

***Исследование клеток нейронов в культуре при
патологии и в норме методами биофизики и
нанобиотехнологии***

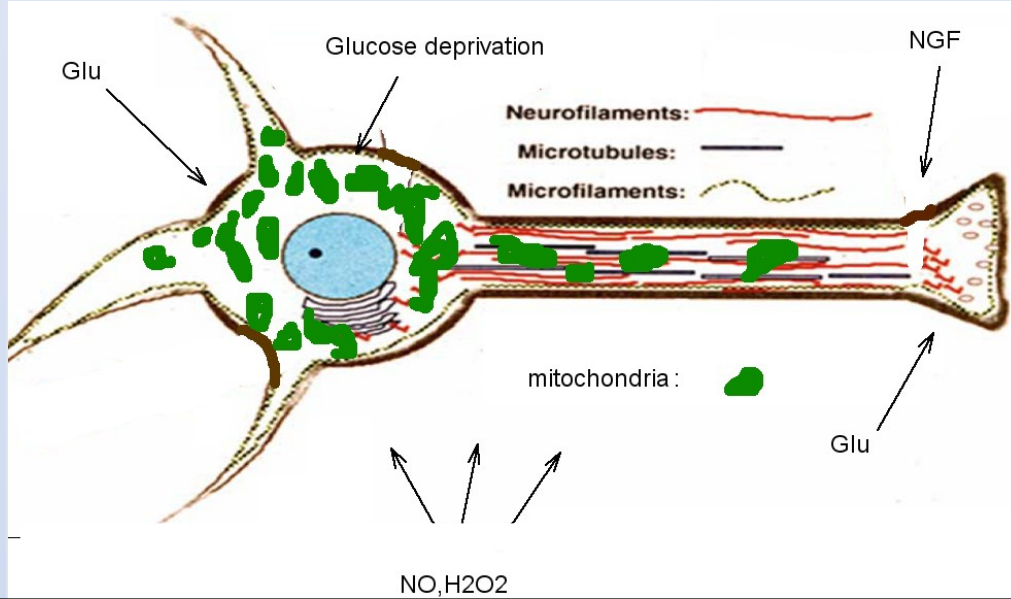
Дзюбенко Е.В.,

Руководители:

Шрам С.И., к. х. н.;

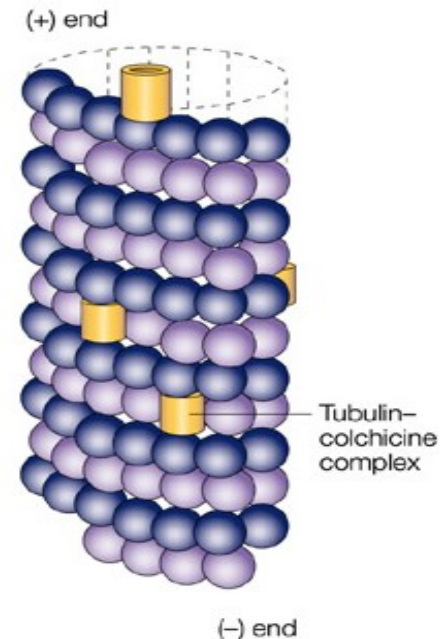
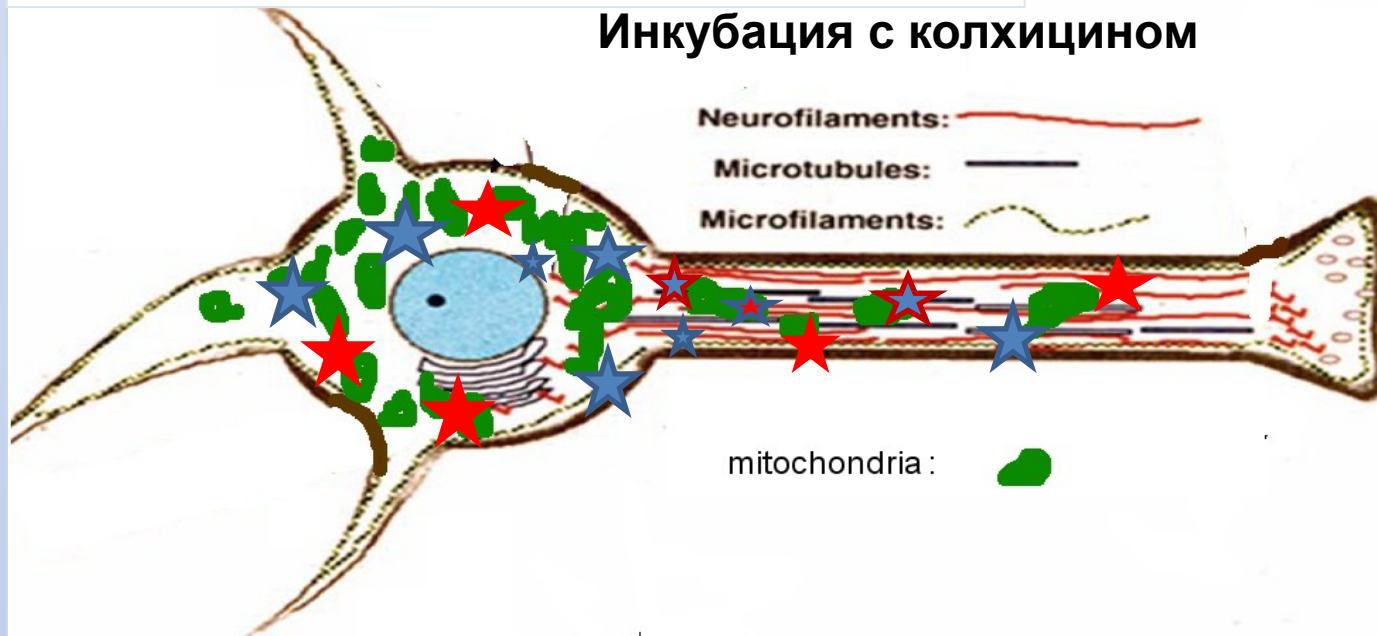
Максимов Г.В., д. б. н.

