



Leica

MICROSYSTEMS

**ЗАДАЧИ ДЛЯ ПРАКТИКУМА
ПО КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ**

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

П.А. Зыкин, Е.И. Краснощёкова, Л.А. Ткаченко

**ИЗУЧЕНИЕ РАЗВИТИЯ ПИРАМИДНЫХ КЛЕТОК КОРЫ МОЗГА
МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА РАННИХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА**

**Биолого-почвенный факультет
Санкт-Петербургский государственный университет**

2009

Оглавление

Введение.....	3
Онтогенез и строение коры конечного мозга млекопитающих.....	3
Методы окраски нейронов развивающейся коры.....	4
Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.....	11
Устройство микроскопа Leica TCS SPE.....	13
Порядок работы с микроскопом.....	20
Использование программного обеспечения конфокального микроскопа.....	22
Задачи исследования.....	34
Задача № 1. Иммуногистохимическое исследование дифференцировки пирамидных нейронов коры мозга человека.....	34
Постановка задачи.....	34
Материал и методы.....	37
Характеристика материала.....	37
Изготовление срезов.....	39
Окраска по Ниссля.....	40
Выявление MAP2 иммунопозитивных нейронов.....	41
Получение изображений.....	42
Обработка изображений.....	44
Задача № 2. Иммуногистохимическое исследование дифференцировки пирамидных нейронов коры мозга крысы.....	50
Постановка задачи.....	50
Материал и методы.....	51
Характеристика материала.....	51
Введение трейсерного маркера.....	51
Фиксация материала.....	53
Изготовление срезов в криостате.....	54
Выявление MAP2 и N200 иммунопозитивных нейронов.....	55
Получение изображений.....	56
Обработка изображения.....	58
Задача № 3. Гистологическое исследование шипиков нейронов коры мозга крысы.....	60
Постановка задачи.....	60
Материал и методы.....	62
Характеристика материала.....	62
Фиксация, импрегнация материала, изготовление препаратов.....	62
Получение изображений.....	63
Литература.....	66

Перед выполнением практической работы рекомендуется ознакомиться с теоретическим курсом «Основы световой микроскопии»

Введение

Онтогенез и строение коры конечного мозга млекопитающих

Кора полушарий конечного мозга (плащ) - представляет собой поверхностно расположенное серое вещество, состоящее из нескольких слоев клеток. С филогенетических позиций кору принято делить на древнюю (палеокортекс), старую (архикортекс), и новую (неокортекс). Новая кора в мозге млекопитающих составляет основной объем плаща и на всем протяжении отграничивается от филогенетически более старых отделов межзачаточной корой.

Неокортекс имеет шестислойный тип строения, что отличает его от палео- и архикортекса. Филогенетически слои коры имеют разное происхождение и только рассматривая последовательные стадии онтогенеза, можно установить их преемственность. Начальная закладка коры – препластинка объединяет все корковые территории. Более поздняя формация – корковая пластинка имеется в составе старой и новой коры. При этом только в неокортексе слои корковой пластинки формируются по принципу «изнутри – наружу», то есть генез нижних слоев происходит раньше поверхностных. В процессе миграции нейробласты корковой пластинки разделяют препластинку на две части: поверхностную маргинальную зону (слой I дефинитивной коры) и глубокую субпластинку. Обнаруженная в эмбриональной коре всех млекопитающих, субпластинка, в зависимости от длительности периода гестации и видовой специфичности, претерпевают более или менее полную, генетически запрограммированную, редукцию (Allendoerfer, Shatz, 1994). Если эмбрион в течение беременности подвергается воздействию тератогенных факторов, нейроны субпластинки не элиминируются, вследствие этого нарушается дальнейшее развитие слоев корковой пластинки и возникает угроза развития врожденных неврологических патологий (Andres et al., 2005). Принимая во внимание такую закономерность ранних этапов развития неокортекса для успешной диагностики и лечения гестационных патологий ЦНС важно знать последовательность дифференцировки основных типов корковых нейронов. Две основные популяции нейронов коры представлены пирамидными проекционными и непиримидными (звездчатыми, корзинчатыми, веретеновидными и т.д.) интернейронами. Важные функциональные и нейрохимические различия основных типов нервных клеток заключается в следующем:

- Подавляющее число пирамид относится к глутаматэргичным проекционным, их аксоны образуют системы нисходящих, внутри- и межполушарных трактов;

- Подавляющее число непиримидных нейронов являются ГАМК-эргичными вставочными, их аксоны не выходят за пределы локальной области коры и через синапсы терминальных ветвлений оказывают тормозное влияние на пирамидные клетки.

Слои неокортекса различаются по нейронному составу. Самый наружный слой I – молекулярный слагается преимущественно из густого сплетения нервных волокон и в его составе имеется лишь небольшое количество нервных клеток. Слой II – наружный зернистый, содержит большое количество мелких непиримидных нейронов. Слой III – наружный пирамидный, состоит из мелких и средних пирамидных клеток. Слой IV – внутренний зернистый, содержит большое количество мелких и средних звездчатых, веретеновидных, корзинчатых клеток. Слой V – внутренний пирамидный содержит наряду с довольно крупными пирамидными клетками гигантские пирамидные, особенно крупные пирамидные клетки Беца встречаются в моторных полях коры. Слой VI – полиморфный, содержит, как показывает его название, клеточные элементы самой разнообразной формы. Пирамидные и непиримидные клетки в составе разных слоев различаются по времени и источникам эмбрионального происхождения, путям миграции в кору, генотипу, транскрипционным факторам, контролирующим их дифференцировку.

Методы окраски нейронов развивающейся коры

Визуализация эмбриональных нейронов, по сравнению с клетками зрелого мозга, является более сложной задачей. На ранних этапах онтогенеза трудно различить по размеру и форме тела нервных и глиальных клеток, поэтому классический нейростологический метод Ниссля не дает полного представления о нейронном составе отдельных слоев коры. Метод Гольджи, который основан на импрегнации отростков нейрона (аксона и дендритов) солями серебра, также не дает желаемых результатов из-за слабой дифференцировки этих отростков. Окрашивание миелинизированных волокон (по методу Вейгерта), с помощью которого можно выделить отдельные слои по радиальному или тангенциальному направлению аксонов также не пригодно для изучения эмбриональной коры, ввиду слабой миелинизации (рис. 1).

Развитие иммуногистохимических методов окрашивания тканей существенно расширяет возможности изучения развития коры на ранних этапах онтогенеза. Эти методы позволяют визуализировать результаты реакции антиген-антитело на гистологических срезах. В качестве антигена выступают компоненты клеточных структур. Антитела, меченые флуоресцирующей краской, дают возможность идентифицировать комплекс тканевого

антигена и диагностического антитела с помощью флюоресцентного микроскопа. Впервые способ окрашивания клеточных и тканевых компонентов с помощью специфических антител для микроскопического исследования был предложен А. Coons с соавт. в 1941 году.

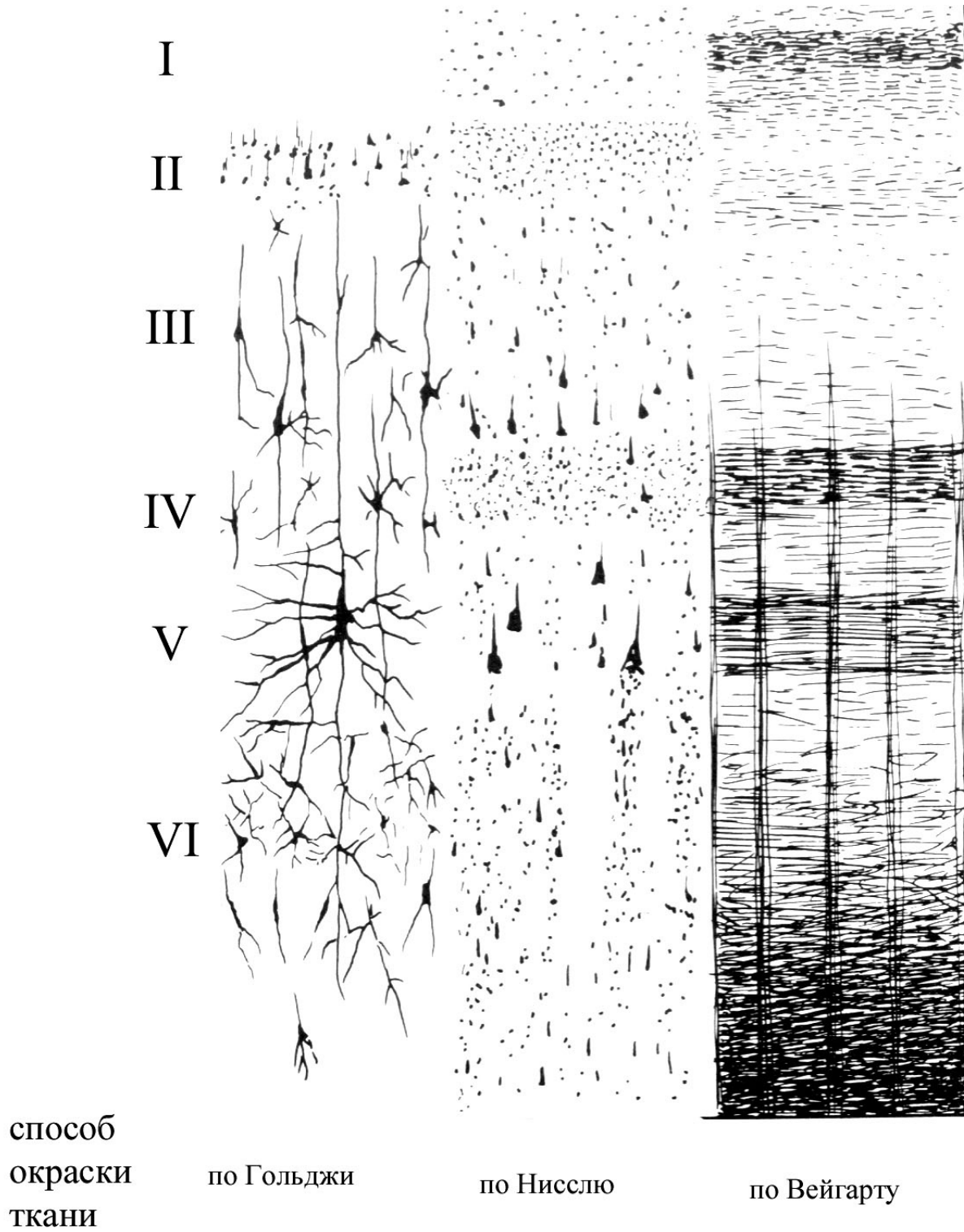


Рис. 1. Схема строения неокортекса мозга взрослого человека по результатам окраски нервной ткани разными методами. Обозначения: I-VI – слои коры.

Принципиальным отличием иммуногистохимии от других методов иммунологической диагностики, использующих реакцию антиген-антитело, является структурная специфичность исследования. Это означает, что в реакции оценивается не только наличие сигнала (есть окрашивание или нет) и его сила (интенсивность окрашивания), но и пространственное распределение сигнала в гистологическом препарате, то есть окрашивание структурных элементов клетки. В настоящее время установлена взаимосвязь между морфотипом нейрона, его физиологическими свойствами, местоположением в определенном слое коры и генной экспрессией. В результате уже на ранних этапах онтогенеза иммуногистохимически возможно выделить отдельные популяции нейронов. Так для клеток-предшественников, которые в дальнейшем дифференцируются как нейроны, характерна экспрессия бета-III-тубулина. Дифференцировку морфотипа нейрона и степень его зрелости можно установить по экспрессии белка микротрубочек MAP-2, который маркирует типичное для данной клетки ветвление дендритов.

Существует несколько вариантов иммуногистохимического анализа, которые детально описаны в специальных руководствах (Полак, Норден, 1987; М.В. Угрюмов, 1991):

- Прямой метод взаимодействия меченых антител с тканевыми антигенами предполагает использование меченых первичных антител к исследуемому антигену. Достоинства этого метода – простая обработка и возможность использования для нескольких меток антител от одного вида животного. Недостатки – большой расход первичных антител, низкая чувствительность (рис.2).
- Непрямые методы иммуномечения изучаемых антигенов предусматривают использование двух антител, полученных из разных животных. Сначала применяются первичные не меченые антитела, которые взаимодействуют с исследуемым антигеном, затем с ними взаимодействуют меченые вторичные антитела (рис. 2). Главным достоинством непрямых методов является более высокая чувствительность в следствие того, что с не меченым первичным антителом могут взаимодействовать несколько меченых вторичных антител. Кроме того при использовании этих методов имеется возможность использовать ассортимент высоко специфичных не меченых первичных антител, которые используются в комплексе со сравнительно дешёвыми мечеными вторичными антителами.
- Распространенный вариант непрямого метода – метод авидин-биотинового-комплекса (АВС). В качестве метки для вторичных антител в этом методе используется биотин. Авидин имеет несколько мест для связывания биотина, при определённой концентрации авидина и биотинизированной метки на вторичных биотинизированных

антителах возникает комплекс авидин-биотин-метка, в результате чего формируется крупная объёмная структура содержащая большое количество меток. Основное преимущество метода — высокая чувствительность. Кроме того, эта методика позволяет использовать каталог доступных биотинизированных вторичных антител и биотинизированных меток. Из недостатков следует отметить трудоемкую обработку препаратов и необходимость блокировки эндогенного биотина.

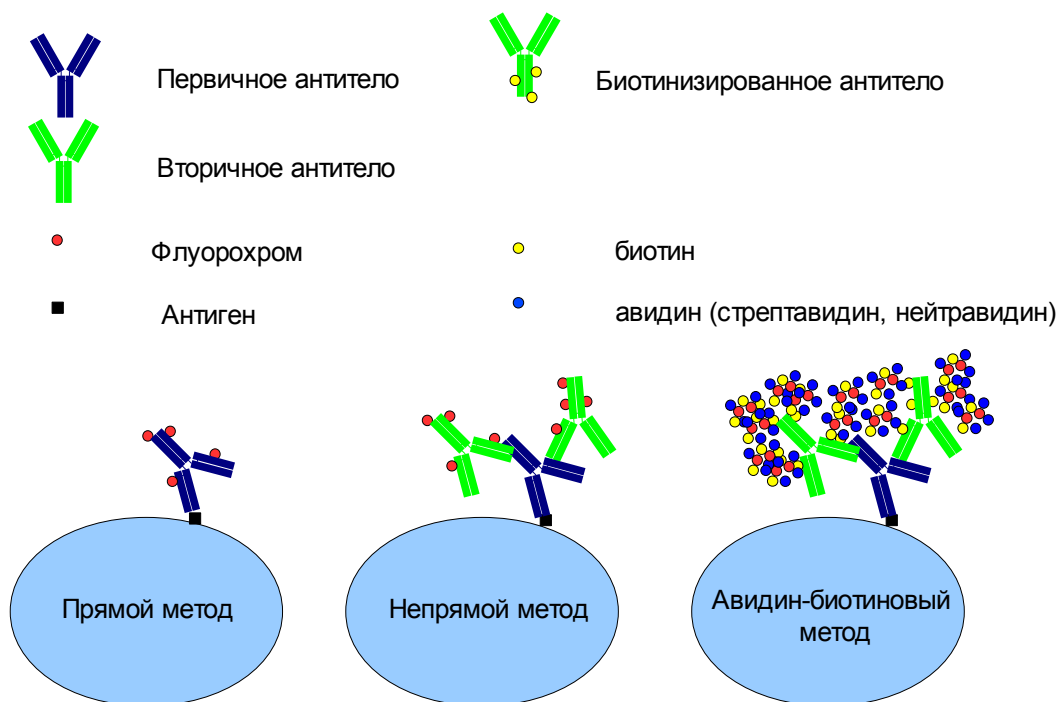


Рис. 2. Схема прямого, непрямого и АВС методов иммуногистохимического анализа.

В настоящее время используется много вариантов основных методов иммуногистохимии: методы для одновременного окрашивания нескольких антигенов, метод гаптенного сэндвича, методы с использованием в качестве метки коллоидного золота, авидин-биотиновые методы и др. В качестве примера использования иммуногистохимических методов в нейробиологии можно привести масштабное исследование распределения ферментов, пептидов и нейротрансмиттеров в центральной нервной системе животных, результаты которого публикуются в многотомной серии "Handbook of Chemical Neuroanatomy" (ed. A.Bjorklund, T.Hokfelt).

Флуоресцентная микроскопия

Методы микроскопирования препаратов в проходящем свете имеют ряд ограничений, обусловленных трудностями разделения нескольких меток и низкой чувствительностью. Флуоресцентная микроскопия отличается большей чувствительностью, а с учётом разницы в спектрах возбуждения и флуоресценции для разных флуорохромов позволяет получить точное распределение каждого из них на препарате. С использованием квантовых точек или специальной обработки изображений можно разделить до семи и более меток.

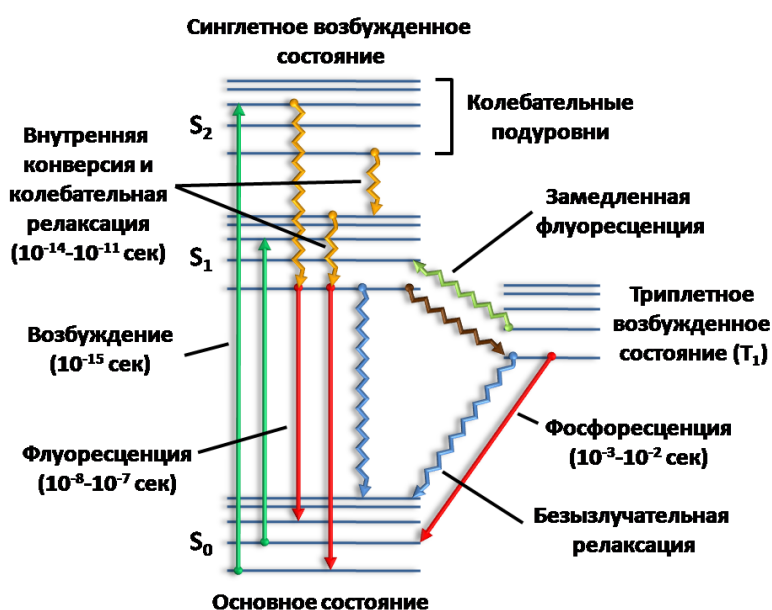


Рис. 3. Диаграмма Яблонского.

Люминесценция — свечение вещества, происходящее после поглощения им энергии возбуждения. Флуоресценция, как и фосфоресценция, - частный случай люминесценции при котором энергия возбуждения обеспечивается поглощением фотона. В отличие от фосфоресценции для флуоресценции характерен короткий интервал времени между возбуждением и свечением. Термин «флуоресценция» был введён Джорджем Стоксом в 1852 году для описания свечения минерала флюорита в видимом диапазоне света при его облучении ультрафиолетом. Для перехода в возбужденное состояние молекула должна поглотить фотон определённой энергии (длины волны). Наличие разных вибрационных и ротационных состояний у молекулы обуславливает относительно широкий спектр поглощения и испускания (рис.3).

При однофотонном возбуждении длина волны испускаемого света всегда больше длины волны поглощённого. Разница между максимумами спектров поглощения и испускания называется сдвигом Стокса и зависит от природы флуоресцирующего вещества (рис. 4).

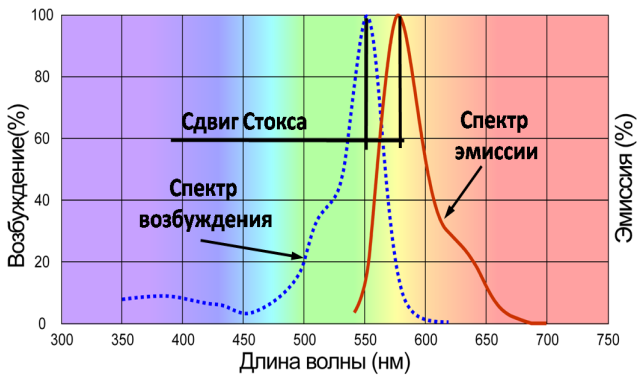


Рис. 4. Характеристики флуоресцентного вещества.

Интенсивность флуоресценции заметно ниже, чем интенсивность возбуждающего света поэтому для её наблюдения необходима система оптических фильтров, блокирующих или ослабляющих долю возбуждающего света. Преимущественное распространение получила схема эпифлуоресцентного микроскопа, в котором для освещения препарата используется тот же объектив, что и для наблюдения (рис 5).

