

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ КЛЕТОК И ИХ ОРГАНЕЛЛ

© 2015 г. К.Б. Асланиди

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: kbaslanidi@gmail.com

Поступила в редакцию 20.10.14 г.

Методом микроспектрального анализа, позволяющим проводить оптические измерения при охлаждении вплоть до температуры жидкого азота, проведена идентификация молекулярных компонентов ряда растительных и животных клеток. Выявленная биохимическая гетерогенность свидетельствует о функциональной специализации отдельных клеток внутри популяции. Анализ тушения флуоресценции позволил выявить температурные области, в которых происходят процессы перекристаллизации внутриклеточной воды, связанной с конкретными пигмент-белковыми комплексами. Предложенный экспериментальный подход может найти применение в современной корреляционной микроскопии, а также в криобиологии для отработки оптимальных режимов замораживания и размораживания различных клеток с целью криоконсервации генетического материала.

Ключевые слова: криогенная микроскопия, спектр, флуоресценция, поглощение, криобиология.

В последние годы криогенная микроскопия становится все более важным методом для создания изображения, информативного как с точки зрения структуры, так и с позиции молекулярной организации клетки *in vivo*. Суть метода заключается в создании виртуального 3D-изображения объекта с нанометровым разрешением посредством объединения наборов данных, полученных разными методами криогенной микроскопии на одном объекте. Для увеличения информативности изображения разрабатываются новые криогенные методы оптической флуоресцентной микроскопии [1–4], электронной микроскопии [4–6] и томографии, использующей мягкое рентгеновское излучение [7], на одном витрифицированном биологическом образце. В последние годы широко используются именно методы быстрого замораживания ткани, поскольку они создают меньше структурных артефактов во время подготовки витрифицированного образца по сравнению с методами химической фиксации при комнатной температуре [8]. Флуоресцентная микроскопия криогенных образцов позволяет с помощью флуоресцирующих белков или флуоресцирующих красителей определить конкретные уникальные области, ультраструктура которых затем выявляется методами электронной микроскопии. Отметим, что качество 3D-оптического изображения определяется числом получаемых двухмерных картин, а количество изображений при

комнатной температуре ограничено временем фотодеструкции красителя. При криогенных температурах выгорание образца происходит значительно медленнее [4], что позволяет увеличить количество изображений.

Развитие новых методов в значительной степени обязано также разработкам мощных компьютеров, быстрых высокоразрешающих CCD-камер, специально разработанных методов анализа, программного обеспечения и многообразных зондов, предназначенных для маркировки витрифицированных клеток [9,10].

Следует отметить и самостоятельную ценность оптических измерений на витрифицированных клетках. Анализ спектральных характеристик поглощения и люминесценции отдельных клеток и их органелл позволяет идентифицировать определенные биохимические компоненты, а также оценить биохимическую гетерогенность отдельных клеток в квазиоднородной популяции. Ослабление энзиматических процессов при охлаждении и устранение фотохимического тушения люминесценции должны облегчать идентификацию некоторых биохимических компонентов клетки. Более того, температурная зависимость интенсивности люминесценции может являться маркером холодовых повреждений конкретных клеточных структур.

В ранних моделях криомикроскопов [11–16] во избежание конденсации водяных паров на оптических деталях микроскопа камера с ох-

лаждаемым препаратом была изолирована от объектива микроскопа. Кроме того, как сама камера, так и микроскоп помещались в жесткий бокс, заполненный сухим газом [13]. Объект охлаждался жидким азотом или его парами непосредственно или через стенку камеры [15]. При этом разность температур между объектом и микрообъективом могла достигать 200 градусов, и этот градиент локализовался на относительно толстом стекле герметической камеры и газовом зазоре между камерой и объективом [11]. Существенным недостатком всех этих конструкций является наличие значительного расстояния между объективом и препаратом, что затрудняет применение высокоапертурных объективов. Однако только использование объективов с большой апертурой (и, как правило, малым рабочим расстоянием) позволяет регистрировать собственную люминесценцию отдельных клеток или клеточных органелл [17–21]. Это замечание относится в большей степени к животным клеткам [22–24], интенсивность собственной люминесценции которых, в отличие от фотосинтезирующих, как правило, очень низка.

Практически единственной областью применения криомикроскопов этого типа [11–13,25] было изучение процессов кристаллизации и рекристаллизации воды в биологических тканях при околонулевых температурах. Поэтому нижний предел диапазона исследуемых температур составлял несколько десятков градусов ниже нуля, использовались достаточно низкие скорости замораживания и отсутствовали возможности спектральных измерений.

Люминесцентная микроскопия при криогенных температурах бурно развивается в последние годы. Если по результатам поиска в базе PubMed на словосочетание *fluorescence microscopy* в 1988 г. было найдено 726 статей, то в 2013 г. – 5575, а на словосочетание *cryo microscopy* в 1988 г. было найдено всего 12 статей, а в 2013 г. – уже 423. Встречаются даже вызывающе смелые публикации [26], предлагающие создание криомикроскопа менее чем за \$40 из деталей, имеющихся в лаборатории и в продуктовом магазине!

Очевидно, что использование внутрилабораторных конструкторских возможностей для создания измерительного криомикроскопа на базе отечественных узлов и деталей будет способствовать широкому внедрению современных методов анализа структуры и функции клетки. Целью данной статьи является описание криоприставки и методов измерения спектральных параметров клетки в широком диапазоне температур.

Ниже будет представлена простая приставка к микроспектрофлуориметру, созданная на базе отечественных микроскопов ЛОМО и позволяющая проводить измерение спектральных характеристик поглощения и люминесценции оптическим зондом диаметром до 2 мкм в широком диапазоне температур, вплоть до температуры жидкого азота. Конструкция позволяет варьировать скорости охлаждения и нагрева. Возможно также очень быстрое охлаждение (300–500 К/мин) микрообъекта посредством заполнения камеры с препаратом жидким азотом или жидким пропаном. На широком круге объектов будет продемонстрировано, как спектральные измерения при низких температурах [17,21,27] расширяют возможности традиционных измерений при комнатной температуре [18–20,22–24,28–32].

