

На правах рукописи

Кутузов Николай Павлович

МЕТОД МИКРОСПЕКТРОСКОПИИ
КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ ДЛЯ
ИССЛЕДОВАНИЯ СВОЙСТВ МИЕЛИНА
НЕРВНЫХ ВОЛОКОН

03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2016

Работа выполнена на кафедре биофизики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель:

Максимов Георгий Владимирович

доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научный консультант:

Рубин Андрей Борисович

доктор биологических наук, заведующий кафедрой биофизики биологического факультета МГУ, профессор, член-корр. РАН

Официальные оппоненты:

Сури́н Алекса́ндр Миха́йлович

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, г. Москва

Вишняков Геннадий Николаевич

доктор технических наук, профессор, руководитель научно-исследовательской лаборатории отделения «голографии, оптической томографии, нанотехнологий и наноматериалов» в федеральном государственном унитарном предприятии «Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений», г. Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П.Огарёва", факультет биотехнологии и биологии, г. Саранск, Мордовия.

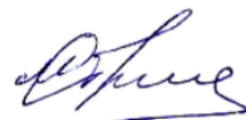
Защита состоится «___» _____ 2017 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском государственном университете имени М. В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.24, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и на сайте: <http://istina.msu.ru/dissertations/38220643/>

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

М. Г. Страховская



Общая характеристика работы

Актуальность темы. Важным направлением современной биофизики является исследование изменений структуры и свойств миелина при проведении нервным волокном потенциалов действия (ПД). Известно, что миелин содержит большое количество липидов и шунтирует распространение мембранных токов из перехвата Ранвье (ПР) в паранодальную область волокна. В связи с этим миелину отводится важная роль в реализации сальтаторного механизма и обеспечении высокой скорости проведения ПД [Tasaki 1994]. Однако, и при проведении нервным волокном серии ПД или активации ряда рецепторов меняется как морфология миелина, так и содержание в нем некоторых ионов (калий и кальций), а также упорядоченность мембранных фосфолипидов [Harden et al., 1994, Maksimov et al., 1996].

Приоритетами в данной области являются работы, в которых использовали спектроскопию комбинационного рассеяния (КР) для исследования состояния некоторых липидов миелина нервных волокон [Larsson 1973], а также работы, в которых с помощью КР исследовали изменения состояния липидов миелина при проведении серии ПД [Szalontai et al., 1977; Maximov et al., 1985; Rodionova et al., 2009; Bibinesvilli et al., 2011].

Однако, использование микроскопии показало, что при регистрации КР от различных отделов одиночного миелинового нервного волокна (миелин, перехват Ранвье, шванновская клетка (ШК)) исследователь сталкивается с целым рядом существенных проблем, требующих детального изучения.

Во-первых, размер фокального объема (объем пространства, в пределах которого регистрируется КР) становится сравнимым с размером самого объекта: если различные отделы волокна отличаются по спектру КР, то необходимо однозначным образом задать координаты измерения.

Во-вторых, наличие в миелине нервного волокна «природной метки» — молекул каротиноидов представляет собой не только научный интерес [Rodionova et al., 2009], но и возможность для создания новой методологии тестирования состояния липидного бислоя мембран миелина. Важно, что в зависимости от химической структуры молекулы каротиноидов, они могут быть различным образом ориентированы в липидных мембранах [Gruszecki et al., 2005]: некоторые каротиноиды могут располагаться перпендикулярно к плоскости бислоя за счет взаимодействия концевых полярных групп с

полярными головами фосфолипидов, другие (неполярные каротиноиды) могут быть ориентированы как перпендикулярно, так и параллельно бислою мембран миелина. Все это позволит разработать новый метод исследования состояния биологической мембраны.

В-третьих, ориентация молекул каротиноидов в липидном бислое может по-разному влиять на упорядоченность «хвостов» жирных кислот мембранных липидов и, наоборот, что регулирует электрическое сопротивление миелина и скорость проведения ПД [Gruszecki et al., 2005]. В связи с этим нами было проведено исследование роли локальной ориентации молекул каротиноидов и жирных кислот липидов в мембранах миелина при изменении функционального состояния нервного волокна (активация пуринергических рецепторов ШК).

Целью данной работы была разработка методологии исследования изменений локализации, ориентации и конформации молекул липидов и каротиноидов в миелине в покое и при изменении функционального состояния нервного волокна.

В связи с целью исследования было необходимо решить следующие **задачи**:

1. Разработать методологию регистрации спектров КР от одиночных миелиновых нервных волокон (фокусировка, поляризации лазера, разделение сигналов КР и флуоресценции).
2. Зарегистрировать КР спектры в различных областях нервного волокна (перехват Ранвье, паранодальная и интернодальная области).
3. Разработать методологию регистрации и количественной оценки упорядоченности молекул каротиноидов и липидов в бислоях миелина.
4. Исследовать изменения локализации, ориентации и конформации молекул каротиноидов и липидов в миелине нервного волокна в норме и при изменении функционального состояния нервного волокна (действие экстраклеточного АТФ и аденозина).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Молекулы каротиноидов миелина находятся в упорядоченном состоянии и ориентированы преимущественно перпендикулярно к по-

верхности, а «хвосты» жирных кислот мембранных липидов — в среднем под углом 30° к нормали к поверхности мембраны.

2. Степень упорядоченности и насыщенности жирных кислот липидов варьирует в пределах интернодальной области миелина нервного волокна.
3. Активация пуриnergических рецепторов, вызывает изменение содержания холестерина и фосфатидилхолина (ФХ), а также упорядоченности и степени насыщенности «хвостов» жирных кислот липидов в мембранах миелина.

Научная новизна:

1. Впервые разработана методология и проведен количественный анализ ориентации молекул каротиноидов и липидов миелина нервных волокон с помощью метода КР и доказано, что молекулы каротиноидов ориентированы преимущественно перпендикулярно, а «хвосты» жирных кислот в среднем под углом 30° к нормали к поверхности мембраны.
2. Впервые обнаружено явление распространения монохроматического излучения внутри миелина и предложен способ его использования для исследования упорядоченности липидов в различных участках вдоль миелина.
3. Доказано, что интернодальная область нервного волокна представляет собой совокупность участков миелина, обладающих различной степенью упорядоченности и насыщенности «хвостов» жирных кислот мембранных липидов.
4. Разработан комплексный подход (КР спектроскопии и масс-спектрометрии) исследования миелина и доказано, что холестерин накапливается в мембранах миелина в ответ на активацию *P2* пуриnergических рецепторов.

Практическая значимость В диссертации систематизированы экспериментальные подходы и реализована методология регистрации спектров КР для исследования миелина в нативных нервных волокнах. Доказана существенная роль локализации фокуса и направления плоскости поляризации лазера при измерении КР, а применение поляризованной спектроскопии КР существенно повышает эффективность исследования и интерпретации ре-

зультатов. Впервые обнаружена способность миелина осуществлять распространение монохроматического света аналогично кольцевому микрорезонатору, и предложен метод использования данного эффекта для тестирования упорядоченности липидов вдоль поверхности миелина.

Получены результаты, свидетельствующие о том, что изменение упорядоченности липидов и химического состава миелина может быть вызвано активацией P2 пуриnergических рецепторов. Доказано, что комплексное использование методов КР спектроскопии и масс-спектрометрии позволяет выявить не только изменения упорядоченности и конформации липидов и каротиноидов, но и изменения химического состава мембран миелина. Полученные данные указывают на то, что сопротивление миелина и, соответственно, скорость проведения ПД по аксону могут зависеть от ориентации и упорядоченности некоторых мембранных липидов миелина.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались на: семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ, Российских и международных конференциях: «Ломоносов-2011», «Метрология в нанотехнологиях» и «GLIA Bilbao 2015».

