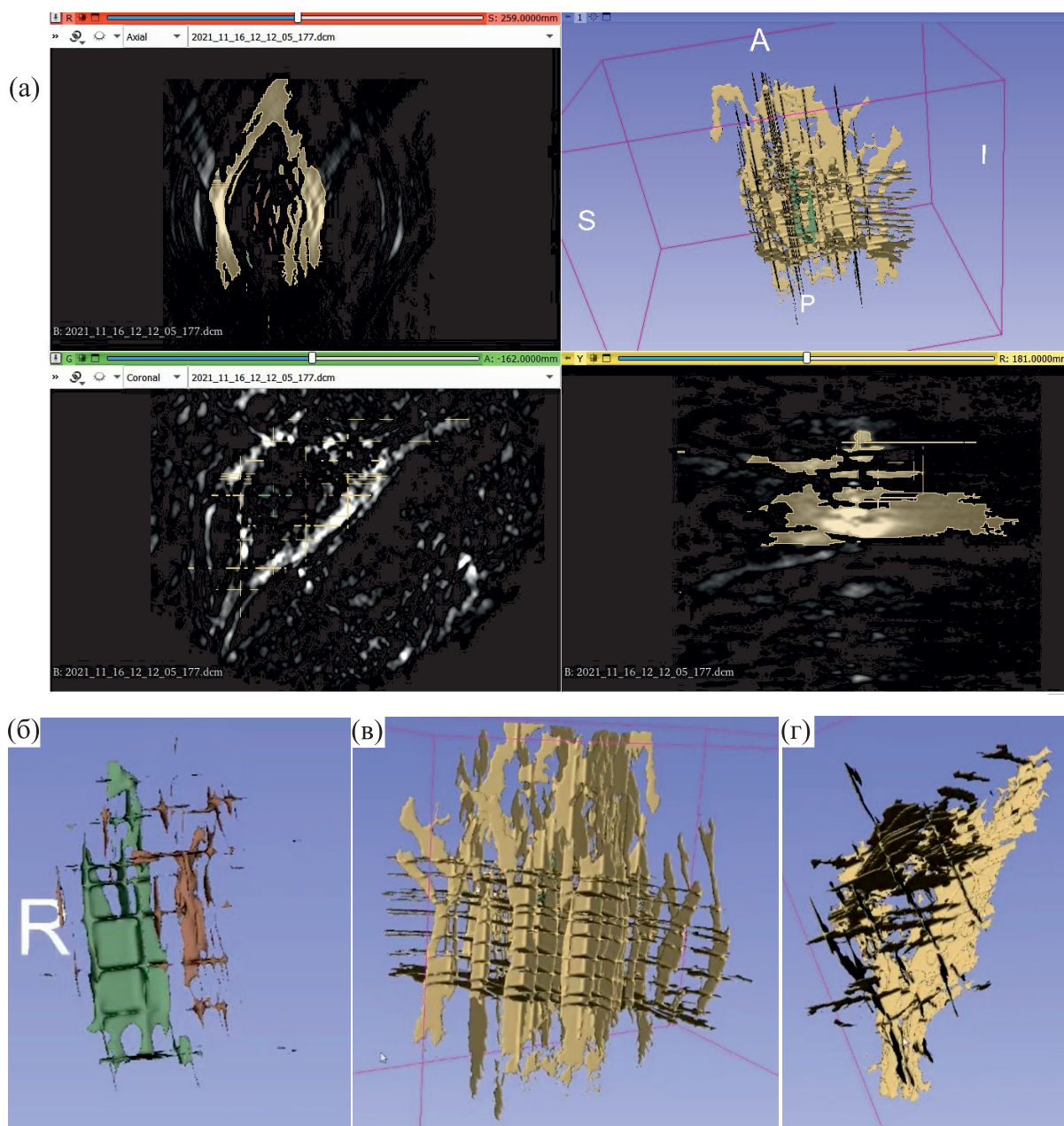


Рис. 5. 3D-изображения нейрона: (а) — слои цитоскелета, ядра и органелл в одной модели, (б) — ядро, (в) — цитоскелет, (г) — область дендрита и аксона.

что данный подход позволит не только исследовать 3D-структуру нейрона и его субклеточных структур, но и динамику изменения этих локальных структур при функционировании нейрона (рис. 5б–г).