ОПИСАНИЕ КРИОПРИСТАВКИ ДЛЯ ИЗМЕРИТЕЛЬНОГО МИКРОСКОПА

Разные варианты криоприставки были созданы для отечественных микроскопов МЛД, ЛЮАМ К-1 и ЛЮАМ Р-8. В качестве иммерсионной жидкости при работе со стандартными объективами производства ЛОМО использовали жидкий пропан или жидкий азот. Использование жидкого азота в качестве иммерсионной жидкости уменьшает несоответствие коэффициентов преломления между образцом и линзами объектива, что ведет к более эффективному сбору света от исследуемого образца. В предлагаемой конструкции температурный градиент между объектом и объективом отсутствовал, что позволяло использовать высокоапертурные объективы с большим увеличением и малым рабочим расстоянием [17,21,27].

Минимизация структурных повреждений образца достигалась за счет хорошего смачивания биологической ткани жидким пропаном, охлажденным до температуры жидкого азота. При этом происходит переход внутриклеточной воды в стекловидное состояние без кристаллизации (витрификация).

Отметим, что коэффициент преломления n составляет для жидкого пропана 1,34, для жидкого азота – 1,19, для воды – 1,33, для льда – 1,313, а для воздуха – 1,00. Температура кипения пропана равна 230,9 К, что позволяет, периодически доливая жидкий азот, длительно поддерживать жидкий пропан в камере с объектом при температуре 77 К.

Отметим, что согласование показателей преломления фронтальной линзы объектива микроскопа, иммерсионной жидкости и криоген-

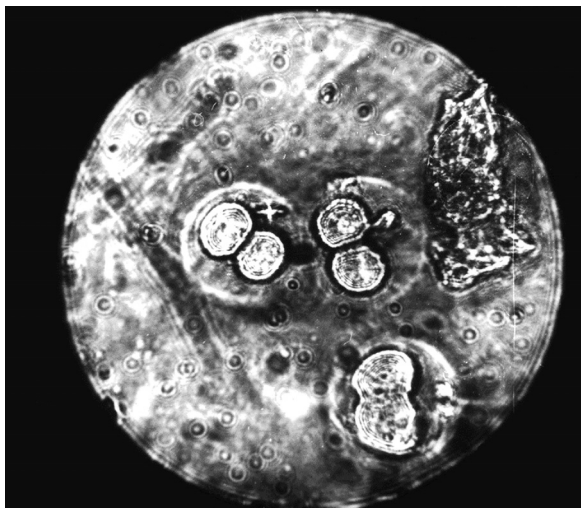


Рис. 1. Микрофотография двухклеточных эмбрионов мыши в жидком азоте. Быструю витрификацию проводили погружением клеток, помещенных между двумя покровными стеклами, в жидкий азот. Объектив ВИ 30 × 0,90. Препарат был любезно предоставлен Л.М. Межевикиной.

ного образца должно уменьшать светорассеяние на границе раздела сред и улучшать качество изображения. Результат использования жидкого азота в качестве иммерсионной жидкости для стандартного водноиммерсионного объектива производства ЛОМО и витрифицированного образца представлен на рис. 1.

Температурный градиент в предлагаемой конструкции возникал между объективом и корпусом микроскопа. Схема устройства для низкотемпературных микроспектральных исследований представлена на рис. 2.

Стандартный сухой объектив сильно рассеивает свет на границе раздела между двумя средами с различными показателями преломления, как между гидратированным биологическим образцом и воздухом, так и между воздухом и фронтальной линзой объектива. Использование криогенной иммерсионной жидкости с показателем преломления, соответствующим объективу, значительно снижает такие проблемы, позволяя получать флуоресцентные изображения лучше, чем при использовании высокоапертурного объектива при комнатной температуре.

Исследуемый препарат (1) и объектив микроскопа (2) помещали в специальную термоизолирующую камеру, состоящую из кварцевого сосуда (3) объемом около 400 мл, помещенного в пенопластовый кожух (4) и заполняемого при измерениях жидким азотом, а также пенопластовой крышки (5), перемещающейся по ко-

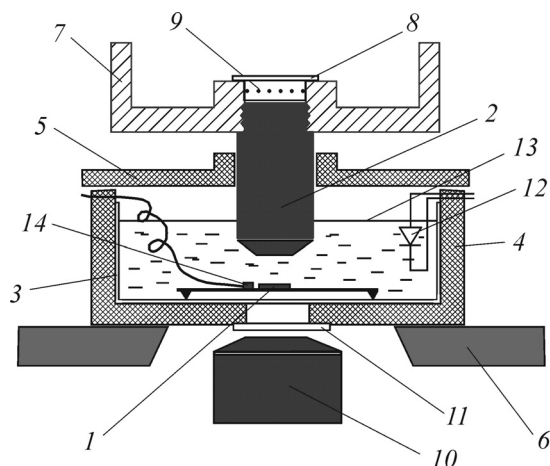


Рис. 2. Схема камеры для низкотемпературных микроспектральных исследований: 1 – исследуемый препарат, 2 – объектив микроскопа, 3 – кварцевый сосуд, 4 – теплоизолирующий корпус камеры, 5 – крышка камеры, 6 – столик микроскопа, 7 – теплоизолирующий переходник, 8 – кварцевое стекло, 9 – нагреватель, 10 – конденсор микроскопа, 11 – лавсановая пленка, 12 – датчик уровня жидкого азота в камере, 13 – уровень азота, поддерживаемый при длительных измерениях, 14 – термопара.

жуху (4) и по объективу (2) при перемещении столика микроскопа (6). Теплоизолирующий корпус камеры (4) жестко связан с препаратоводителем. Объектив отделен от металлического корпуса микроскопа теплоизолирующим капролоновым переходником (7), устанавливаемым вместо револьверной головки микроскопа. Выходная линза объектива изолирована от атмосферного воздуха тонкой лавсановой пленкой (100 мкм) или тонким кварцевым стеклом (8). С целью предотвращения запотевания и обмерзания выходной линзы и защитной пластинки (8), между ними располагался либо нагреватель (9), изготовляемый из тонкой вольфрамовой проволоки, либо крепящееся вакуумной смазкой кварцевое стеклышко (8), обдуваемое снаружи нагретым воздухом (60°C). Небольшое количество водяных паров, находящихся в замкнутом пространстве между выходной линзой объектива и защитной пластинкой (8), при охлаждении обычно конденсировалось на латунном корпусе объектива (2). В дне теплоизолирующего корпуса камеры (4) имеется отверстие, служащее для освещения препарата проходящим светом через конденсор микроскопа (10). При длительных измерениях, во избежание запотевания и обмерзания дна кварцевого сосуда, это отверстие защищено лавсановой пленкой (11), расположенной на расстоянии 5–8 мм от дна кварцевого сосуда и обдуваемого теплым (40–60°C) воздухом. Покровное стекло с препаратом (1) крепится к металлической