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 6-ти печатных изданиях, 4 из которых изданы в журналах, рекомендованных ВАК [1–4], 2 — в тезисах докладов [5;6].

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и двух приложений. Полный объем диссертации составляет **172** страницы текста с **38** рисунками и **4** таблицами. Список литературы содержит **151** наименований.

Содержание работы

Во **введении** и первой главе («Обзор литературы») обоснована актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, формулируется цель, ставятся задачи работы. Обзор литературы систематизирует современные представления о микроструктуре миелина, дает теорию метода КР спектроскопии.

В **Обзоре литературы** анализируются современные данные, полученные с помощью электронной микроскопии и метода рентгеновской дифрактометрии, свидетельствующие о наличии в интернодальной области

нервных волокон участков, отличающихся по составу белков и упаковке ламелл миелина [Inouye 2014], где меняется цилиндрически-симметричная упаковка слоев миелина и формируется локальная микрогетерогенность структуры миелина. Исследование свойств таких структур важно не только для понимания роли миелина при проведении ПД, но и для разработки более эффективных оптических методов тестирования нервных клеток. Заключительный раздел обзора литературы посвящен описанию механизма функционирования пуринергических рецепторов, активируемых АТФ, АДФ и АМФ [Grafe 2006].

Вторая глава содержит описание объекта и методов, а также используемых реактивов, процедуры приготовления препаратов и обработки полученных данных.

Объект исследования.

Объектами исследования служили изолированные миелиновые нервные волокна лягушки (*Rana temporaria*), инкубированные в растворе Рингера, (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.08 mM CaCl₂, 10 mM HEPES), а способность генерировать ПД которых проверяли с помощью экстраклеточного отведения при стимуляции нерва прямоугольными импульсами электрического тока (амплитуда — 0.5–0.8 В, частота стимуляции — 20 Гц, длительность импульса — 0.3 мс).

Микроспектроскопия комбинационного рассеяния (КР).

Регистрацию спектров КР осуществляли с помощью системы WITec alpha-300, включающую ближнепольный микроскоп, атомно-силовой микроскоп, конфокальный микроскоп и КР спектрометр. Система оборудована ND:YAG непрерывным твердотельным лазером с длиной волны 532 нм. Линейно поляризованный свет фокусировался на объекте с помощью 20X (NA=0.4) или 50X (NA=0.8) объективов. Средняя используемая мощность лазера на выходе из объектива составляла около 0.5 мВт, а время накопления одиночных спектров варьировалось от 10 сек до 2 мин.

Для регистрации ориентации молекул в миелине на объект подавали плоско-поляризованный луч лазера, а КР детектировали с помощью анализатора (фильтр, пропускающий свет строго определенной поляризации). Из параметров КР спектров рассчитывались величины интенсивностей полос и их отношения: I_{1527}/I_{1160} (I_1), которое соответствует доле C=C и C—C колеба-

ниям в молекулах каротиноидов [Szalontai 1977, Maksimov 1995] I_{1655}/I_{1440} (I_2) соответствует доле $C=C$ и $C-C$ колебаний «хвостов» жирных кислот липидов [Wu 2011] и I_{2884}/I_{2932} (I_3) соответствует доле несимметричных и симметричных колебаний метиленовых групп липидов [Szalontai 1977, Maksimov 1995].

Масс-спектрометрия В работе использовался TOF-SIMS тип масс-спектрометрии (МС) с пульсирующим сфокусированным первичным потоком 30 кэВ Bi_3^+ ионов. Первичный ионный ток составлял 0.5 пА, что соответствует ионной плотности 2.5×10^{11} ионов/см². Площадь поверхности, с которой происходила регистрация сигнала составляла 500×500 мкм² (128×128 пикселей). Выход ионов рассчитывался как отношение интенсивности спектрального пика к общему числу ионов.

Третья глава посвящена описанию результатов и их обсуждению.

Особенности КР спектроскопии одиночных нервных волокон.

В данной серии экспериментов исследовано распределение величины интенсивностей полос спектра КР липидов и каротиноидов в трех основных отделах миелинизированного нервного волокна: перехвате Ранвье, интернодальной и паранодальной областях (Рис 1).

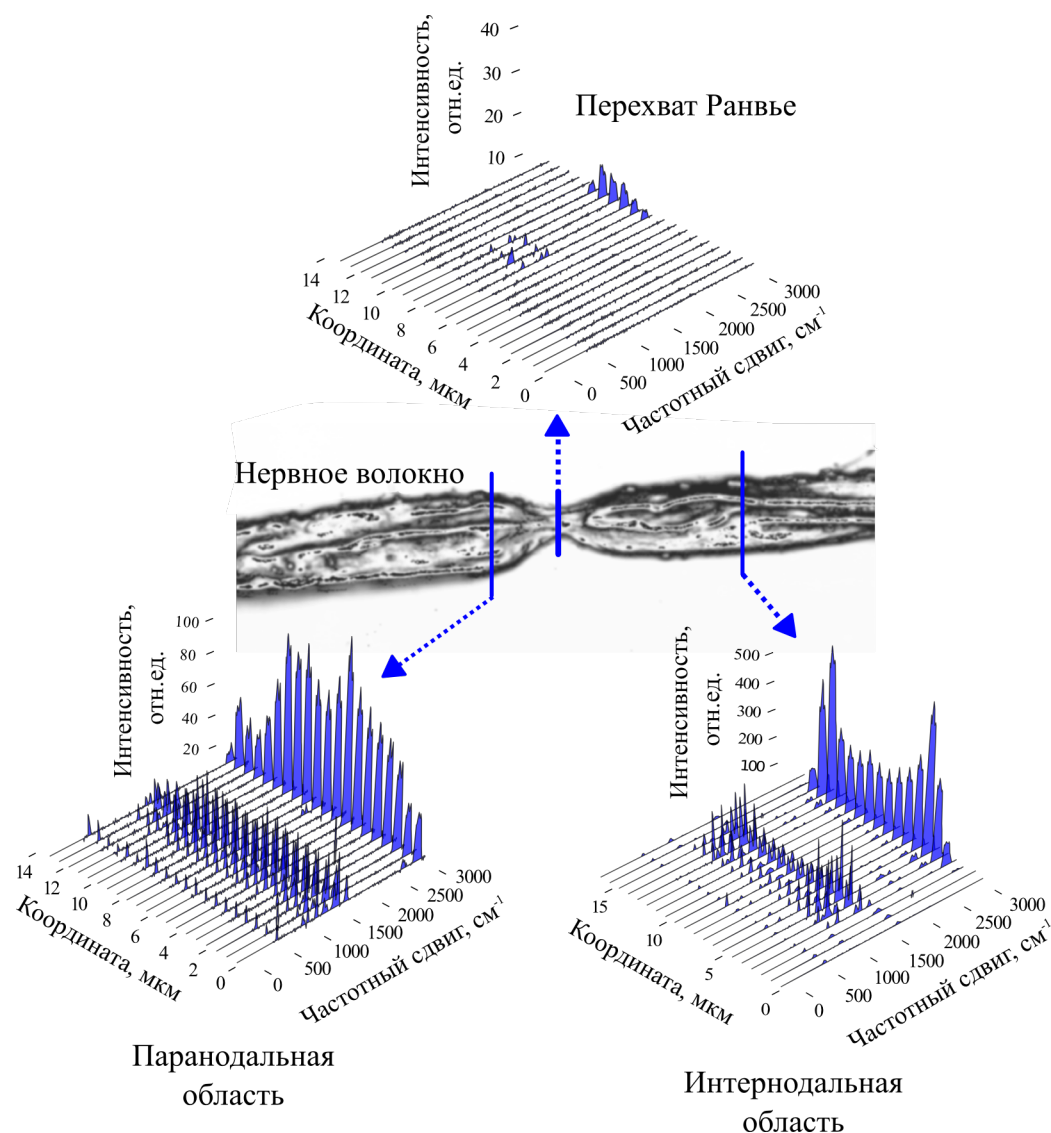


Рис. 1 — Распределение величины интенсивности КР в перехвате Ранвье, интернодальной и паранодальной областях миелинового нервного волокна.