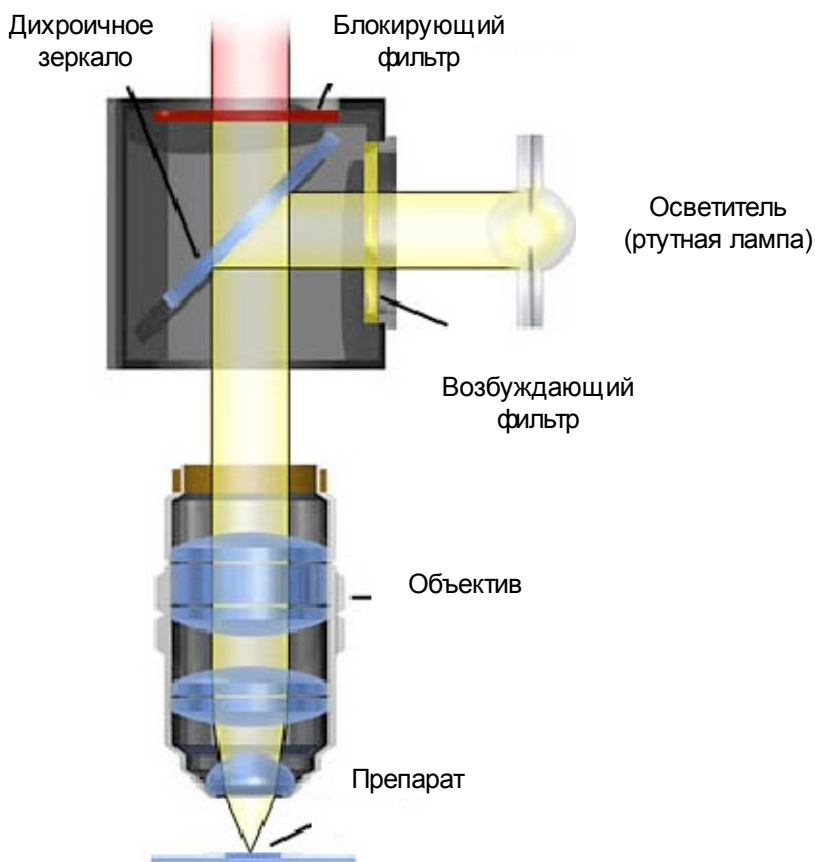


Рис. 5. Схема эпифлуоресцентного микроскопа.

В этом типе микроскопов яркость флуоресценции (B) зависит от числовой апертуры объектива (NA) и увеличения микроскопа (M) следующим образом:

$$B \propto \frac{NA^4}{M^2}$$

Для разделения возбуждающего и флуоресцентного света по длине волны используется дихроичное зеркало. Три элемента: фильтр возбуждающего света, дихроичное зеркало, блокирующий фильтр, собраны в один модуль — «фильтровый кубик». Каждый фильтровый кубик предназначен для исследования одного или нескольких флуоресцентных красителей (флуорохромов). Кроме того кубики могут отличаться блокирующим фильтром. Наиболее распространён низкочастотный тип блокирующего фильтра («low-pass»), пропускающий все длины волн, которые длиннее возбуждающего света. Для некоторых исследований предпочтительнее использовать кубик с полосовым блокирующим фильтром («band-pass»), который пропускает только максимум флуоресценции определённого флуорохрома (рис.6). В частности это позволяет разделить флуорохромы с близкими спектрами излучения или ослабить сопутствующую автофлуоресценцию. Примерами таких кубиков для FITC могут быть I3 и L5, первый имеет низкочастотный блокирующий фильтр от 515 нм и длиннее, второй имеет полосовой блокирующий фильтр 527 +/-30 нм.

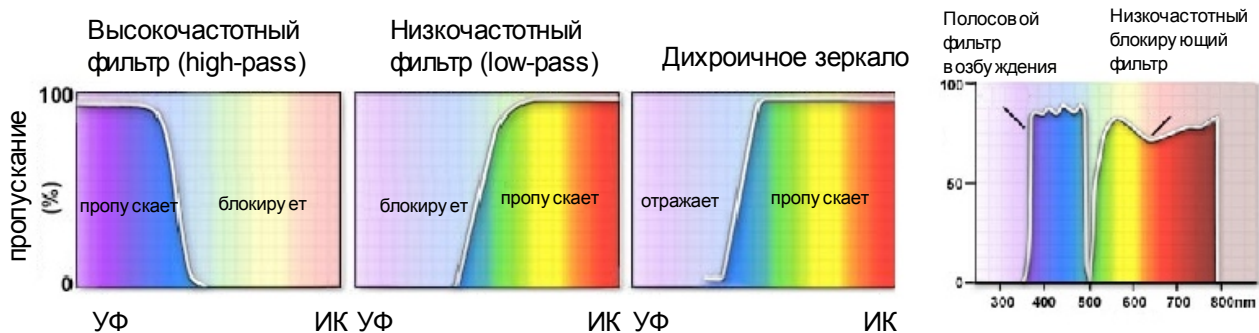


Рис. 6. Характеристики элементов фильтрового кубика.

В части подготовки препарата иммунофлуоресцентные методы в целом аналогичны иммуногистохимическим, за исключением того, что вместо фермента используется флуорохром, и отпадает необходимость в использовании субстрата для визуализации. Однако помимо флуорохрома, сам препарат может содержать вещества, обладающие свойством флуоресценции, например, NADPH, липофусцин, альдегиды. Это явление получило название автофлуоресценции. Возникновение флуоресцирующих соединений в ходе обработки —

индуцированная автофлуоресценция. Она может возникать при фиксации в глютаральдегиде, формалине, в меньшей степени это относится к метанолу. Для нервной ткани главными источниками автофлуоресценции служат альдегиды, образовавшиеся при фиксации в формалине, липофусцеин, количество которого в нейронах возрастает с возрастом, NADPH, содержащийся в митохондриях. Для подавления автофлуоресценции используется ряд методов, один из них — обработка препарата борогидратом натрия, который, как сильный восстановитель, разрушает ароматические кольца.

Чувствительность флуоресцентного метода выше, по сравнению с микроскопией проходящего света в связи с тем, что каждая молекула флуорохрома может большое, хотя и конечное, количество раз активироваться и испускать свет. Молекула, поглотив фотон и находясь в возбуждённом состоянии до момента испускания реакционно очень активна и гораздо легче вступает в реакции, например, окисляется, при этом теряя флуоресцентные свойства. Такое явление называется выцветанием и зависит от большого количества параметров, среди которых: природа флуорохрома, интенсивность освещения, время экспозиции, количество свободных радикалов в среде в которую заключён препарат. Для минимизации выцветания используются стойкие к выцветанию флуорохромы, применяются специальные вещества, уменьшающие скорость выцветания, например полифенилендиамин или н-пропил-галлат, сокращается время экспозиции и яркость возбуждающего света. Выцветание флуорохрома происходит и при хранении препаратов, в связи с чем время хранения препарата ограничено.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

При исследовании мозга очень часто возникает необходимость проведения трехмерной реконструкции. Традиционно эта задача решалась путём изготовления серийных гистологических срезов и проведения трёхмерной реконструкции на их основе. Необходимость пространственного моделирования трехмерной структуры нервной ткани обуславливается интересами исследователей относительно взаимосвязей нейронов внутри отдельных упорядоченно организованных структур мозга. В настоящее время эта задача может быть решена с использованием конфокальной микроскопии, которая позволяет визуализировать пространственную структуру живого и фиксированного материала на глубину до 200 мкм, однако для глубины более 80-100 мкм рекомендуется использовать двухфотонную микроскопию. Отличительной особенностью конфокальной микроскопии является возможность делать «оптические срезы» с высоким пространственным разрешением не только в плоскости, но и по глубине препарата. Пространственное

разрешение конфокального микроскопа при размере конфокальной диафрагмы (пинхола) равного одному диску Эйри можно оценить по формулам:

$$\text{Разрешение}_z \sim \frac{1.4 \lambda n}{NA^2} \quad \text{Разрешение}_{xy} \sim \frac{0.44 \lambda}{NA}$$

NA – числовая апертура объектива, n – коэффициент преломления иммерсионной среды, λ – длина волны.

Как видно из формул при применении соответствующих объективов и иммерсии разрешающая способность конфокального микроскопа близка к теоретическому дифракционному минимуму.

Суть конфокального принципа состоит в том, что используется диафрагма с крошечным отверстием (пин-хол), расположенная в плоскости, сопряженной с плоскостью фокуса объектива таким образом, что при проекции диафрагмы на объект, изображение точно совпадает с фокусом освещающего объект света (название «конфокальный» можно перевести как «софокусный») (рис.7).

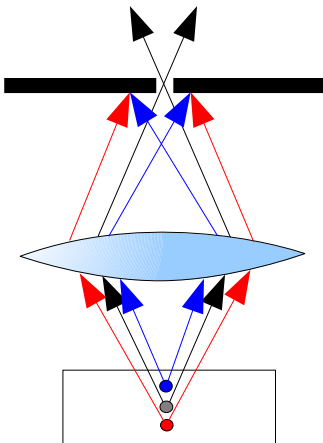


Рис.7. Иллюстрация конфокального принципа. Красный и синий объекты лежат дальше и ближе фокусного расстояния соответственно, их излучение существенно блокируется конфокальной диафрагмой. Серый объект находится точно в проекции конфокальной диафрагмы и его излучение не блокируется.

Для построения изображения подобной системой необходимо поточечное сканирование образца либо за счёт его перемещения, либо за счёт системы отклонения лучей в двух плоскостях. Полученные данные о яркости флуоресценции в каждой точке препарата сохраняются компьютером для последующего составления картинки. Процесс сканирования позволяет произвольно выбирать размер сканируемого участка, что даёт возможность «плавного» увеличения получаемых снимков.

При диаметре конфокальной диафрагмы равным одному диску Эйри на детектор будет попадать только свет, соответствующий центральному пятну дифракционной картины точечного объекта. Это позволяет выявить дополнительные детали изображения которые в обычной микроскопии не видны виду наложения вторичных максимумов дифракционной картины ярких объектов на менее контрастные объекты. Кроме того есть возможность дополнительно повысить латеральное и аксиальное разрешение до 1,4 раза по сравнению с обычной микроскопией при закрытой до 0,25 диска Эйри пинхол-диафрагме.

К немногочисленным недостаткам конфокальной микроскопии можно отнести высокую стоимость оборудования, и более низкое отношение сигнал/шум получаемого в итоге изображения.

Устройство микроскопа Leica TCS SPE

Установленный микроскопический комплекс Leica TCS SPE (рис.8) состоит из antivибрационного стола (1), прямого не моторизованного флуоресцентного микроскопа Leica DM2500 (2), блока осветителя металл-галогенидной лампы EL-6000 со световодом (3), сканирующей головки TCS SPE (4), интегрированного блока управления (5), включающего в себя 4 светодиодных лазера (405 нм, 488 нм, 532 нм, 635 нм) и компьютер, монитора (6), клавиатуры и манипулятора «мышь» (7).

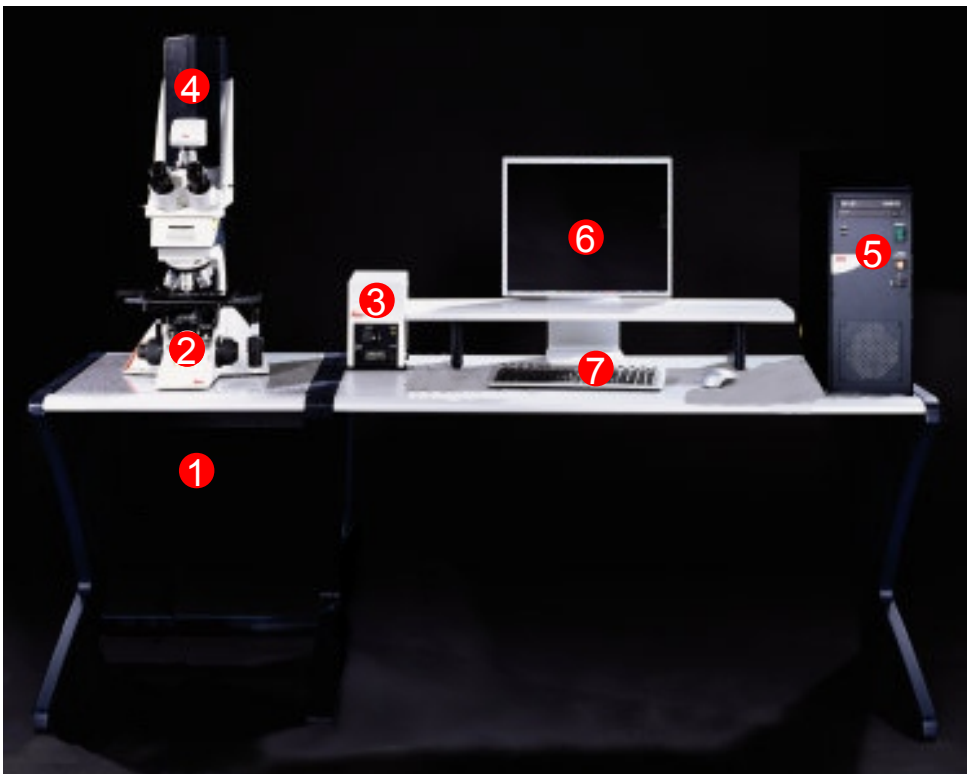


Рис.8. Внешний вид микроскопического комплекса Leica TCS SPE с микроскопом Leica DM 2500.

В основании станины микроскопа Leica DM 2500 (рис.9) с левой стороны находятся: 1 — тумблер включения микроскопа, 2 — колёсико регулировки полевой диафрагмы проходящего света, 3 — регулировка яркости встроенного галогенного осветителя, 4 — коаксиальная ручка макро- и микро- винта фокусировки, 5 — кольцо регулировки усилия макровинта, с правой стороны - 6 — кольцо блокировки подъёма столика макровинтом, коаксиальная ручка препаратоводителя, 7 — комбинированный конденсор, 8 — апертурная диафрагма конденсора, 9 — регулятор подъёма конденсора, 10 — ручка смены насадки конденсора для больших увеличений с числовой апертурой 0.9, 11 — карусель нейтральных светофильтров, 12 — место для установки дополнительных светофильтров проходящего света и поляризационного фильтра для DIC контрастирования.

В верхней части станины микроскопа (рис. 9) находится: 13 - револьвер объективов, установленные объективы приведены в таблице 2, 14 — карусель кубиков светофильтров, установленные кубики приведены в таблице 1, с левой стороны микроскопа 15 — планка анализатора поляризации, 16 — шток светоделителя тринокулярной насадки, имеющий 3 положения — полностью убранный — весь свет направлен в окуляры, среднее положение — 40% света направлено в фотоокуляр (и затем на матрицу камеры, которая не установлена на данном микроскопе) и 60% света в окуляры для наблюдения, полностью выдвинутый — весь свет направлен в фотоокуляр, с правой стороны — 17 — пластинка с призмой Волластона для ДИК контрастирования, 18 — шток зеркала, имеющий 2 положения убранный — зеркало введено в оптический путь для работы конфокальной насадки, выдвинутый — зеркало убрано из оптического пути для работы CCD камеры, 19 — набор из нейтральных светофильтров для эпифлуоресцентного осветителя, 20 — полевая диафрагма эпифлуоресцентного осветителя, 21 — апертурная диафрагма эпифлуоресцентного осветителя.

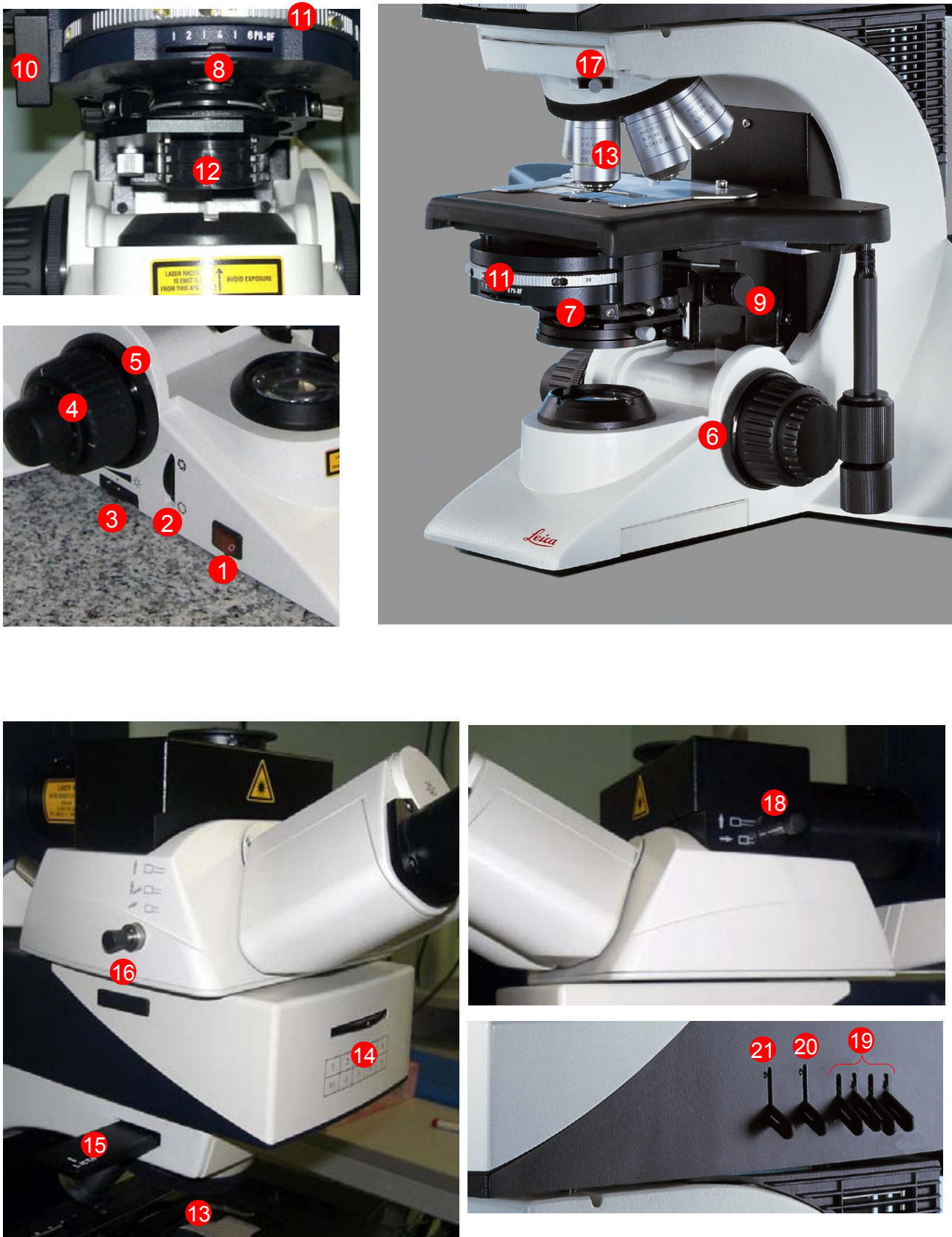


Рис. 9. Элементы управления микроскопа Leica DM 2500.

Табл. 1. Установленные фильтровые кубики и их характеристики.

Номер позиции в карусельке	Установленный кубик	Фильтр возбуждения	Блокирующий фильтр	Дихроичное зеркало	Совместимые флуорохромы
1	Нет	-	-	-	
2	Нет	-	-	-	
3	A	Полосовой 340-380нм	425	400nm	AMCA (Aminocoumarin) Cascade Blue DAPI Fast Blue Hoechst dye no. 33258 Hoechst dye no. 33342 Alexa 405
4	I3	Полосовой 450-490нм	515	510nm	Acridine orange Acridine yellow Calcium Green DiO FITC Fluo 3 Alexa 488
5	N2.1	Полосовой 515-560нм	590	580nm	Calcium Orange Ethidium bromide Nuclear Fast Red Propidium iodide Pyronine B Rhodamine B Spectrum Orange Thiazin red R TRITC XRITC Texas Red Alexa 555

Сзади микроскопа (рис. 10) располагаются: 22 — коробка с зеркалом, 23 — внешний фотодетектор проходящего света, 24 — лампа галогенного осветителя, 25 — переключатель оптического пути; в положении по-диагонали (как на фотографии) возможна работа галогенного осветителя, в положении поперёк возможна работа внешнего фотодетектора.