Нейродегенерация и модели экспериментального исследования патологических процессов в нейрональных клетках

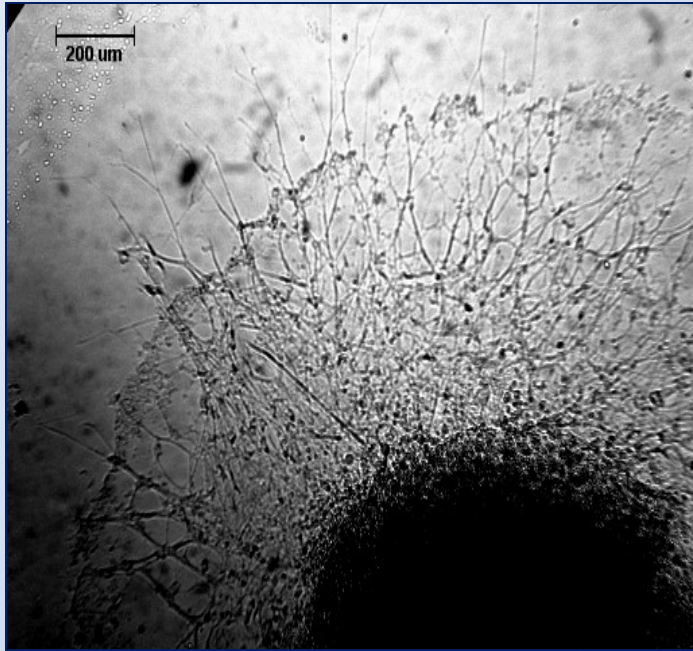


- Модели нейродегенерации:
- Глутаматная эксайтотоксичность
 - Окислительный стресс
 - Депривация трофических факторов
 - Аксоотомия и микротравмы