подставке при помощи упругих стальных зажимов или магнитов. При измерении светопропускания по методу Шибата [33] вместо покровного стекла использовались фторопластовые пластинки толщиной до 0,3–0,5 мм. Препарат при этом находился на расстоянии около 2–3 мм от дна сосуда (3). Конденсор микроскопа (10) в этих условиях может приближаться к препарату на расстояние до 10–15 мм. Для увеличения рабочего расстояния конденсора с него снималась фронтальная линза. Следует заметить, что сильное светорассеяние, создаваемое фторопластовой пластинкой, исключало влияние апертуры конденсора на качество регистрации проходящего света по методу Шибата [33].

Для регистрации спектров флуоресценции и поглощения при 77 К камера заполнялась жидким азотом. Азот при этом испарялся на 1/3 за 1–2 мин. Для стабильной регистрации оптических параметров уровень азота в камере (13) не должен опускаться ниже 8–10 мм. Последующее заполнение камеры могло производиться вручную или автоматически по гибкому шлангу с теплоизоляцией из сосуда Дьюара, внутри которого поддерживалось избыточное давление около 0,3 атм. Датчик уровня жидкого азота в камере (12) управлял клапаном, сбрасывающим этот избыток давления и прекращающим подачу жидкого азота. В качестве датчика уровня жидкого азота использовался светодиод, сопротивление которого резко падает при 77 К. Для получения различных скоростей охлаждения препарата необходимо было варьировать не только давление внутри сосуда Дьюара, но и диаметр, длину, а также качество теплоизоляции шланга.

Регистрацию температуры исследуемого объекта осуществляли с помощью медь-константановой термопары (14), один спай которой, диаметром около 0,15 мм, был расположен в непосредственной близости от регистрируемого участка препарата, другой же был погружен в сосуд с кипящим азотом или тающим льдом. Для быстрого нагрева образца могла использоваться спираль из тонкой вольфрамовой проволоки, расположенная под препаратом.

После непрерывной работы в течение нескольких часов необходимо было провести обезвоживание элементов установки, подверженных конденсации водяных паров. Для этого объектив (2) вместе с теплоизолирующим капролоновым переходником (7) и камера выдерживаются в течение одного–двух часов в сушильном шкафу при 50–60°C.

Следует заметить, что необходимые изменения в оптической схеме микроскопа (сдвиг

положения конденсора, введение теплоизолирующих прокладок между конденсором и камерой для препарата, между объективом и корпусом микроскопа, кипение иммерсионной жидкости) приводят к определенному ухудшению качества изображения. Однако, как следует из рис. 1, качество получаемого изображения вполне удовлетворительно для проведения микроспектральных измерений. В принципе возможно определенное улучшение качества изображения при 77 К за счет использования контактных объективов. Однако использование контактной оптики для целого ряда задач, требующих регистрации оптических параметров нескольких участков препарата последовательно, неприемлемо.

ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА

Важным применением низкотемпературного микроспектрального анализа является изучение гетерогенности клеток в квазиоднородных популяциях [17,21,27,31]. На рис. 3 представлены спектры люминесценции отдельных клеток водоросли *Glaucozystis nostochinearum*, зарегистрированные в одном препарате [27]. Применение жидкого азота в качестве иммерсионной жидкости для сухих объективов отрицательно сказывается на качестве изображения, однако качество спектров люминесценции вполне удовлетворительное (см. рис. 3).

В спектрах люминесценции клеток водоросли отчетливо выявлялись максимумы, характерные для фотосинтетических пигментов хлорофилла и фикобилинов. Спектры клеток при комнатной температуре практически идентичны, в то время как при температуре жидкого азота обнаруживались значительные различия в соотношении интенсивностей люминесценции разных пигментов [17,21,27]. Лишь отчасти это можно объяснить лучшим разрешением полос при низких температурах. Нельзя это явление связать и с различиями в скоростях охлаждения, поскольку клетки находились в монослое между двумя покровными стеклами и были заморожены почти мгновенно за счет погружения в жидкий азот. Полученные результаты позволяют предположить наличие количественных различий в соотношении пигмент-белковых комплексов в разных клетках и особенностей миграции энергии в них. Приведенный результат не имеет универсального характера. Так, низкотемпературные спектры люминесценции отдельных клеток в трихоме цианобактерии *Phormidium uncinatum* очень сходны, и незначительные отличия носят скорее количественный, нежели качественный характер (рис. 4). В то же

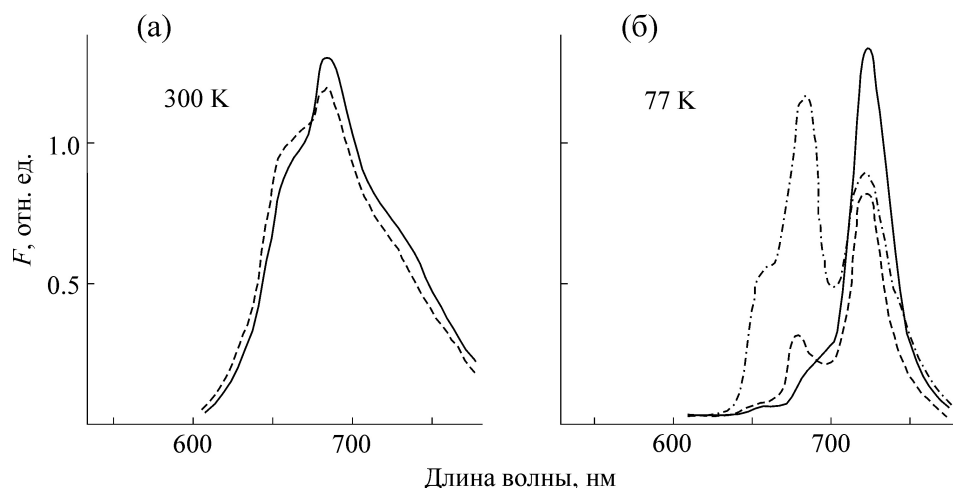


Рис. 3. Спектры люминесценции отдельных клеток *Glaucocystis nostochinearum* (Glaucophyta), зарегистрированные в одном препарате при 300 К (слева) и после быстрого охлаждения до 77 К (справа). Возбуждение 405–436 нм. Объектив $40 \times 0,65$. Диаметр оптического зонда в поле зрения препарата составлял около 3 мкм.

