

ИССЛЕДОВАНИЕ НЕЙРОННЫХ СТРУКТУР
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭВМ

УДК 577.37

В. А. СЮЮШЕВ, В. П. ФЕДОСЕЕВ, М. Б. ШТАРК

(Новосибирск)

ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
НЕЙРОННЫХ СТРУКТУР

Введение. К настоящему времени наиболее надежным физическим методом анализа деятельности нейронных структур признава микроэлектродная техника измерений электрических параметров клеточных мембран. Тем не менее, когда возникают проблемы пространственно-временного картирования электрогенеза, взаимоотношений нейронов в нервных сетях и исследований кооперативных взаимодействий внутримембранных подструктур различных клеток, применение микроэлектродного метода в его традиционном варианте сопряжено с большими трудностями, прежде всего обусловленными сложностью одновременного отведения электрической активности несколькими микроэлектродами. Попытка осуществить прямое считывание электрических потенциалов нетрадиционным способом с помощью матричного датчика, представляющего собой плоскую подложку с распределенными электродами, была предпринята в работах [1—3]. Оказалось, что его реализация осложняется ненадежностью контакта электрод — клетка, спецификой препаратов, пригодных к исследованию, «зашумлением» полезного сигнала электрическими шумами окружающих клеток.

Более исчерпывающую информацию о контактной мультиэлектродной методике можно найти в вышеуказанных работах. Отметим главное: при таком способе измерения регистрируется в лучшем случае внеклеточный потенциал — параметр, трудно интерпретируемый с точки зрения электрического состояния клетки. Другие нетрадиционные модификации мультиэлектродных способов измерения нам неизвестны.

Таким образом, на этапе исследования многонейронных систем возникает необходимость применения качественно новых методов, обладающих хорошим пространственно-временным разрешением, многоканальностью, возможностью проведения одновременного статистического анализа многоточечного поля сигналов.

О возможности исследования электрической активности возбудимых клеток оптическими методами. Если говорить о связях ансамбля нейронов в нервных сетях, то, несмотря на все многообразие взаимодействий клеток, представляется разумным использовать в качестве коррелируемых сигналов их импульсную активность — параметр, в настоящее время наиболее достоверно определяемый экспериментально. Поскольку непосредственное измерение потенциала мембраны оптическим методом невозможно, будем считать, что любые изменения оптических свойств клеток, строго коррелирующие со спайком, наиболее просто и достоверно регистрируемые, являются индикатором функциональной связи между ними.

Изменения оптических характеристик, обусловленные перестройкой структуры мембраны во время возбуждения, связаны прежде всего с мембранной проводимостью, ионными токами и сопутствующими им факторами, такими как изменение ориентации липидных и белковых молекул и т. п. Ионные токи обусловлены, согласно существующим представлениям [4, 5], либо переносом заряда по каналам проводимости, либо транспортом молекулярных комплексов, сорбирующих ионы и легко проникающих через мембрану.

Расчитанные размеры ионных каналов составляют 1—2 нм, что лежит далеко за пределами оптического разрешения. Однако в работе [6] путем регистрации упругих свойств бислоистой липидной мембраны в связи с изменением количества встраиваемых в мембрану каналов проводимости (грамцидин А) определена область структурных «искажений» мембраны за счет встраивания одного каналоформера. Было найдено, что средний радиус конформационных изменений может простираться до величин, на два порядка больших, чем размер самого канала. Расчитанное число каналов на единицу площади возбудимых мембран составляет 20—50; следовательно, при размерах ионного канала 1—2 нм вся площадь мембраны оказывается почти перекрытой сетью структурных изменений, что может оказаться вполне «заметным» для оптического зонда.

В результате исследования свойств возбудимых мембран при генерации потенциала действия (ПД) было обнаружено изменение двух оптических характеристик — двойного лучепреломления (ДЛП) и интенсивности светорассеяния [7, 8]. Эффект ДЛП появляется в результате разных скоростей распространения обыкновенного (с вектором электрического поля, перпендикулярным оптической оси поверхности клетки) и необыкновенного (вектор электрического поля составляет некоторый угол с оптической осью) лучей через мембрану. Поскольку мембрана обладает этим свойством, то следует предположить, что некоторые молекулярные ассоциации способны строго ориентироваться таким образом, что оптическая ось мембраны становится перпендикулярной к ее поверхности. Экспериментально найденная величина разности хода для мембран эритроцитов [9] очень мала и по порядку величины составляет 10^{-4} л. Для возбудимых мембран в результате генерации ПД интенсивность зондирующего света в системе скрещенных анализатора и поляризатора линейно связана с потенциалом на мембране, что может быть обусловлено, по крайней мере, тремя причинами:

изменениями электрического поля внутри мембраны —

$$\delta(E) = 1,11 \cdot 10^{-5} BE^2 l \text{ (эффект Керра),}$$

магнитного поля —

$$\delta(H) = 1,58 CH^2 l \text{ (эффект Коттона — Муттона),}$$

а также механической деформацией —

$$\delta(P) = \text{const } Pl, \quad P = E^* \epsilon = E^*(\Delta l/l), \quad \text{где } P \text{ — механическое напряжение, } \epsilon \text{ — модуль Юнга, } \delta(E), \delta(H), \delta(P) \text{ — фазовый сдвиг между обыкновенными и необыкновенными лучами, } B \text{ — константа Керра, } C \text{ — константа Коттона — Муттона, } l \text{ — толщина мембраны.}$$

В системе скрещенных поляризатора и анализатора, согласно уравнению Френеля, относительное изменение интенсивности $\Delta I/I$, обусловленное изменением $\Delta \delta$, при генерации ПД будет равно

$$\Delta I/I \sim 2(\Delta \delta/\delta) \sim 10^{-5}.$$

Сам факт зависимости $\delta(T, E, H, P)$ свидетельствует о том, что возбуждение мембраны может определяться изменениями температуры, полей, механического воздействия; во всяком случае, все эти факторы влияют на термодинамическое состояние мембраны.

Одновременное измерение спектра рассеяния и эффекта ДЛП позволяет получить дополнительную информацию о том, какие структуры упорядоченно ориентированы либо меняют ориентацию в результате генерации ПД. Агентами, позволяющими проявить участие различных соединений (липиды, белки, каналоформеры) в механизмах возникновения и передачи возбуждения, являются ингибиторы ионной проводимости, липидоактивные вещества и т. п. [10—12].

Технические требования, предъявляемые к оптоэлектронной аппаратуре для исследований свойств возбудимых мембран. Наиболее важным условием, на наш взгляд, является соответствие между величиной наблюдаемых эффектов и аппаратурными возможностями. Не меньшие трудности, разумеется, возникают и при подготовке оптически доступного интактного препарата, удовлетворяющего требованиям продолжительности «жизни», возможной частоте стимуляции и неизменности функционального состояния. Изменения световых потоков, несущих информацию о светорассеянии и ДЛП на возбудимых мембранах, находятся в пределах $\Delta I/I \sim 10^{-6} \div 10^{-5}$, где $\Delta I/I$ — относительное изменение интенсивности [8]. В реальном эксперименте такие малые величины полезного сигнала могут подавляться аппаратурными шумами детектирующего блока, вибрациями экспериментальной установки, пульсациями источника излучения, конвективными явлениями при использовании мощных осветительных приборов и, наконец, даже наличием пыли в измерительном объеме.

Пульсации интенсивности источника излучения — наиболее трудноустраняемая помеха. Понятное стремление экспериментатора к использованию лазеров, обладающих уникальными свойствами по спектральной мощности, когерентности, узкополосности и направленности, не всегда приводит к успеху, так как стабильность лазерного излучения, как правило, не превышает долей процента. Стабилизация излучения, обусловленная введением обратной связи между фотоэлементом и электрооптической ячейкой сглаживающей пульсации, может привести к положительному эффекту, хотя чаще всего используется схема вычитания сигналов опорного и информативного фотодетекторов. Несмотря на это в практике оптических исследований свойств биологических мембран отдается предпочтение использованию 100—150 Вт ламп накаливания с высокостабилизированным источником питания, гарантирующих относительно высокое ($\sim 10^{-3}$) отношение пульсаций интенсивности к постоянному фону.

Принципиально неустранимыми помехами являются дробовой шум фотоприемника и пульсации источника света, достигающие $10^{-4}—10^{-3} \sim \Delta I/I$. Для сравнения этой величины с дробовыми шумами необходимо знать, сколько фонового света попадает на фотокатод в каждом отдельном случае: при светорассеянии, ДЛП, поглощении и флуоресценции. Сравним дробовые шумы с шумами источника. Величина дробового шума

$$j_{др} \sim \sqrt{vej\Delta f},$$

где заряд e — заряд электрона, j — ток фоновой засветки, Δf — полоса пропускания частотного фильтра.