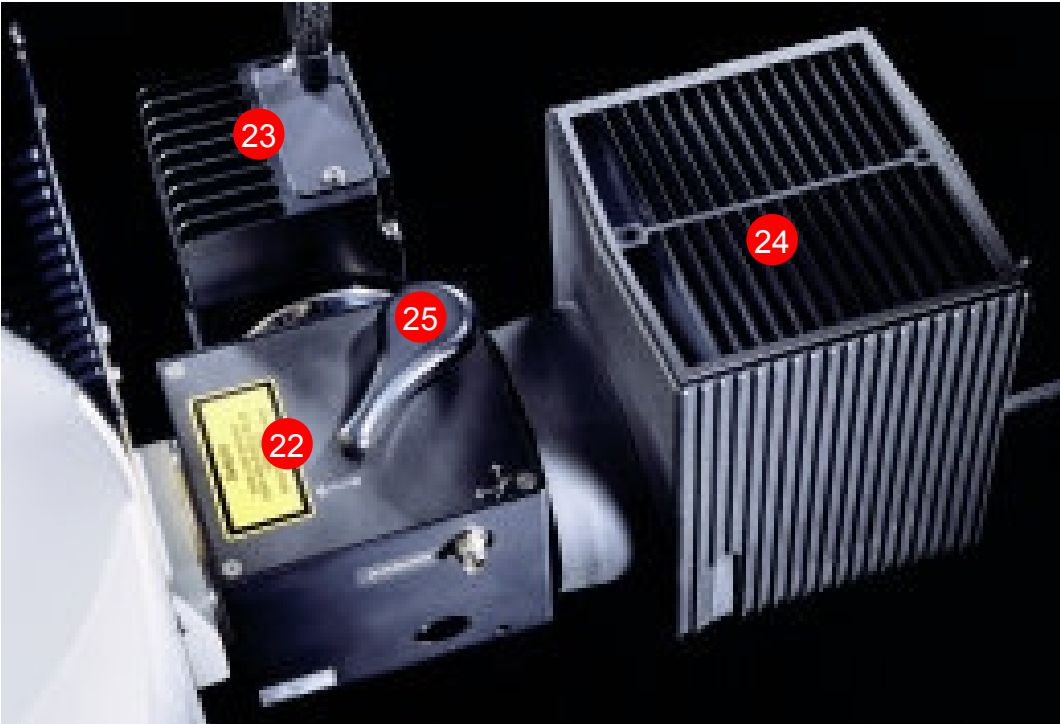


Рис.10. Элементы управления микроскопа, задняя часть.

На интегрированном блоке управления (рис.11) расположены: 1 — тумблер включения питания, 2 — ключ включения блока лазеров, 3 — индикатор включения лазеров, 4 — оптическое записывающее устройство, 5 — разъёмы универсальной последовательной шины для подключения внешних носителей информации.

На блоке флуоресцентного осветителя (рис.12) расположены: 1 — тумблер включения питания, 2 — индикатор включения лампы, 3 — таймер учёта времени работы лампы, 4 — кнопка шторки лампы, 5 — регулятор интенсивности светового потока (диафрагма) лампы.



Рис.11. Элементы интегрированного блока управления.



Рис. 12. Элементы управления блоком флуоресцентного осветителя.

Схематически, внутреннее устройство блока управления (А) и сканирующей головки (В) представлено на рис.13. Блок лазеров 1, включает в себя полупроводниковые лазеры 2 (405 нм, 488 нм, 532 нм, 635 нм) с дихроичными зеркалами, которые смешивают лазерные лучи и с помощью зеркала передают их на акустооптический управляемый фильтр (АОУФ). АОУФ, 5, может селективно выбирать нужный лазер и регулировать степень пропускания, тем самым регулируя его выходную мощность. Свет лазера поступает по гибкому световоду, 6, в сканирующую головку (В), проходит через диафрагму-пинхол возбуждения 7, и попадает на светоделительную пластинку 8, расположенную под углом 45°, которая, также, как и в флуоресцентном кубике представляет собой дихроичное зеркало. В микроскопе установлено 3 светоделительных пластинки: 405/532 для использования с лазерами 405 нм и 532 нм, 488/635 для использования с лазерами 488 и 635 нм, и RT30/70 которая является полупрозрачным зеркалом не вносящим изменение в спектральный состав света, отражающая 30% света и пропускающая 70%. После этого возбуждающий свет попадает на сканирующую систему 14, и линзу сканирующей системы 15, затем на объектив 16, который фокусирует его в дифракционно-ограниченную точку. Отсюда, при правильной настройке микроскопа по Кёллеру, проходящий свет может попасть на внешний фотодетектор 17. Флуоресцентный свет от препарата проходит через объектив 16, линзу сканирующей системы

15, десканируется сканирующей системой 14, проходит через светоделительную пластинку 8, и попадает на диафрагму-пинхол детектирования 9. После этого свет попадает на призму 10 из стекла с высоким коэффициентом цветовой дисперсии, которая расщепляет свет флуоресценции в спектр, попадает на шторки спектрального селектора 11, собирается линзой 12, и попадает на фотодетектор (ФЭУ) 13.

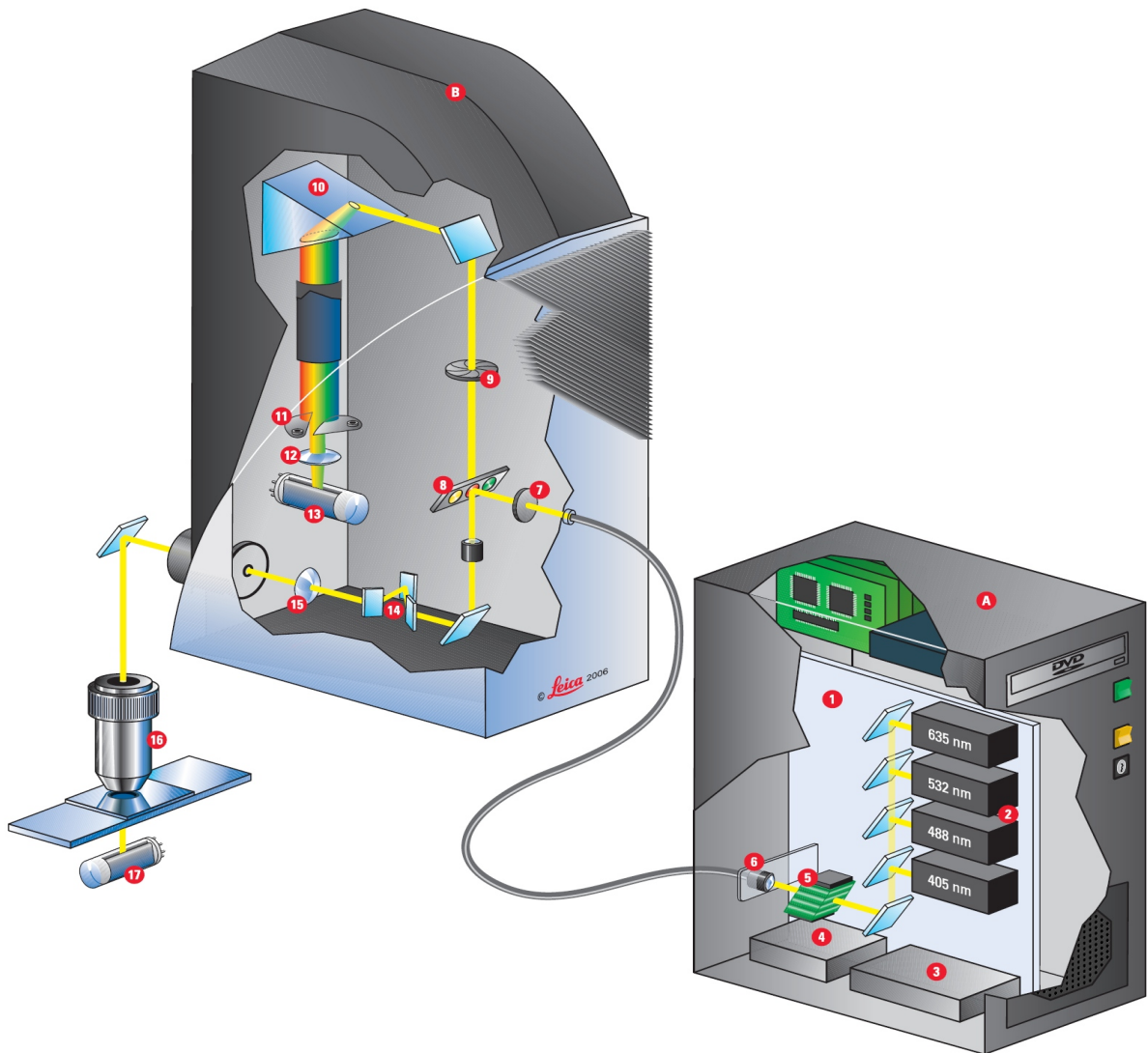


Рис. 13. Схема внутреннего устройства интегрированного блока и сканирующей головки конфокального микроскопа Leica TCS SPE.

Табл. 2. Характеристики установленных объективов (разрешение объективов приведено для лазера 488nm при размере конфокальной диафрагмы равной диаметру одного диска Эйри)

Тип объектива	Увеличение	Числовая апертура	Иммерсия	Коррекция на толщину покровного стекла	Рабочая дистанция	Разрешение по плоскости XY	Разрешение по оси Z
ACS APO	10x	0.30	-		3.00 мм	650,7 нм	4767,6 нм
ACS APO	40x	1.15	масло	0.17 мм	0.27 мм	169,7 нм	416,6 нм
ACS APO	63x	1.30	масло	0.17 мм	0.16 мм	146 нм	380 нм

Порядок работы с микроскопом

Начало работы. Записаться в журнал учёта времени работы, снять пылезащитный колпак с микроскопа, проверить микроскоп на наличие явных неисправностей. В случае обнаружения неисправностей или изменения в работе микроскопа в ходе занятия незамедлительно сообщить об этом преподавателю. Включить сетевой фильтр, включить тумблер включения микроскопа, находящийся с левой стороны основания его станины. Если предполагается пользоваться эпифлуоресцентным осветителем для работы в флуоресцентном режиме, посмотреть на таймер учёта времени работы лампы на внешнем осветителе и если счётчик показывает менее 2000 часов, нажать тумблер включения осветителя. Если предполагается использование конфокального режима, включить интегрированный блок управления, включить лазеры поворотом ключа, дождаться окончательной загрузки компьютера и запустить программу LAS AF, ярлык которой находится на рабочем столе.

Использование проходящего света. Сзади микроскопа перевести переключатель оптического пути в положение по-диагонали (как на рис. 10), установить карусельку кубиков светофильтров в пустое положение (положения 1 и 2), поставить препарат, выбрать необходимый объектив и соответствующий конденсор, найти и сфокусироваться на интересующем месте препарата (при необходимости можно регулировать яркость встроенного галогенного осветителя колёсиком с правой стороны основания станины микроскопа). Закрывать полевую диафрагму проходящего света и глядя в окуляры отрегулировать подъём конденсора так, чтобы края полевой диафрагмы были видны резко. В случае, если получившееся изображение отверстия полевой диафрагмы находится не по центру, при помощи центровочных винтов отцентровать его. Глядя в окуляры открыть полевую диафрагму строго по полю зрения. Аккуратно вынуть один из окуляров

бинокулярной насадки, глядя в тубус бинокулярной насадки без окуляра открыть апертурную диафрагму конденсора примерно на две трети. Вставить на место окуляр, при необходимости настроить бинокулярную насадку и приступить к микрокопированию.

Настройка бинокулярной насадки. Бинокулярная насадка микроскопа DM 2500 позволяет настраивать межглазное расстояние и снабжена двумя диоптрийными окулярами. Для уменьшения нагрузки на глаза исследователя необходимо произвести настройку. Для этого, повернуть диоптрийный поясок обоих окуляров в центральное положение, поставить препарат и навестись на резкость, после этого, посмотреть на удалённый предмет, закрыть один глаз и переведя взгляд в бинокулярную насадку, подстроить резкость микровинтом, посмотреть на удалённый предмет и закрыв другой глаз подстроить резкость диоптрийным пояском окуляра. Глядя в бинокулярную насадку обоими глазами настроить межглазное расстояние. Отрегулировать высоту посадки за микроскопом так, чтобы для работы не требовалось напряжение шеи. Приступить к микрокопированию.

Использование эпифлуоресцентного режима. Сзади микроскопа перевести переключатель оптического пути, в положении поперёк, ввести соответствующий выбранному флуорохрому кубик светофильтров (Табл. 1). На блоке флуоресцентной лампы выставить необходимую интенсивность и открыть шторку, использовать набор нейтральных фильтров на правой стороне микроскопа для регулировки интенсивности возбуждающего света. Первым в наборе светофильтров стоит непрозрачный экран, который можно использовать как шторку осветителя далее следуют нейтральные светофильтры с возрастающей оптической плотностью. Открыть полевую диафрагму эпифлуоресцентного осветителя сторого по полю зрения для того, чтобы избежать выцветания флуорохрома вне поля зрения. При необходимости можно использовать апертурную диафрагму эпифлуоресцентного осветителя для плавной регулировки яркости. Приступить к микрокопированию.

Использование конфокального режима. Подготовить микроскоп как в случае эпифлуоресцентного режима. Найти необходимое место на препарате. Используя непрозрачный экран в наборе светофильтров закрыть флуоресцентный осветитель. Установить карусельку кубиков светофильтров в пустое положение, с левой стороны микроскопа полностью выдвинуть шток светоделиителя бинокулярной насадки, с правой стороны полностью задвинуть шток зеркала. Приступить к работе с программным обеспечением микроскопа.

Завершение работы. Закрывать программу, выключить лазеры поворотом ключа, после отключения лазеров интегрированный блок должен проработать не менее 10 минут до

отключения питания, чтобы блок полупроводниковых лазеров успел остыть, после чего интегрированный блок можно отключить. Вынуть препарат из микроскопа, если использовалась иммерсия — промокнуть объектив специальной тканью. Перевести револьвер объективов на объектив с увеличением 10х, выключить микроскоп. Перевести переключатель интенсивности света на блоке флуоресцентного осветителя в минимальное положение, выключить осветитель. Одеть на микроскоп пылезащитный колпак, последним выключить сетевой фильтр. Заполнить в журнале учёта время работы и расписаться.

Использование программного обеспечения конфокального микроскопа

Интерфейс пользователя LAS AF можно разделить на четыре области (рис. 14) 1 — панель меню, 2 — выбор задачи (Конфигурация, Получение изображение, Обработка изображения и Подсчёт), 3 — дополнительные вкладки выбранной задачи, например эксперименты, получение изображений и оптический путь, 4 — рабочая область изображения. Область дополнительных вкладок и рабочая область меняются в зависимости от выбранной задачи.

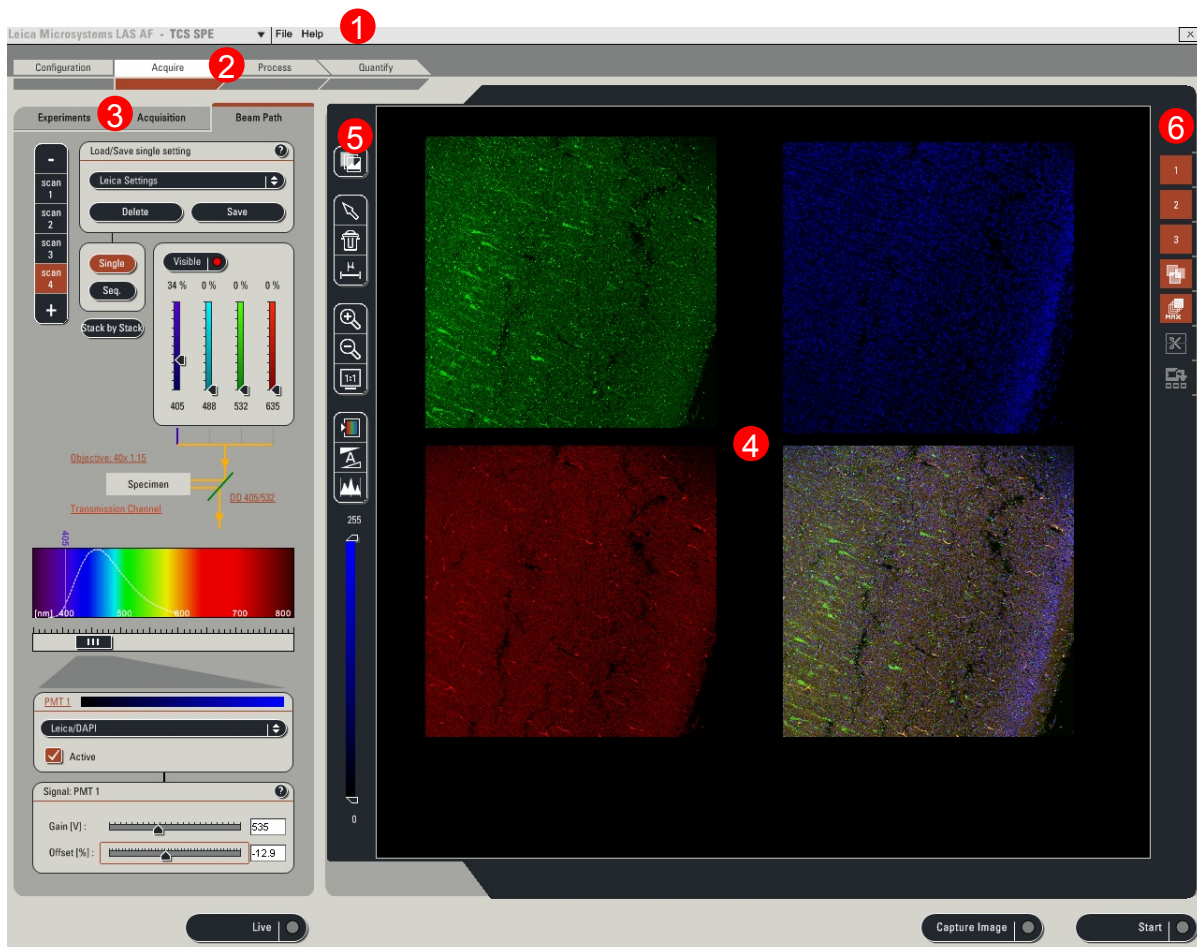


Рис. 14. Общий вид программы LAS AF.

Панель меню содержит три выпадающих меню: режим работы (на нашем микроскопе доступен только режим LAS AF), стандартное меню файл, позволяющее открыть, закрыть, загрузить файл и распечатать текущий вид, меню помощи по работе с программой.

Задача «Configuration» позволяет произвести настройку программы и получить сведения о микроскопе, установленных объективах и имеющихся в памяти данных о спектрах красок. При выборе в поле «Hardware configuration» иконки «Objective» на рабочей области будет отображен список установленных объективов. Выбрав из списка объективов интересующий объектив можно получить по мимо прочего данные о типе объектива, числовой апертуре, разрешающей способности, увеличении, необходимой толщине покровного стекла, глубине фокуса, типе иммерсии.

Задача «Acquire» позволяет организовать настройку необходимую для сканирования препарата, само сканирование и получение одного или серии изображений и сохранение полученных изображений.

На вкладке «Beam path» производится настройка оптического пути конфокальной системы и детекторов для одного или нескольких флуорохромов. Для удобства работы готовые настройки можно сохранить или загрузить в диалоге «Load/Save settings».

На вкладке «Experiments» будут отображаться полученные вами снимки, или серии снимков (пачки). Можно выбрать любой снимок для просмотра на рабочей области. Для сохранения результатов можно сохранить все полученные в ходе эксперимента данные, нажав внизу вкладки кнопку «Save all», однако, для удобства последующей обработки рекомендуется разбить все полученные снимки по какому-либо значимому признаку, например номеру препарата, создать при помощи кнопки «New» необходимое количество экспериментов переименовать их, например, по номеру препарата и перенести соответствующие картинку в каждый из них. Таким образом, после сохранения ваши данные будут расположены в *.lif файлах каждый из которых будет называться номером препарата и в каждом таком файле будут находиться снимки именно этого препарата. На нашем микроскопе для сохранённых данных предназначен диск D:\ , на котором располагаются папки с фамилиями экспериментаторов, набранные в латинской транскрипции. Рекомендуется сохранять свои данные в свою папку, создав в ней подпапку с датой получения снимков. Полученные данные необходимо забрать с компьютера микроскопа в течение 3 месяцев. В виду ограниченного места для хранения результатов после трёх месяцев данные могут быть удалены. Для открытия файлов *.lif можно воспользоваться бесплатной версией программы LAS AF Lite (ftp://ftp.llt.de/softlib/LAS_AF_Lite/), и свободно доступной программой ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) с дополнением LOCI

(<http://www.loci.wisc.edu/ome/formats.html>).