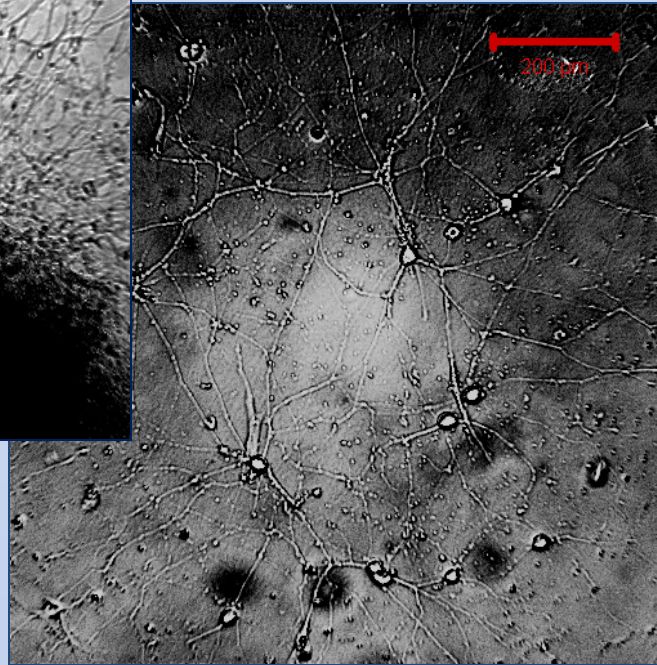
Инкубация с колхицином



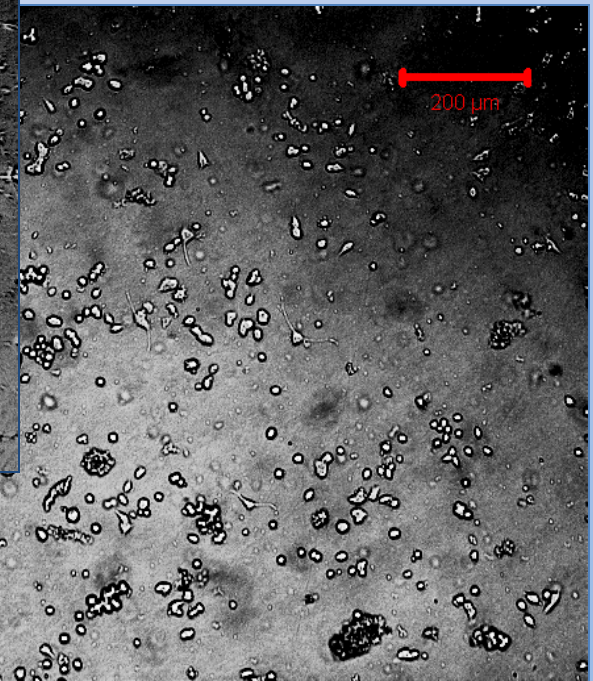
Объект исследования



Органотипичная культура
спинномозговых ганглиев
эмбрионов курицы,
желатиновая подложка

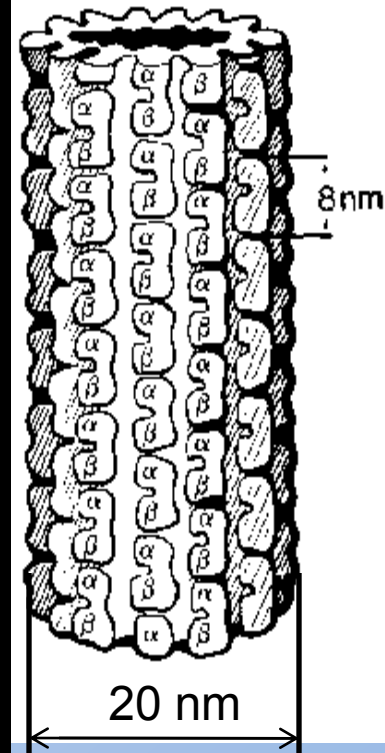
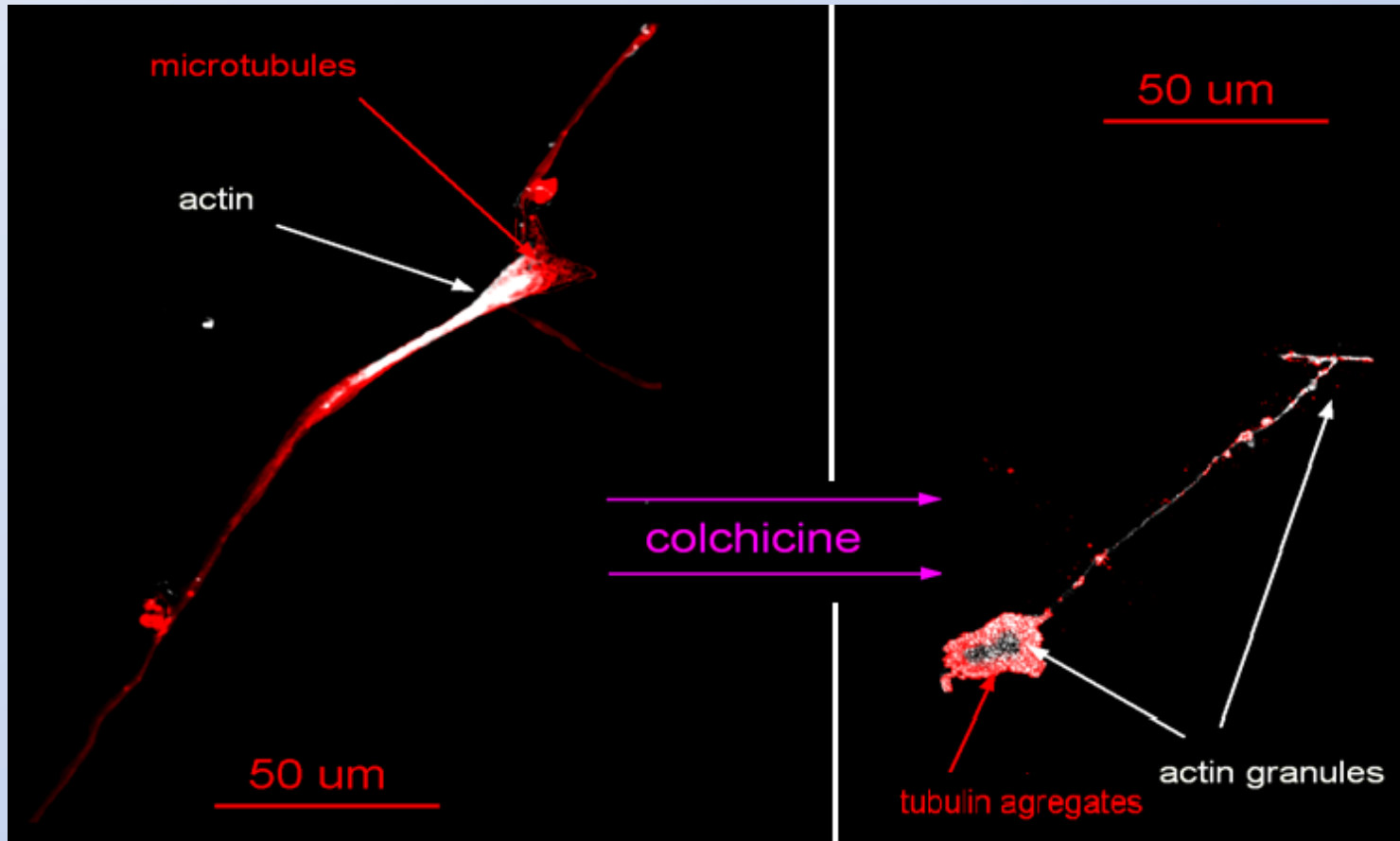