Определим, начиная с какой величины фоновой засветки дробовой шум будет превышать шум источника света:

$$j_{др}/j \sim 10^{-3} \sim \sqrt{ve\Delta f/j},$$

т. е. при $j \sim 3 \cdot 10^{-9}$ А. Переведем эту величину в интенсивность засветки, учитывая, что коэффициент преобразования интенсивность — ток ФЭУ — $S_\lambda \sim 3 \cdot 10^{-2}$ А/Вт:

$$I_\phi \sim (3 \cdot 10^{-9} \text{ А}) / (3 \cdot 10^{-2} \text{ А/Вт}) = 10^{-7} \text{ Вт}.$$

Если величина засветки превышает 10^{-7} Вт, пульсации интенсивности источника света превалируют над дробовыми шумами; следовательно, при соотношении сигнал/шум лучше чем 10^{-2} мы сможем зарегистрировать полезный сигнал без использования техники многократного накопления. Что касается оптической регистрации единичного спайка, то улучшение аппаратурной функции сопряжено с уменьшением шума источника света либо с увеличением полезного сигнала.

Несмотря на свою привлекательность, возможность разумного использования техники многократного накопления прежде всего ограничена свойствами возбудимых мембран, предполагает знание характера шумов, подавляющих сигнал, количества информативных параметров, извлекаемых после операции накопления. Практически все исследования по регистрации оптических спайков, требующие многократного накопления, были проведены на гигантских аксонах, что не удивительно, так как этот объект удовлетворяет основным требованиям, необходимым для успешного применения метода накопления: стабильности реакции на электрическую стимуляцию, допустимости длительного раздражения, неизменности электрических параметров. Что касается использования техники многократного накопления или статистического усреднения, например, для регистрации электрической активности нейронов в функционирующих нервных сетях, то анализ электрофизиологических свойств, связанных с оценкой параметров накопления, следует проводить с особой тщательностью. Так, например, из полуэмпирических оценок возможности исследования функциональных связей между нейронами в нервных сетях [13] был предложен метод регистрации взаимной корреляционной функции электрической активности двух нейронов, физической основой которого является регистрация изменения ДЛП либо светорассеяния неокрашенных мембран при изменении потенциала на них. Такой способ нахождения функционально связанных нейронов позволяет обойтись без искусственной стимуляции опорного нейрона, так как время между спонтанным (или опосредованным) возбуждением опорной и тестируемой клеток не зависит от момента времени возбуждения опорного нейрона. Этот метод исследования действительно мог бы быть весьма привлекательным, тем более что, по оценкам автора, для регистрации коррелята оптических спайков, вызванных потенциалзависимым изменением ДЛП ($\Delta I/I \sim 5 \cdot 10^{-6}$), требуется усреднение $t \sim 10$ мин для получения соотношения сигнал/шум ~ 300 .

При более тщательном анализе условий проведения эксперимента и характера электрической активности в нервных сетях ситуация складывается не столь благополучным образом, как это представлено в работе [13]. Согласно приведенным в оценке величинам, соотношение сигнал/шум было принято ~ 1 . Выше указывалось, что экспериментально подтвержденное аппаратурное разрешение оптической системы ограничивается соотношением $\Delta I_{\text{ш}}/I_0 \sim 10^{-4} - 10^{-3}$. С другой стороны, соотношение сигнал/фон при потенциалзависимом эффекте ДЛП не превышает $\Delta I/I \sim 5 \cdot 10^{-6}$, следовательно, соотношение сигнал/шум не лучше, чем $S/N \sim 5(10^{-2} - 10^{-3})$. Поскольку согласно [13] в соотношение S/N для корреляционной функции $\Delta I/I$ входит в квадратичной форме, $(S/N)_{\text{кор}}$ не лучше 10^{-4} , что на четыре порядка меньше принятого в работе и должно приводить к увеличению времени статистического усреднения для получения $(S/N)_{\text{кор}} \sim 300$ в 10^9 раз, т. е. до 10^{10} мин, вместо 10.

Корреляционно-оптический метод, вероятно, может быть применен для корреляции оптических спайков в нейронных сетях на основе анализа потенциалзависимых изменений поглощения и флуоресценции окрашенных нейронов, где отношение сигнал/шум может достигать 1—10. Тогда $(S/N)_{\text{кор}} \sim 1-10^2$, и соответственно время статистического усреднения $t \sim 10-10^3$ с. Серьезным недостатком метода, использующего по-

тенциалзависимый краситель, является, в частности, фотосенсибилизация, приводящая к быстрой инактивации мембран. Окрашивание потенциалчувствительным красителем (мероцианиноксозолоновым) приводит к фотодинамическому повреждению клеточных мембран в течение 10—12 мин.

Экспериментальные исследования оптических свойств возбудимых мембран. Первые попытки исследования изменения светорассеяния при генерации ПД были предприняты в 1966 г. Комиссарчиком и его сотрудниками [14]. Несмотря на то что отношение шум/фон было доведено до величины $2 \cdot 10^{-4}$, зарегистрировать какие-либо изменения оптических свойств мембран оказалось невозможным. Изменение светорассеяния на нерве краба при ритмической его стимуляции впервые обнаружено Хиллом и Кейнсом [15, 16]. Позже с применением техники многократного накопления Козну и соавторам удалось зарегистрировать изменение светорассеяния по отношению к фоновой засветке на величину $\sim 10^{-5}$ [10, 11, 17—20]. В дальнейшем эти результаты неоднократно воспроизводились рядом советских и зарубежных исследователей.

Наиболее полное и подробное исследование оптических свойств мембран гигантских аксонов кальмара было проведено в лаборатории Кейнса Козном и сотрудниками. Результаты их сводятся к следующему: замечено два эффекта — увеличение светорассеяния при деполяризации под углом 90° к падающему лучу ($\Delta I/I \sim 2 \cdot 10^{-6}$) и уменьшение под углом $10-30^\circ$ ($-\Delta I/I \sim 4 \cdot 10^{-6}$). Путем перфузии аксона показано, что эти эффекты обусловлены изменением состояния мембраны; с помощью метода фиксации потенциала выявлена зависимость $\Delta I/I$ только от количества транспортированных ионов. Из рис. 1, а видно, что инерционность нарастания интенсивности светорассеяния в первой фазе (натриевый ток) имеет характерное время ~ 3 мс, во второй фазе (калиевый ток) — 40 мс. Кроме того, при предъявлении деполяризующего импульса, равного равносному натриевому потенциалу, и блокировании калиевого

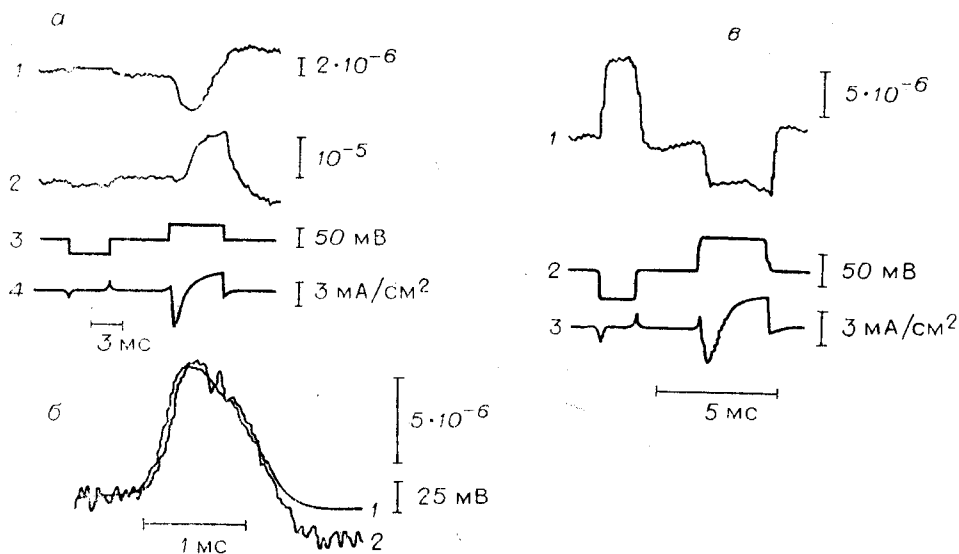


Рис. 1. Изменение светорассеяния и ДЛП при изменении потенциала на мембране гигантского аксона кальмара:

а — изменение светорассеяния при ступенчатых смещениях потенциала на мембране: 1 — под углом 30° , 2 — 90° , 3 — мембранный потенциал, 4 — трансмембранный ток [17]; б — оптический отклик (2) на генерацию ПД (1) в результате изменения ДЛП; в — изменение ДЛП (1), потенциала мембраны (2) и трансмембранного тока (3) в ответ на ступенчатые гипер- и деполяризующие импульсы [29, 30]. (Во всех случаях использовалась техника многократного накопления.)