На вкладке «Acquisition» производится настройка типа сканирования, места сканируемого на препарате, размера получаемого изображения, диаметра конфокальной диафрагмы и накопления или усреднения получаемых изображений.

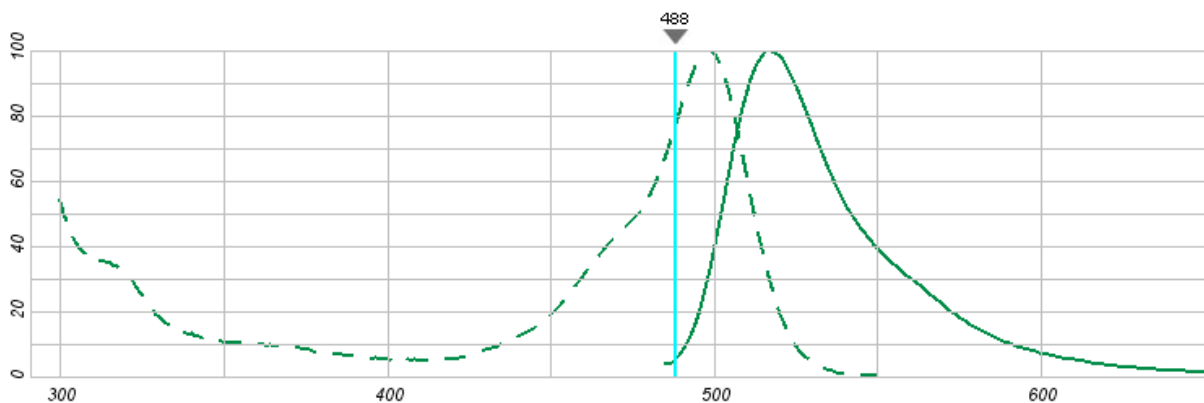
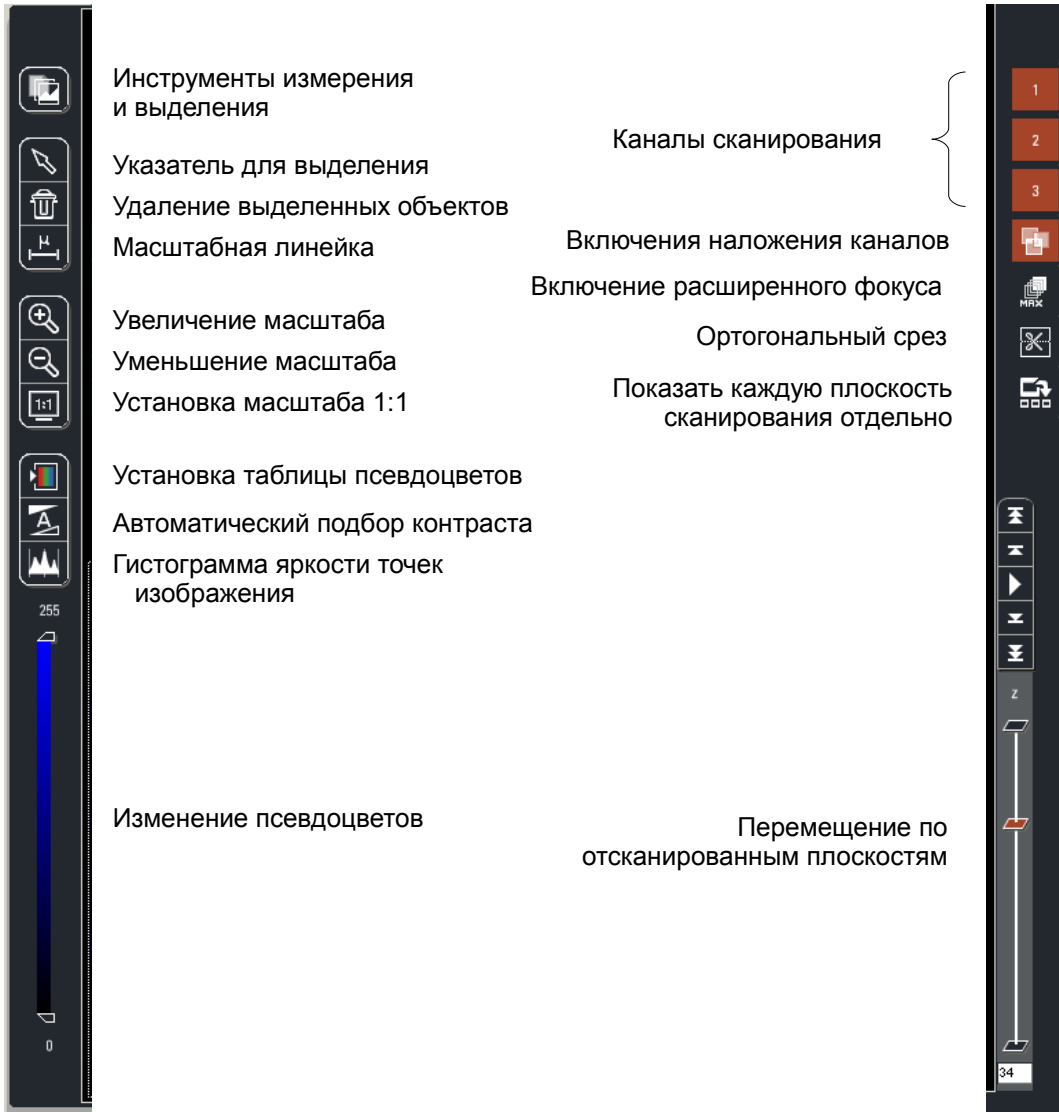


Рис. 15. Спектр возбуждения (пунктирная линия), флуоресценции (сплошная линия) флуоресцеин изоцианата (FITC) и используемый для его возбуждения лазер с длиной волны 488нм.

Настройка системы для работы с препаратом, окрашенным одним флуорохромом. Рассмотрим подробнее порядок действий для препарата окрашенного FITC, спектр возбуждения и поглощения которого представлен на рисунке 15. Перед использованием программного обеспечения найдите интересующий участок препарата, в эпифлуоресцентном режиме проверьте качество окраски препарата, подготовьте микроскоп для работы в конфокальном режиме. Выберите задачу «Acquire», перейдите на вкладку «Acquisition» (рис. 17), выберите режим сканирования хуз, установите размер области сканирования равным 512x512 точек. Перейдите на вкладку «Beam path» (рис. 18), в окне управления лазерами активируйте АОУФ, нажав на кнопку «visible», установите мощность лазера с длиной волны 488 нм примерно на 10-12 %, ниже укажите используемый объектив, установите светоделительную пластинку «DD 488/635». В данном микроскопе вместо фиксированного набора светофильтров, устанавливаемых перед фотоумножителем для конкретного флуорохрома, используется спектральный детектор, который может быть настроен пользователем на регистрацию любого выбранного участка спектра. Для удобства настройки, можно использовать нормализованный спектр исследуемого красителя «Leica/FITC», загрузив его из базы программы, затем надо настроить окно спектра детекции, например от 493 до 650 нм. При настройке спектрального детектора следует учитывать что

светоделительная пластинка всё же пропускает некоторое количество отражённого от препарата света лазера, несмотря на шаг настройки спектрального детектора в 1нм, дифракция этого света на срезе шторки детектора приводит к тому, что необходимо отступить минимум 5 нм в большую сторону чтобы избежать его регистрации. Изменяя окно детекции можно добиться уверенной регистрации флуоресценции интересующего красителя, заметно уменьшив регистрацию других красителей и автофлуоресценцию. Нажав на полоске выбора псевдоцвета этого канала можно присвоить получаемой яркостной картине привычный для флуорохрома цвет, например зелёный. Теперь необходимо настроить детектор таким образом, чтобы диапазон интенсивностей флуоресценции приходился на линейный участок регистрации. Для этого, поставить значение усиления («Gain») примерно на 500 вольт, и значение смещения («Offset») на 0%, переключить таблицу псевдоцветов изображения («Quick LUT») правой панели инструментов рабочей области (рис. 16а) на настроенную таблицу. Начните «живое» сканирование, нажав кнопку «Live». Найдите самое яркое место, перемещаясь по глубине препарата, для этого на вкладке «Acquisition» в диалоге «Z-stack» при помощи колёсика мышки перемещайте плоскость сканирования. Добейтесь почти полного отсутствия на изображении синих точек (слишком большой сигнал — потеря информации о ярких участках) регулируя усиление и зелёных точек (слишком слабый сигнал — потеря информации в тёмных участках) регулируя смещение. Если для регулировки изображения приходится увеличивать усиление до 850 вольт и более на изображении возможно появление выраженного шума, в этом случае рекомендуется поднять мощность лазера, однако при этом увеличится и скорость выцветания препарата. В случае, если условия эксперимента не позволяют улучшить соотношение сигнал/шум, используя меньшую скорость сканирования, большую мощность лазера или изменение протокола обработки препаратов, то можно прибегнуть к использованию режима усреднения нескольких сканирований. Суть сводится к тому, что регистрируемый совместно с изображением шум является случайной величиной (в случае фотонного шума). В таком случае сигнал будет на всех изображениях повторяться одинаково, а шум каждый раз будет различным. Усреднив значения сканирований для каждой точки изображения мы увеличим сигнал и уменьшим шум, однако следует учитывать, что улучшение соотношения сигнал/шум пропорционально квадратному корню из количества усредняемых сканирований. В связи с этим рекомендуется усреднять 2-4 сканирования. В случае если флуоресценция очень слабая можно прибегнуть к уменьшению скорости сканирования. Если этого недостаточно можно использовать режим накопления сканирований, при котором значения яркости для каждой точки суммируются. Остановите «живое» сканирование, перейдите на

вкладку «Acquisition», посмотрите на значения размера точки сканирования, сравните этот размер с разрешением используемого объектива (Табл. 2), для оптимальной съёмки без потери деталей по критерию Найквиста необходимо, чтобы размер точки сканирования был в 2 раза меньше разрешения объектива. Подберите увеличение «zoom» и количество точек сканирования для примерного соблюдения этого условия. Включите режим «живого» сканирования, проверьте настройки смещения и усиления, перемещаясь по глубине препарата найдите нижнюю поверхность среза, отметьте её, нажав в диалоге «Z-stack» на указателе «begin», найдите верхнюю поверхность препарата, нажмите на указателе «stop», остановите «живое» сканирование. Нажмите на точку рядом с пунктом «Nr. of steps», посмотрите на толщину сканируемого среза («Z-volume») подберите толщину шага таким образом, чтобы она была в два раза меньше разрешения используемого объектива по оси Z (Табл. 2). Произведите сканирование препарата, нажав кнопку «start», находящуюся под рабочей областью программы. Время сканирования зависит от количества точек сканирования, числа каналов последовательного сканирования, установленной скорости сканирования, количества кадров аккумуляции или накопления, количества плоскостей сканирования и может быть достаточно большим. Поэтому надо принимать во внимание задачи, стоящие перед исследователем, если нет необходимости снимать препарат в объёме, можно ограничиться получением одиночного изображения, нажав кнопку «Capture Image», если нет необходимости в максимальном разрешении, можно уменьшить количество точек сканирования и плоскостей сканирования препарата, если нет необходимости в высоком качестве получаемых снимков можно увеличить частоту сканирования. По завершении сканирования перейдите на вкладку «Experiments» и выполните сохранение полученного изображения. Если планируется сканирование последующих препаратов, можно сохранить настройки сканирования в диалоге «Load/Save settings» на вкладке «Beam path» указав в качестве названия настроек свою фамилию латиницей и через подчёркивание добавив их краткое описание.



а

б

Рис. 16. Панели рабочей области. а - левая, б - правая панели.

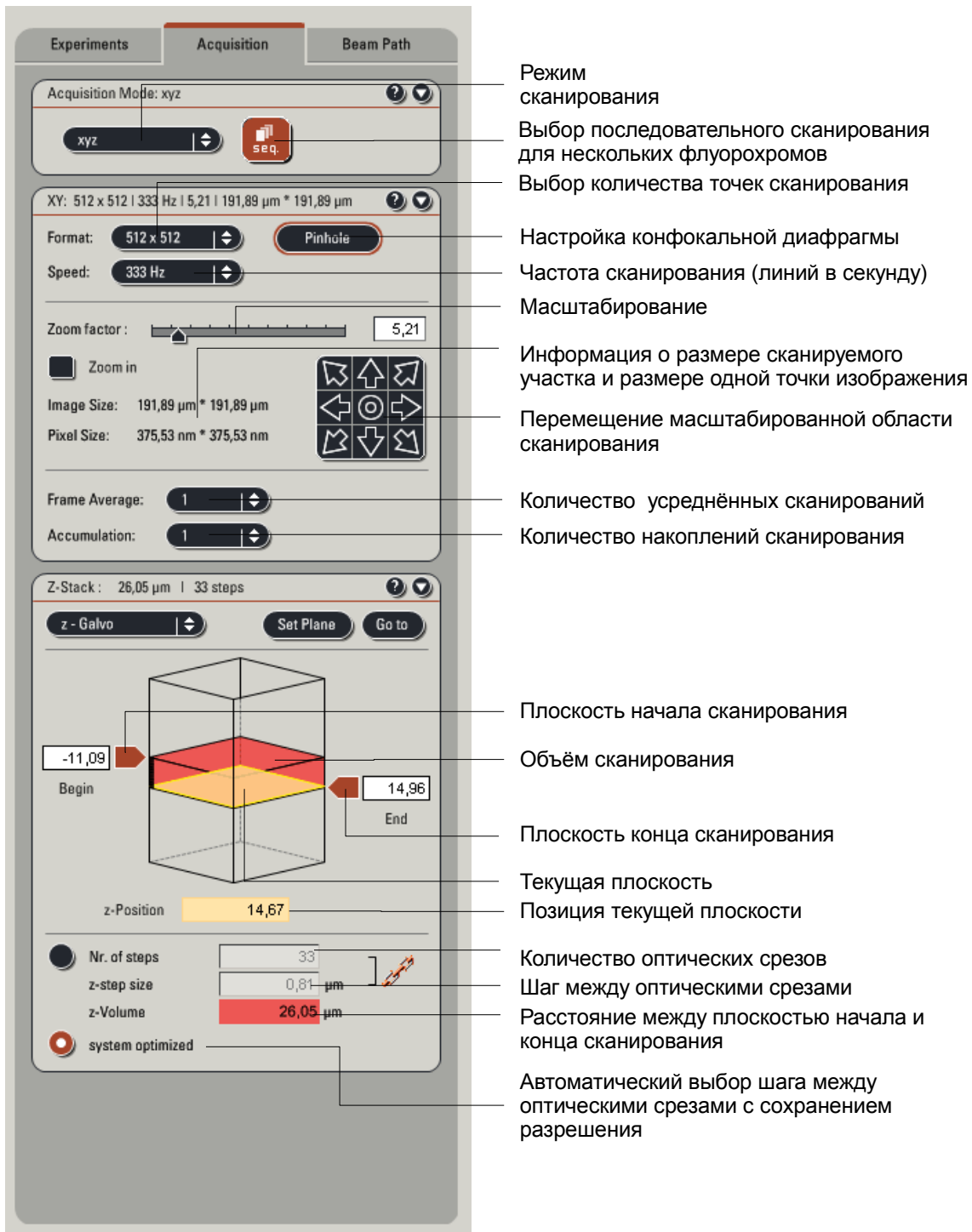


Рис. 17. Вкладка «Acquisition».

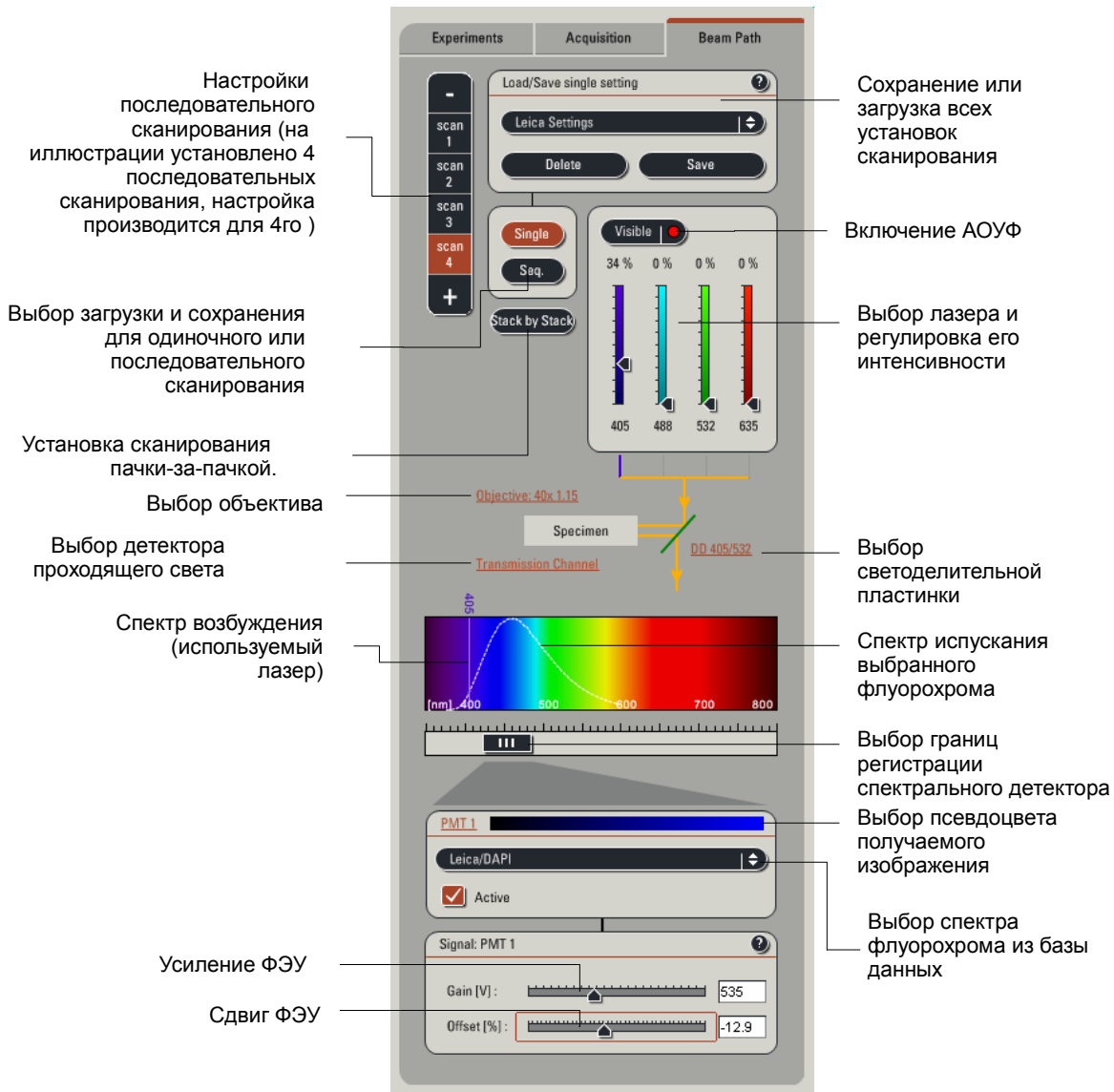


Рис. 18. Вкладка «Beam Path».

Настройка микроскопа для последовательного сканирования препарата, окрашенного несколькими флуорохромами. Убедиться что на вкладке «Acquisition» включено последовательное сканирование. Произвести настройку первого канала сканирования как в случае с одним красителем, выбрав соответствующую комбинацию длины волны лазера, цветоделительной пластинки и настроек спектрального детектора, нажать на кнопку «+» на вкладке «Beam path» для активации второго канала сканирования, произвести настройку второго канала сканирования, выбрав соответствующую этому красителю комбинацию длины волны лазера, цветоделительной пластинки и настроек спектрального детектора. При необходимости таким же образом настроить остальные каналы. Для неподвижных фиксированных срезов выбрать режим сканирования «Stack by stack» на вкладке «Beam path» для уменьшения общего времени сканирования, произвести

сканирование, сохранить результаты. Если планируется сканирование последующих препаратов с теми же настройками, можно сохранить настройки сканирования в диалоге «Load/Save settings» на вкладке «Beam path».