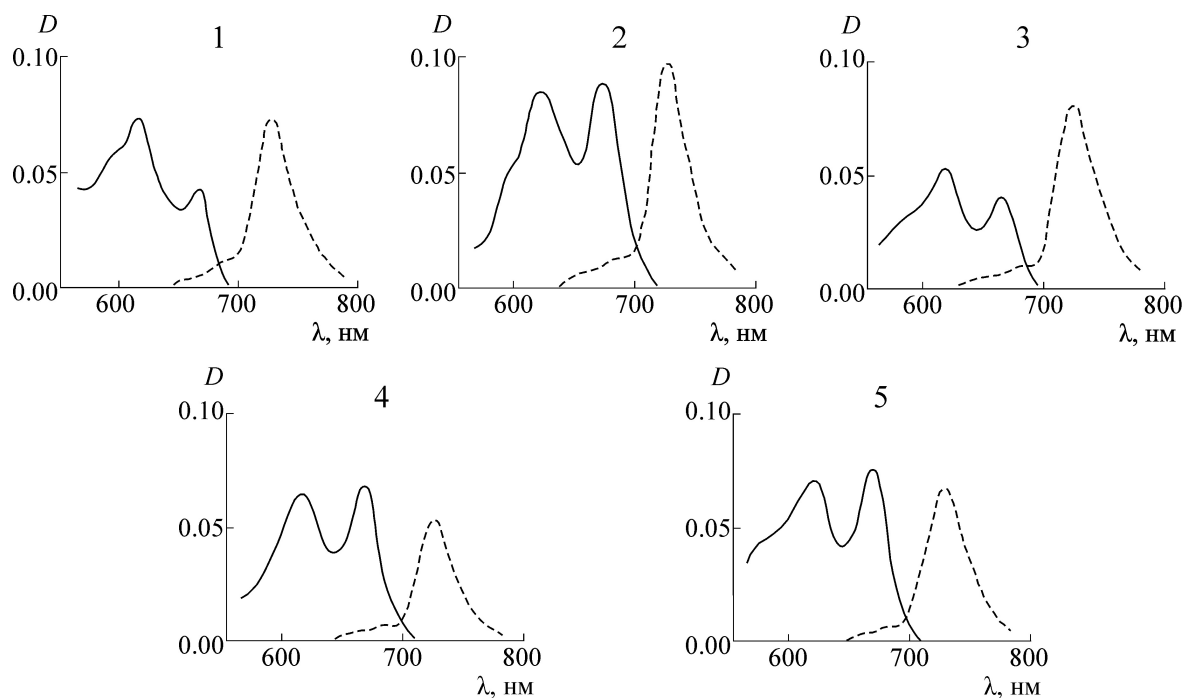


Рис. 4. Спектры поглощения (сплошные линии) и люминесценции (пунктирные линии) различных участков трихома цианобактерии *Phormidium uncynatum* при 77 К. Расположение участков указано на схеме в правом верхнем углу. Цифры над спектрами указывают номера участков на схеме. Спектры поглощения измерены по методу Шибата [33]. Возбуждение 405–436 нм. Объектив ВИ $65 \times 1,1$. Диаметр оптического зонда в поле зрения препарата составлял около 2 мкм.

время низкотемпературные спектры поглощения этих клеток существенно различаются по величине максимумов, принадлежащих хлорофиллу (680 нм) и фикобилинам (620–660 нм) [17,21,27].

Различия в спектрах поглощения свидетельствуют, по-видимому, об эффективной мигра-

ции энергии с фикобилинов на хлорофилл. При нарушении связи фикобилинов с тилакоидными мембранами, например под действием возбуждающего излучения ($\lambda = 435$ нм), в спектрах флуоресценции отчетливо выявляется максимум в области 660 нм, принадлежащий фикобилинам, а интенсивность флуоресценции хлорофилл-

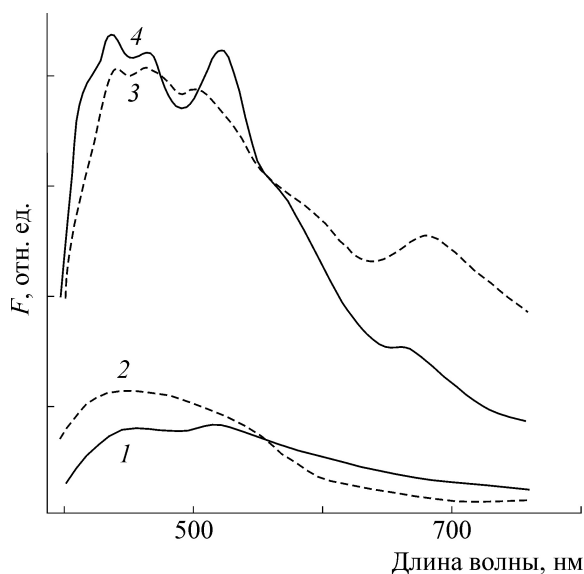


Рис. 5. Спектры люминесценции отдельных клеток слюнной железы (1,3) и нейрона (2,4) моллюска *Lymnaea stagnalis* при 293 К (1,2) и при 77 К (3,4). Возбуждение 365 нм. Объектив $10 \times 0,30$. Диаметр оптического зонда в поле зрения препарата составлял около 13 мкм.

ла падает. Гетерогенность клеток сравнительно слабо выражена в молодых быстро растущих трихомах и резко возрастает при ухудшении условий культивирования и старении культуры. По-видимому, это означает, что она не связана с фазами клеточного цикла, а служит одним из способов сохранения устойчивости ассоциации в ухудшающихся условиях обитания [17,21,31].