С помощью опции «Fill beteen slicer» программы 3D Slicer были получены объемные 3D-изображения нейрона с учетом выделенных слоев (рис. 6а,б), а также область ядра клетки (рис. 6в), цитоскелет (рис. 6г) и область аксона (рис. 6д).

Как отмечалось выше, анализ изображений локальной ОКТ позволяет выбрать локализацию (координаты) исследуемых структур нейрона и оценить их динамику. Например, выберем точку в области ядра клетки (рис. 7а) и определим ее координаты: (24.45289, 11.18260, –16.97716) мкм, в области цитоплазмы клетки (рис. 7б): (28.749766 11.613736 –14.30570) мкм, или же в области аксона (рис. 7в): (14.99557, 7.57512, –14.17602) мкм. Размер указан с учетом перевода пикселей в мкм.

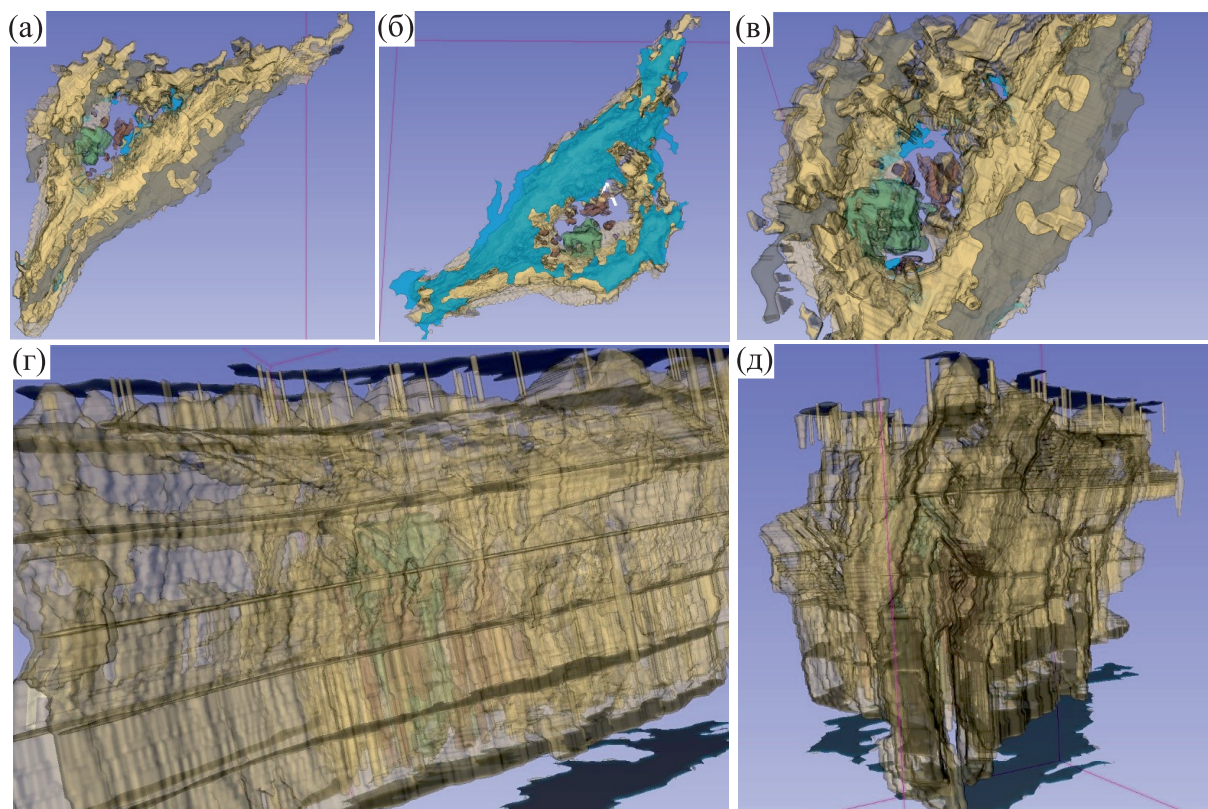


Рис. 6. Объемное 3D-изображение нейрона: (а) — верхний слой, (б) — нижний слой, (в) — область ядра, (г) — цитоскелет в приближении «полупрозрачный», (д) — область аксона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в данной работе результаты использования локальной ОКТ позволяют исследовать динамические процессы в субклеточных структурах функционирующего нейрона [12–16]. Преимущество предлагаемого подхода применения локальной томографии заключается в том, что метод позволяет проводить анализ динамики распределения заданных структур нейрона в интересующей точке или области внутри клетки без проведения полной реконструкции всего сечения объекта. При этом остается возможность определения точных размеров, интересующей области клетки и координат субклеточных структур для исследования их динамики. В данной модификации метод локальной томографии позволяет исследовать большие клетки и клеточные структуры, т.к. не требует освещения (анализа) всего поля зрения. Зондирование только интересующей исследователя части клетки позволяет, во-первых, сократить время регистрации данных для локальных томограмм, и, во-вторых, исследовать одновременно динамику нескольких областей внутри клетки, если они находятся в поле зрения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-79-30062 для МГВ и КТА). Это исследование также было поддержано Междисциплинарной научно-образовательной школой МГУ имени М.В. Ломоносова «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Спонсор работы не участвовал в разработке исследования; при сборе, анализе или интерпретации данных; в написании рукописи или в решении опубликовать результаты.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с экспериментальными животными проведены в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в научных исследованиях (1986, 86/609/ЕЕС).