Настройка микроскопа для сканирования препарата в режиме проходящего света. Перед использованием программного обеспечения найдите интересующий участок препарата в режиме проходящего света и настройте систему освещения микроскопа по Кёллеру, как описано в разделе «Использование проходящего света». Правильная настройка освещения для этого режима является ключевым параметром, обеспечивающим качество изображения. При правильной настройке по Кёллеру каждая точка препарата будет проецироваться на всю площадь внешнего фотодетектора проходящего света, обеспечивая равномерность поля изображения. Подготовьте микроскоп для работы в конфокальном режиме. Выберите задачу «Acquire», перейдите на вкладку «Acquisition» (рис. 17), выберите режим сканирования хуз. Перейдите на вкладку «Beam path» (рис. 18), в окне управления лазерами активируйте АОУФ, нажав на кнопку «visible», выберите подходящий лазер и установите его мощность на 10-12%, ниже укажите используемый объектив, установите светоделительную пластинку «RT 30/70».

Выбор лазера зависит от спектра поглощения используемой окраски и среды в которую заключён препарат. Получению наибольшей контрастности будет способствовать выбор лазера, наиболее сильно поглощаемого используемым красителем и наименее поглощаемого используемой средой. Простым правилом может являться выбор лазера, цвет которого является дополнительным к цвету краски, например, для синей окраски методом Ниссля лучше всего подойдёт красный лазер (635нм), для красной окраски белков эозином лучше подойдёт синий (488нм) лазер. Для препаратов, заключённых в канадский бальзам не рекомендуется использовать лазер с длиной волны 405нм, так как эта среда эффективно поглощает такое излучение и имеет заметную жёлтую флуоресценцию.

На вкладке «Acquisition» нажмите на тексте «Transmission channel» для активации детектора проходящего света. После этого нижняя часть вкладки изменится (рис. 19), позволяя настроить детектор проходящего света. Для настройки детектора необходимо поставить галочку «Active» и нажать на текст «PMT Trans ()», что приведёт к активации детектора.

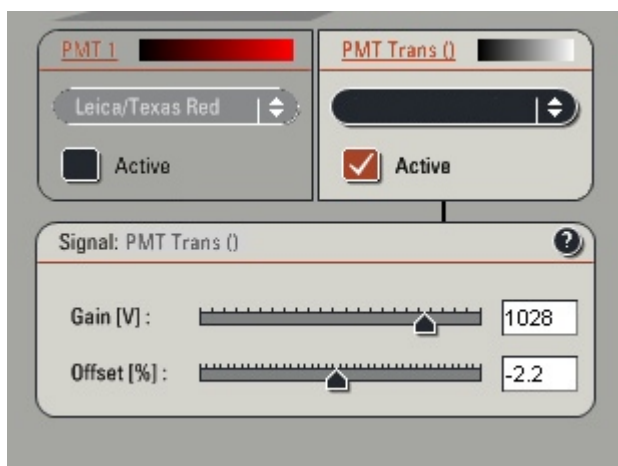


Рис. 19. Нижняя часть вкладки «Acquisition» при включении детектора проходящего света.

Теперь необходимо настроить детектор таким образом, чтобы диапазон интенсивностей проходящего через препарат света приходился на линейный участок регистрации. Для этого, поставить значение усиления («Gain») примерно на 500 вольт, и значение смещения («Offset») на 0%, переключить таблицу псевдоцветов изображения («Quick LUT») правой панели инструментов рабочей области (рис. 16а) на настроенную таблицу. Начните «живое» сканирование, нажав кнопку «Live». Найдите самое яркое место, перемещаясь по глубине препарата, для этого на вкладке «Acquisition» в диалоге «Z-stack» при помощи колёсика мышки перемещайте плоскость сканирования. Добейтесь почти полного отсутствия на изображении синих точек (слишком большой сигнал — потеря информации о ярких участках) регулируя усиление и зелёных точек (слишком слабый сигнал — потеря информации в тёмных участках) регулируя смещение. Если для регулировки изображения приходится увеличивать усиление до 850 вольт и более на изображении возможно появление выраженного шума, в этом случае рекомендуется вынуть из держателя светофильтров проходящего света (12, рис.9) поляризатор, используемый для DIC контрастирования или поднять мощность лазера. В некоторых случаях ухудшение контрастности может происходить из-за попадания на препарат и конденсор света от внешнего источника, например, освещения комнаты.

Для определённых задач возможно совместное одновременное использование спектрального детектора сканирующей головки и внешнего детектора проходящего света. Примером такой задачи может являться изучение живых клеток, для которых необходимо свести к минимуму время экспозиции, при этом получив данные как о распределении флуоресцентной метки, так и об их внешней морфологии. В таком случае настройку спектрального детектора надо производить, как и в случае с одним флуорохромом,

предварительно активировав этот детектор «PMT 1», затем не изменяя настроек лазера, настроить детектор проходящего света «PMT Trans ()».

В конфокальной микроскопии возможно реализовать несколько последовательностей сканирования образца. В зависимости от выбранного типа сканирования во вкладке «Acquisition» будут появляться дополнительные диалоги. Ниже приведено краткое описание каждого типа сканирования.

XY - Сканирование препарата по двумерной плоскости xy . Сканирующий луч движется в одной плоскости. Применяется для получения одного «оптического среза» препарата.

XYZ - Сканирование препарата по набору двумерных плоскостей xy отстоящих друг от друга на некоторое расстояние по оси z . Применяется для получения набора «оптических срезов» («z-stack», «пачка срезов»). Этот тип сканирования удобен для изучения трехмерной организации исследуемого объекта. При сохранении файла в формате *.lif, кроме самих изображений в нём сохраняются технические данные, такие как настройки сканирования, использованный объектив, и расстояние между «оптическими срезами» в пачке. С помощью специальных программ, таких как SVI Huygens, Bitplane Imaris и других из *.lif файла можно составить трёхмерную модель исследуемых структур.

XZY — Сканирование подобное XYZ сканированию, в котором изменён порядок сканируемых плоскостей. Препарат сканируется как набор двумерных плоскостей XZ отстоящих друг от друга на некоторое расстояние по оси Y . Этот тип сканирования может применяться, например, для быстрой оценки качества окраски препарата, проникновения антител и флуорохрома вглубь препарата. При выборе XZY сканирования диалог «Z-stack» изменится, позволяя выбирать новые параметры плоскостей сканирования (рис. 20)

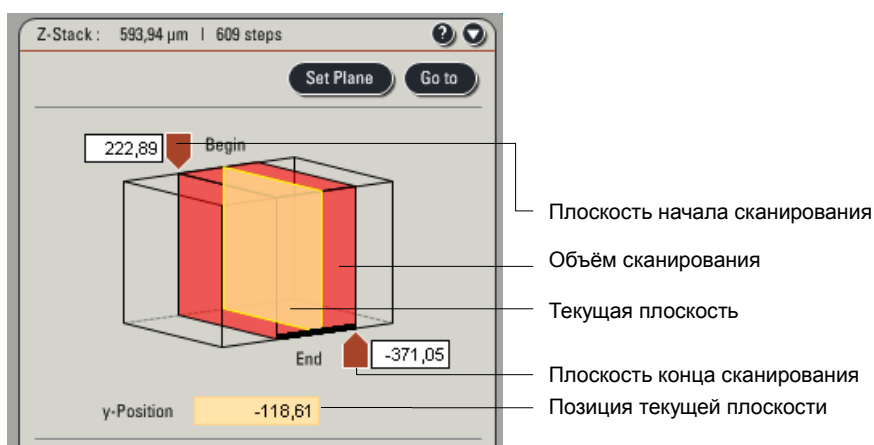


Рис.20. Диалог «Z-stack» при выборе XZY сканирования.

XT — Одномерное сканирование по линии вдоль оси X по времени T . Этот тип сканирования применяется для исследования быстрых процессов, когда можно пожертвовать

структурной информацией и пространственным разрешением для увеличения разрешения по времени. В результате сканирования будет получено двумерное изображение, по оси X будет представлена яркость точек вдоль оси сканирования, а по оси Y время. Может применяться для оценки физиологических параметров живых клеток, например в исследовании динамики внутриклеточного Ca^{++} вдоль аксона или дендрита нервной клетки.

XYT — Двумерное сканирование плоскости XY препарата по времени T. Этот тип сканирования применяется для исследования процессов во времени, когда важно получить структурную информацию о процессе. В результате будет получен набор изображений одной и той же плоскости XY препарата, полученных в разное время. Может применяться для оценки транспорта органелл внутри клеток, процессов миграции клеток в культуре. Для всех типов сканирования по времени на вкладке «Acquire» появится дополнительный диалог (рис.21).

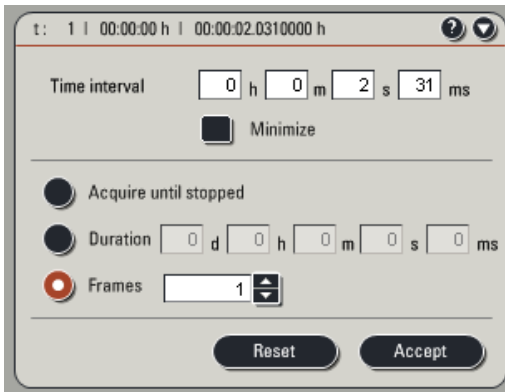


Рис.21. Диалог настройки временного интервала сканирования.

XYZT — Трёхмерное сканирование участка препарата XYZ по времени T. Этот тип сканирования применяется когда необходимо проследить изменение препарата по времени в объёме. Сканирование в этом режиме идёт очень медленно, поэтому подходит только для медленных процессов, например миграция нейробластов в переживающем органотопном срезе коры.

Λ (Лямбда-сканирование). Благодаря наличию спектрального настраиваемого детектора, данный микроскоп может быть использован для съёма спектра флуоресценции с разрешением до 5 нм. Конечно прибор не является спектрометром в строгом смысле слова, специализированные спектрометры обладают разрешением лучше 0,014 нм. Однако для съёмки спектра флуорохрома при ширине спектра 200 нм, с шагом 5 нм мы получим 40 опорных точек для построения графика. При этом, в отличие от спектрометра кроме спектра мы, также, получим пространственную информацию о распределении флуорохрома по

препарату. Таким образом этого разрешения достаточно для целей оценки спектра красителей, их спектрального разделения (spectral unmixing, spectral dye separation) и оценки сдвига спектра флуоресценции. Конкурирующий спектральный детектор QUASAR фирмы Zeiss, используемый в микроскопах LSM710 использует другой подход — спектр снимается одновременно 34 ПЗС детекторами, при этом спектральная разрешающая способность хуже чем у TCS SPE, но за счёт того что спектральное сканирование осуществляется за один проход такая система лучше подходит для исследования живых объектов.

«Лямбда-сканирование» может быть использовано совместно с другими режимами сканирования: Xλ, XTλ, XYλ, XYλT, XYZλ, XYZλT. При настройке «лямбда-сканирования» пользователем указывается диапазон и количество шагов для деления всего спектра на узкие полосы (до 5 нм включительно). В случае этого типа сканирования на вкладке «Acquire» появится дополнительный диалог (рис.22).

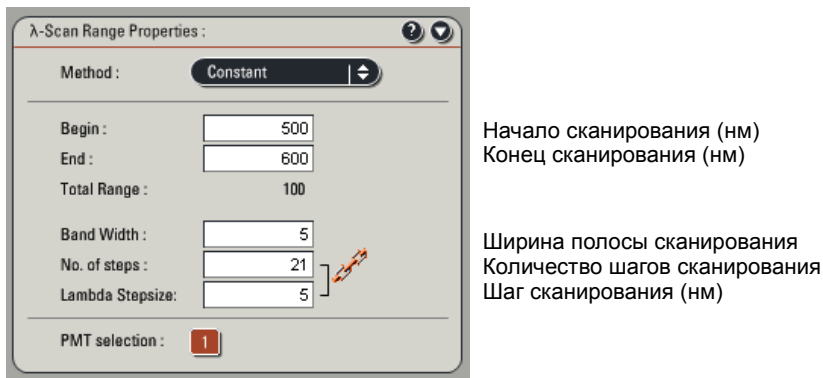


Рис.22. Диалог настройки параметров λ-сканирования.

Задачи исследования

Задача № 1. Иммуногистохимическое исследование дифференцировки пирамидных нейронов коры мозга человека

Постановка задачи

Пирамидные клетки составляют основную массу корковых нейронов, они имеют характерную треугольную (в виде пирамиды) форму тела. Дендрит отходящий от вершины клетки называется апикальным, от углов основания сомы отходят базальные дендриты. Апикальный дендрит может восходить вплоть до слоя I коры, базальные дендриты образуют систему горизонтальных ветвлений в слоях V, IV. Все дендриты ветвятся до 4-5 порядков, их дистальные отделы покрыты шипиками, которые являются постсинаптической частью глутаматергичных синапсов. Аксон, как правило, отходит от основания клетки, его проксимальный отдел образует аксонный холмик, аксонные коллатерали немногочисленны,

имеют восходящее, нисходящее или горизонтальное направление (рис. 23). Аксоны пирамидных нейронов покидают кору, приобретают миелиновую оболочку и образуют систему эфферентных связей: нисходящих (кортикофугальных), внутри- и межполушарных корково-корковых. Нисходящие связи проходят в составе капсул конечного мозга, ножек среднего мозга и пирамид продолговатого мозга. Внутриполушарные корково-корковые связи образуют белое вещество полушарий мозга. Межполушарные корково-корковые волокна формируют большую комиссуру мозга – мозолистое тело (*corpus callosum*), от ее латинского названия происходит второе название таких связей – каллозальные. В зависимости от того, в каком слое коры локализованы пирамидные нейроны они образуют преимущественную систему эфферентных связей: из слоя III – кортико-кортикальных, из слоя V – кортико-спинальных, кортико-бульбарных, кортико-тектальных, из слоя VI – кортико-таламических и кортико-стриарных. Строгая приуроченность нейронов, которые инициируют определённый тип проекций к одному слою, известна для коры приматов и человека. У остальных млекопитающих каждый слой коры состоит из смешанной популяции пирамидных клеток. В ходе пренатального развития пирамидные нейроны слоев V и VI образуются раньше, чем слоя III.

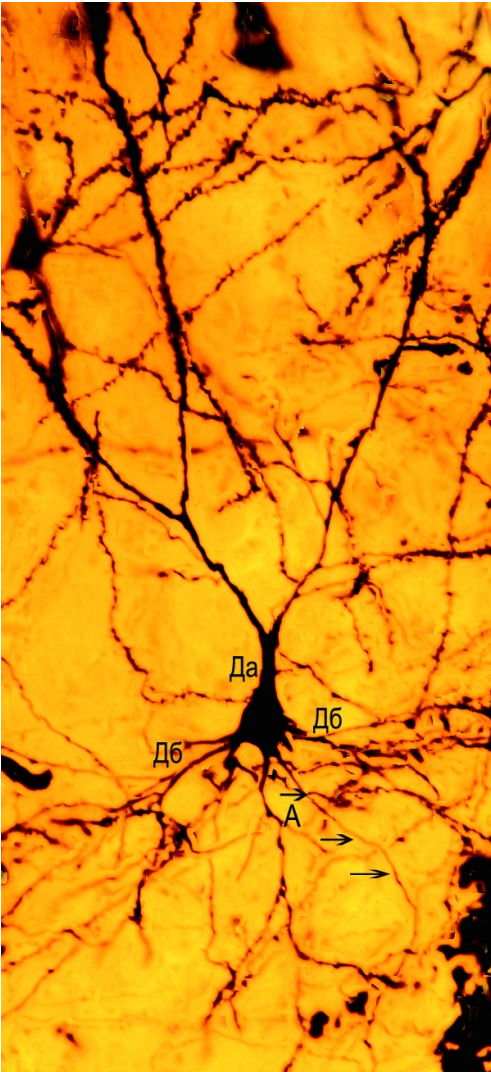


Рис. 23. Пирамидная клетка коры. Мет. Гольджи. Обозначения: Да – апикальный дендрит, Дб – базальные дендриты, А – аксон (указан стрелками).

Генезе врожденных (пренатальных) поражений ЦНС часто связывают с дисплазией белого вещества мозга: внутренней капсулы, мозолистого тела, пирамидных трактов и т.д. Несмотря на то, что нарушения нормальной структуры белого вещества нередко диагностируются у недоношенных или рожденных после неблагополучной беременности детей, их очень редко объясняют отклонениями в нормальном развитии клеток коры. Вместе с тем известно, что в период дифференцировки нейроны повышено уязвимы к тератогенным факторам, так как в это время ослабевает экспрессия белков антиоксидантной защиты (Blomgren, Hagberg, 2006). Из-за методических трудностей обработки эмбрионального материала особенности нейрогенеза коры мозга человека изучены далеко не полно и для разработки фундаментальных основ генеза врожденной неврологической патологии необходимы иммуногистохимические исследования пренатальной

дифференцировки нейронов коры полушарий конечного мозга.

Нейроны являются высокоспециализированными клетками, что обусловлено направленным ростом отростков – дендритов и аксонов, которые имеют характерный для каждой популяции нейронов рисунок ветвлений. Приобретая определенную ориентацию, отростки сохраняют ее неопределенно долго, часто до конца жизни организма. Стабилизация формы клеток и их отростков происходит благодаря цитоскелетным системам (нейрофиламентам и нейротрубочкам), что в результате обеспечивает строго упорядоченную организацию нервной системы. Кроме того, микротрубочки участвуют в процессах роста клеток. Создавая цитоскелет, микротрубочки могут быть факторами ориентированного движения внутриклеточных компонентов, задавать своим расположением в пространстве направление для потоков разных веществ и перемещения крупных структур. Стабилизацию микротрубочек объясняют модификацией тубулинов или их связыванием с т.н. MAP-белками. MAP-белки (MAP-microtubule associated proteins) ускоряют процесс полимеризации тубулина, а начало их экспрессии в развивающейся нервной клетке является признаками стабилизации отростков и дифференцировки определенного морфотипа (пирамидная, звездчатая, веретеновидная и т.п. нейроны).

Задача исследования пренатальной дифференцировки пирамидных нейронов коры полушарий мозга человека убедительно решается методами иммуногистохимии с применением конфокальной микроскопии.

Материал и методы

Характеристика материала

Материал для решения поставленной исследовательской задачи получен из патологоанатомической лаборатории, имеется заключение об отсутствии у плода неврологической патологии. Мозг фиксируется погружением в 4% растворе параформальдегида на ФБ. Через 2-3 дня мозг рекомендуется извлечь из фиксатора, снять оболочки и путем перерезки мозолистого тела разделить его на два полушария. Каждое полушарие после предварительного фотографирования разрезать на блоки по границам крупных борозд: центральной, латеральной, шпорной. После этого положить блоки на дофиксацию в течение 5-6 дней. Рекомендуется хранить блоки в холодильнике при температуре от +2 до +5 градусов.

Из эмбрионального мозга сложно изготовить непрерывную серию замороженных (в криостате или на замораживающем микротоме) срезов хорошего качества, поэтому

необходима заливка в парафин. Процесс обезвоживания, предварительного пропитывания и заливки эмбриональной ткани требует большой тщательности. В процессе обезвоживания легко допустить следующие ошибки: переуплотнения при полном обезвоживании или недостаточное обезвоживание при нормальном уплотнении. Оба эти недостатка являются следствием несоблюдения оптимальных условий обезвоживания и отрицательно сказываются на дальнейшей обработке. Оптимальные условия обезвоживания эмбрионального материала достигаются путем постепенного возрастания концентрации этилового спирта, начиная с 20%. Ниже в таблице сроки обезвоживания и пропитывания в каждом растворе, а также заливки приводятся для блоков объемом 3-4 см³. При увеличении размера блоков эти сроки должны быть увеличены.

Протокол 1. Обезвоживание, пропитка и заливка материала.

Обезвоживание		Пропитка		Заливка (в термостате при температуре 54 – 56°)	
20° спирт	24 часа	Касторовое масло+ хлороформ Хлороформ I Хлороформ II Хлороформ+ парафин (1:1)	24 часа	Парафин I Парафин II Заливка в формочки	1,5 – 2 часа
30° спирт	24 часа		1,5 часа		1,5 – 2 часа
40° спирт+	24 часа		1,5 часа		
настойка йода (до цвета крепкого чая)			12 – 24 часа		
50° спирт+йод	24 часа		(в термостате при температуре + 37°)		
60° спирт+йод	24 часа				
70° спирт+йод	24 часа				
80° спирт+йод	24 часа				
90° спирт+йод	24 часа				
96° спирт+йод	24 часа				
96° спирт I	24 часа				
96° спирт II	24 часа				
96° спирт+ касторовое масло (1:1)	24 часа				
Касторовое масло	От 48 часов (до 10 дней)				

Примечания к протоколу 1:

1. Спирт и хлороформ, используемые для обезвоживания и пропитки время от времени меняют во избежание их насыщения водой и жирами.
2. Вне работы хлороформ-парафин и парафин сохраняют в застывшем виде.
3. Многократное использование хлороформ-парафина ведет к испарению хлороформа, поэтому его постепенно добавляют.
4. Заливку надо проводить в предварительно разогретые до температуры плавления парафина формочки. Удобнее всего использовать специальные пластмассовые формы подходящего размера, так как они имеют площадку для закрепления залитого блока в держателе объекта микротом. Если таких нет, можно проводить заливку в самодельные бумажные ванночки, дно которых рекомендуется предварительно смазать глицерином. После застывания такие блоки наклеивают на деревянные колодки с помощью расплавленного парафина.