Особый интерес представляет исследование низкотемпературных спектров клеток животных. При комнатной температуре спектры люминесценции самых разнообразных клеток мало различаются и форма спектра определяется двумя–тремя слабовыраженными максимумами [18,19,23,24,30,32]. При охлаждении до 77 К в спектрах клеток слюнной железы и нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis* (рис. 5) обнаруживается сложная структура с четырьмя хорошо разрешенными максимумами и двумя плечами. Они находятся главным образом в области 400–550 нм, где флуоресцируют при комнатной температуре восстановленные пиридиннуклеотиды, окисленные флавопротеины [18–20,30], некоторые производные ретиналя [32] и ряд ненасыщенных жирных кислот [23,24].

Идентификация соответствующих люминофоров позволит создать новые перспективные подходы к изучению спектральными методами адаптационных перестроек энергетического метаболизма животных клеток под влиянием кри-

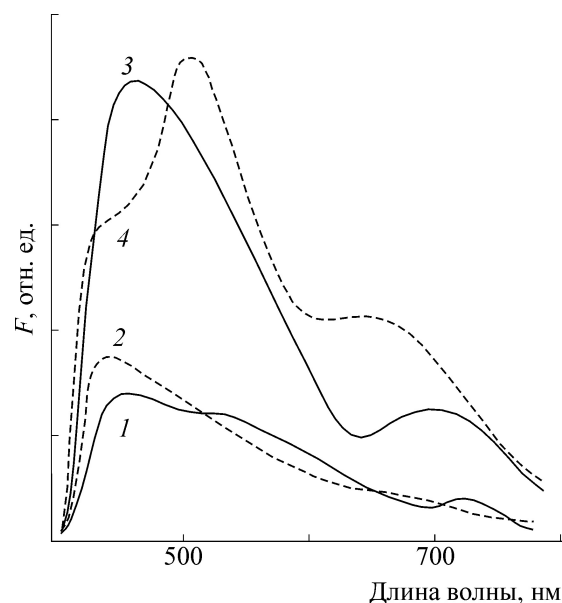


Рис. 6. Спектры люминесценции двухклеточных эмбрионов мыши (1,3) и кардиоцитов быка (2,4) при 293 К (1,2) и 77 К (3,4). Возбуждение 365 нм. Объективы ВИ $30 \times 0,90$ (1,3) и $10 \times 0,30$ (2,4). Диаметр оптического зонда в поле зрения препарата составлял около 4 мкм. Изображения двухклеточных эмбрионов мыши представлены на рис. 1.

опротекторов и при охлаждении. Описанное явление присуще не всем животным клеткам. Так, в низкотемпературных спектрах люминесценции двухклеточных эмбрионов мыши, представленных на рис. 1, в сине-зеленой области выявляется только один неразрешающийся максимум, соответствующий, по-видимому, восстановленным пиридиннуклеотидам (рис. 6).

В спектрах люминесценции кардиоцитов быка выявляется также максимум около 550 нм, принадлежащий липофусциновым гранулам. Максимум в области 550 нм совпадает с максимумом, регистрируемым от фракции этих клеток, обогащенной липофусциновыми гранулами. Более того, широким максимумом в области 550 нм обладают производные ретиналя [32], являющиеся важной составной частью этих гранул. Особый интерес представляют выявляющиеся в низкотемпературных спектрах (рис. 5 и 6) широкие полосы излучения в области 650–750 нм. Предполагается, что эта люминесценция вызвана порфиринами [18,19].

Значительный интерес представляет изучение температурной зависимости интенсивности люминесценции клеток и тканей (см. рис. 7), позволяющее определить в эксперименте параметры температурного тушения согласно выражению:

$$\ln(F_0/F - 1) = \ln C - E/kT.$$

Здесь E – энергия активации, определяющая зависимость скорости безизлучательного перехода от температуры (разность энергий между нижним подуровнем первого возбужденного состояния и точкой пересечения кривых потенциальной энергии возбужденного и основного состояний), F – текущая интенсивность флуоресценции, F_0 – интенсивность в отсутствие тушения, т.е. в области низких температур, k – постоянная Больцмана, T – термодинамическая температура в градусах Кельвина, $C = \text{const}$.

В координатах $\ln(F_0/F - 1)$ и $1/T$ эта зависимость для чистых веществ имеет линейный вид, и по наклону прямой можно оценить величину энергии активации, причем интенсивность люминесценции можно измерять в относительных единицах. Количественная оценка энергии активации – еще один подход к идентификации эндогенных люминофоров. Следует особо отметить, что оценку величины энергии активации люминофоров следует проводить в тех температурных диапазонах, в которых не происходит физико-химических изменений, приводящих к изменению квантового выхода или изменению рассеивающих свойств объекта.

С другой стороны, анализ параметров температурного тушения при работе с клетками позволяет определить температурные интервалы, при которых происходят фазовые или конформационные переходы в исследуемых пигмент-белковых комплексах [17,21,27]. Информация об этих температурных интервалах, а также влияние на них криопротекторов или скоростей охлаждения и отогрева препарата могут способствовать отработке оптимальных режимов криоконсервации [34–38]. Кроме того, определенные сложности при работе с пресноводными организмами могут быть обусловлены кристаллизацией внеклеточного раствора, температура образования льда в котором может быть значительно выше температуры кристаллизации воды в клетке. Некоторые артефакты возникают и при криогенных температурах. После испарения жидкого азота при 77 К или жидкого пропана при 231 К коэффициент преломления среды между фронтальной линзой объектива ($n \approx 1,5$) и объектом резко изменяется от $n = 1,19$ (для азота) или от $n = 1,34$ (для пропана) до $n = 1,00$. При этом резко вырастает светорассеяние на границах раздела сред между витрифицированным объектом, средой и фронтальной линзой объектива.