Установлено, что в аксолементе перехвата Ранвье интенсивность КР была существенно ниже, чем в миелине, а в интернодальной области волокна сигнал был симметричным относительно центра с выраженными максимумами интенсивности КР на краях волокна. Известно, что фокальный объем вытянут в направлении, перпендикулярном плоскости измерения, поэтому на краю волокна максимальное количество миелина локализовано именно внутри фокального объема, что и сопровождается значительным КР. В паранодальной области пространственная упаковка слоев миелина другая, в результате чего расположение отдельных мембран миелина относительно друг друга и распределение величины интенсивности полос спектров КР становится нерегулярным (Рис 1).

Исследование распределения спектров КР вдоль интерно- дальной области миелина.

В следующей серии экспериментов исследовали распределение интенсивности КР вдоль интернодальной области миелина нервного волокна, что важно для сопоставления полученных данных при регистрации КР в различных отделах миелина.

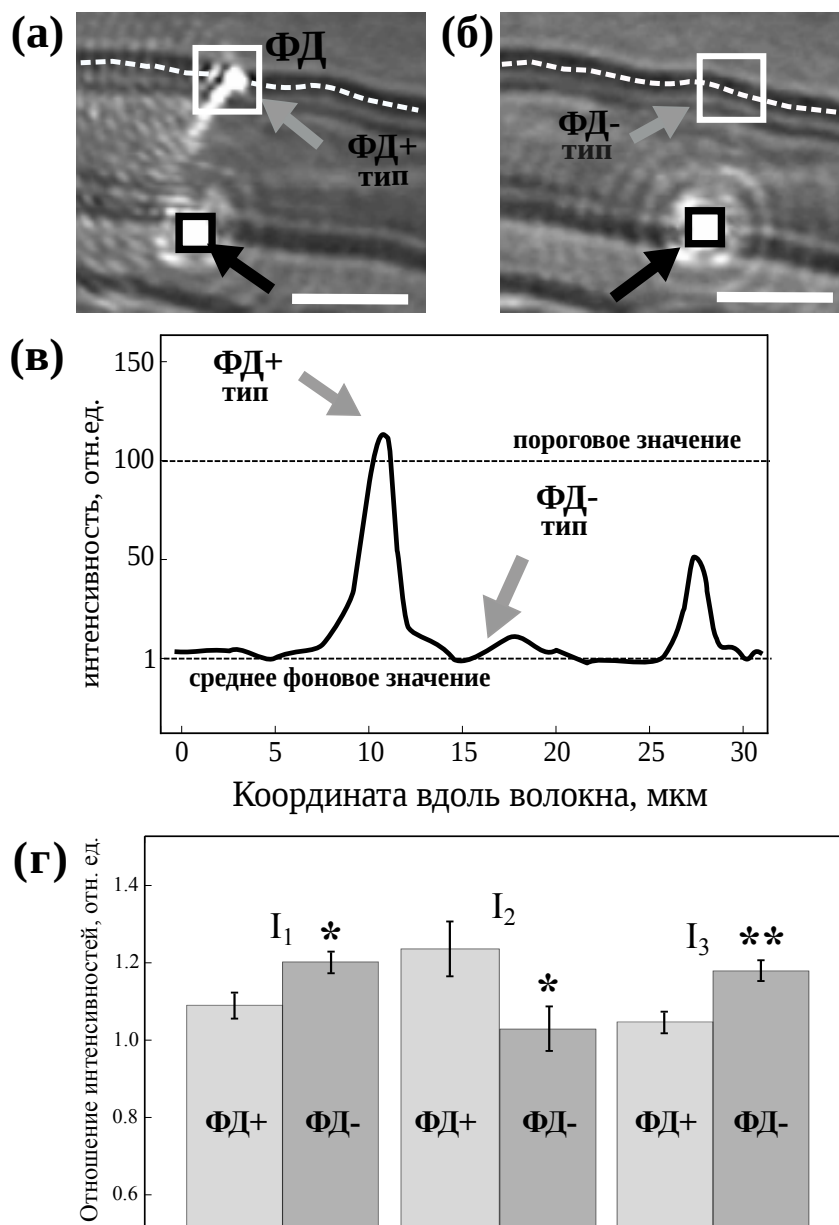


Рис. 2 — Эффективность кольцевого распространения монохроматического света вдоль миелина нервного волокна (а,б). Профиль распределения интенсивности ФД по длине волокна (в). Параметры спектра КР в участках ФД+ и ФД- типов (г). Черные стрелки и квадраты обозначают место фокусировки лазера, серые стрелки и белые квадраты — ожидаемое место возникновения ФД.

При фокусировке лазера на определенных участках интернодальной области нервного волокна нами впервые был обнаружен эффект появления второго «пятна» лазера (обозначаемого в дальнейшем как ФД — фокальный дублет) в миелине с противоположной стороны волокна (эти участки обозначим как ФД+ тип, а где данное явление отсутствует, будут называться участками ФД— типа). На Рис 2(а, б) представлены оптические изображения нервного волокна с сфокусированным на миелине лазером (черная стрелка) на участках ФД+ и ФД— типов, соответственно. Перемещая положение фокуса луча лазера вдоль волокна и регистрируя интенсивность ФД с противоположной стороны волокна (в пределах белого квадрата на Рис 2), получили распределение интенсивности ФД вдоль волокна (Рис 2(в)).

Для того, чтобы выявить природу различий состояния липидов в данных участках миелина мы регистрировали спектры КР в областях ФД+ и ФД— типов. Установлено, что участки ФД— типа характеризуются более высокой степенью упорядоченности и насыщенности «хвостов» жирных кислот липидов (Рис 2(г)). Вероятно, в случае липидных бислоев с низкой степенью упорядоченности «хвостов» жирных кислот мембранных липидов, формирование плотных контактов между соседними слоями миелина затруднено, по сравнению с участками ФД— типа. По-видимому, снижение локальной упорядоченности «хвостов» жирных кислот липидов миелина отражает наличие участков с оптической неоднородностью и появлению «центров рассеяния» света внутри слоев миелина (Рис 2(а)). Мы не ставили перед собой задачу изучить природу обнаруженной гетерогенности оптического сигнала в миелине, но считаем важным, что при разработке методологии исследования состояния липидов миелина при различных условиях функционирования нервного волокна этот факт необходимо учитывать и регистрировать КР только от участков ФД— типа (область максимальной упорядоченности «хвостов» жирных кислот мембранных липидов)

Исследование ориентационной упорядоченности каротиноидов и липидов в мембранах миелина.

Одной из задач исследования было использование принципов теории молекулярной ориентации к анализу спектров КР нативных нервных волокон. Основное различие между измерениями клеток такого типа и макрообъектов состоит в том, что размер фокального объема соизмерим с разме-

ром самой клетки. Последнее приводит к тому, что становится необходимо выяснить, каким образом исследуемая молекула ориентирована по отношению к липидному бислою. В связи с этим мы регистрировали спектры КР нервных волокон с различными положениями плоскости поляризации лазера относительно волокна, а также регистрировали сигнал при фиксированной плоскости поляризации (Рис 3).