Нейроны диссоциированной
культуры спинномозговых
ганглиев эмбрионов курицы,
полиорнитин – ламининовая
подложка



Клетки нейрональной
культуры PC12,
адгезированные на
полилизине.

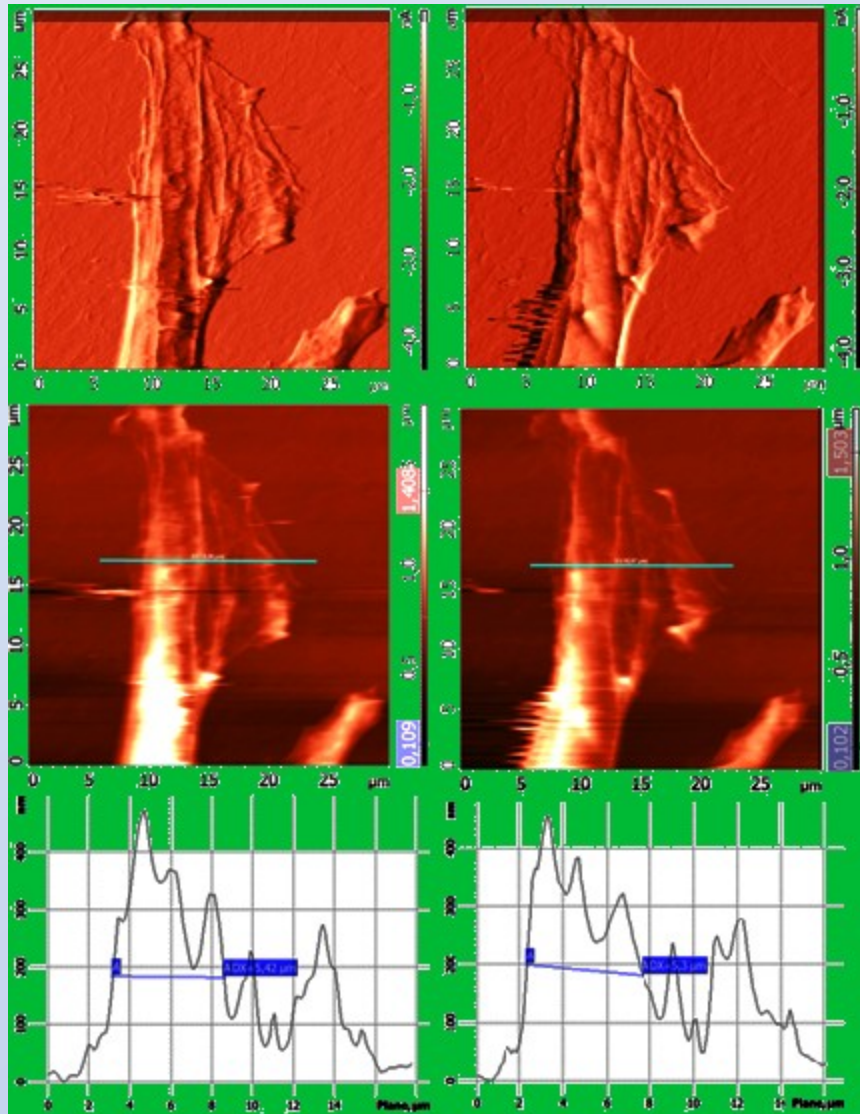
Влияние колхицина на морфологию цитоскелета нервных клеток