тока бромистым тетраэтиламмонием изменения светорассеяния не наблюдалось.

Козном и соавторами предлагается следующая модель изменения состояния мембран. В первой фазе спайка из гликопротеидной области происходит транспортировка ионов Na^+ и его гидратной воды, что приводит к уменьшению щели между шванновскими клетками и аксолеммой, во второй фазе за счет транспортировки ионов K^+ и гидратной воды в щель аксолема — шванновская клетка наблюдается обратный процесс, причем, как это видно из приведенных результатов, скорость изменения объема гликопротеидов во время второй фазы меньше из-за более быстрого насыщения щели ионами K^+ (по сравнению с током $\text{Na}_{\text{Na}^+}/J_{\text{K}^+} \sim 0,4$) и последующей медленной диффузии Cl^- и воды. Это подтверждается замедленной Cl^- на менее подвижные анионы изотриптата или глутамината, замедляющие период релаксации. Эффект изменения светорассеяния, вероятно, объясним разрежением примембранной области в результате сжатия аксон-шванновской щели. Более быстрая релаксация в отличие от светорассеяния под углом 90° может быть вызвана насыщением примембранной области гидратной водой, связанной с ионами K^+ .

Кроме наблюдаемых эффектов светорассеяния, обусловленных флуктуациями размеров аксон-шванновской щели и примембранной области, наблюдается и потенциалзависимое светорассеяние, происходящее в ответ на предъявление гиперполяризующего импульса. Это быстрое и на порядок меньшее предыдущих эффектов изменение светорассеяния (постоянная времени 25 мкс) под углом 90° , как было показано с помощью блокирования ионных каналов тетродотоксином, а также блокирования липидов при добавлении октанола и бутанола, объясняется изменением толщины липидного слоя. Светорассеяние под углом $10-25^\circ$ определяется изменениями в нелипидной части мембран. Наблюдается также некоторое медленное ($0,9-1$ с) увеличение ($\Delta I/I \sim 2 \cdot 10^{-6}$) светорассеяния при гиперполяризации мембраны, связанное также с нелипидной частью мембраны.

Дополнительную информацию о структуре мембраны можно извлечь из результатов исследования потенциалзависимого эффекта ДЛП, предсказанного Франком [21], впервые экспериментально обнаруженного Берестовским и другими [22] и исследованного впоследствии Козном, Тасаки и рядом авторов [8, 23-28]. Интересно, что ДЛП прежде всего связано с нелипидными мембранными частицами, расположенными в области ионных каналов. Это подтверждается тем, что обратимое блокирование ионных каналов может привести к исчезновению эффекта ДЛП. К такому же результату приводят и длительная гиперполяризация, повышение температуры, изменение концентрации ионов кальция, причем время, в течение которого теряются потенциалзависимые свойства двулучепреломляющих структур, достаточно велико (Ca^{++} -зависимое ~ 1 мин, при гиперполяризации — 100 мс). Важно отметить, что и потенциалзависимое светорассеяние, и ДЛП указывают также на то, что в результате спайка происходит существенное изменение поверхностных структур, непосредственно не связанных с работой ионных каналов и, возможно, ответственных за такие важные функции мембраны, как регуляция ферментативной деятельности, активного транспорта и т. п. Функциональная зависимость ДЛП от потенциала мембраны, полученная Козном и другими, указывает на возможность керровского механизма двулучепреломления ($\tau \sim 20-40$ мкс, $\Delta I/I \sim E^2$). На рис. 1, б, в приведены результаты [29, 30], иллюстрирующие оптические отклики на изменение потенциала мембраны за счет эффекта ДЛП.

Кроме этих изменений оптических свойств возбудимых мембран обнаружено, что нервные волокна при прохождении электрического импульса подвергаются механической деформации, впервые описанной в

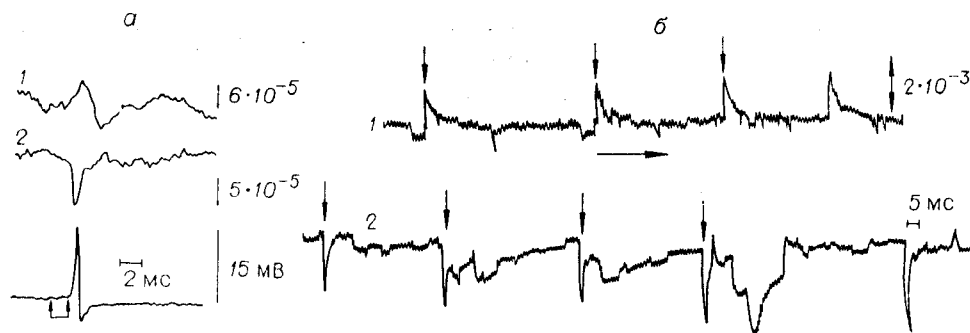


Рис. 2. Оптические ответы, обусловленные поперечным смещением аксона краба (а) и коннектива виноградной улитки (б) при электрической стимуляции: 1 — щелевой зонд с правой стороны, 2 — с левой. На рисунке б виден эффект «накопления» (слева направо). (↓ — момент стимуляции, → — направление развертки.)

работе [31], где был использован интерференционный метод определения механического сдвига отражающей пластинки золота в 20 мкм, прикрепленной к мембране, во время генерации ПД. В работе [32] также показано, что вместе с потенциалом действия по нервному волокну краба распространяется механическая волна. Эксперимент был поставлен таким образом, что оптическим способом регистрировалось поперечное смещение аксона по степени перекрытия световой щели плотным краем нервного волокна. В этом случае изменение светового потока было $\Delta I/I \sim \sim 3 \cdot 10^{-5}$ в расчете на один ПД. Предполагается, что при этом происходит поперечное смещение аксона на 10 нм, причем интересно то, что в месте раздражения механическая волна опережает электрическую на 0,5—1 мс, впоследствии (через 3—5 мм) двигаясь синхронно (рис. 2, а).

Нами ранее был получен подобный результат (техника измерения была той же), но, так как синхронное накопление не использовалось, зарегистрировать смещение при единичной стимуляции не удалось. Тем не менее при периодическом длительном раздражении эффект проявлялся настолько сильно, что его можно было зарегистрировать и без накопления. В свое время это явление мы объяснили артефактом, обусловленным либо гидродинамическими возмущениями, либо пузырьковой электродиссоциацией физиологического раствора при периодической стимуляции (см. рис. 2, б), вследствие чего результат не был опубликован.

Потенциалзависимые молекулярные красящие зонды. В 1964 г. И. Г. Штранкфельд и Г. М. Франк зарегистрировали изменение квантового выхода флуоресценции при электрической стимуляции окрашенного люминесцентным красителем аксона. Позднее, применив потенциалзависимые флуоресцентные зонды, Тасаки и соавторам [33—37] удалось обнаружить, что краситель АНС (анилинонафталинсульфонат), связанный мембраной гигантского аксона кальмара, проявляет потенциалзависимые свойства, выражающиеся в изменении интенсивности его флуоресценции ($\Delta I/I \sim 10^{-4}$). Дальнейшие исследования флуоресцентных свойств АНС, ТНС показали, что интенсивность оптического сигнала в ответ на предъявление деполяризующего импульса зависит только от потенциала на мембране.

В последние годы Коэном и соавторами [38] исследовано несколько сотен потенциалзависимых зондов (ПЗЗ). Наиболее эффективными оказались красители класса мероцианинов. Механизм молекулярного взаимодействия красителя с мембраной и потенциалзависимость изменений интенсивности флуоресценции к настоящему времени остаются не вполне ясными. Трудность интерпретации результатов состоит в том, что если эффекты ДЛП и светорассеяния связаны с обратимыми структурными изменениями мембраны, то этого нельзя сказать о потенциалзависимой

флуоресценции, интенсивность которой может меняться при переносе красителя в разные части мембраны, при диффузии в примембранную область, изменении микроокружения и т. п. В этом смысле, используя ПЗЗ в качестве оптического индикатора электрического состояния мембраны, следует быть осторожным в оценке результатов. Например, количество сорбированного мембранами различных клеток красителя трудно-контролируемо, в результате чего амплитуда оптических ответов либо меняется в широком диапазоне, либо сигнал отсутствует вообще. В зависимости от наличия анионных, катионных или нейтральных групп в ПЗЗ может сильно меняться динамика его связывания с мембраной. Например, замечено, что при деполяризации мембраны анионные красители электрофоретически входят в мембрану из раствора сильнее, чем катионные или нейтральные; так же оказывают значительное влияние на спектрально-поляризационные свойства флуоресценции изменения рН среды, упругих свойств мембран (39).