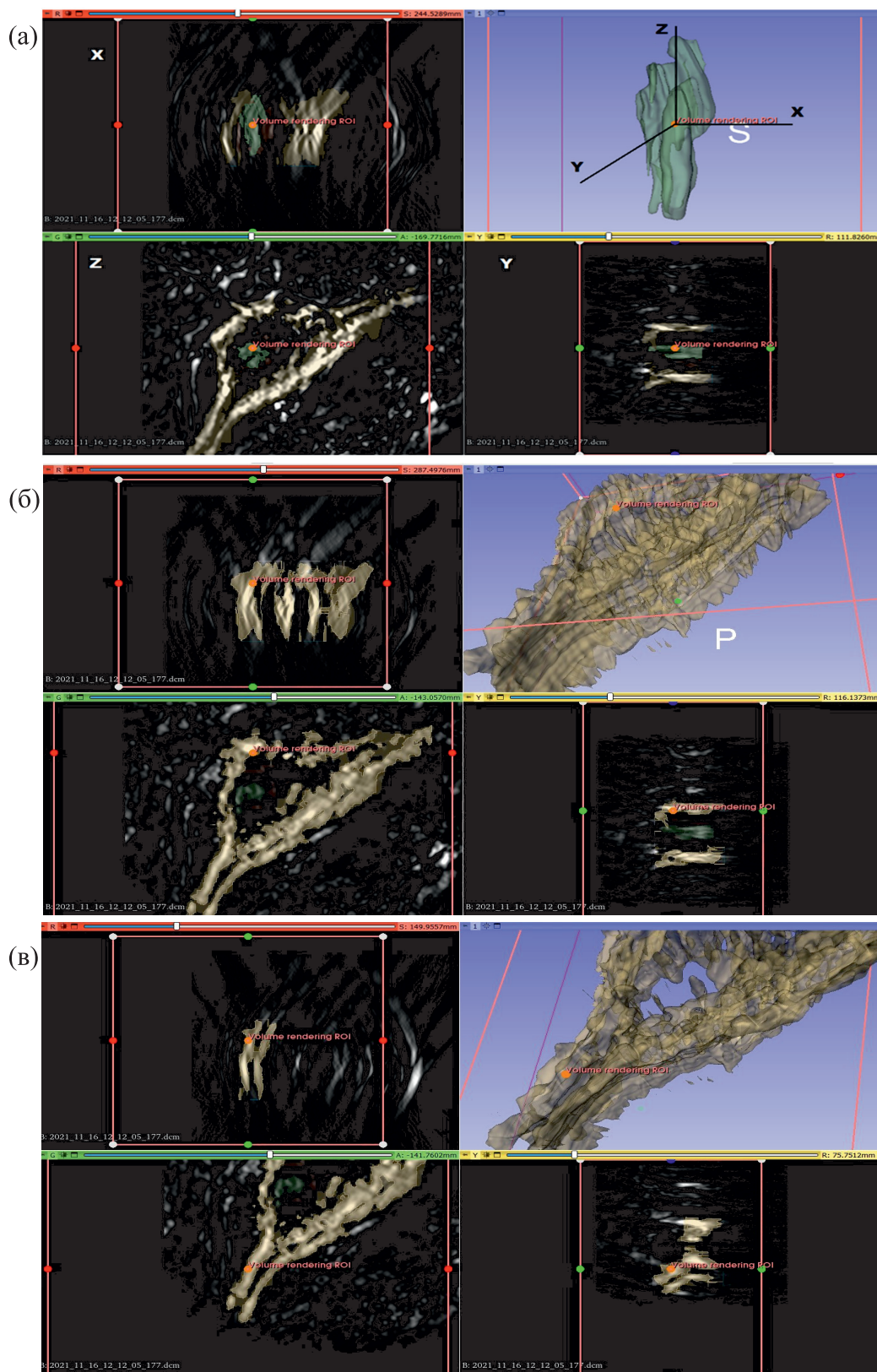


Рис. 7. Выбор локальных координат: (а) — в ядре, (б) — в цитоплазме, (в) — в аксоне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. I. Yusipovich, E. Yu. Parshina, A. A. Baizhumanov, et al., *Instruments and Experimental Techniques*, **64** (6), 877 (2021).
2. А. И. Юсипович, С. М. Новиков, Т. А. Казакова и др., *Квантовая электроника*, **36** (9), 874 (2006).
3. <http://www.tomocube.com> (дата посещения 01.08.2022).
4. G. N. Vishnyakov, G. G. Levin, V. L. Minaev, et al., *Microscopy and Analysis*, **87**, 19 (2004).
5. M. Slaney and A. C. Kak, *Proc. SPIE*, **413**, 2 (1983).
6. T. A. Kazakova, O. N. Suchalko, A. D. Ivanov, et al., *bioRxiv* (The preprint server for biology) (2020).
7. T. A. Kazakova, A. I. Yusipovich, and G. V. Maksimov, *Вестн. МГТУ им. Н.Э. Баумана (Естественные науки)*, **6** (93), 137 (2020).
8. G. N. Vishnyakov, G. G. Levin, V.L. Minaev, et.al., *Opt. Spectrosc.*, **125**, 1065 (2018).
9. G. N. Vishnyakov, G. G. Levin, et al., *Proc. SPIE*, **348**, 596 (1982).
10. Э. И. Вайнберг, И. А. Казак и В. П. Курозаев, *ДАН СССР*, **257** (1), 89 (1981).
11. A. Faridani, E. L. Ritman, and K. T. Smith, *J. Appl. Math.*, **52** (2), 459 (1992).
12. А. Р. Браже, Н. А. Браже, О. В. Сосновцева и др., *Компьютерные исследования и моделирование*, **1** (1), 77 (2009).
13. A. A. Platonova, S. V. Koltsova, G. V. Maksimov, et al., *Biophysics*, **58**, 389 (2013).
14. N. S. Bondarenko, A. I. Yusipovich, S. S. Kovalenko, et al., *Biologicheskie Membrany*, **30** (3), 199 (2013).
15. A. I. Yusipovich, Yu. Berestovskaya, V. Shutova, et al., *Measurement Techniques*, **55** (3), 351 (2012).