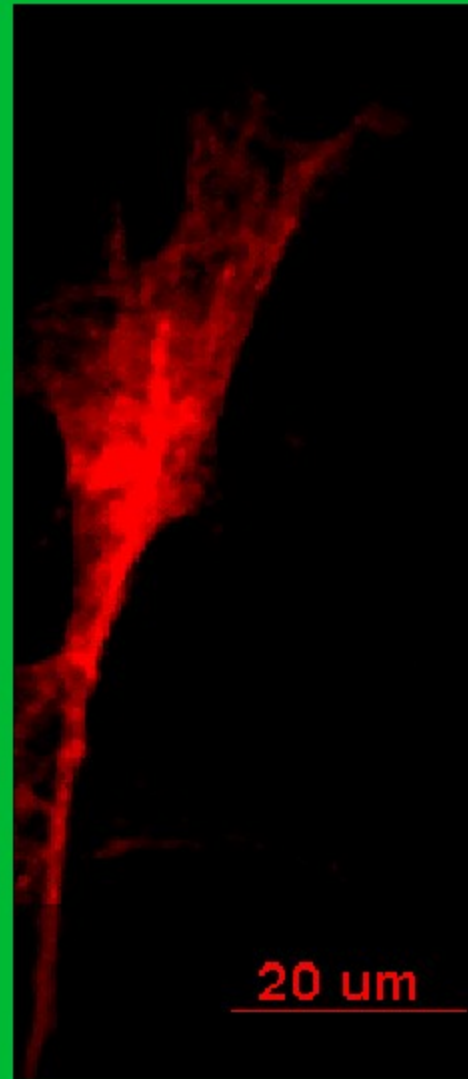
Кристаллографическая структура микротрубочки, (Amos and Klug, 1974)

Окрашивание : тубулин - антитела DM1A + Alexa 594,
актин – Rhodamine – phalloidin