Изготовление срезов

Парафиновый блок прочно фиксируют в держателе объекта микротомы и удаляют излишки парафина, оставляя его в виде каемки (шириной до 2 мм) по краю блока на стороне обращенной к ножу и противоположной ей. Это рекомендуется делать для склеивания срезов в ленты в процессе резки, что облегчает задачу получения непрерывной серии срезов. Для решения поставленной задачи рекомендуется изготавливать срезы толщиной 15 – 25 мкм. При использовании одноразовых ножей рекомендуются таковые с маркировкой «routine section». Полученные срезы аккуратно снимают с ножа при помощи мягкой кисточки или препаровальной иглы и переносят в чашку с подогретой дистиллированной водой. Не рекомендуется использовать некипяченую водопроводную воду, т.к. в ней под срезом скапливается большое количество пузырьков воздуха, которые мешают равномерному приклеиванию среза к стеклу. Расправленные срезы осторожно натягивают и монтируют на адгезивные стёкла. Хорошее приклеивание срезов к стеклу является важным фактором влияющим на качество получаемых препаратов. При иммуногистохимической обработке применяются многоразовые промывки, разнообразные растворители, препараты могут подвергаться кипячению или обработке ферментами, в следствие этого плохо прикреплённый срез легко потерять. При этом широко используемый метод прикрепления на белок чаще всего неприменим, так как ведёт к повышенному фоновому окрашиванию. Рекомендуется использовать желатинизированные стёкла, лучших результатов можно добиться при использовании стёкол покрытых полилизинном или стёкол, поверхность которых несёт избыточный электрический заряд. После монтирования срезов на предметном стекле препарат рекомендуется просушить в термостате при температуре 37⁰С в течение суток.

Перед окраской по Ниссля или иммуногистохимической обработкой препараты необходимо депарафинировать и регидратировать (см. протокол 2).

Окраска по Ниссля

Рекомендуется использовать метод Ниссля для окраски каждого третьего или пятого препарата. Этим способом окрашиваются цитоплазма, ядра нервных клеток и ядра глиальных клеток, в результате возможно идентифицировать слои коры, при необходимости провести их морфометрию, определить плотность расположения нейронов. При решении поставленной задачи препараты окрашенные по Ниссля полезны для сравнения и уточнения локализации иммунопозитивных нейронов.

Наиболее употребительные красители: крезильовый фиолетовый (крезивиолет), толуидиновый синий, тионин в 1% водных растворах.

Протокол 2. Депарафинизация и регидратация препаратов

1. Обеспарафинить препараты в двух сменах орто-ксилола по 10 минут в каждой
2. Выдержать препараты в двух сменах 96% спирта по 10 минут в каждой
3. Провести по серии спиртов понижающейся концентрации (80%, 50%, 20%) по 10 минут в каждой порции

Протокол 3. Окраска, дифференцировка, заключение препаратов.

1. После удаления парафина и регидратации на срезы нанести свежешелтированную краску.
2. Окрашивание производится прямо на предметных стеклах при постепенном нагревании над пламенем спиртовки (около 1 мин.). Иногда для лучшего окрашивания рекомендуется оставлять краску на стеклах до ее остывания. Срезы должны быть сильно перекрашены. При недостаточном закрашивании допускается повторное нагревание.
3. Удаление излишков краски (дифференцировку) проводят в чашках Петри с 96° этиловым спиртом. Дифференцировка длительный процесс, который может затянуться на десятки минут. Для ее ускорения в первую порцию спирта можно добавить 2-3 капли эвкалиптового масла или уксусной кислоты. Последующие две порции спирта не должны содержать этих добавок.
4. Окончательную дифференцировку нужно проводить под контролем микроскопа, пока отчетливо не выступят детали клеток (ядра, зернистость цитоплазмы), а фон препарата станет бесцветным или бледно голубым.
5. Заканчивая дифференцировку, со стекла удаляют излишки спирта и просветляют в смеси из 2 частей ацетона, 1 части ксилола и 1 части касторового масла. Смесь готовят заранее и для равномерного перемешивания составляющих ее жидкостей сильно встряхивают или используют магнитную мешалку. Время просветления препарата – 3-5 минут. Просветляющую смесь можно использовать многократно.
6. Окончательное обезвоживание окрашенных препаратов проводят в двух порциях орто-ксилола по 3-5 минут в каждой.
7. Окрашенные, обезвоженные препараты заключают в канадский бальзам под покровное стекло.

Выявление MAP2 иммунопозитивных нейронов

Применяемая для патологоанатомического материала фиксация в 4% параформе достаточно хорошо сохраняет структурно-морфологические особенности препарата, однако, сшивая белки препятствует доступу антител к антигену и индуцирует флуоресценцию белков. Чтобы облегчить доступ к эпитопу антигена часто применяется нагревание препарата с определёнными буферными растворами в микроволновой печи, для MAP2 используется цитратный буфер с pH=6,0. Снижения индуцированной автофлуоресценции нервной ткани фиксированной в 4% параформе можно добиться обработкой препаратов раствором борогидрата натрия. Это сильный восстанавливающий агент, в основном ослабляющий

флуоресценцию посредством разрыва ароматических колец в соединениях.

Протокол 4. Иммуногистохимическая окраска для выявления белка MAP2 (a,b,c изоформы)

Фосфатный буфер - приготовить 2 раствора: раствор А (Кислый) - NaH_2PO_4 2-водный 3,45г на 250 мл дистиллированной воды, раствор В (Щелочной) — Na_2HPO_4 12-водный 14,2г на 1 литр дистиллированной воды; смешать 160мл раствора А и 640мл раствора В, титруя довести pH буфера до 7,4 .

Цитратный буфер - приготовить 2 раствора: раствор А - лимонная кислота 1-водная 1.6г на 500мл дистиллированной воды, раствор В - NaOH 2г на 25мл дистиллированной воды; в раствор А добавить 10мл раствора В, дальнейшим добавлением раствора В довести pH до 6,0.

Блокирующий раствор - 1% нормальной сыворотки козы, 0,3% Triton-X100 на фосфатном буфере

Первичные антитела - развести 1:250 моноклональных антител мыши против MAP2 (клон HM-2) в растворе 1% нормальной сыворотки козы и 0,05% Triton-X100 на фосфатном буфере

Вторичные антитела - развести 1:250 антитела коза-анти-мышь конъюгированные с флуорохромом Alexa 488.

1. Депарафинизировать и регидратировать препараты
2. Промыть препараты в трёх сменах фосфатного буфера
3. Выдержать 30 минут в 0,1% растворе борогидрата на фосфатном буфере
4. Промыть препараты в трёх сменах фосфатного буфера
5. Выдержать в цитратном буфере в микроволновой печи 10 минут при температуре близкой к температуре закипания раствора
6. Промыть препараты в трёх сменах фосфатного буфера
7. Инкубировать препараты в блокирующем растворе 120 минут при комнатной температуре
8. Инкубировать препараты с раствором первичных антител при температуре +4°C 12 часов
9. Промыть препараты в трёх сменах фосфатного буфера
10. Инкубировать препараты в темноте с раствором вторичных антител при температуре +37°C 1 час
11. Промыть препараты в четырёх сменах фосфатного буфера

Примечания к протоколу 4:

Для предотвращения деградации и преждевременного выцветания флуорохрома все последующие операции начиная с инкубации со вторичными антителами проводить при затемнении.

Современные флуорохромы значительно меньше подвержены выцветанию, однако в некоторых случаях при заключении препаратов можно применять вещества уменьшающие скорость выцветания. Для флуорохрома Alexa 488 можно использовать пара-фенилендиамин, но лучшие результаты даёт использование коммерческого Prolong Gold. В связи с тем, что для решения поставленной задачи используются малые увеличения микроскопа и применяется стойкий флуорохром, необходимости в применении веществ, препятствующих выцветанию, нет.

Протокол 5. Заключение препаратов для флуоресцентного метода исследования.

Раствор для заключения - 80% не флуоресцирующего глицерина на фосфатном буфере с добавлением 50нг/мл диамидинофенилиндола (DAPI) для подкраски клеточных ядер.

1. Нанести небольшую каплю раствора для заключения на препарат, придерживая препаративной иглой положить покровное стекло, избегая образования пузырьков воздуха.
2. Для фиксации покровного стекла и герметизации препарата заклеить по краям покровное стекло прозрачным лаком для ногтей.
3. Препараты можно микроскопировать через 2 часа после заключения, хранить препараты следует в темноте при температуре +4 °С.

Получение изображений

Перевести микроскоп (см. раздел «Порядок работы с микроскопом») в эпифлуоресцентный режим, использовать фильтровый кубик А (для DAPI). Наблюдая окрашенные ядра клеток найти участок препарата на котором весь поперечник коры помещается в поле зрения. Эмбриональная кора отличается от взрослой слабым расслоением (рис.25) отчётливо выделяется только маргинальная зона (MZ) с низкой плотностью клеток и эмбриональный слой eII, с высокой клеточной плотностью. Несколько хуже виден переход от корковой пластинки к субпластинке (Sp_u) характеризующийся понижением клеточной плотности. Слои eIII, eIV, eV, eVI достаточно плохо разделяются по плотности клеточных элементов.

Переключиться на фильтровый кубик I3 (для Alexa 488), проверить качество иммуногистохимической окраски. Переключить микроскоп в конфокальный режим, настроить параметры последовательного сканирования по стекам для DAPI и Alexa 488. В режиме сканирования XZY (см. раздел «Использование программного обеспечения конфокального микроскопа») оценить степень иммуногистохимической окраски препарата по глубине. Если препарат неравномерно окрашен по глубине это может свидетельствовать о плохом проникновении первичных или вторичных антител в ткань. Наличие флуоресцентного осадка на поверхности препарата может свидетельствовать о плохой промывке. В случае неудовлетворительного качества окраски надо переделать препараты, и в зависимости от наблюдаемого дефекта увеличить время инкубации с первичными антителами, использовать встряхивающее устройство или увеличить продолжительность промывок. В режиме сканирования XYZ снять участок препарата, включающий в себя весь поперечник коры. Если изображение не контрастно сделать снимок в режиме «Лямбда-сканирования» сканирования XYλ с диапазоном от 493 нм до 693 нм с шагом 10 нм. Перейти

на вкладку «Quantify» (рис.24), выбрать второй тип графика, выделить на препарате две области подсчёта (ROI) одну поместить на ярко помеченную клетку, другую на область на которой не должно быть окраски, но есть заметный фон. Выбрать задачу «Graph», на получившихся графиках нажать правую кнопку мышки, выбрать пункт «Normalize». Обратить внимание на получившийся график: по оси абсцисс отложена длина волны, по оси ординат яркость. Если для обеих областей подсчёта максимум графиков совпадает, то наблюдается неспецифическое фоновое окрашивание (случай представлен на рис. 24). Если характер графиков различается, то наблюдается автофлуоресценция. В случае с неспецифическим окрашиванием необходимо изменение протокола окраски, изменение состава блокирующего раствора, уменьшение концентрации антител или изменение условий промывки. В случае с автофлуоресценцией можно подобрать границы регистрации спектрального детектора таким образом, чтобы в них попадал максимум флуоресценции используемого флуорохрома и минимум автофлуоресценции. Если подобрать такие параметры невозможно, необходимо переделать препараты уменьшив срок фиксации материала, применить другой фиксатор или использовать иные методы подавления автофлуоресценции.

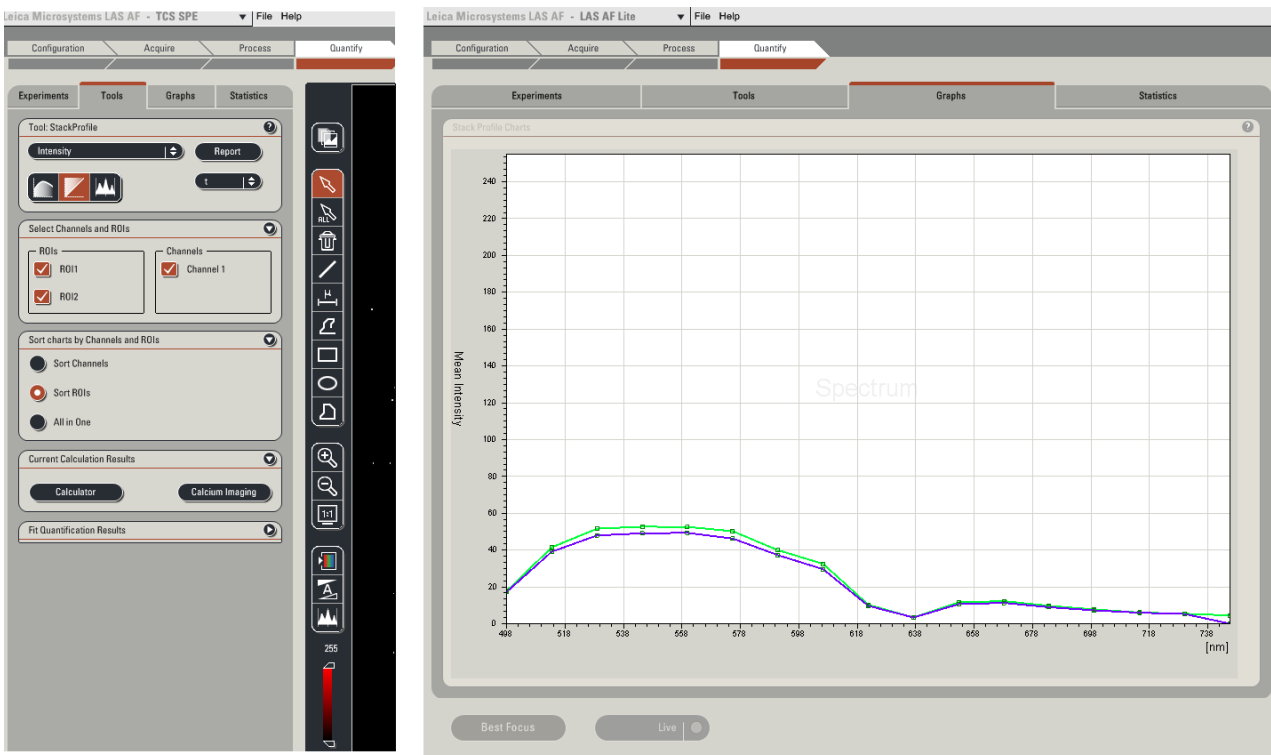


Рис. 24. Обработка результатов лямбда сканирования. Спектрограммы обеих областей подсчёта совпадают, что означает неспецифическое фоновое окрашивание препарата.

Обработка изображений

Применение двух флуоресцентных красителей позволяет исследовать отдельно особенности цитоархитектоники (DAPI) и распределение MAP2-позитивных нейронов (Alexa 488) в одном и том же участке коры. Последующее совмещение таких изображений дает возможность локализовать MAP2-позитивные клетки в пределах определенного цитоархитектонического слоя, что позволяет судить об их функциональной специализации.

Просмотр препаратов мозга 18,5-недельного плода (рис.25) позволяет выявить MAP2-позитивные клетки вытянутой треугольной формой тела и коротким, неветвящимся апикальным дендритом. Все клетки располагаются компактно, образуя в пределах слоя eIV+eV пласт толщиной около 195 мкм. Характер стратификации коры мозга плода (как при окраске по Нисслию, так и при исследовании препаратов подкрашенных DAPI) отличается от взрослого: маргинальная зона (слой eI) четко отделена от формаций корковой пластинки и сравнительно редкоклеточен; слой eII (наружный край корковой пластинки) дифференцируется четко, благодаря очень высокой плотности окрашенных ядер клеток; слой eIII, по сравнению со слоем eII, менее густоклеточен; середину поперечника корковой пластинки образует самый широкий в этот период онтогенеза слой eIV+eV, который, по сравнению с выше и ниже лежащими слоями, характеризуется небольшим повышением плотности клеточных ядер; слой eVI менее густоклеточен, по сравнению со слоем eIV+eV; субпластинку можно отличить от слоя eVI благодаря сравнительно высокой плотности ядер в ее верхней зоне sp_u.

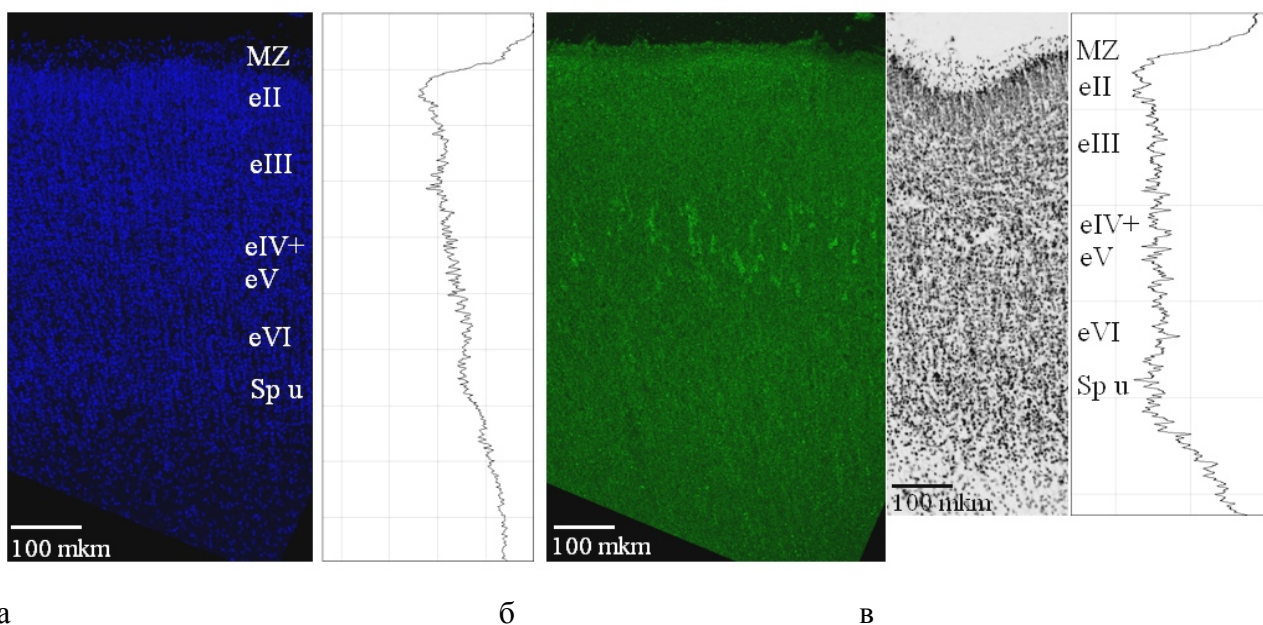
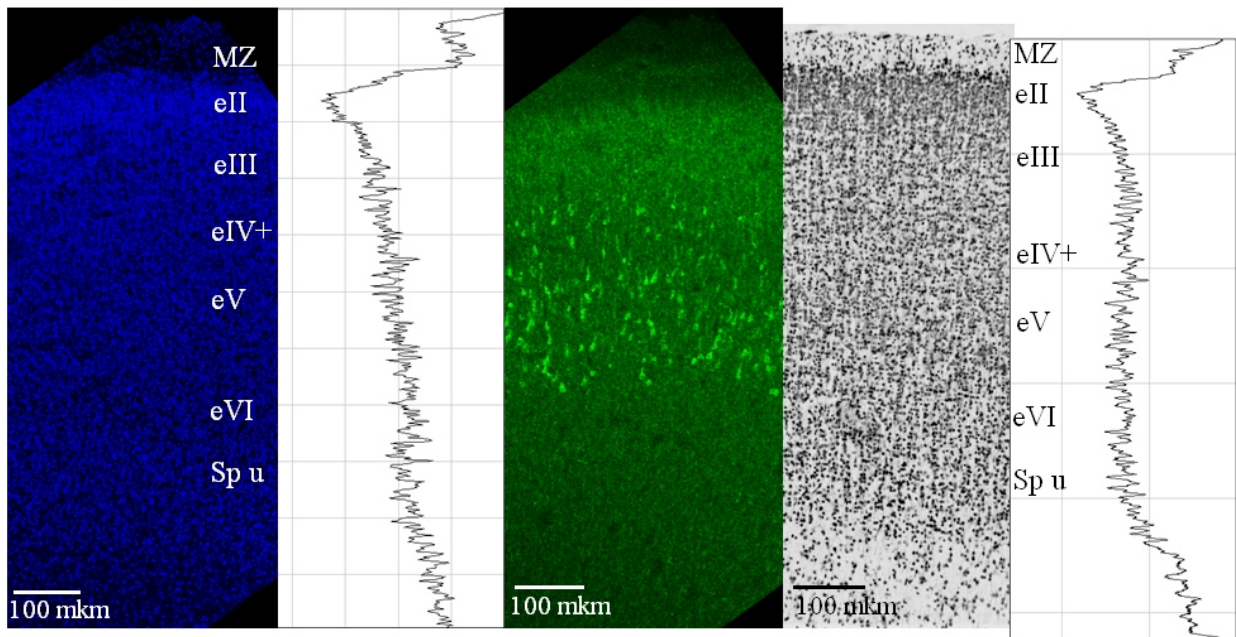


Рис. 25. Кора мозга 18-недельного плода. а - окраска DAPI, (MZ, eII, eIII, eIV+, eV, eVI, Sp_u - слои коры); б - послойный график плотности ядер; в - MAP2-позитивные нейроны в том же участке коры, цитоархитектоника (окраска по Нисслию) и график плотности клеток.