Методика окрашивания препарата прежде всего затруднена тем, что мероцианиновые красители плохо растворимы в воде. Хорошим детергентом является этиловый спирт. Однако при добавлении воды ПЗЗ неизбежно полимеризуется и перестает флуоресцировать, так как флуоресцируют только мономеры. Интересно отметить, что краситель, хорошо окрашивающий мембрану аксона, может вообще не связываться с соматической мембраной, проявляя, таким образом, специфичность к отдельным структурам нейронов различных животных.

Существуют также трудности с подготовкой препарата к окрашиванию. Не всегда удается хорошо очистить нервную сеть ганглия от соединительнотканной оболочки, что затрудняет доступ красителя к поверхности мембраны, а также получить оптически доступный и прозрачный объект. Перспективными в этом смысле являются искусственно выращенные сети культуры нервных клеток и изолированная сома нейронов.

Критичным параметром при окрашивании оказывается концентрация красителя. При очень больших и малых концентрациях сигнал может отсутствовать. Оптимальной считается концентрация 0,1—1 мг/мл, однако эта величина может варьировать в широких пределах для мембран клеток различных животных. Становится ясно, насколько важна отработка методики на этапе исследования взаимодействия мембран с красителем.

Первые оптические регистрации ПД окрашенных флуоресцентным красителем (мероцианин) нейронов провели Залсберг, Дэвил и Коэн [40] на *Hirudo medicinalis*. Выбор был обусловлен высокой прозрачностью препарата и большими размерами клеток (~ 80 мк). Кроме того, нейроны этого ганглия были идентифицированы, нервная сеть представляла собой монослой стереотиически выстроенных клеток. В этом же году, пятью месяцами ранее, Дэвил, Залсберг, Коэн и Ваггонер [41] зарегистрировали единичный оптический спайк окрашенного мероцианином гигантского аксона кальмара (с соотношением сигнал/шум ~ 10 : 1), используя синхронное накопление. В 1973 г. им удалось исключить технику синхронного накопления и зарегистрировать единичный ПД [40]. По мнению авторов, полученный результат важен с точки зрения открывающейся возможности изучения межнейронных связей в простых нервных сетях с использованием матричного фотодатчика, позволяющего следить за многими нейронами одновременно. Несмотря на то что площадь аксона в 10^3 раз больше площади средней клетки ганглия (~ 50 мк), применение мероцианинового красителя дало возможность получить единичный оптический спайк. Многочисленные последующие попытки обойтись без накопительной техники при регистрации единичного ПД в клетках некоторых других животных не увенчались успехом.

Для получения жизнеспособного, многослойного, прозрачного пре-

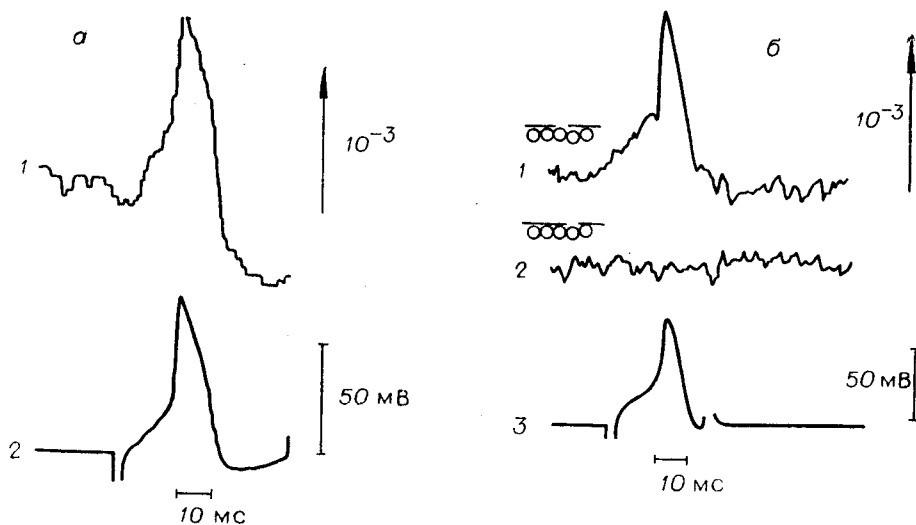


Рис. 3. Результат измерения интенсивности флуоресценции окрашенного мероцианиновым красителем нейрона медицинской пиявки [40]:

a — оптический отклик (1) при генерации ПД (2); применялась техника многократного накопления; диаметр клетки 68 мк, температура 21°C; *b* — оптический отклик (1) при генерации ПД (3) в случае, когда изображение нейрона проципировалось на фотодетектор; 2 — нейрон выведен из поля зрения на 95 мкм; видно, что в этом случае оптического спайка нет; размер нейрона 50 мкм, температура 21°C. Для улучшения разрешения проводилось 9-кратное усреднение, хотя сигнал можно зарегистрировать от единичного спайка [42].

парата авторам пришлось разработать специальный метод его приготовления. Ганглий окрашивается в растворе Рингера с добавлением 0,05 мг/мл красителя вместе с 0,02% детергента. Затем ганглий помещался в раствор с повышенным содержанием кальция (5 ммоль вместо 1,8 ммоль). Несмотря на то что были приняты меры, предотвращающие фотодинамический эффект (содержание в темноте с минимальным доступом кислорода), избежать повреждения мембран не удалось. Время измерения было ограничено 10—20 мин (рис. 3).

Дальнейшее развитие техники измерения с помощью ПЗЗ по изменению флуоресценции, поглощения, дихроизма и двулучепреломления наиболее полно отражено в работе [42], выполненной на гигантском аксоне кальмара, где преследовалась цель выявления возможности получения оптического сигнала любой природы с максимальным соотношением сигнал/шум путем перебора ряда красителей, условий окрашивания, техники измерения. Были синтезированы красители, дающие высокое соотношение сигнал/шум, превышающее по эффективности все ранее известные, причем наибольший эффект был получен с использованием мероцианинпроламинового красителя. В процессе генерации ПД потенциалзависимое поглощение менялось с соотношением сигнал/шум 100:1. Однако фотодинамическое повреждение мембраны возникало уже после нескольких минут освещения препарата. На рис. 4 представлено изменение поглощения при гипер- и деполаризующих скачках потенциала, приведена фотография оптических спайков поглощения, полученных без накопления (рис. 4, *a*, *б*) и методом многократного накопления (рис. 5). Зависимость степени фотодинамического повреждения от времени освещения для различных красителей (см. рис. 4, *в*) показывает, что лучший из них повреждает мембрану уже через 12 мин после включения излучателя.

В 1977 г. Залсберг, Коэн и Дэвил [43] предприняли обещанную ими в 1973 г. [40] попытку одновременной регистрации импульсной активности 14 нейронов ганглия *Balamis nubilus*. Техника приготовления пре-

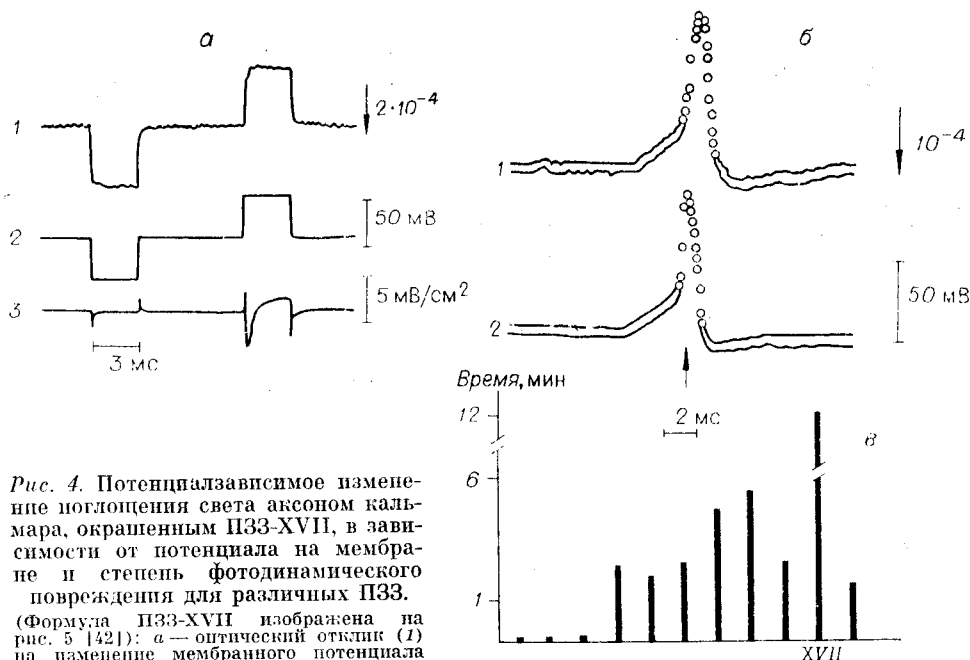


Рис. 4. Потенциалзависимое изменение поглощения света аксоном кальмара, окрашенным ПЗЗ-XVII, в зависимости от потенциала на мембране и степень фотодинамического повреждения для различных ПЗЗ.