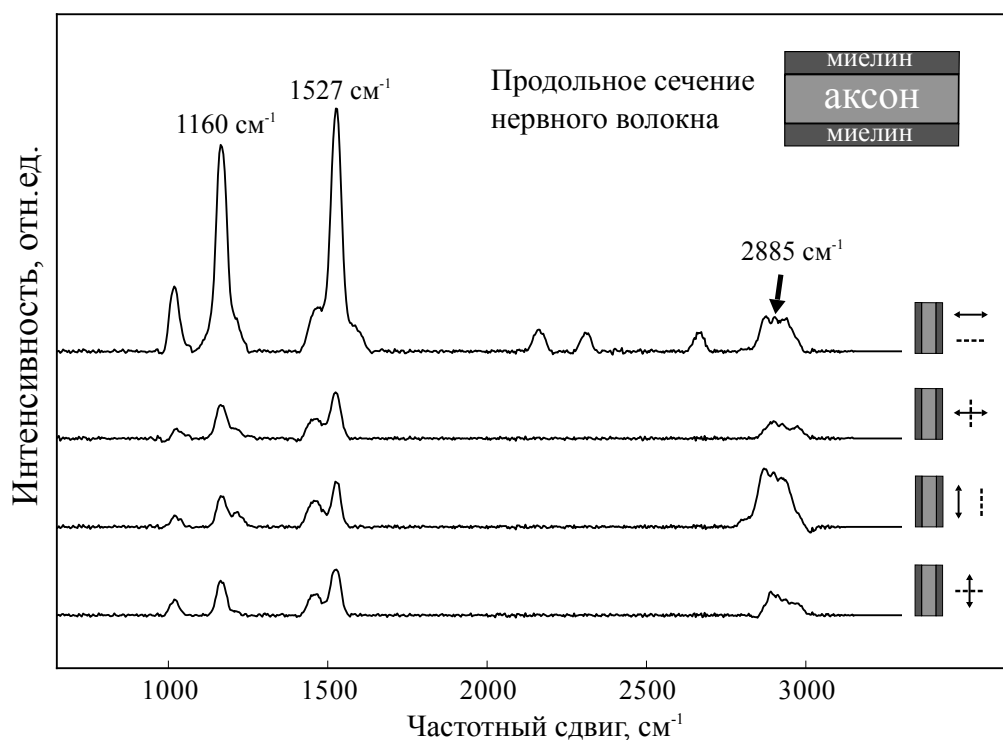


Рис. 3 — Спектры КР миелина, полученные при использовании различной ориентации поляризатора (сплошная двойная стрелка) и анализатора (пунктирная линия). Нервное волокно схематично представлено справа от каждого из спектров.

Известно, что ориентация молекул внутри фазы может быть описана с помощью параметров упорядоченности [Bower 1972].

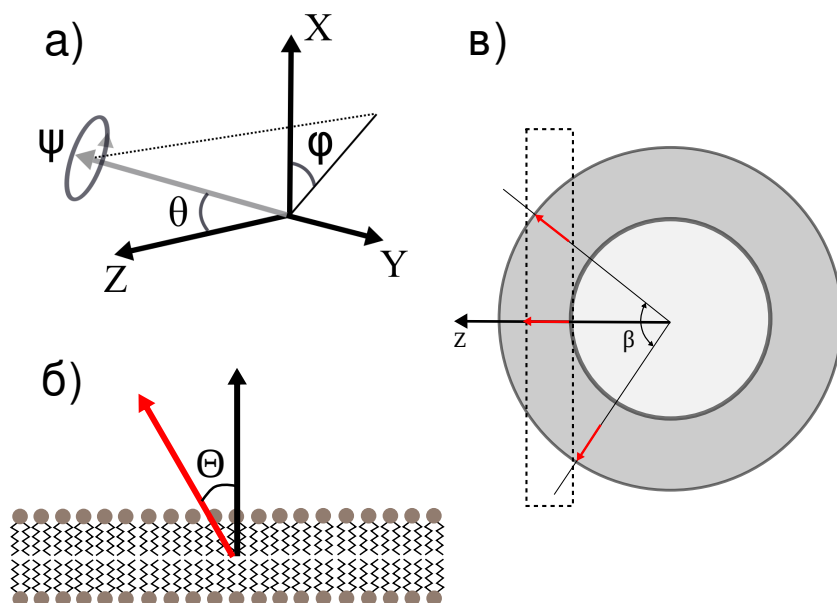


Рис. 4 — Схема описания ориентации молекул с помощью пространственных углов (а,б). Ввиду конечной кривизны мембран миелина в пределах фокального объема (обозначен пунктиром) идеально ориентированные молекулы (стрелки) будут казаться располагающимися в пределах угла β (в).

Для того, чтобы использовать данные КР для выявления ориентации молекул, мы использовали модель симметричной молекулы цилиндрической формы, интенсивность КР которой максимальна, если направление поляризации падающего света соответствует направлению длинной оси молекулы (Рис 4(а)). Для описания ориентации данной молекулы (например, в мембране) необходимо найти углы ϕ и θ . Если направить на данную молекулу свет, поляризованный по оси X , и зарегистрировать X и Y компоненты КР сигнала, то, используя их отношение, можно вычислить угол ϕ . Затем тот же самый подход мы можем применить, используя свет, поляризованный по оси Z , и измеряя компоненты Z и X , найти угол θ . Таким образом, измеряя 4 параметра КР спектра для молекулы с известными спектральными свойствами, можно рассчитать ее ориентацию внутри однородной фазы. В эксперименте, как правило, сигнал обусловлен многими молекулами, каждая из которых в среднем имеет какое-либо преимущественное направление. Для описания такой системы мы использовали параметры упорядоченности ($\langle P_2 \rangle$ и $\langle P_4 \rangle$), строили ориентационную функцию распределения (ОФР), используя которую, можно рассчитать долю молекул, ориентированных в определен-

ном интервале углов по отношению к мембране (угол θ на Рис 4(б)). Ввиду наличия кривизны у миелиновой оболочки (Рис 4 (в)) были введены дополнительные поправки на значения $\langle P_2 \rangle$ и $\langle P_4 \rangle$. Полученные коэффициенты упорядоченности липидов и каротиноидов использовали для построения ОФР (Рис 5). Установлено, что молекулы каротиноидов ориентированы преимущественно перпендикулярно поверхности, а «хвосты» жирных кислот липидов — в среднем под углом 30° к нормали к поверхности мембран миелина. Для оценки точности рассчитывали стандартную ошибку среднего (СОШ) значения коэффициента упорядоченности. Если варьировать $\langle P_2 \rangle$ и $\langle P_4 \rangle$ в пределах СОШ, то можно получить семейство различных ОФР, которые можно изобразить в виде сплошного серого фона на Рис 5.

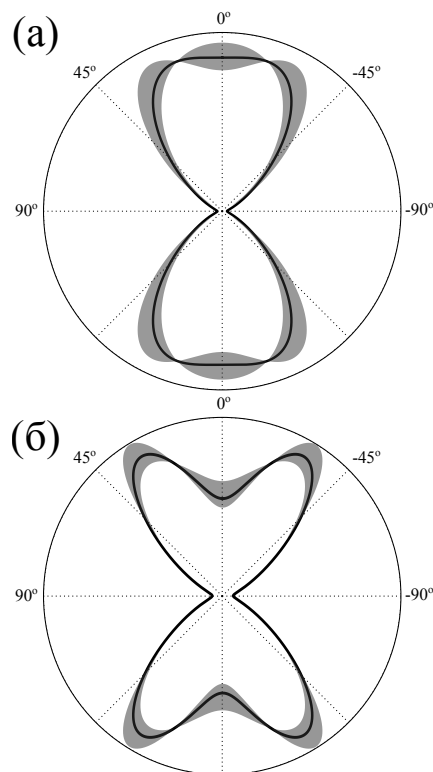


Рис. 5 — Ориентационные функции распределения молекул каротиноидов (а) и «хвосты» жирных кислот липидов (б) в миелине. Фоном обозначен диапазон изменения ОФР при варьировании параметров упорядоченности в пределах стандартной ошибки среднего.