16. A. R. Brazhe, N. A. Brazhe, G. V. Maksimov, et al., *J. Biomed. Optics*, **13** (3), 034004 (2008).

Local Optical Tomography of a Nerve Cell

G.G. Levin*, A.A. Samoilenko*, T.A. Kazakova, T.A. Marakutsa***, and G.V. Maksimov**, *****

**All-Russian Research Institute of Optical and Physical Measurements, Ozernaya ul. 46, Moscow, 119361 Russia*

*** Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1/24, Moscow, 119892 Russia*

****National Research Technological University "MISiS", Leninskiy prosp. 4, Moscow, 119049 Russia*

The presented modification of the method of local optical tomography makes it possible to study the dynamic processes of subcellular structures of native nerve cells. The advantage of this approach is that it is possible to analyze the dynamics of the distribution of neuron structures at a point or area of interest inside the cell without performing a complete reconstruction of the cell image. It has been proved that it becomes possible to determine the dimensions, the cell area of interest, and the coordinates of subcellular structures for further study of their dynamics. In this modification, the method of local tomography could be used to study both cells and cellular structures, because it is not necessary to probe a full field of view. Local probing of the region of interest during the functioning of the nerve cell will, firstly, reduce the time of data recording for obtaining local tomograms, and, secondly, provide the opportunity to explore the dynamics of several regions inside the cell at the same time.

Keywords: local optical tomography, neuron