(Формула ПЗЗ-XVII изображена на рис. 5 [42]); а — оптический отклик (1) на изменение мембранного потенциала (2) и трансмембранный ток (3); пропускание интерференционного фильтра на $\lambda \sim 750$ нм; применялось 128-кратное накопление; постоянная времени системы 20 мкс; аксон окрашивался в растворе красителя 0.01 мг/мл; б — изменение поглощения (1) при генерации ПД (2); фотографии единичных спайков снята с осциллографа без накопления; постоянная времени 170 мкс, $\lambda \sim 750$ нм, $C \sim 0.01$ мг/мл; в — время, в течение которого наступает фотодинамическое нарушение (падение потенциала покоем до 50%) в зависимости от структуры ПЗЗ. Наименее повреждающим, используемым в настоящей работе, является ПЗЗ-XVII. Все красители относятся к классу мероцианинов. Эксперимент проводился при одинаковых условиях.

парата оставалась той же, что и в работе [40], однако в качестве красителя был использован мероцианиноксозолоновый, данные о котором приведены в работе [42].

Несмотря на большие трудности, которые пришлось преодолеть, эксперимент удался, появилась возможность не только регистрировать оптические спайки 14 нейронов одновременно (рис. 6), но и получать опти-

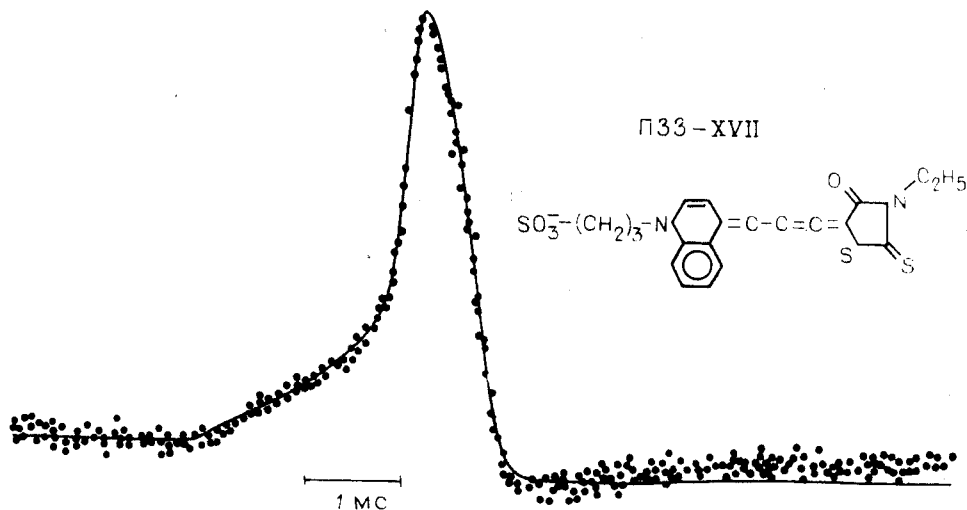


Рис. 5. Изменение оптического сигнала поглощения при генерации ПД аксона кальмара, окрашенного ПЗЗ-XVII.

Использована техника многократного накопления [42].

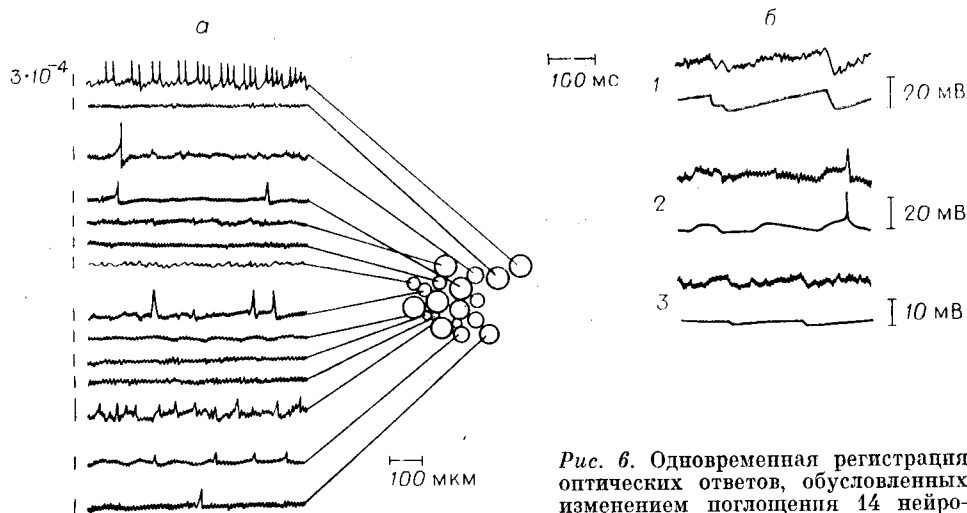


Рис. 6. Одновременная регистрация оптических ответов, обусловленных изменением поглощения 14 нейронов, окрашенных мероцианиноксазоловым ПЗЗ, на их импульсную активность (а), а также попытка регистрации синаптических потенциалов (б — 1—3).
Несмотря на то что (1) и (2) — синаптические потенциалы клеток одного ганглия, сигнал (б — 2) скрыт в шумах [43].

ческий сигнал, повторяющий форму синаптического потенциала. Этот результат уже предполагает реальную возможность исследования межнейронных связей ансамбля нервных клеток. Однако существенным осложнением является сильное фотодинамическое повреждение, следующее через несколько минут после освещения. Схема установки для регистрации оптических спайков отличалась от предыдущих применением световодов, подводимых к изображениям нейронов с помощью магнитного привода. Позднее в работе [44] была продемонстрирована возможность регистрации импульсной активности 90 нейронов. Техника измерения оставалась прежней, однако для регистрации использовался матричный фотодатчик 10×10 ячеек.

Уже упоминалось, что мероцианиновые красители оказываются специфичными для различных мембранных структур. Так, в работе [45] проводилось исследование изменения поглощения мероцианиновым красителем, встроенным в мембрану, в зависимости от мембранного потенциала нейронов различных животных: морского желудя, медицинской пиявки, лягушки, диссоциированных нейронов спинного мозга куриного эмбриона, верхнего шейного ганглия крысы. Оказалось, что константы сорбции красителя и молекулярный механизм взаимодействия с мембранами различных животных существенно различаются.

Несмотря на то что для окрашивания применялся новый, наиболее эффективный краситель WW-375, который при возбуждении клеток изменяет интенсивность зондирующего света в области 500—600 и 600—730 нм, для регистрации оптического спайка требовалось многократное накопление сигнала. Исключение составляют нейроны морского желудя и медицинской пиявки. Таким образом, удачное применение мероцианинового красителя к нейронам одного животного не гарантирует его применимости к другим клеткам.

Авторы отмечают, что при освещении нейронов в течение нескольких минут лампой накаливания (100 Вт) наблюдается фотодинамическое повреждение мембран, выражающееся в изменении и даже отсутствии ответа на электрическую стимуляцию. Схема устройства содержала источник света, тепловой и интерференционные фильтры (500—600 и 600—730 нм), фотодиод, накопитель и детектор.

С целью исследования молекулярного механизма взаимодействия зонда с мембраной в работе [46] изучался квантовый механизм флуоресценции ПЗЗ с помощью регистрации поглощения и поляризованной флуоресценции. Впервые показано, что оптический зонд {4 — [(п — (дипептиамино)стирил) — 1 метил-пиридиний иодида} обладает электрохромной природой флуоресценции ($\lambda \sim 575$ нм, $\Delta I/I \sim 5 \cdot 10^{-2}$); изменение электрического поля в мембране приводит к существенному перераспределению заряда в хромофорной группе красителя, причем потенциалзависимо флуоресцируют только молекулы, нормально ориентированные к поверхности мембран. Эти результаты указывают на существование механизма флуоресценции не за счет изменения мономер-димерного соотношения потенциалзависимого красителя на мембране (как это предполагалось ранее), а в результате электрохромного механизма. С целью проверки существования такого механизма квантового взаимодействия была предпринята попытка повторить этот результат на общеиспользуемых и наиболее эффективных красителях (мероцианин-540, мероцианинродоминовый и мероцианиноксозолоновый) [47]. Проведено исследование импульсной активности сердечной мышцы лягушки по изменению поглощения во время генерации ПД. В отличие от предыдущих экспериментов поглощение измерялось в широком спектральном диапазоне с использованием монохроматора при одновременном считывании на видекопе. Механизм флуоресценции не являлся электрохромным, что свидетельствует о существовании различных молекулярных взаимодействий красителей и мембран. Длительное облучение мышцы, как и в предыдущих работах, вызывало фотодинамическое повреждение, проявляющееся в нарушении электрической активности. В присутствии избытка кислорода повреждение усиливалось. Влияние температуры на латеральную подвижность мембранных «частиц» связано с фазовыми переходами ассоциаций липидных молекул, что, в свою очередь, вызывает изменение проницаемости мембраны и коэффициента сорбции зондов [48]. Наличие детергентов, необходимых для эффективного окрашивания препарата плохо растворимыми красителями, что показано на нейронах коры головного мозга крыс и гигантском аксоне кальмара, также приводит к увеличению подвижности липидов мембраны, хорошо растворимых в детергентах [49], например алифатических спиртах и этаноле. Детергенты влияют на связывание Ca^{++} , состав мембраны; при больших концентрациях происходит подавление натриевого тока.