АСМ живых нейронов в культуре



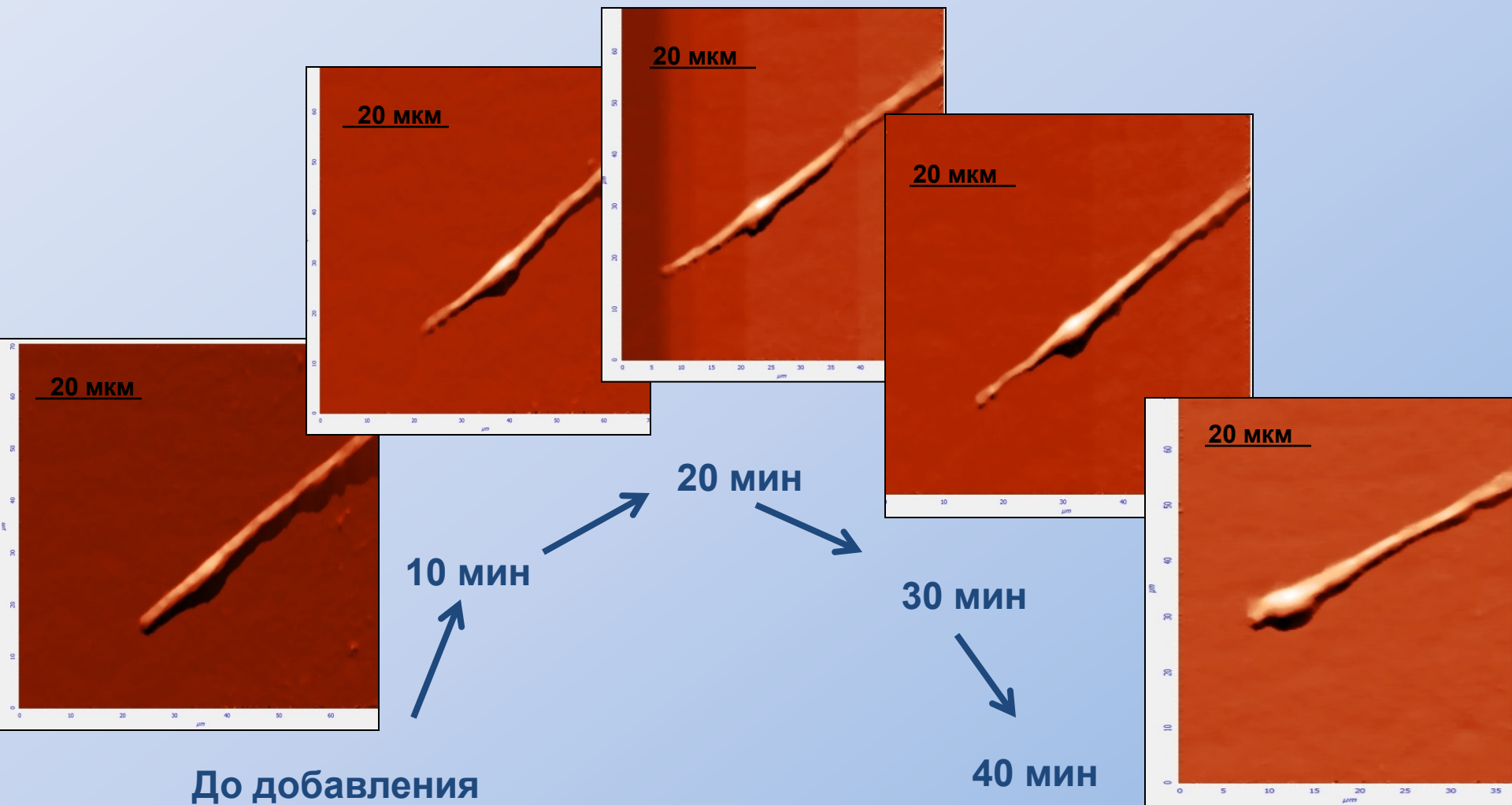
А.