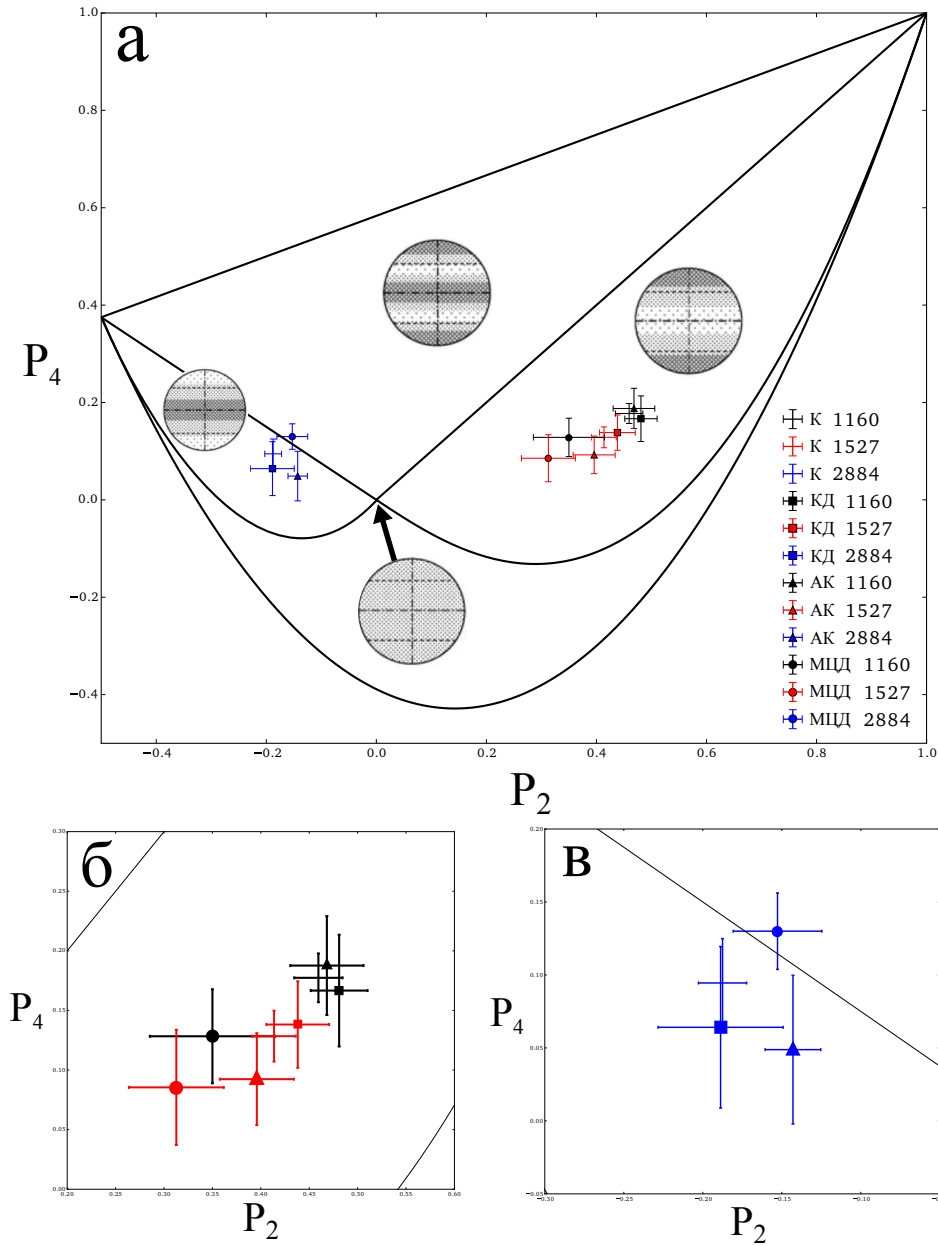


Рис. 6 — Изменения параметров упорядоченности $\langle P_2 \rangle$ и $\langle P_4 \rangle$ при различных воздействиях на нервное волокно: К—контроль, КД—калиевая деполяризация, АК—инкубация с арахидоновой кислотой, МЦД—экстракция холестерина (а). Приближение в область полос каротиноидов (б) и липидов (в). Разбросы рассчитаны как 95% доверительные интервалы. Диаграммы соответствуют теоретическим видам ОФР (серый цвет соответствует преимущественной ориентации молекул). Точка (0,0) характеризуется однородным распределением молекул по всем возможным направлениям.

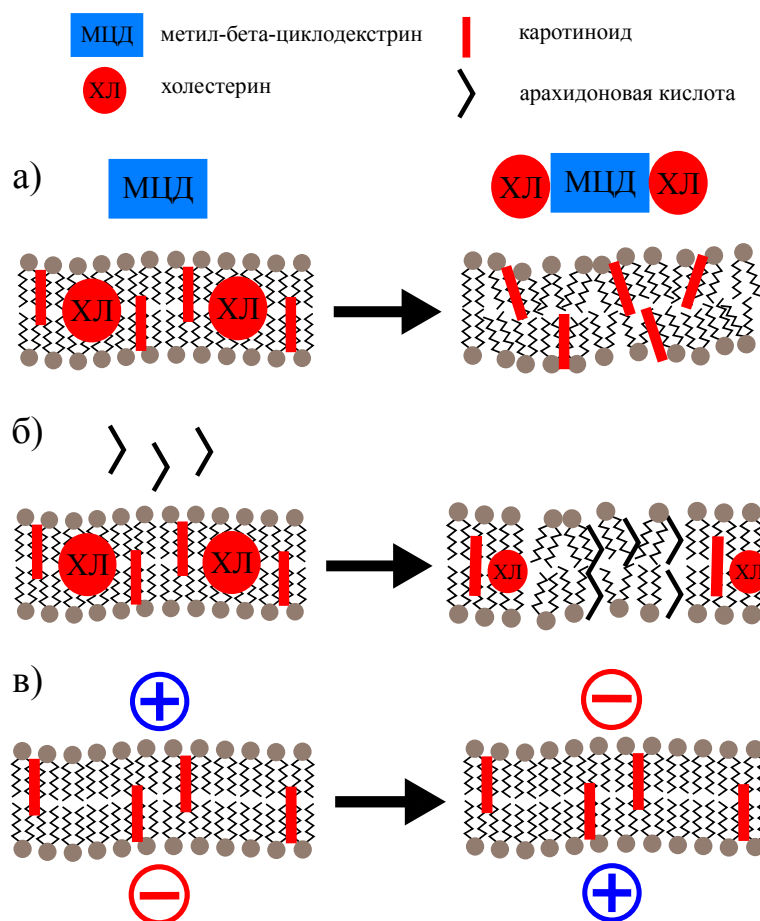


Рис. 7 — Схема, объясняющая воздействие на мембраны миелина нервного волокна экстракции холестерина (а), инкубации с арахидоновой кислотой (б) и калиевой деполяризации (в).