Представленная на рис. 8 зависимость интенсивности люминесценции 20-суточного эмбриона форели от температуры демонстрирует

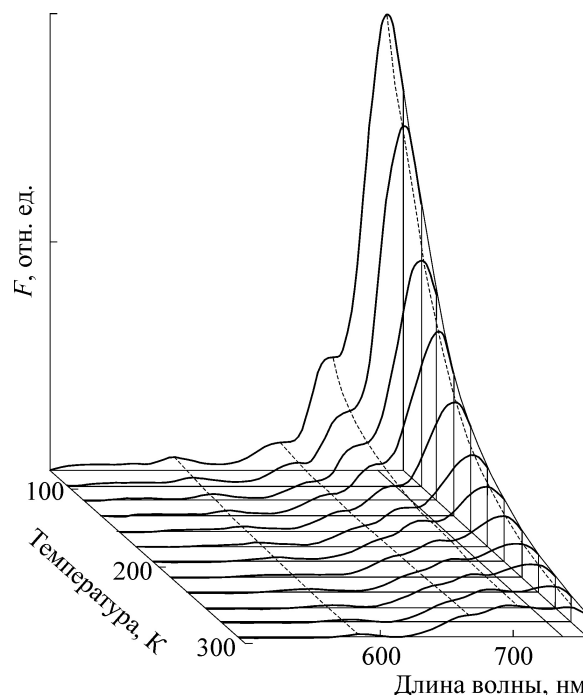


Рис. 7. Зависимости интенсивностей люминесценции одноклеточной синезеленой водоросли *Gloerichia sp.2* от температуры при отогреве препарата со скоростью 3 К/мин. Охлаждение до 77 К проводилось путем заливки жидкого азота в экспериментальную камеру (500 К/мин). Возбуждение 405–436 нм. Объектив ВИ 60 × 1,0. Диаметр оптического зонда в поле зрения препарата составлял около 2 мкм.

усиление интенсивности люминесценции в области 510–540 нм после прогрева эмбриона до 250 К. Интенсивность люминесценции в области 505 нм при нагреве препарата падала в 8,8 раз, а в области 530 нм уменьшалась в 5,7 раз. Эксперименты показали, что температурная зависимость люминесценции клетки или ткани, несмотря на все сложности интерпретации, несет в себе значительную информацию о структуре и молекулярном окружении люминофоров.

На обоих графиках, представленных на рис. 9, выявляются перегибы при $T_1 = 90–100$ К, $T_2 = 120–140$ К, $T_3 = 170–190$ К и $T_4 = 250–260$ К. Предполагается, что при нагревании аморфной стеклоподобной массы от 77 К до 100 К начинается образование кристаллов льда из воды, связанной с пигмент-белковым комплексом. Процессы перекристаллизации внутриклеточной воды происходят в широком диапазоне температур от 100 К до 250 К. Кристаллизация внешней воды, в которой находится эмбрион, выявляется в виде увеличения светорассеяния при $T_4 = 250–260$ К. Изучение влияния криопротекторов на поведение объекта в этих тем-

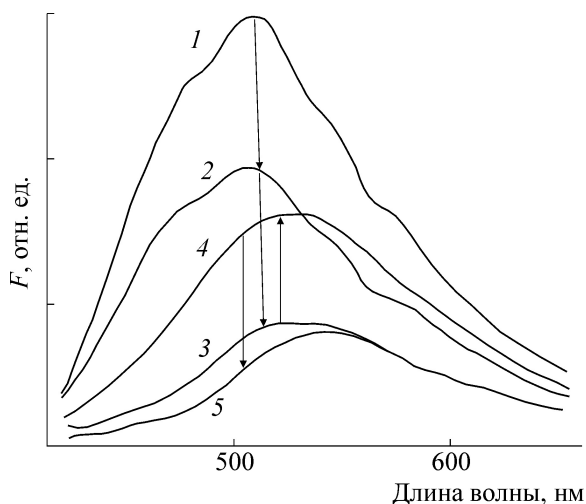


Рис. 8. Эволюция спектра собственной люминесценции 20-суточного эмбриона радужной форели *Salmo gairdneri* Richardson от температуры после быстрого замораживания (150–180 К/мин) и медленного нагревания со скоростью 3–5 К/мин. Возбуждение 365 нм. Объектив ОК 10 × 0,30. Диаметр оптического зонда в поле зрения препарата составил 13 мкм.

пературных диапазонах должно определять направление будущих исследований.

Проблемы криоконсервации отдельных клеток и даже целых эмбрионов существуют не только в современной медицине, где разработаны различные протоколы криоконсервации эмбрионов человека, но и для сохранения редких и исчезающих видов животных и растений.

В последние годы в криобиологии интенсивно развивается новое направление – быстрая витрификация, вытесняющее традиционно используемое медленное замораживание в присутствии различных криопротекторов [37]. Оптимизация режимов криоконсервации обычно сводится к подбору скоростей охлаждения и нагревания с разными комбинациями проникающих и непроникающих криопротекторов. Тестирование множества возможных режимов криоконсервации предлагается проводить с использованием описанной криоприставки по изменению температур фазовых переходов, регистрируемых при охлаждении и нагреве препарата (см. рис. 9).

Предварительные эксперименты, представленные на рис. 10, выявили влияние криопротектора диметилсульфоксида на форму спектров флуоресценции спермы форели. В этих экспериментах каплю спермы наносили на контактный объектив, который после регистрации спектра при 290 К погружался в жидкий азот. Спектр при 77 К регистрировали через 2–3 минуты после погружения в жидкий азот.

Инкубация с диметилсульфоксидом приводила к падению интенсивности люминесценции при 290 К без существенного изменения формы спектра, что можно объяснить изменением светорассеяния, вызванного уменьшением подвижности сперматозоидов и, следовательно, уменьшением их плотности. Отметим, что в этих экспериментах диаметр оптического зонда в поле зрения препарата многократно превосходил размеры отдельного сперматозоида и уменьшение интенсивности люминесценции можно объяснить уменьшением плотности активно движущихся сперматозоидов. Однако существенное различие низкотемпературных спектров свидетельствует о значительных изменениях в структуре и метаболизме спермы. Характерно, что после инкубации с диметилсульфоксидом сперма необратимо теряла не только оплодотворяющую способность, но и подвижность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение флуоресцентных изображений витрифицированного образца в видимом свете имеет ряд преимуществ перед измерениями при комнатной температуре:

1. Флуоресцентное изображение витрифицированного образца может использоваться как для совмещения с картиной, полученной методами электронной или рентгеновской микроскопии [1,3,6], так и самостоятельно, в частности, для анализа температурной зависимости флуоресценции.

2. Быстрая витрификация биологических образцов приводит к значительно меньшим нарушениям структуры, чем методы химической фиксации [39].

3. Интенсивность как собственной люминесценции, так и флуоресцентных зондов при охлаждении до температуры жидкого азота увеличивается в 5–10 раз, а ширина отдельных полос в спектрах люминесценции уменьшается [40]. Использование узкополосных интерференционных светофильтров для флуоресцентных зондов улучшает отношение сигнал–шум получаемого изображения [14].