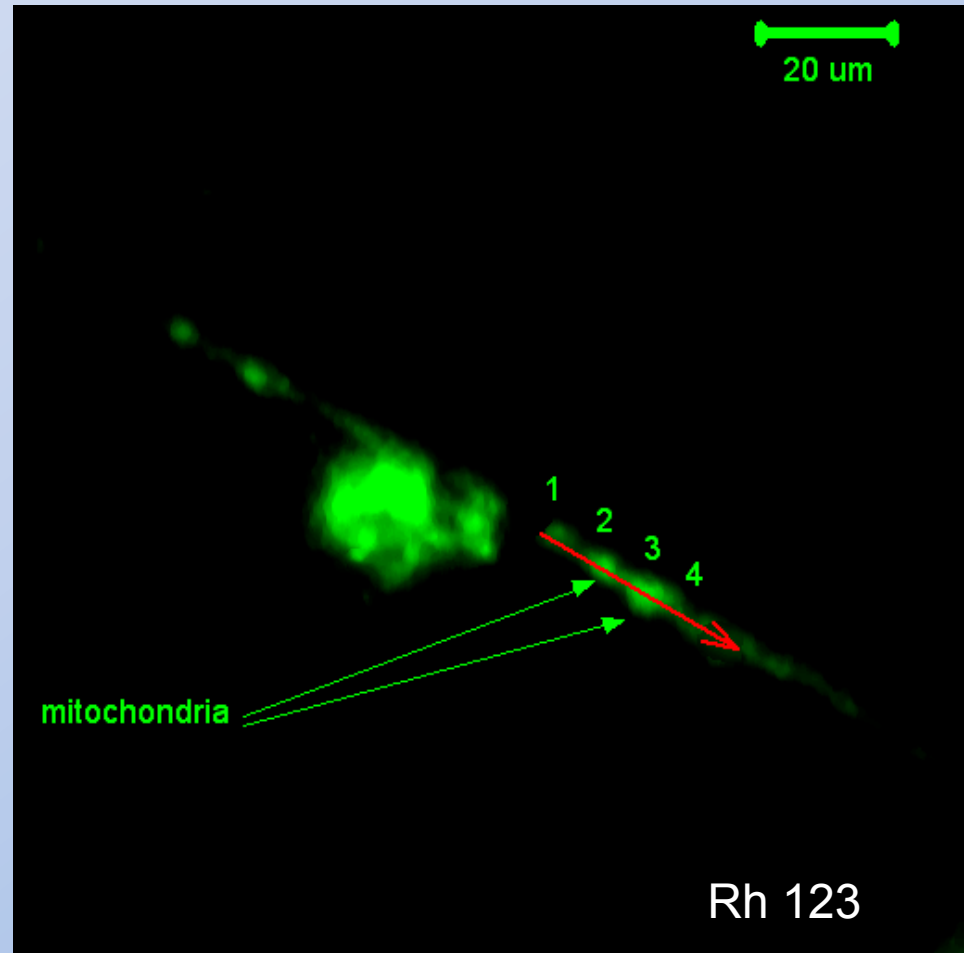
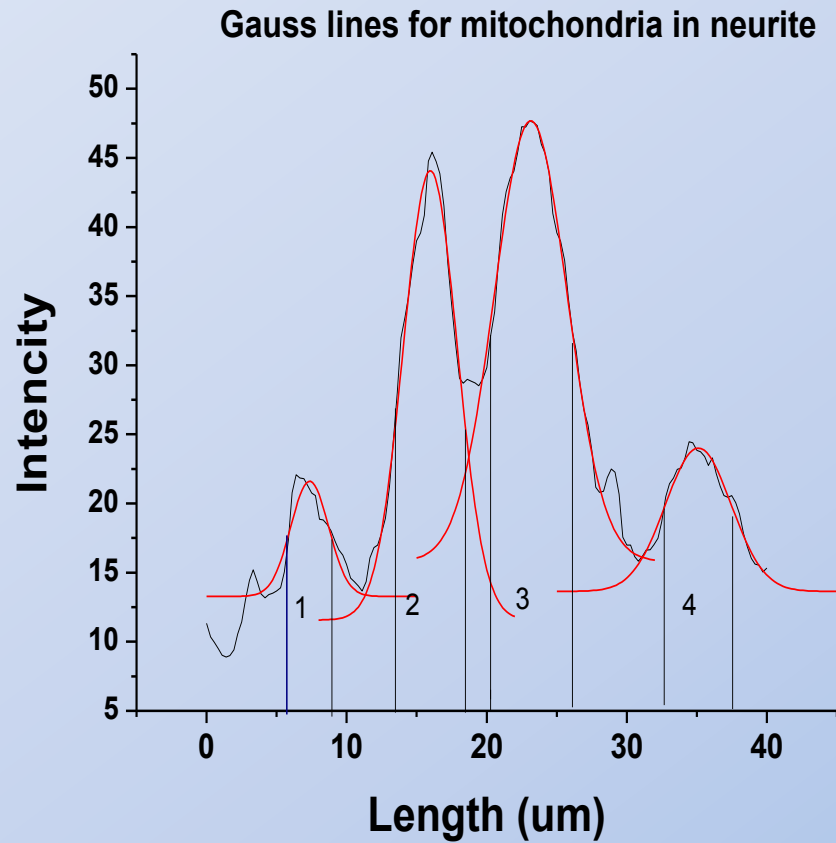
Б.

А. Атомно –
силовая
микроскопия
конуса роста;
Б. Конус роста
аналогичной
клетки,
окрашивание на
микротрубочки

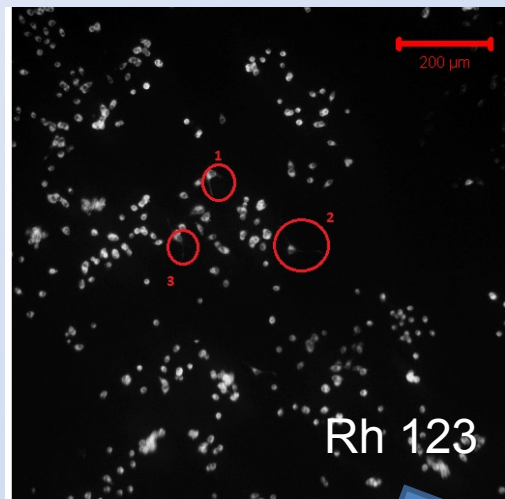
Влияние колхицина на морфологию нейрита живого нейрона