В следующей серии экспериментов мы применили результаты разработанной методики для описания изменений вязкости мембран миелина (экстракция холестерина, действие полиненасыщенной арахидоновой кислотой (АК)) и мембранного потенциала аксона и ШК (калиевая деполяризация (КД))). Установлено, что экстракция холестерина из мембран миелина с помощью метилциклодекстрина (МЦД) приводит к максимальному изменению коэффициентов упорядоченности молекул липидов и каротиноидов (Рис 6). Данный результат подтверждает важную роль холестерина в обеспечении упорядоченного состояния молекул каротиноидов в мембранах миелина и, вероятно, формирует область мембраны (рафт) с высокой степенью упорядоченности молекул липидов. Вероятно, каротиноиды могут быть расположены именно в таких участках в непосредственном окружении молекул холестерина (Рис 7(а)). Наличие в экстраклеточной среде АК также приводит к разупорядочению ориентации липидных хвостов, но не молекул каротиноидов.

дов (Рис 6). Вероятно, АК не может встраиваться в «рафты» с холестерином и каротиноидами, но влияет на ориентацию «хвостов» жирных кислот мембранных липидов (Рис 7(б)). Наконец, калиевая деполяризация не приводила к изменениям в коэффициентах упорядоченности ни липидов, ни каротиноидов (Рис 6). Неполярные остатки жирных кислот липидов находятся в гидрофобной области мембраны и изменение внешнего электрического поля не влияет на их ориентацию (Рис 7(в)). В работах Gruszecki и соавт. также было продемонстрировано, что изменение величины электрического поля не влияло на ориентацию каротиноидов в модельных липидных пленках [Gruszecki, 2008].

Использование метода КР микроспектроскопии для исследования состояния миелина при изменении функционального состояния нервного волокна.

Пуринергическая сигнализация (ПС) представляет собой важную систему контроля функционального состояния нервных волокон. В ряде работ было продемонстрировано, что ПС с участием АТФ может приводить к запуску регуляторных механизмов, изменяющих структуру липидной мембраны клетки. Примером такого процесса может служить синтез простаноидов. При действии экстраклеточного АТФ происходит высвобождение остатка полиненасыщенной арахидоновой кислоты от липидов мембран [Goswami 1985]. Таким образом, имеются основания полагать, что активация ПС может приводить к перестройкам и изменениям свойств миелина.

В связи с этим, в заключительной части данной работы мы использовали разработанную методологию КР - микроскопии в комплексе с масс-спектрометрией (МС) для исследования изменения состояния миелина нервного волокна путем активации рецепторов экстраклеточным АТФ и аденозином.

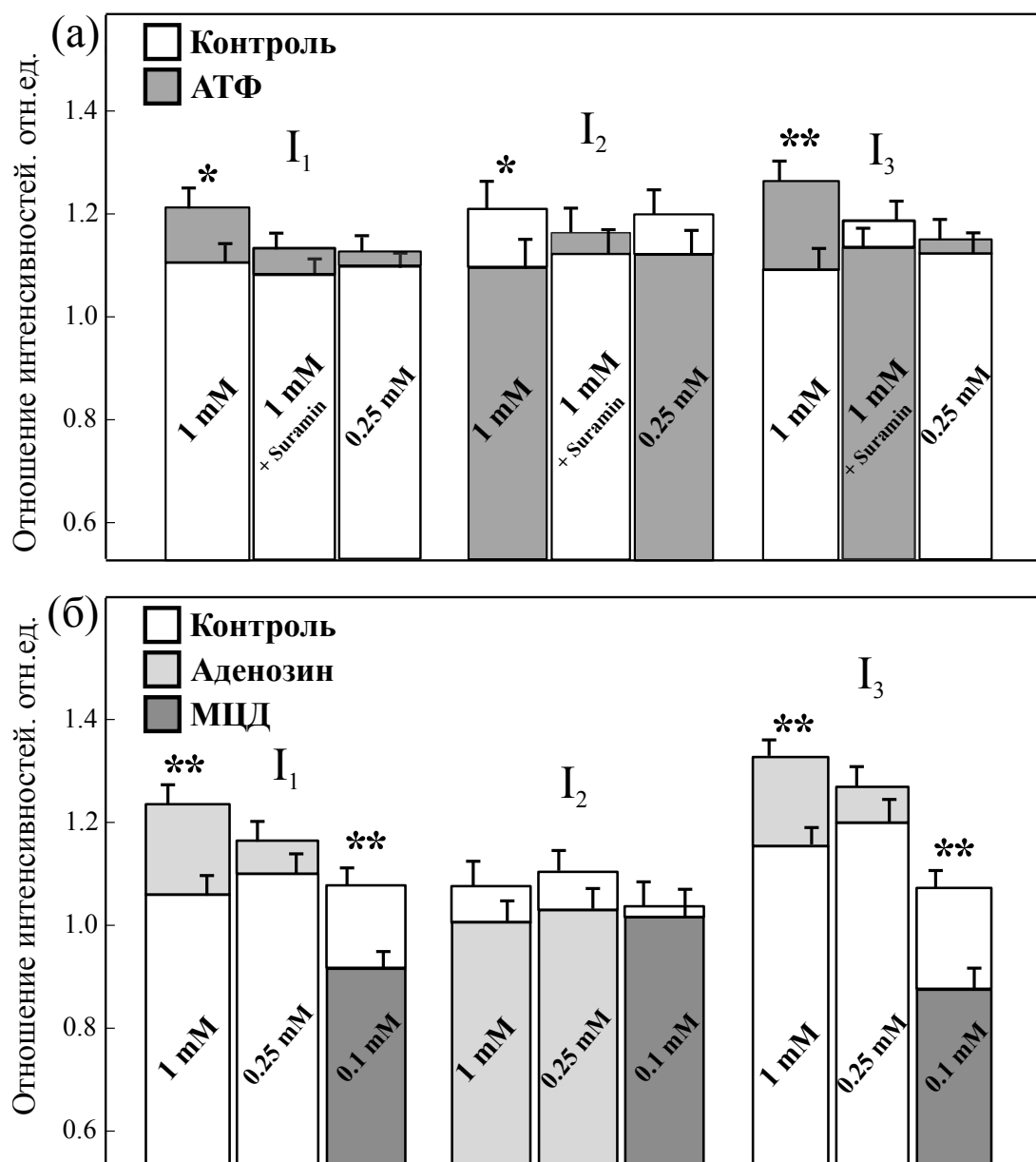


Рис. 8 — Изменения параметров спектра КР нервных волокон при инкубации клеток с АТФ (а), аденозином и МЦД (б). Используемые концентрации обозначены на гистограмме.

Установлено, что инкубация нервного волокна с АТФ и аденозина (концентрация 1 мМ) приводит к увеличению степени упорядоченности липидов и возрастанию насыщенности «хвостов» жирных кислот липидов мембран миелина (увеличение отношений I_1 и I_3) (Рис 8).