Что касается фотодинамического повреждения, то оно имеет место даже в неокрашенных мембранах нейронов [50]. Путем воздействия лазерного излучения различных длин волн (1064, 532, 354 нм; $\epsilon \sim 10^6$ Вт/см²; $\tau \sim 10^{-8}$ с; $\nu \sim 12,5$ Гц) на центральные нейроны виноградной улитки было показано, что преобладающая реакция в этом случае — снижение уровня мембранного потенциала и увеличение частоты импульсной активности. То же наблюдалось на нейронах аплизии, рецепторе речного рака, клетках коры головного мозга крыс, причем даже при освещенных He-Ne-лазером (632,7 нм). В работе [51] облучение мощным импульсным лазером (0,1 Дж, $\tau \sim 400$ мкс) приводило к эффекту фотостимуляции нейронов, проявляющемуся в ритмической импульсной активности. Восстановление деятельности нейронов происходило через несколько минут после освещения.

Возможности применения других оптических методов. Общепринятым при исследовании свойств возбудимых мембран является анализ трансмембранного потенциала, ионных токов и т. п. Сопутствующее ПД явление выделения и поглощения тепла при K^+ - Na^+ -обмене, на наш взгляд, является исключительно важной характеристикой, связанной со структурными перестройками и с изменением термодинамического состояния мембраны. Кроме того, изучение пространственно-временной

структуры поля тепловых источников позволит определить характер синхронических пучков на поверхности гигантских нейронов, изменения их эффективности в результате электрогенеза, т. е. даст возможность выявить динамику развития наиболее активных участков мембраны.

Вопрос о влиянии динамики сорбции и десорбции тепла во время ПД на структуру возбудимой мембраны остается открытым. Это прежде всего связано с тем фактом, что тепловой эффект при генерации ПД чрезвычайно мал и трудноизмерим. Например, при K-Na-обмене выделяется 2700 кал/моль, полное тепловыделение в мембране составляет приблизительно 7—25 кал/г на один ПД. Это соответствует изменению температуры мембраны $\Delta T/T \sim 10^{-5} \text{ } ^\circ\text{C}$. Одна из известных нам попыток регистрации $\Delta T/T$ при генерации ПД (неопубликованный, но приведенный в работе [52] результат) показывает изменение $\Delta T/T$ при возбуждении мембраны на величину $20 \cdot 10^{-6}$. По утверждению Мюралта и других [52], тепловой спайк при 0°C почти совпадает с оптическим спайком, обусловленным эффектом ДЛП.

Одновременное измерение ДЛП и теплового спайков указывает на тесную связь между ними, так как ДЛП, вероятно, возникает за счет понижения энтропии молекулярных ассоциаций в мембране (что подтверждается данными поляризационной флуоресценции), т. е. их более анизотропной ориентацией, сопровождающейся выделением тепла в момент первой фазы спайка с положительным градиентом сигнала. Во второй фазе — отрицательном градиенте — уменьшение сигнала ДЛП свидетельствует о поглощении тепла и повышении степени изотропности ассоциаций молекул в мембране. В работе не описана аппаратура, используемая для регистрации теплового спайка, однако указано, что измерения проводились высокочувствительной термонарой с комплексом усиливающей аппаратуры и 20-кратным накоплением. Это означает, что чувствительность измерения была доведена до величины $10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}$, что весьма сомнительно, так как известные модификации термодинамических измерений ограничиваются величиной $10^{-2} \text{—} 10^{-3} \text{ } ^\circ\text{C}$. Измерения проводились на первом волокне щуки. Форма теплового спайка приведена на рис. 7.

В течение последних лет в различных физических исследованиях становится все более популярным использование термочувствительных жидкокристаллических зондов (ТЖЗ) [53] (например, на основе эфиров холестерина), обладающих также температурозависимыми электрооптическими свойствами. В искусственно синтезированных ТЖЗ замечательным является то, что при незначительных изменениях температуры (порядка десятых долей градуса) структура последних меняется от аморфной до жидкой, причем в области температур фазового перехода ТЖЗ проявляет свойство избирательно отражать свет по длине волны, т. е., «пробегая» область температур $T_0, T_0 + \Delta T$, ТЖЗ меняет свой цвет непрерывно во всем видимом диапазоне длин волн (от красного до фиолетового); это свойство и положено в основу использования кристалла как индикатора малых изменений температур с высоким пространственным разрешением.

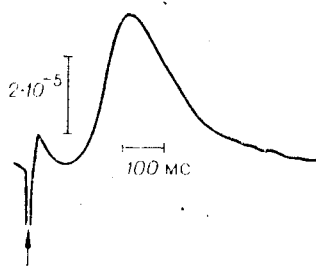


Рис. 7. Тепловой спайк периферического нерва щуки при 0°C .

Использовано 20-кратное накопление, максимальное изменение температуры $\Delta T \sim 20 \cdot 10^{-6} \text{ } ^\circ\text{C}$. Сигнал, предшествующий ПД, вызван стимулирующим импульсом. Стрелкой указан момент стимуляции [52].

Преимущества такого зонда перед традиционно используемыми очевидны как с точки зрения проведения локальных измерений, так и с позиций возможности одновременного анализа пространственного распределения тепловых источников. Начальная температура T_0 фазового перехода и интервал обесцвечивания ΔT легко регулируются многокомпонентным смещением эфиров холестерина с различными удельными весами. Причем T_0 и ΔT варьируются в весьма широких пределах.

Для получения оптического сигнала, линейно связанного с изменением температуры, можно применить в качестве детектирующего устройства интерференционный фильтр с достаточной большой крутизной и линейностью характеристики изменения поглощения в зависимости от длины волны отраженного света с его последующей регистрацией на фотодетекторе. Амплитуда этого сигнала однозначно связана с текущей температурой калибровочной кривой.

Интересно было бы выяснить реальность применения этого метода к исследованию термодинамического состояния возбудимых мембран, однако подобные работы нам неизвестны. Интерес к ТЖЗ обусловлен также тем, что многие компоненты, входящие в состав мембраны, обладают жидкокристаллической структурой (например, липиды) и обнаруживают температурозависимые свойства, проявляющиеся в фазовом переходе гель — жидкий кристалл, что подтверждается исследованием температурных фазовых переходов методами микрокалориметрии и релаксации флуоресценции красящего зонда [48, 54]. Более того, в мембранах клеток содержатся и эфиры холестерина, описанные выше как индикаторы температуры (ТЖЗ). Следовательно, не исключено, что эффект ДЛП, обнаруживаемый при возбуждении мембраны, обусловлен температурозависимым фазовым переходом, причем баланс тепловой энергии, возможно, регулируется работой ионных каналов.

Дополнительным свойством жидкокристаллических соединений в мембранах может являться и свойство температурозависимого селективного отражения света, механизм которого был рассмотрен выше на примере эфиров холестерина. В этом случае появляется возможность без введения флуоресцирующего красителя — зонда, существенно нарушающего структуру мембраны, исследовать внутримембранные температурные фазовые переходы, играющие, по-видимому, фундаментальную роль в жизнедеятельности клеток. По крайней мере, искусственно синтезированная мембрана холестеринного типа должна обладать подобным свойством.

Заключение. Интенсивное внедрение оптических технологий в биологию свидетельствует не только и, может быть, не столько об ограниченности традиционных методов, сколько о бурном развитии оптоэлектронной техники измерений. В первую очередь это относится к рэлеевской и доплеровской спектроскопии рассеянного света [55, 56], рамановской спектроскопии [57] и оптоэлектронным методам анализа микроизображений [58].

В обзоре мы ставили перед собой задачу детального, в значительной степени хронологического рассмотрения всех существующих исследований и их результатов, связанных главным образом с изучением возбудимых мембран, свойства которых (поддержание постоянной разницы потенциалов за счет активных и пассивных механизмов, генерация постсинаптических потенциалов и потенциалов действия, распространение их на большие расстояния) должны были проявляться в изменениях оптических характеристик нервных клеток и их элементов (синапсов, отростков, внутриклеточных структур). Анализ литературы проводился в предположении альтернативности оптических методов существующим, в первую очередь микроэлектродному.