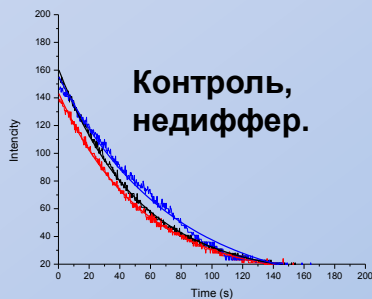
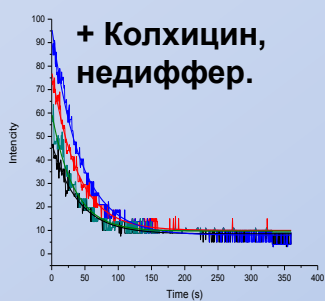
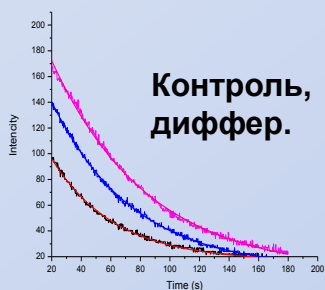
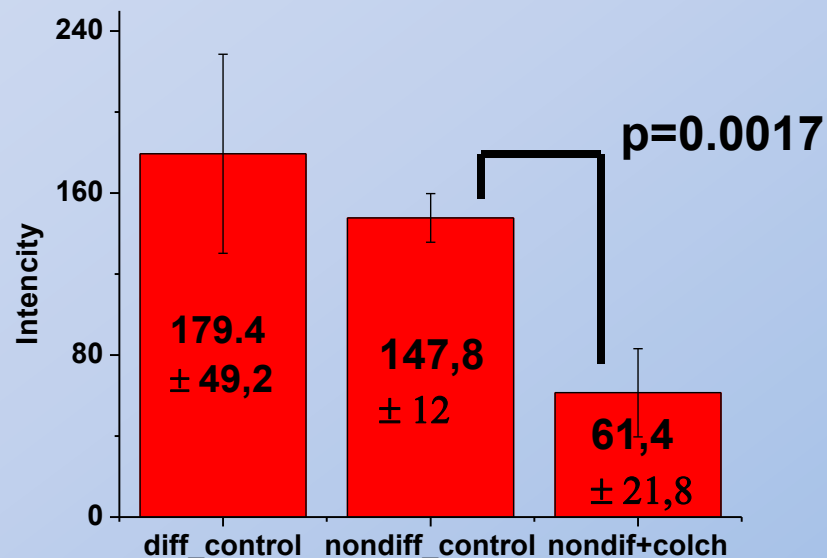
Распределение интенсивности потенциалзависимой флуоресценции отдельных митохондрий в нейрите



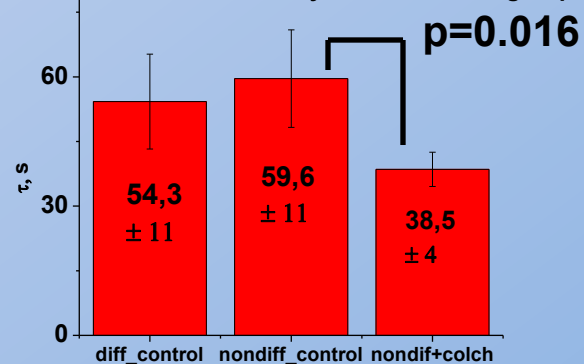
Влияние колхицина на митохондрии нейрональных клеток культуры PC12



Rh 123 fluorescence in different cell groups



τ of Rh123 fluorescence decay in different cell groups



Заключение

- **Полученные препараты живых нейрональных клеток позволяют исследовать процессы аксональной нейродегенерации методами конфокальной и атомно – силовой микроскопии.**
- **Методом конфокальной микроскопии с применением иммуноцитохимического окрашивания продемонстрирована дезорганизация как микротрубочек, так и актиновых филаментов в нейронах при действии колхицина.**
- **С помощью прямого метода атомно – силовой микроскопии рассмотрена тонкая морфология конуса роста и организация цитоскелета в нём, при этом данные, полученные с помощью АСМ, подтверждаются конфокальной микроскопией.**
- **Рассмотрено изменение морфологии нейрита при сканировании на АСМ во времени.**
- **При окрашивании родамином 123 удалось сравнить параметры потенциалзависимой флуоресценции для отдельных митохондрий в отростке нейрона, что в дальнейшем поможет рассматривать энергетику клетки на уровне отдельной митохондрии**
- **Показано уменьшение мембранного потенциала митохондрий нейрональных клеток при дестабилизации цитоскелета, что достоверно говорит о наличии взаимосвязи энергетического статуса клетки и организации цитоскелета, точные механизмы которой требуют дальнейшего изучения**

Благодарности

Представленные в данной работе результаты никогда не были бы получены без помощи и совета Станислава Ивановича Шрама, сотрудников сектора нейрофармакологии ИМГ РАН, Георгия Владимировича Максимова и сотрудников лаборатории биофизики клетки МГУ.

Отдельная благодарность нашим коллегам с кафедры биоинженерии МГУ Багрову Дмитрию Владимировичу и Ефремову Юрию Михайловичу за неоценимую помощь при проведении атомно – силовой микроскопии нейронов в жидкой среде.