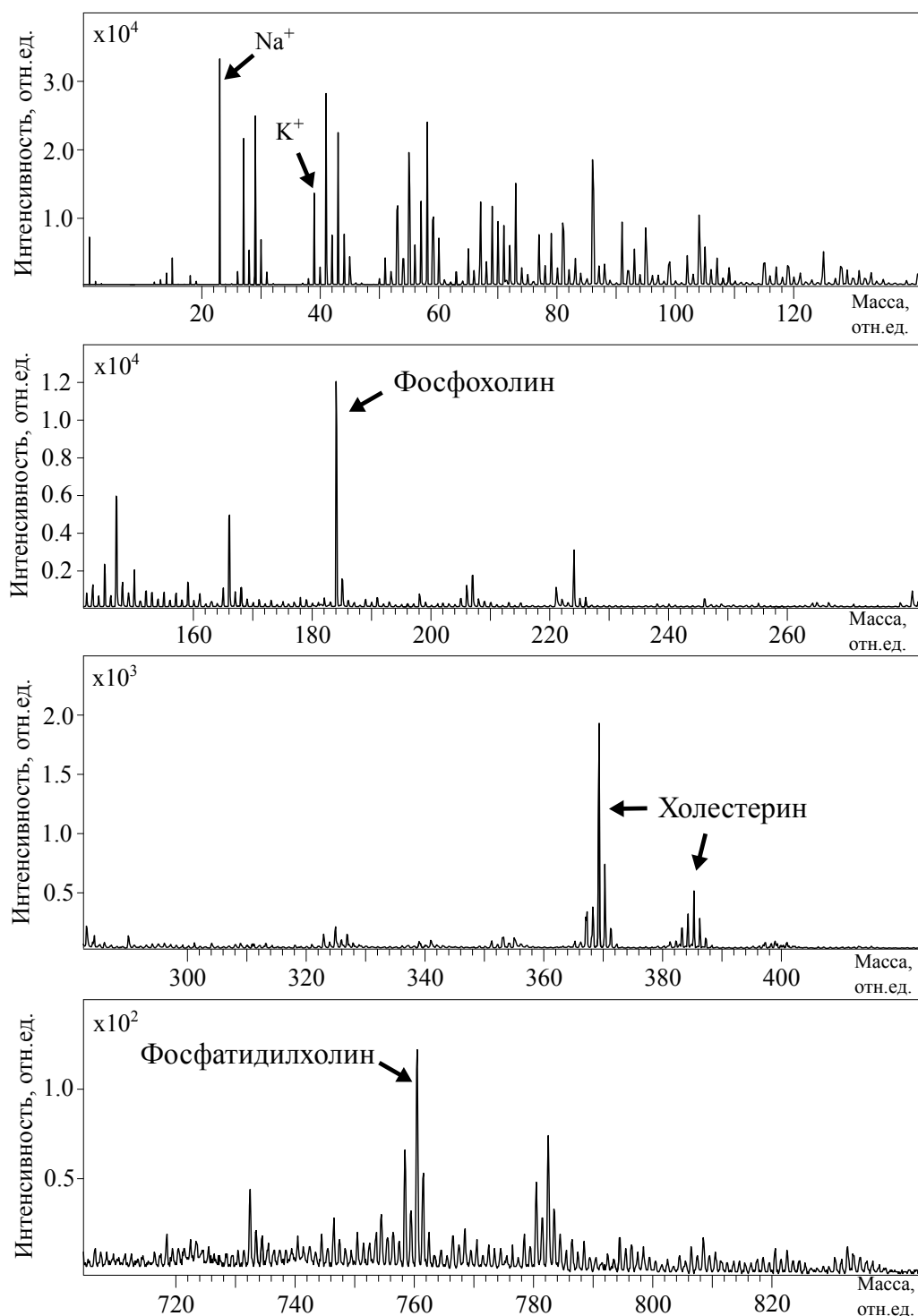


Рис. 9 — Масс-спектрометрия миелина нервного волокна. Стрелками обозначены наиболее интенсивные полосы.

На Рис 9 представлен типичный МС спектр фиксированных миелиновых нервных волокон, в котором выявлены характерные полосы, соответствующие фосфатидилхолину (ФХ) и холестерину. Известно, что на интенсивность полос спектра МС конкретного вещества могут оказывать влияние и другие компоненты («матричный эффект») [Fletcher 2013, Lazar 2013].

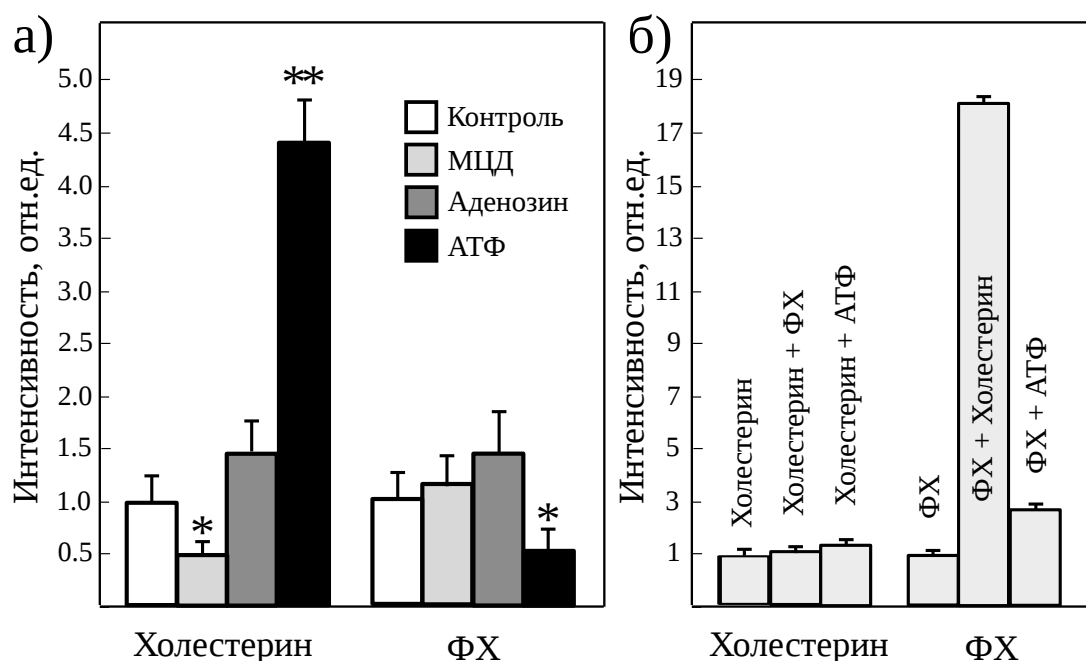


Рис. 10 — Изменения содержания ФХ и холестерина в нервных волокнах, обработанных МЦД, АТФ и аденозином (а). Оценка вклада «матричного эффекта» в определении содержания холестерина и ФХ в липидных пленках различного химического состава (б)

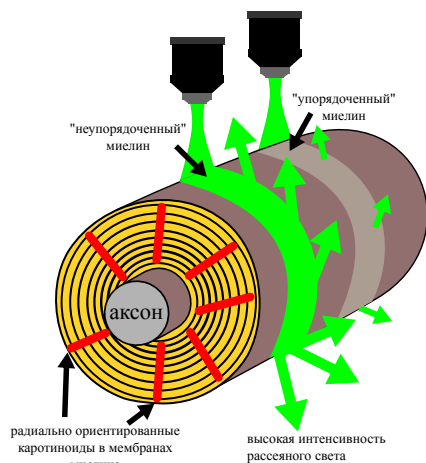
Для выяснения вклада данного эффекта были использованы модельные системы разного состава и измерены содержание холестерина и ФХ (Рис 10(б)). Контрольный эксперимент показал, что присутствие холестерина (как и АТФ) в липидном бислое приводит к существенному увеличению выхода ФХ и действительное снижение содержания ФХ при добавлении АТФ к миелиновому нервному волокну превышает 40%. Таким образом, при инкубации нервного волокна с 1 мМ АТФ в миелине содержание холестерина возрастает, а содержание ФХ — уменьшается.

Для того, чтобы выяснить механизм действия экстраклеточного АТФ на миелин нервного волокна, использовали специфический блокатор пуринергических рецепторов Р2 класса—сурамин (Рис 8). Сурамин нивелирует действие АТФ на состояние липидов мембран миелина. Очевидно, что выявленные АТФ-индуцируемые изменения свойств миелина нервного волокна могут быть вызваны активацией пуринергических рецепторов Р2 типа.