Целесообразность выбора и использования какой-либо из существующих

ющих оптических технологий для изучения свойств возбудимых мембран вообще и нейрональных в частности прежде всего связана с конкретной целью и задачами исследований. При этом первостепенную важность приобретает выбор объектов для изучения оптических свойств нейронных структур. Создается впечатление, что медленное развитие «оптической нейрофизиологии» определяется ограниченностью используемых объектов. До самого последнего времени это были традиционный гигантский аксон беспозвоночных животных, хотя, как показали результаты, полученные группой Коэна [10—12, 17—20, 43] возможности методов позволяют существенно расширить круг «моделей». В первую очередь ими могут стать изолированная сома, диссоциированные и реагегированные культуры нейронов позвоночных и беспозвоночных животных.

Так, оценка пространственно-временной организации функциональных связей между отдельными нейронами сети путем анализа коррелированности во времени импульсной активности в простейшем случае предполагает лишь знание самого факта возникновения ПД без учета его формы, постоянной времени и амплитуды. Тогда достаточно сформировать стандартный ответ, не обладающий линейной зависимостью от потенциала на мембране, но строго коррелирующий со спайком. При одновременном слежении за многими нейронами нужно знать, принципиально ли важны сведения об их взаимном пространственном расположении, и если нет, то задача упрощается до регистрации интегральной активности нейронного ансамбля. В этом случае не имеет смысла исследовать оптические корреляты деятельности отдельных клеток, так как достаточным кажется анализ частотного спектра импульсного «шума» нейронов. Более того, меняя пространственное частотное окно (путем последовательного диафрагмирования изображения сети), можно получить информацию о пространственно-сглаженных временных спектрах.

Если знание о взаимном расположении клеток в архитектуре сети принципиально важно, то это предполагает существование дисперсионного соотношения между пространственными и временными частотами. Информация о спектре временных частот априори может содержаться в пространственной структуре сети, и тогда оба подхода становятся альтернативными.

Известные из литературы попытки свидетельствуют о трудности исследования связей в нейронных сетях на изолированных препаратах. Как показывает наш опыт и анализ мировой практики, результаты, полученные с помощью распределенных электродов в 1974 г. на изолированных ганглиях пиявки, морских моллюсков и в культуре ткани [3], несмотря на их кажущуюся привлекательность, трудновоспроизводимы и вряд ли могут стать предпочтительными по отношению к оптическим исследованиям.

Создается впечатление, что наиболее подходящими для решения этих задач могут стать «искусственные» сети различной сложности, возникающие в культуре нервной ткани позвоночных и беспозвоночных животных при использовании методов диссоциации и последующей реагегации. Наиболее интересными здесь могут оказаться культура диссоциированных нейронов дыхательного центра или монослойные препараты культуры кардиоцитов, генерирующие *in vitro* периодическую активность.

Подтверждением правильности таких соображений является работа [59], в которой была исследована семидневная культура мозжечка. Специфика эксперимента основана на свойстве избирательного окрашивания М-540 только возбудимых мембран. Конечной целью подобных исследований может оказаться анализ динамики пространственно-временных связей и развития электрогенеза в процессе роста, дифференцировки, при различных структурных модификациях в связи с функциональными

перестройками сети под влиянием химических или физических факторов, приводящих, например, к изменениям синаптической эффективности. Возможность регистрации оптических возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП), показанная Коэном [43], может служить основой для подобного рода исследований. Ближе к таким работам стоят анализ распределения синаптических пулов и их функционирование на поверхности гигантских нейронов (в маутнеровских клетках, нейронах Ретикуса, пейсмейкерных элементах ганглиев моллюсков, гигантских пирамидах в препаратах Майорова — Самойлова, пре- и постсинаптических структурах мочевого пузыря лягушки, по Майорову). Описанные конструкции экспериментов, проводящихся на реагрегированных нейронных сетях и изолированной клеточной коме, лежат в русле традиционных нейрофизиологических исследований.

Необычным, как нам кажется, развитием оптических методов исследования возбудимых мембран может стать анализ взаимодействия антигенов поверхности нейронов с антителами к ним с учетом потенциалзависимости такого взаимодействия [60].

Что же касается техники регистрации оптических ПД и постсинаптических потенциалов (ПСП), то, несмотря на ряд отрицательных факторов, основное место среди которых занимает фотодинамическое повреждение, преимущества оптических методов с точки зрения высокого соотношения сигнал/шум при применении ПЗЗ неоспоримы. Кроме того, не использованы еще все возможности для регистрации оптических эффектов в мембранах, сопутствующих генерации единичного ПД (ДЛП, светорассеяние, изменение энтропии). Низкие соотношения сигнал/шум диктуют необходимость применения в последнем случае вычислительной техники и методов многократного накопления.

В ряде случаев электронное накопление можно заменить более простым — оптическим. Например, задача о выделении функционально связанных нейронов в сети может быть решена путем измерений разницы в оптических плотностях, окрашенных менее токсичным красителем нейронов при многократном стимулировании, вызывающем его десорбцию [7]. Последовательность распространения нервного импульса от нейрона к нейрону может быть определена изменением скважности импульсной подсветки источника излучения с временным окном характерной длительности ПД. Такое же оптическое накопление можно осуществить при регистрации флуоресценции, теплопродукции, ДЛП и светорассеяния в случае многократного возбуждения.

Систематические исследования оптических коррелятов электрической активности для анализа деятельности нейронов и нейронных сетей развиваются у нас в стране, к сожалению, очень медленно. Число же проблем и задач нейробиофизики и нейрофизиологии, в которых оптические методы становятся альтернативными, возрастает. В особенности это касается тех из них, которые тесно связаны с вычислительной техникой. Соединение оптоэлектронных систем, работающих на линии с ЭВМ, открывает самые широкие перспективы для развития оптических методов исследования структуры и функции нейронных сетей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Guenter W. Gross. Simultaneous Single Unit Recording in Vitro with Photoetched Laser Deinsulated Gold Multimicroelectrode Surface.— IEEE Trans. on Biomed. Eng., 1979, vol. BME-26, N 5.
2. Bushwald J. S. et al. Multiple Unit Recording, Technique Interpretation and Experimental Applications in Bioelectric Recording Techniques/Ed. A. R. F. Tompson and N. M. Patterson. N. Y.: Academic, 1978.
3. Штарк М. Б., Ратушняк А. С., Воскресенская Л. В. Мультиэлектродная перфузионная камера для исследования культуры ткани.— БЭВМ, 1974, № 9, с. 42.
4. Hodgkin A. L., Huxley A. F. Currents Carried by Sodium and Potassium Ions