У 21-недельных плодов (рис.26) происходит заметное увеличение количества MAP2-позитивных нейронов и расширение зоны поперечника, которую они занимают в пределах корковой пластинки до 249,3 мкм. Все иммунопозитивные клетки являются пирамидными, их апикальные дендриты удается проследить вплоть до слоя eII. При этом наблюдается дифференцировка нейронов по размеру профильного поля, по этому признаку их можно разделить на мелкие (45 – 90 мкм²), средние (91 – 190 мкм²) и крупные (191 – 380 мкм²), причём средние и мелкие нейроны равномерно распределены по поперечнику зоны иммунопозитивных клеток, а крупные приурочены только к ее внутренней части.



а

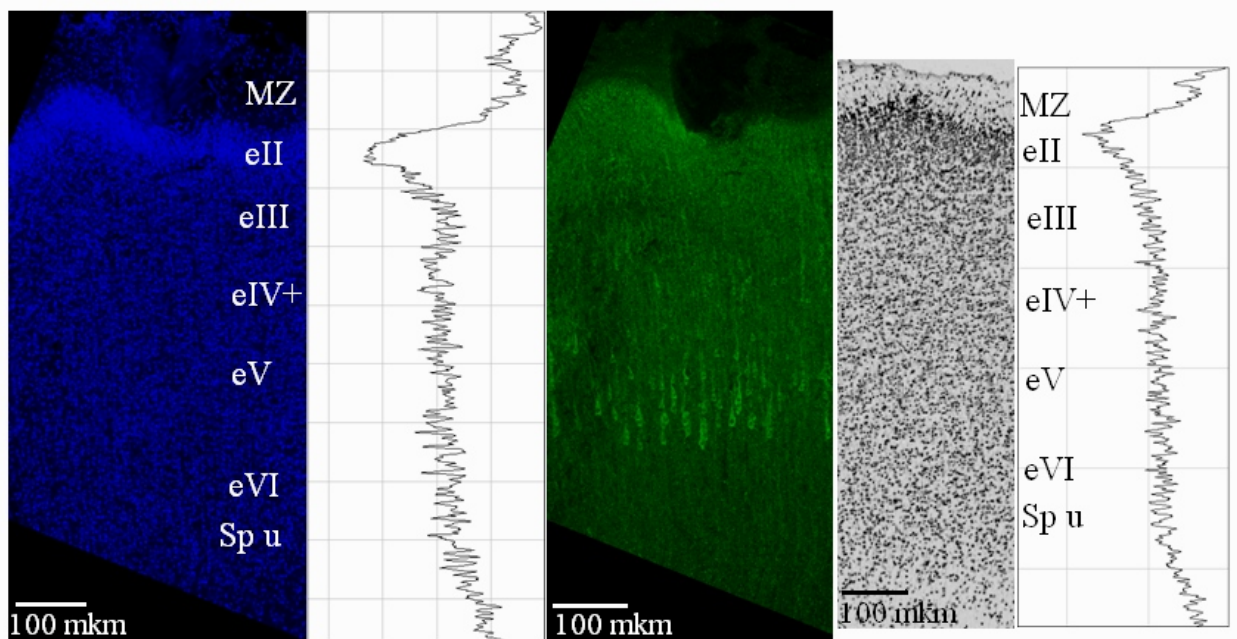
б

в

Рис. 26. Кора мозга 21-недельного плода. а - окраска DAPI, (MZ, eII, eIII, eIV+, eV, eVI, Sp_u - слои коры); б - послойный график плотности ядер; в - MAP2-позитивные нейроны в том же участке коры, цитоархитектоника (окраска по Нислю) и график плотности клеток.

Ближе к концу второго триместра (на 25 –26 неделе) поперечник зоны MAP2-позитивных нейронов расширяется до 437,8 мкм, при этом можно наблюдать его отчетливое разделение на два уровня (рис.27). Нижний формируют средние и крупные, а верхний – средние и мелкие пирамидные клетки. Крупные пирамиды присутствуют только на нижнем уровне, а их число заметно возрастает, по сравнению с более ранними сроками. На этом сроке иммунопозитивные клетки характеризуются хорошо развитой дендритной системой: апикальный дендрит прослеживается до слоя eII (рис. 28). Подкраска DAPI позволяет уточнить особенности локализации иммунопозитивных клеток: крупные пирамидные нейроны располагаются в нижней трети слоя eIV+eV, а мелкие – по наружной границе этого

слоя. Между ними появляется слой с высокой плотностью клеточных ядер свободный от MAP-позитивных нейронов.

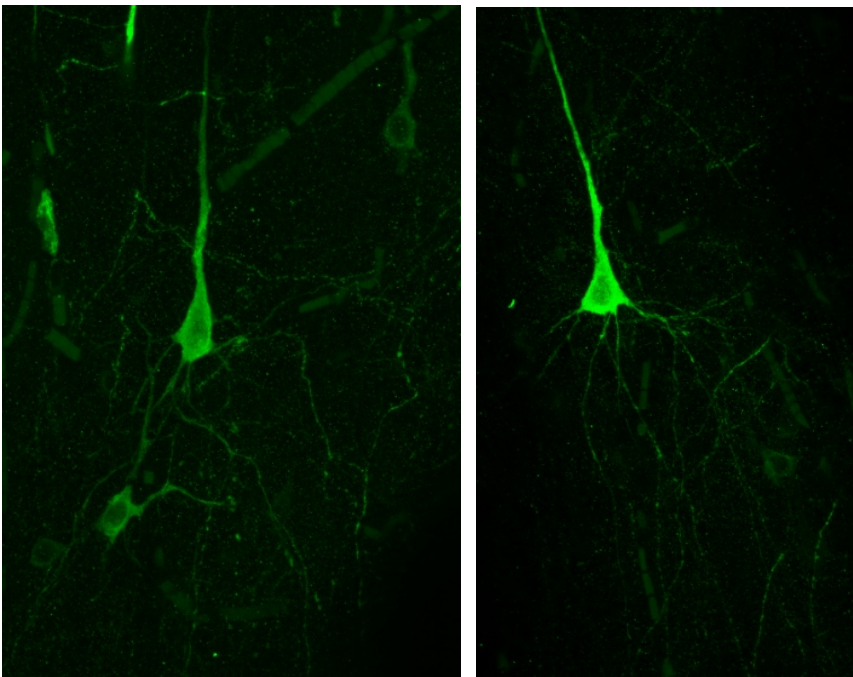


а

б

в

Рис. 27. Кора мозга 25-недельного плода. а - окраска DAPI, (MZ, eII, eIII, eIV+, eV, eVI, Sp_u - слои коры); б - послойный график плотности ядер; в - MAP2-позитивные нейроны в том же участке коры, цитоархитектоника (окраска по Нислю) и график плотности клеток.



а

б

Рис. 28. MAP2 иммунопозитивные нейроны слоёв eIII (а) и eV (б) в коре 26-недельного плода.

Для обработки изображений рекомендуется использовать бесплатную программу ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) и дополнение LOCI (<http://www.loci.wisc.edu/ome/formats.html>), позволяющее открывать *.lif файлы используемые микроскопом Leica TCS SPE. При открытии файла программой ImageJ появится диалоговое окно (рис.29)

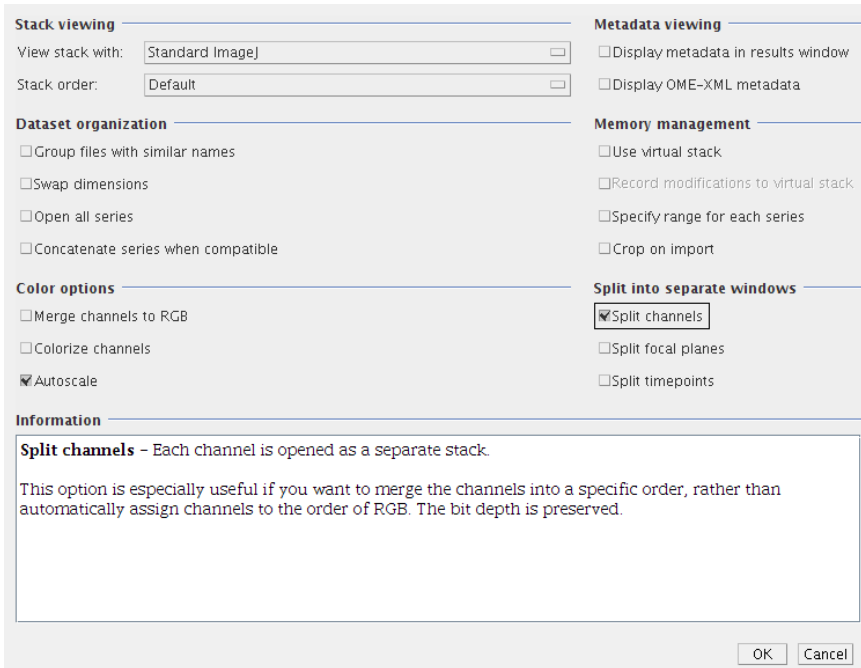


Рис. 29. Диалоговое окно импорта файлов *.lif в программу ImageJ.

Установить флажок «Split channels» чтобы каждый канал изображения открылся как отдельная пачка изображений. В случае если в файле содержится несколько экспериментов, появится окно, в котором надо выбрать пачки для импорта (Рис. 30). После этого каждый канал изображения будет открыт в отдельной пачке (Stack).

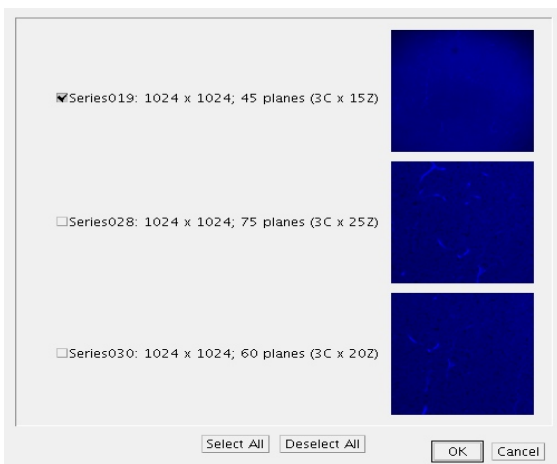
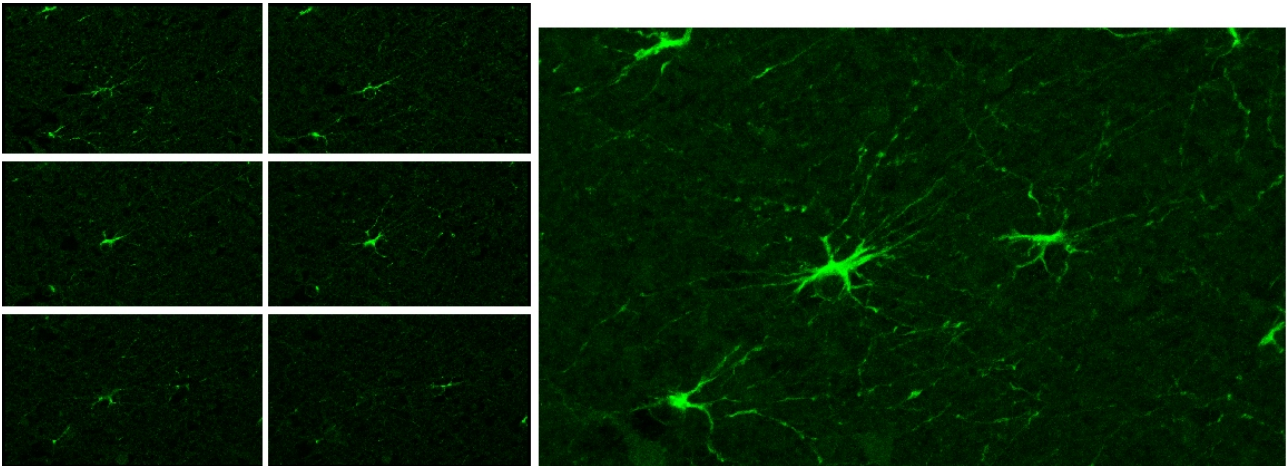


Рис. 30. Выбор пачек для импорта из эксперимента сохранённого в формате *.lif.

В случае XYZ сканирования каждая пачка будет представлять собой серию «оптических срезов» в плоскости XY отстоящих друг от друга на определённое расстояние по оси Z. Для визуализации протяжённых по оси Z объектов можно воспользоваться методом «расширенного» фокуса, сложив изображения в пачке таким образом, чтобы в результирующей картинке оказались только самые яркие точки (рис. 31). В ImageJ получить такое изображение можно выбрав в меню Image->Stacks->Z Project.



а

б

Рис. 31. а — шесть последовательных оптических срезов, б — изображение полученное методом «расширенного» фокуса.

В практической части работы необходимо:

- Для каждого полученного изображения коры необходимо построить графики клеточной плотности.
- Для всех MAP2 иммунопозитивных клеток измерить площадь профильного поля и расстояние от пиальной поверхности коры.
- Составить таблицу, в которую занести возраст плода, ширину коры, площадь профильных полей MAP2 иммунопозитивных нейронов и глубину залегания каждого из них.

Для оценки плотности клеток прежде всего необходимо измерить средний диаметр ядер на препарате. Для этого надо случайно выбрать одно ядро, вручную обвести его периметр с использованием инструмента Free Hand Selections, и нажать затем CTRL-M, эту операцию повторить 5-10 раз. В окне результатов для каждого учтенного ядра будут представлены размеры профильного поля (Area), средняя яркость, минимальный диаметр

круга в который можно вписать каждое ядро (Ferret's diameter). В этом окне выбрать Edit->Summarize, в результате будет выведено среднее значение всех измеренных параметров. Создать изображение «расширенного» фокуса толщиной равной среднему диаметру ядер (Ferret's diameter, полученный ранее). При необходимости сориентировать изображение (Image->Rotate->Arbitrary). Построить график клеточной плотности, для этого указать Vertical profile в настройках графика (Edit->Options->Profile plot options), выделить прямоугольным выделением область и построить для неё график (Analyse->Plot Profile).

Для измерения профильного поля и положения MAP2 позитивных нейронов необходимо создать изображение «расширенного» фокуса всей толщины препарата (20 мкм), сориентировать (Image->Rotate->Arbitrary) и обрезать (Image->Crop) изображение таким образом, чтобы пиальная поверхность коры находилась точно по верхней границе изображения. Затем для каждого нейрона вручную обвести его периметр с использованием инструмента Free Hand Selections, и нажать CTRL-M. После измерений в окне результатов будет представлена площадь профильного поля (Area) и глубина залегания (YM).

Задача № 2. Иммуногистохимическое исследование дифференцировки пирамидных нейронов коры мозга крысы

Постановка задачи

Полноценное и многоаспектное исследование закономерностей развития неокортекса невозможно без проведения модельных экспериментов на животных. Для того чтобы делать обобщающие выводы и использовать полученные результаты для сравнения с мозгом человека, необходимо выделить ключевые этапы нейрогенеза, принимая во внимание их соответствие периодам онтогенеза. Сроки гестации у человека и мелких лабораторных животных значительно различаются, те этапы кортикогенеза, которые плод человека проходит пренатально во втором триместре гестации, у крысы приходятся на первые три недели постнатального развития. В качестве ключевого этапа нейрогенеза можно использовать признак экспрессии пирамидными клетками коры белка нейротрубочек MAP2.

Эфферентные (пирамидные) нейроны коры инициируют кортикофугальные (нисходящие) и кортико-кортикальные (каллозальные и внутрислоушные) связи. Как уже отмечалось (см. задачу №1) в коре мозга человека данные популяции нейронов локализируются в разных слоях коры: кортико-кортикальные – в слое III, кортикофугальные – в слоях V и VI. В мозге крысы эфферентные пирамидные нейроны образуют смешанную популяцию, не имеющую такой строгой приуроченности к определенному слою.

С целью более точной идентификации таких нейронов можно использовать дополнительное иммуномаркирование. Известно, что экспрессия нейрофиламента N-200 коррелирует с функциональной специализацией нейрона и наблюдается только в пирамидных кортико-фугальных, но не каллозальных нейронах.

Местоположение каллозальных пирамидных клеток можно уточнить с помощью трейсерного флюоресцентного маркера – Dil. Диалкилкарбоцианины в частности DiI и диалкиламиностирилы (DiA и его аналоги) широко используются в качестве антероградного и ретроградного красителя нейронов как в живых так и в фиксированных тканях. Они не способны проходить через межклеточное пространство и межклеточные контакты от одной клетки к другой. Красители равномерно окрашивают мембрану нейронов посредством диффузии в билипидном слое со скоростью порядка 0.2–0.6 мм в день для фиксированных тканей и со скоростью порядка 6 мм в день для живых тканей за счёт активного транспорта при этом их использование не влияет на жизнеспособность клеток.

Таким образом, применение дополнительных маркеров и конфокальной микроскопии позволяют более точно выделить популяции кортикофугальных и кортико-кортикальных пирамидных клеток в развивающейся коре животных.

Материал и методы

Характеристика материала

Решение поставленных задач выполняют иммуногистохимическим исследованием коры больших полушарий мозга 10-дневных крысят. Поскольку совмещение всех маркеров в одном эксперименте нежелательно, исследование проводят на разных животных. Экспрессию MAP2 и N-200 исследуют на одном животном (крыса №2). Задача постнатальной дифференцировки пирамидных каллозальных нейронов решается методом одностороннего введения трейсерного маркера Dil (крыса №1).

Введение трейсерного маркера

Для трейсерного исследования каллозальных нейронов с использованием Dil краситель необходимо ввести в кору контрлатерального полушария мозга. В тех случаях, когда экспериментальная задача связана с изучением строго локальной области коры, рекомендуется использовать стереотаксический атлас или предварительно для параметров конкретного стереотакса отработать координаты исследуемой структуры.

Стереотаксы состоят из двух основных частей: головодержателя (для крепления головы животного в определённом положении) и устройства для перемещения держателя

электродов на заданные расстояния по трём координатам. Конструкция головодержателя для крыс сравнительно проста: он состоит из двух стержней, которые вводят в наружные слуховые проходы, и держателя верхней челюсти. Последний заводится за резцы крысы, а упор прижимает к нему морду животного. Все держатели крепятся стопорными винтами. Каретка держателя электродов может перемещаться по горизонтальной направляющей спереди назад, во второй горизонтальной плоскости вправо или влево от средней линии и в вертикальном направлении благодаря специальным стержням, образующих между собой прямой угол. Плоскость, проходящая через оси ушных стержней, параллельна горизонтальной направляющей стереотакса и после установки головы животного в головодержателе совпадает с основной плоскостью черепа.

После ознакомления с конструкцией стереотакса, следует определиться с областью трепанации черепа по внешним ориентирам (швам черепа) и подготовить крысу к операции. Ввести внутривенно барбитуровый препарат (гексенал или нембутал в дозе 40 мг на 1 кг живого веса). Закрепить крысу в стереотаксическом аппарате. Зафиксировать голову в ушных держателях и прочно закрепить верхнюю челюсть с помощью челюстного держателя.