Предложена простая конструкция криомикроскопа, которая позволяет проводить разнообразные спектральные исследования микрообъектов при охлаждении вплоть до температуры жидкого азота. Простота предложенной конструкции обязана, в первую очередь, способности серийно выпускаемых отечественных объективов ЛОМО переносить значительные перепады температур без нарушения оптических характеристик. Описанное устройство может

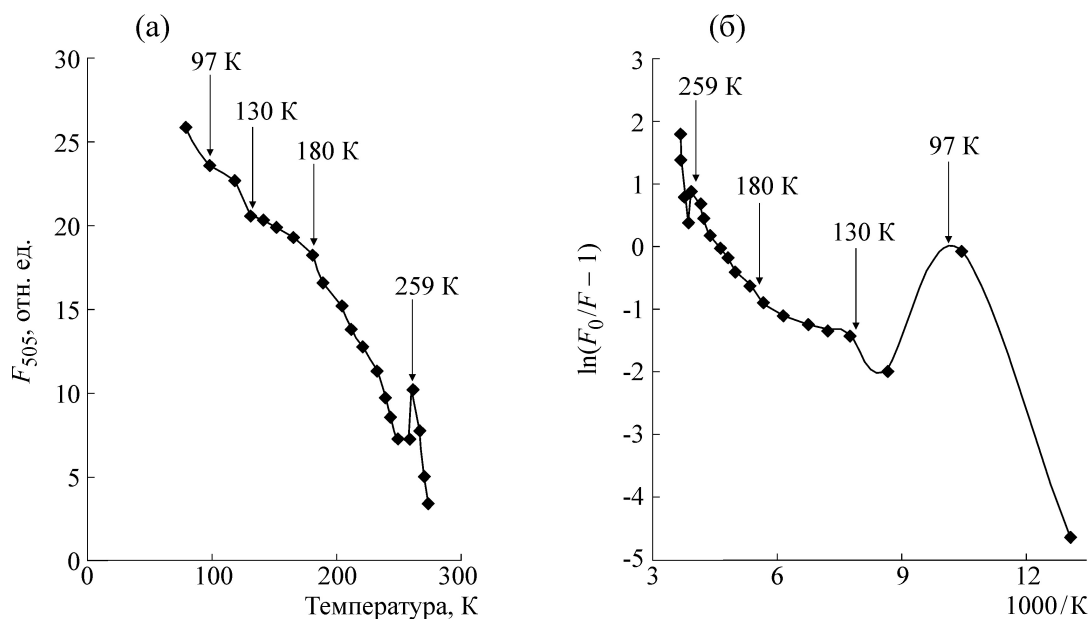


Рис. 9. Анализ температурной зависимости интенсивности люминесценции в области 505 нм для 20-суточного эмбриона радужной форели *Salmo gairdneri* Richardson. Возбуждение 365 нм. Объектив ОК 10x0,30. Диаметр оптического зонда в поле зрения препарата составлял 13 мкм. (а) – Зависимость интенсивности люминесценции в области 505 нм от температуры после быстрого замораживания (150–180 К/мин) и медленного нагревания со скоростью 3–5 К/мин. (б) – Анализ температурного тушения собственной люминесценции в области 505 нм в координатах $\ln(F_0/F - 1)$ и $1000/T$.

найти применение во всех областях, где в настоящее время используется микроспектральный анализ, а также в криобиологии для отработки оптимальных режимов замораживания и размораживания различных клеток с целью криоконсервации.

Поводом для настоящей публикации послужила статья исследователей из Калифорнии, опубликованная в 2009 г. Авторы восхищаются возможностями стандартных микрообъективов многократно выдерживать длительное пребывание в жидком азоте [3]. Напомним, что наши первые эксперименты по регистрации собственной люминесценции растительных и животных клеток посредством погружения серийных объективов производства ЛОМО в жидкий азот были проведены еще в 1988–1991 гг. [17,21,27]. Остается только сожалеть, что идея использования стандартных объективов с жидким азотом в качестве иммерсионной жидкости не была востребована более 20 лет. Более того, рассмотренные выше, а также современные методы анализа спектров собственной люминесценции клеток [41,42] по информативности могут конкурировать с методами флуоресцентных зондов при создании, совместно с методами электронной микроскопии, виртуального 3D-изображения объекта.

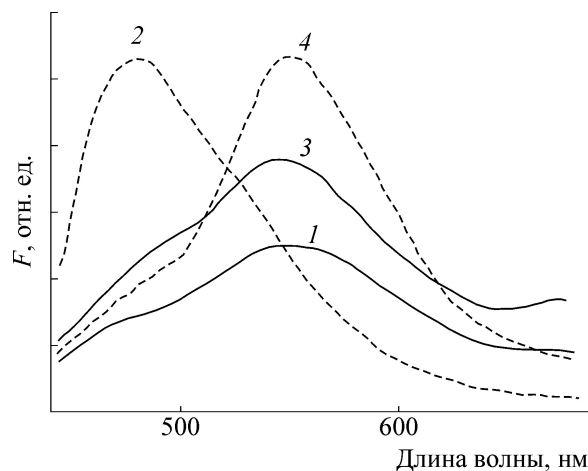


Рис. 10. Спектры собственной люминесценции спермы форели: интактной (1,2) и инкубированной с диметилсульфоксидом (10%) в течение одного часа при 273 К (3,4). Спектры (1,3) регистрировались при одинаковом усилении при 293 К, а спектры (2,4) – при 77 К. Объектив ОК 10 × 0,3. Диаметр оптического зонда в поле зрения препарата составлял 13 мкм.