Заключение:

В настоящей работе разработана методология исследования состояния молекул липидов миелина нервного волокна и проведено исследование изменений миелина, вызванных активацией пуринаргических рецепторов ШК.

а) Фрагмент интернодальной области миелина (поперечное сечение)



б)

Фрагмент интернодальной области миелина (продольное сечение)

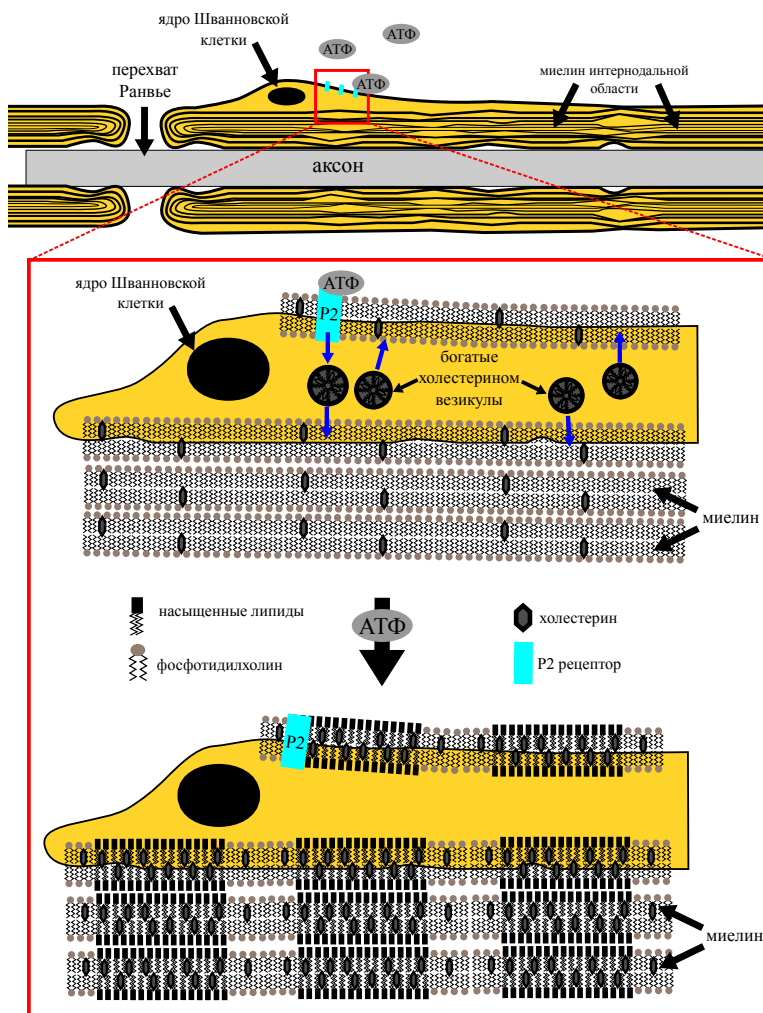


Рис. 11 — Схема нервного волокна, ориентации и упорядоченности липидов мембран (а). Гипотетический механизм изменения содержания холестерина и ФХ в мембранах миелина при активации P2 пуринорецепторов (б).

При разработке методологии учитывались следующие полученные результаты (Рис 11):

1. в интернодальной области нервного волокна существуют участки миелина, отличающиеся по степени упорядоченности и насыщенности «хвостов» жирных кислот липидов.
2. с помощью поляризованной КР спектроскопии количественно охарактеризована ориентация молекул каротиноидов и липидов.

3. разработанная методология в комплексе с методом масс-спектрометрии, показала, что экстраклеточный АТФ вызывает увеличение содержания холестерина и уменьшение ФХ в мембранах миелина и меняет степень упорядоченности и насыщенности «хвостов» жирных кислот липидов.

Таким образом, активация P2 пуринергических рецепторов ШК необходима для перестройки мембран миелина и, вероятно, увеличения скорости проведения ПД ((Рис 11)(б)). Вероятно, первичным актом процесса является вход Ca^{2+} через P2 рецептор и активация слияния богатых холестерином везикул, содержащихся в цитоплазме ШК с мембранами миелина [Shin 2014]. Источник холестерина (везикулы) находится в составе цитоплазмы ШК, большая часть которой находится в наружном слое миелина, при этом высокая латеральная подвижность молекулы [Organ 2009] и возможность ее перемещения между слоями миелина [Maxfield 2002] позволит холестерину распределиться по всем слоям миелина и сформировать более упорядоченную структуру мембран.

Выводы:

1. Разработана методология проведения измерений и обработки спектров комбинационного рассеяния от миелина нервных волокон, включающая процедуры фокусировки луча лазера, подбор оптимальной плоскости поляризации возбуждающего лазера и сигнала комбинационного рассеяния, а также его выявления на фоне флуоресценции образца.
2. Обнаружены различия в распределении величины интенсивности основных полос спектра КР молекул, локализованных в основных областях нервного волокна (перехват Ранвье, паранодальная и интернодальные области).
3. С помощью анализа ориентационной функции распределения молекул доказано, что каротиноиды миелина находятся в упорядоченном состоянии, которое зависит от присутствия холестерина, и ориентированы преимущественно перпендикулярно, а «хвосты» жирных кислот липидов миелина — в среднем под углом 30° к нормали к поверхности липидного бислоя.

4. Доказано, что регистрация распространения монохроматического излучения между липидными бислоями миелина позволяет исследовать изменения упорядоченности молекул липидов в различных областях нервного волокна.
5. С помощью комбинации методов масс-спектрометрии и спектроскопии комбинационного рассеяния установлено, что экстраклеточный АТФ (но не аденозин) при активации P2 типа пуриnergических рецепторов вызывает увеличение количества холестерина и уменьшение фосфатидилхолина, а также повышает степень упорядоченности и насыщенности «хвостов» жирных кислот липидов в мембранах миелина.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. NP Kutuzov, AR Brazhe, AI Yusipovich, GV Maksimov, OE Dracheva, VL Lyaskovskiy, FV Bulygin and AB Rubin (2013) ATP-induced lipid membrane reordering in the myelinated nerve fiber identified using Raman spectroscopy. *Laser Phys. Lett.* **10**, P. 075606.
2. NP Kutuzov, AR Brazhe, GV Maksimov, OE Dracheva, VL Lyaskovskiy, FV Bulygin and AB Rubin (2014) Orientational Ordering of Carotenoids in Myelin Membranes Resolved by Polarized Raman Microspectroscopy. *Biophysical Journal* **107**, 891 – 900.
3. NP Kutuzov, AR Brazhe, VL Lyaskovskiy, GV Maksimov (2015) Laser beam coupling into nerve fiber myelin allows one to assess its structural membrane properties, *Journal of Biomedical Optics* **20**, P. 050501.
4. Nikolay Kutuzov, Alexander Gulin, Vladimir Lyaskovskiy, Victor Nadtochenko and Georgy Maksimov (2015) ATP-Mediated Compositional Change in Peripheral Myelin Membranes: A Comparative Raman Spectroscopy and Time-Of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Study. *PLoS ONE* **11**, P. e0142084.
5. НП Кутузов, ГВ Максимов, ВЛ Лясковский, ФВ Булыгин (2014) Исследование ориентации молекул в мембранах живых клеток посредством Рамановской микроспектроскопии. *Метрология в Нанотехнологиях* **23**, 15-22.
6. E Verdiyan, E Bibineyshvili, N Kutuzov, G Maksimov (2015) Role of Schwann cell in regulation of myelin sheath properties during nerve fiber excitation and activation of purinergic receptors. *GLIA Bilbao 2015: Abstracts Oral Presentations*, **63**, P. E76–E469