- through the Membrane of Giant Axon of Loligo.—*J. Physiol.*, 1952, vol. 116, p. 449—472.
5. **Волькенштейн М. В.** Молекулярная биофизика. М.: Наука, 1975.
 6. **Пасечник В. И., Гланик Т.** О размере области «некажущей» мембраны вблизи канала, образованного грамицидином А.—*Биофизика*, 1978, т. XXIII, № 5.
 7. **Левин С. В.** Структурные изменения клеточных мембран. М.: Наука, 1976.
 8. **Берестовский Г. Н. и др.** Быстрые изменения двойного лучепреломления мембраны первого волокна во время возбуждения.—*ДАН*, 1969, т. 189, с. 203—226.
 9. **Mitchison J. M.** A Polarized Light Analysis of the Human Red Cell Ghost.—*J. Exper. Biol.*, 1953, vol. 30, p. 397—432.
 10. **Cohen L. B. et al.** Changes in Light Scattering that Accompany the Action Potential in Sguld Giant Axons: Potential-Dependent Components.—*J. Physiol.*, 1972, vol. 224, p. 701—725.
 11. **Cohen L. B. et al.** Change in Light Scattering in Sguld Giant Axons.—*J. Physiol.*, 1972, vol. 224, p. 727—752.
 12. **Cohen L. B. et al.** Changes in Neuron Structure During Action Potential Propagation and Synaptic Transmission.—*Physiol. Rev.*, 1973, vol. 53, p. 373—418.
 13. **Штокман М. И.** О корреляционно-оптическом методе изучения взаимодействия нейронов в первых сетях.—Препринт № 96. Новосибирск: изд. ИАН СО АН СССР, 1979.
 14. **Комиссарчик Я. Ю. и др.** О субмикроскопической организации и проведении возбуждения в вищеребральном коннективе перловицы *Unio Grassus*.—В кн.: Электронная микроскопия клеток животных. М.—Л.: Медицина, 1966, с. 119—129.
 15. **Hill D. K., Keynes R. D.** Opacity Changes in Stimulated Nerve.—*J. Physiol.*, 1949, vol. 108, p. 278—281.
 16. **Hill D.** The Effect of Stimulation on the Opacity of a Crustacean Nerve Trunk and its Relation to Fibre Diameter.—*J. Physiol.*, 1950, vol. 111, p. 283—303.
 17. **Cohen L. B.** Light Scattering Changes During Axon Activity.—In: *Permeability and Function of Biological Membranes*. N. Y.: Academic, 1970, p. 318—525.
 18. **Cohen L. B. et al.** Light Scattering and Birefringence Changes During Activity in the Electric Organ of *Electrophorus Electricus*.—*J. Physiol.*, 1969, vol. 203, p. 489—509.
 19. **Cohen L. B., Keykes R. D.** Changes in Light Scattering Associated with the Action Potential in Crab Nerve.—*J. Physiol.*, 1971, vol. 212, p. 259—275.
 20. **Cohen L. B., Landowne D.** Changes in Light Scattering During Synaptic Activity in the Electric Organ of the Skate. *Raja Erinacea*.—*Biophys. J.*, 1970, vol. 10, p. 173—178.
 21. **Карнакова В. Е., Франк Г. М., Штейнгауз В. Н.** Двухлучепреломляющие свойства биологических мембран.—*Физиол. журн. СССР*, 1947, т. 33, с. 483.
 22. **Берестовский Г. Н., Луневский В. З., Ражин В. Д.** Электрооптические эффекты в мембранах.—В кн.: *Физико-химические аспекты поведения и возбуждения*. [Труды симпозиума 4—6 июня 1968 г. Москва]. М.: Наука, 1970.
 23. **Cohen L. B., Keynes R. D.** Evidence for Structural Changes During the Action Potential in Nerves from Working Legs of *Maja Sguinado*.—*J. Physiol.*, 1968, vol. 194, p. 85—86.
 24. **Cohen L. B., Krynes R. D.** Birefringence Changes in the Voltageclamped Sguld Axon.—*J. Physiol.*, 1969, vol. 200, p. 180—200.
 - 24a. **Cohen L. B., Keynes R. D.** Optical Changes in the Voltageclamped Sguld Axon.—*J. Physiol.*, 1969, vol. 200, p. 200—240.
 25. **Tasaki I. et al.** Changes in Fluorescence, Turbidity in Birefringence Associated with Nerve Excitation.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, vol. 61, p. 885—888.
 26. **Берестовский Г. Н.** Зависимость двойного лучепреломления бислойной липидной мембраны от ионной силы среды.—*Биофизика*, 1975, т. 20, с. 633—637.
 27. **Берестовский Г. Н., Луневский В. З.** Электрооптические эффекты в мембранах.—В кн.: *Биофизика мембран*. Каунас: изд. Мед. ин-та, 1971, т. 1, с. 111—136.
 28. **Берестовский Г. Н. и др.** Оптические исследования измерения структуры мембраны нерва при прохождении первого импульса.—*Биофизика*, 1970, т. 15, с. 62—68.
 29. **Cohen L. B. et al.** Changes in Axon Birefringence During the Action Potential.—*J. Physiol.*, 1970, vol. 211, p. 495—515.
 30. **Cohen L. B. et al.** Analysis of Potential Dependent Changes in Optical Retardation in the Sguld Giant Axon.—*J. Physiol.*, 1974, vol. 218, p. 205—237.
 31. **Latimer P.** Light Scattering vs. Microscopy for Measuring Cell Size and Shape.—*Biophys. J.*, 1979, vol. 27, N 1.
 32. **Левин С. В. и др.** Поперечное смещение аксона краба при потенциале действия.—*ДАН*, 1980, т. 251, № 4.
 33. **Tasaki I. et al.** Transient Changes in Extrinsic Fluorescence of Nerve, Produced by Electric Stimulation.—*J. Membr. and Biol.*, 1973, vol. 11, p. 353.
 34. **Tasaki I. et al.** Fluorescence Changes During Conduction in Nerves Stained with Acridine Orange.—In: *4-th Intern. Biophys. Congress Thes. Vol. 3*. M., 1972, p. 12.

35. **Tasaki I., Warashina A.** Changes in Fluorescence, Turbidity and Birefringence Associated with Nerve Excitation.—*Photochem. and Photobiol.*, 1976, vol. 24, p. 191.
36. **Tasaki I. et al.** Properties of Squid Axon Membrane as Revealed with Hydrophobic Probes.—*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1971, vol. 68, p. 938.
37. **Tasaki I. et al.** Fluorescence of Squid Axon Membrane Labelled with Hydrophobic Probes.—*Membrane Biol.*, 1972, vol. 8, p. 100.
38. **Cohen L. B. et al.** Changes in Axon Fluorescence During Activity. Molecular Probes of Membrane Potential.—*J. Membrane Biol.*, 1974, vol. 19, p. 1—36.
39. **Heiple M. et al.** An Optical Technique for Measuring Intracellular pH in Single Cells.—*J. Cell. Biol.*, 1979, vol. 83, p. 320.
40. **Salzberg B. M. et al.** Optical Recording of Impulses in Individual Neurons of an Invertebrate Central Nervous System.—*Nature*, 1973, vol. 246, p. 508—509.
41. **Davila et al.** Changes in Axon Absorption During Activity Staining — *Nature New Biol.*, 1973, vol. 241, p. 159.
42. **Ross W. N. et al.** Changes in Absorption, Fluorescence, Dichroism and Birefringence in Stained Giant Axons: Optical Measurement of Membrane Potential.—*J. Membrane Biol.*, 1977, vol. 33, p. 141—183.
43. **Salzberg B. M. et al.** Optically Recording of Neuronal Activity in an Invertebrate Central Nervous System: Simultaneous Monitoring of Several Neurons.—*J. of Neurophys.*, 1977, vol. 40, N 6.
44. **Frederick F., Hartlin E.** Biological Applications for Voltage Sensitive Dyes.—*Science*, 1979, vol. 203, march.
45. **Ross W. N., Reichardt L. F.** Species-Specific Effects on the Optical Signals of Voltage-Sensitive dye.—*J. Membrane Biol.*, 1979, vol. 48, N 4.
46. **Lev L. M. et al.** Evidence for Charge Shift Electrochromic Mechanism in a Probe of Membrane Potential.—*Nature*, 1979, vol. 281, N 5731.
47. **Sims P. J. et al.** The Cyanine dyes as Probes of Membrane Potential.—*Biochemistry*, 1974, vol. 13, p. 3315—3329.
48. **Владимиров Ю. В., Добрецов Г. Е.** Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980.
49. **Willgren H., Virtanen P.** Membrane Effects of Alcohol in the Nervous System.— In: *Proc. Eur. Soc. Neurochem. 2-nd Meet ESN. Göttingen*, 1978.
50. **Прохоров А. М. и др.** Реакция центральных нейронов виноградной улитки на действие лазерного излучения различной длины волны.—*ДАИ*, 1980, т. 251, № 3.
51. **Arvanitaki A. et al.** Photopotential Primaire et Effects Secondaires par Photoactivation de la Neuromembrane a Haute.—*J. Soc. Biol.*, 1968, N 1, p. 153.
52. **Von Muralt A. et al.** The Optical Spike.—*Phlugers Arch.*, 1976, vol. 367, p. 67—76.
53. **Абрамович Г. В.** Жидкокристаллические термоминдваторы и их применение. М.: Наука, 1978.
54. **Teissie J.** Fluorescence Temperature Jump Relaxation in Aqueous Dispersions of DHD During the Gel to Liquid-Crystal Transition.—*Biophys. Acta*, 1979, vol. 555, N 3.
55. **Earnshaw John C., Martin W.** Studies of Cellular Dynamics by Laser Doppler Microscopy.—*Pestic. Sci.*, 1979, vol. 40, p. 358—368.
56. **Штокман М. И.** Спектроскопия рассеянного света в биологии и биофизике.—*Автометрия*, 1980, № 2.
57. **Bruce S. Hudson.** New Laser Techniques for Studies.—*Ann. Rev. Bioeng.*, 1977, vol. 6, p. 135—150.
58. **Андрянов Л. А. и др.** Автоматический анализ цитограмм.—*Автометрия*, 1977, № 3.
59. **Rohrer H., Schachner M.** Non-Selective Staining of Neurones and Glial Cells by the Fluorescent Dye Merocyanine 540 in Tissue Cultures of Mouse Cerebellum.—*Neurosci. Lett.*, 1979, vol. 13, p. 127—131.
60. **Штарк М. Б.** Иммунонейрофизиология. Л.: Медицина, 1968.

Поступила в редакцию 16 марта 1981 г.