Автор выражает искреннюю благодарность В.Н. Карнаухову и всем сотрудникам лаборатории микроспектрального анализа клетки ИБФ АН СССР (в настоящее время – ИБК РАН) за поддержку идеи и конструктивные замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. B. Carlson, J. Gelb, V. Palshin, and J. E. Evans, *Microsc Microanal.* **19** (1), 22 (2013).
2. F. G. Faas, M. Bárcena, A. V. Agronskaia, et al., *J. Struct. Biol.* **181** (3), 283 (2013).
3. M. A. Le Gros, G. McDermott, M. Uchida, et al., *J. Microscopy.* **235** (1), 1 (2009).
4. C. L. Schwartz, V. I. Sarbash, F. I. Ataulakhanov, et al., *J. Microsc.* **227** (2), 98 (2007).
5. A. Sartori, R. Gatz, F. Beck, et al., *J. Struct. Biol.* **160** (2), 135 (2007).
6. L. F. van Driel, J. A. Valentijn, K. M. Valentijn, et al., *Eur. J. Cell Biol.* **88** (11), 669 (2009).
7. E. A. Smith, B. P. Cinquin, M. Do, et al., *Ultramicroscopy* **7** (2013).
8. I. Hurbain and M. Sachse, *Biol. Cell.* **103** (9), 405 (2011).
9. F. Braet, E. Wisse, P. Bomans, et al., *Microsc. Res. Tech.* **70** (3), 230 (2007).
10. B. P. Cinquin, M. Do, G. McDermott, et al., *J. Cell Biochem.* **115** (2), 209 (2014).
11. M. D. Cosman, M. Toner, J. Kandel, and E. G. Cravalho, *Cryo-Lett.* **10**, 17 (1989).
12. P. Echlin, in: *Low-temperature microscopy and analysis* (Science & engineering library, Plenum Press, 1992), pp. 265–293.
13. C. Korber, S. Englich, P. Schwindke, et al., *J. Microscopy* **141**, 263 (1986).
14. M. A. Le Gros, G. McDermott, and C. A. Larabell, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 593 (2005).
15. J. J. McGrath, in: *The effect of low temperature on biological systems*, Ed. by B.W.W. Grout, G.J. Morris, Edward Arnold (Publisher) (Ltd, 1987), pp. 234–267.
16. D. Y. Parkinson, G. McDermott, L. D. Etkin, et al., *J. Struct. Biol.* **162**, 380 (2008).
17. К. Б. Асланиди, Т. В. Потапова и А. А. Шалапенюк, в сб.: *Люминесцентный анализ в медицине и биологии и его аппаратное обеспечение* (Юрмала, Латвия, РМИ, 1988), сс. 6–7.
18. В. Н. Карнауков, *Люминесцентный микроспектральный анализ клетки* (Наука, М., 1978).
19. В. Н. Карнауков, *Спектральный анализ клеток в экологии и охране окружающей среды* (Клеточный биомониторинг) (Пушино, ОНТИ НЦБИ, 1988).
20. В. М. Пахомова, Л. Х. Гордон и К. Б. Асланиди, *Физиология растений* **32** (5), 948 (1985).
21. К. В. Aslanidi and A. A. Shalapionok, In *Intercellular communication, Proceedings in nonlinear science* (Manchester University Press, 1991), pp. 12–23.
22. П. М. Шварцбург, К. Б. Асланиди и В. Н. Карнауков, *Биофизика* **34** (4), 593 (1989).
23. P. M. Shvartzburd and K. B. Aslanidi, *Medical Oncol. & Tumor Pharmacother.* **8**, 57 (1991).
24. P. M. Shvartzburd and K. B. Aslanidi, *Medical Oncol. & Tumor Pharmacother.* **8** (4), 235 (1991).
25. M. W. Scheiwe and C. Korber, *Cryobiology* **24**, 473 (1987).
26. D. B. Carlson and J. E. Evans, *J. Vis. Exp.* **5** (52), 2909 (2011).
27. К. Б. Асланиди и А. А. Шалапенюк, *Криомикроскоп для спектральных измерений при сверхнизких температурах*. Деп. ВИНТИ, 19.04.88. № 2967-B88 (М., 1988).
28. К. Б. Асланиди, Н. Г. Берестовская, В. Н. Карнауков и А. А. Шалапенюк, в сб. *Информационные проблемы изучения биосферы* (М., Наука, 1988), сс. 164–169.
29. К. Б. Асланиди, А. А. Шалапенюк, В. Н. Карнауков и др., *Метод определения функционального состояния растений по спектрам флуоресценции хлорофилла* (Техника биомониторинга) (Пушино, ОНТИ НЦБИ, 1988).
30. К. Б. Асланиди и А. Р. Чубаков, *О некоторых механизмах регуляции мембранного потенциала клеток нейроглии в условиях культивирования* (Пушино, ОНТИ НЦБИ, 1981).
31. Т. В. Потапова, К. Б. Асланиди, А. А. Шалапенюк и др., *Докл. АН СССР* **289** (6), 1504 (1986).
32. P. M. Shvartzburd and K. B. Aslanidi, *Biomed. Sci.* **2**, 391 (1991).
33. K. Shibata, *J. Biochem. (Tokyo)*. **45**, 599 (1958).
34. P. Butko and L. Szalay, **21** (4), 391 (1986).
35. B. W. W. Grout and G. J. Morris, *The effect of low temperature on biological systems* **147** (1987).
36. G. Harnischfeger, *Adv. Botani. Res.* **5**, 1 (1977).
37. V. Isachenko, J. L. Alabart, M. Dattena, et al., *Theor. Biogenology* **59**, 1209 (2003).
38. M. Kasai and T. Mukaida, *Reprod. Biomed. Online.* **9** (2), 164 (2004).
39. J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, et al., *Rev. Biophys.* **21**, 129 (1988).
40. W. E. Moerner and M. Orrit, *Science* **283**, 1670 (1999).
41. V. V. Roshchina, *Fluorescing World of Plant Secreting Cells* (Science Publishers, USA, 2008).
42. V. V. Roshchina, V. A. Yashin, A. V. Yashina, and M. V. Goltyaev, *Allelopathy* **17**, 1 (2012).

Spectral Measurements of Functional Heterogeneity of Cells and Their Organelles

К.В. Aslanidi

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The microspectral analysis technique was used to identify molecular components of a number of plant and animal cells. This technique allows of performing optical measurements during freezing down to the temperature of liquid nitrogen. Revealed biochemical heterogeneity suggests functional specialization of individual cells within a population. Analysis of the fluorescence quenching revealed temperature intervals in which processes of recrystallization of intracellular water associated with specific pigment–protein complexes take place. A proposed experimental approach may find its application in correlation microscopy and also in cryobiology in order to search after optimal modes for the freezing and thawing of cryopreserved cells.

Key words: cryogenic microscopy, spectrum, fluorescence, absorption, cryobiology