Провести резекционную трепанацию черепа над выбранной областью коры. Для этого сделать разрез кожи, ее лоскуты отвести в стороны, обнажённую кость очистить распатором от мышц, фасций и надкостницы, обескровить перекисью водорода и вытереть насухо так, чтобы отчётливо видеть черепные швы, которые служат наружным ориентиром. Бором просверлить отверстие в кости черепа, стараясь не повредить мозговое вещество и проверяя глубину отверстия зондом. Расширить отверстие до 0,5 см в диаметре. Если возникает костное кровотечение, остановить его гемостатической губкой.

Краситель может поставляться в нескольких различных формах: в виде кристаллов, в виде жидкости и в виде гидрофобной пасты. Для предлагаемого исследования целесообразно использовать его в виде готовой пасты. Методика введения Dil: в трепанационное отверстие по заданным координатам на глубину 1мм ввести тонкий металлический зонд или иглу, предварительно смочив его кончик пастой, оставить на 5-10 сек.

По окончании основных этапов оперативного вмешательства отверстие в кости закрыть фибриллярной губкой, рану ушить. В послеоперационный период, как правило, наблюдается гиперсекреция ликвора как реакция на оперативное вмешательство. При отсутствии тщательной изоляции субарахноидального пространства от внешней среды ликвор начинает истекать в повязку, наступает длительная ликворея и возникает опасность проникновения вторичной инфекции в ликворные пути и развитие гнойного менингита. Во избежании этого провести антисептические процедуры (обработать шов и подколоть

препараты пенициллинового ряда). Обеспечить посленаркозное ведение (поддержание согревающего температурного режима и питьё) и послеоперационный уход за животным (антисептическая обработка ран, содержание животного в чистоте и удобстве, соблюдая режимы гигиены и кормления).

Предложенный метод введения красителя оптимален для решения данной экспериментальной задачи, так как DiI в виде пасты легко диффундирует и способен пометить клетки, аксоны которых проходят как поверхностно, так и в глубине коры. Аппликацией кристаллика красителя на поверхность коры возможно пометить только поверхностно расположенные аксоны. По истечении срока транспорта DiI (для крысенка — 5-7 дней) проводится фиксация материала методом прижизненной перфузии.

Фиксация материала

Фиксация материала проводится методом перфузии через систему кровообращения. Жидкость поступает под давлением, которое примерно соответствует нормальному кровяному давлению животного, что достигается поднятием бутылей с перфузионными жидкостями на высоту около 150 см над животным (рис. 32). Перед перфузией наркотизированное животное кладётся на спину, на его грудной клетке делается надзрез справа и слева от грудины. Канюля (тупая игла), прикреплённая к резиновой трубке вводится в левый желудочек и начинается подача физиологического раствора (0,9% раствор хлорида натрия). В правом желудочке для быстрого замещения крови физиологическим раствором делают небольшой разрез. После того как физиологический раствор вымыл форменные элементы крови, подают фиксирующую жидкость (например, 4% параформальдегид на ФБ). О том, что перфузия проводится правильно можно судить по тремору мышц, вызываемом реакцией фиксатора с белками мышечных клеток. Когда животное окостенеет можно удалять мозг из черепа. Для этого отсекают голову животного и обнажают череп. Начинают удаление кости, осторожно откусывая её кусочками. После удаления кости мозг приподнимают и перерезают черепно-мозговые нервы. По мере возможности удаляются мозговые оболочки и мозг помещается в фиксирующую жидкость для дофиксации.

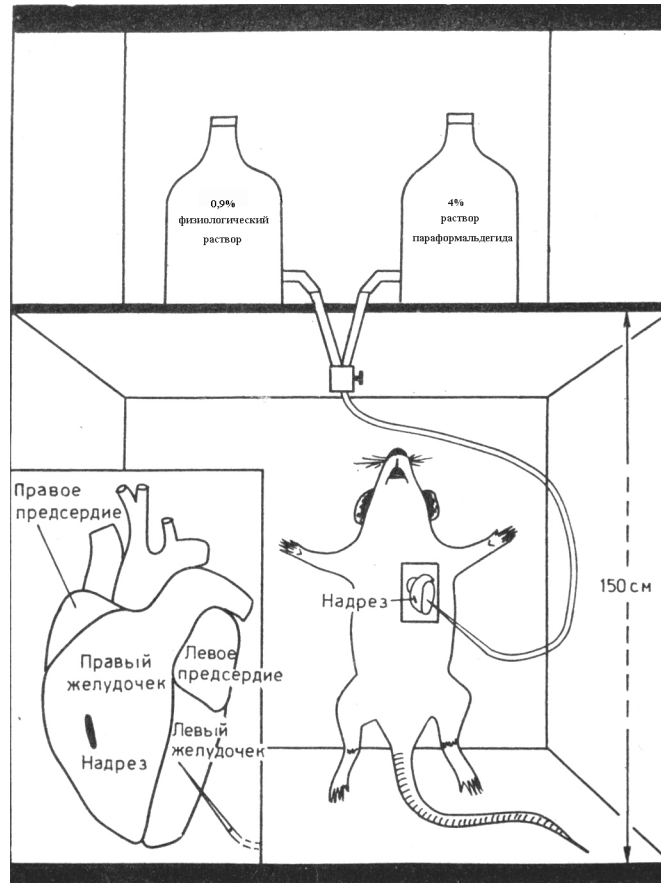


Рис. 32. Система для перфузии (по Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П., 1991)

Изготовление срезов в криостате

После фиксации для изготовления криостатных срезов мозг пропитывают растворами сахарозы возрастающей концентрации. Сахароза мешает образованию кристаллов льда в ткани. В криостат помещают все необходимые инструменты, оборудование, мозг и охлаждают, доведя температуру до -10 — -12°C и поддерживают её на этом уровне. Мозг прикрепляют водой к блоку путём примораживания. Блок закрепляют на блокодержателе, крепко фиксируя винты. Гистологический нож устанавливают в гнездо и регулируют угол резки. Если угол наклона неправильный, то срез морщится и может быть неровным. Оптимальный угол наклона ножа около 30° . Устанавливают толщину среза (подачу микровинта), подводят нож и начинают резку. Срезы ткани мозга снимают кисточкой в направлении от основания ножа к лезвию, стараясь не прикасаться к лезвию ножа. Полученные срезы монтируют на предметные стекла, просушивают 24 часа при температуре 37°C (в термостате) и подвергают дальнейшей обработке. Срезы мозга крысы №1 (введение трейсерного маркера Dil) заключают в раствор для заключения (протокол 5) под покровное стекло. На срезах мозга крысы №2 проводят иммуногистохимическое выявление MAP2 и N200 и устанавливают их колокализацию.

Выявление MAP2 и N200 иммунопозитивных нейронов

Экспрессия нейрофиламента N-200 коррелирует с функциональной специализацией нейрона и наблюдается только в пирамидных кортико-фугальных, но не каллозальных нейронах. MAP2, как уже было отмечено, является маркером нейронов определенной стадии дифференцировки, для него не показана корреляция с функциональной специализацией нейрона.

Для выявления колокализации MAP2 и N200 применяется непрямой метод иммуногистохимического анализа для двух различных антигенов. С использованием иммуногистохимии можно пометить разными флуорохромами нейроны экспрессирующие MAP2 и N200 (рис.32). Таким образом можно выделить все нейроны и среди них выделить кортикофугальные нейроны. Для окраски используются флуорохромы Alexa-488 (для MAP2) и Texas-Red (для N200) которыми помечены антитела козы к иммуноглобулинам мыши и кролика соответственно.

Иммуногистохимическую обработку полученных срезов мозга крысы №2 проводят по схеме, предложенной в задаче №1 (см. протокол 4 и протокол 6).

Протокол 6. Иммуногистохимическая окраска для выявления белков MAP2 и N200.

Протокол аналогичен протоколу 4 за исключением растворов первичных и вторичных антител

Первичные антитела - развести 1:250 моноклональные антитела мыши против MAP2 (клон HM-2) в растворе 1% нормальной сыворотки козы, 0,05% Triton-X100 на фосфатном буфере в этот раствор добавить поликлональные антитела кролика против N-200 в концентрации 1:80

Вторичные антитела - развести 1:250 антитела коза-анти-мышь конъюгированные с флуорохромом Alexa 488 в этот раствор добавить антитела коза-анти-кролик конъюгированные с флуорохромом Texas Red в концентрации 1:250

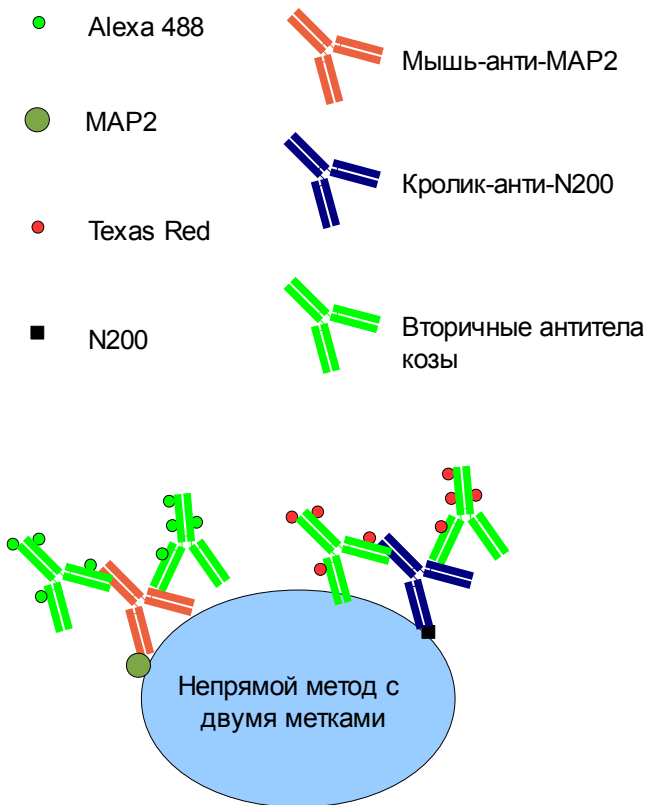


Рис.32. Схема непрямого метода иммуногистохимического анализа для двух различных антигенов.

Получение изображений

Микроскопирование препаратов мозга крысы №1

Перевести микроскоп (см. раздел «Порядок работы с микроскопом») в эпифлуоресцентный режим, использовать фильтровый кубик А (для DAPI). Наблюдая окрашенные ядра клеток найти кору контрлатерального к месту введения DiI полушария. Переключиться на фильтровый кубик I3. Используемый кубик (табл.2) не точно соответствует спектру флуорохрома (рис.33) поэтому следует ожидать достаточно слабую флуоресценцию. В случае если планируется проводить исследование в эпифлуоресцентном режиме разумно будет использовать более подходящий кубик, например Y3. Найти участок коры с ретроградно мечеными клетками. Переключить микроскоп в конфокальный режим, настроить параметры последовательного сканирования по стекам для DAPI и DiI. В отличие от светофильтров с фиксированными характеристиками используемых в эпифлуоресцентном режиме в конфокальном режиме можно точно подстроить спектральный детектор под используемый флуорохром. Рекомендуемые границы спектрального детектора для DiI от 560 до 590 нм. В режиме сканирования XYZ снять пачку оптических срезов через всю толщину препарата (20 мкм).

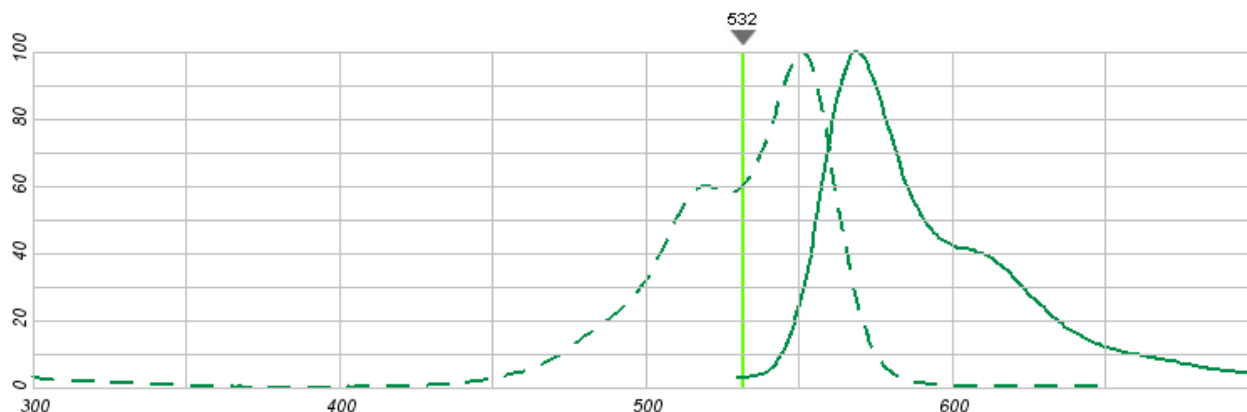


Рис. 33. Спектральная характеристика DiI в мембране клетки. Непрерывная линия — спектр испускания, пунктирная линия — спектр поглощения. 532 — используемый для возбуждения флуорохрома лазер.

Микроскопирование препаратов мозга крысы №2 (выявление MAP2 и N200)

Перевести микроскоп (см. раздел «Порядок работы с микроскопом») в эпифлуоресцентный режим, использовать фильтровый кубик А (для DAPI). Наблюдая окрашенные ядра клеток найти участок препарата на котором весь поперечник коры помещается в поле зрения. Переключиться на фильтровый кубик I3 (для Alexa 488), проверить качество иммуногистохимической окраски для выявления MAP2. Переключиться на фильтровый кубик N2.1 (для Texas Red) проверить качество окраски для выявления N200. Переключить микроскоп в конфокальный режим, настроить параметры последовательного сканирования по стекам для DAPI, Alexa 488 и Texas Red. В режиме сканирования XZY (см. раздел «Использование программного обеспечения конфокального микроскопа») оценить степень иммуногистохимической окраски препарата по глубине для Alexa 488 и Texas Red. Спектры возбуждения и испускания использованных флуорохромов перекрываются незначительно (рис.34), поэтому, во избежание совместной регистрации обоих флуорохромов рекомендуются следующие настройки спектрального детектора: для Alexa-488 от 493 до 560 нм, для Texas Red от 590 до 700 нм, для DAPI от 410 до 480 нм. В режиме сканирования XYZ снять пачку оптических срезов через всю толщину препарата (20 мкм).

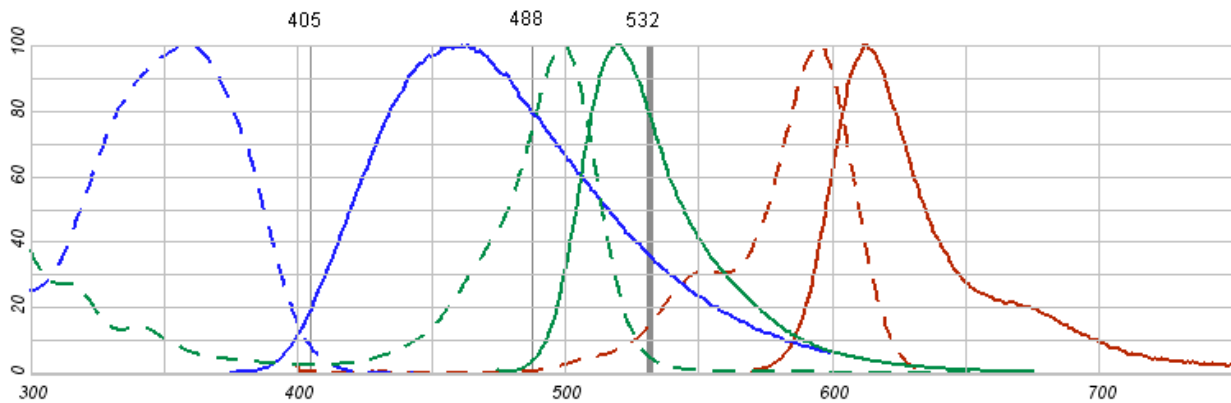


Рис. 34. Спектральная характеристика используемых флуорохромов. Синий — DAPI, зелёный — Alexa 488, красный — Texas Red. Непрерывная линия — спектр испускания, пунктирная линия — спектр поглощения. 405, 488, 532 — используемые для возбуждения флуорохромов лазеры.

Обработка изображения

Для первой крысы аппликация Dil на небольшой участок одного полушария позволяет визуализировать тела и отростки каллозальных нейронов коры противоположного полушария. Подкраска ядер DAPI позволяет соотнести положение выделенных нейронов с цитоархитектоническими слоями коры.

Для второй крысы применение трёх флуоресцентных красителей позволяет отдельно исследовать особенности цитоархитектоники (DAPI) а также распределение MAP2-позитивных (Alexa 488) и N200-позитивных (Texas Red) нейронов и их колокализацию в одном и том же участке коры. Последующая обработка, выявляющая клетки экспрессирующие как MAP2 так и N200 позволяет судить о приуроченности кортикофугальных нейронов к разным слоям коры.

Для обработки изображений рекомендуется использовать бесплатную программу ImageJ (детальное описание обработки изображения при помощи ImageJ см. в Задаче №1).

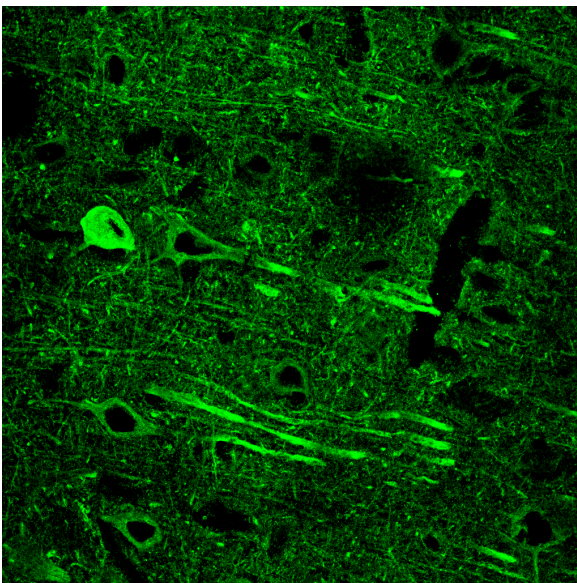
В практической части работы необходимо:

- Для каллозальных нейронов первой крысы измерить площадь профильного поля и установить принадлежность к цитоархитектоническому слою.
- Для всех иммунопозитивных нейронов второй крысы измерить площадь профильного поля, установить принадлежность к цитоархитектоническому слою и коэкспрессию MAP2 и N200.

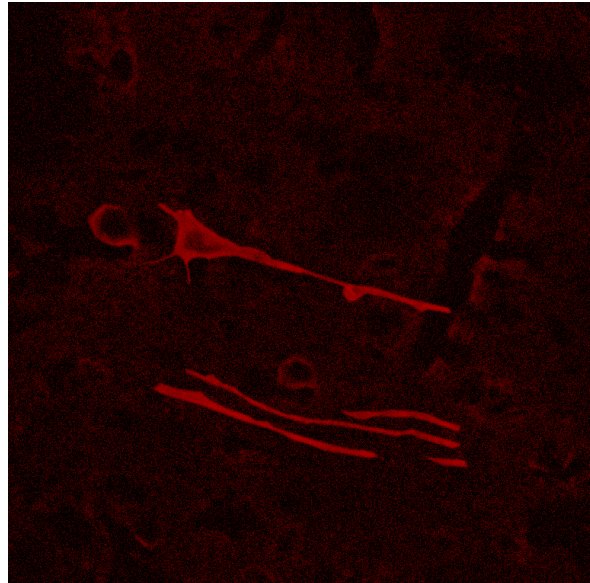
- Составить таблицу, в которую занести площадь профильных полей каллозальных и кортикофугальных нейронов и цитоархитектонический слой к которому они принадлежат.

Для измерения профильного поля нейронов необходимо создать изображение «расширенного» фокуса всей толщины препарата (20 мкм), сориентировать (Image->Rotate->Arbitrary) и обрезать (Image->Crop) изображение таким образом, чтобы пиальная поверхность коры находилась точно по верхней границе изображения. Затем для каждого нейрона вручную обвести его периметр с использованием инструмента Free Hand Selections, и нажать CTRL-M. После измерений в окне результатов будет представлена площадь профильного поля (Area) и глубина залегания (YM).

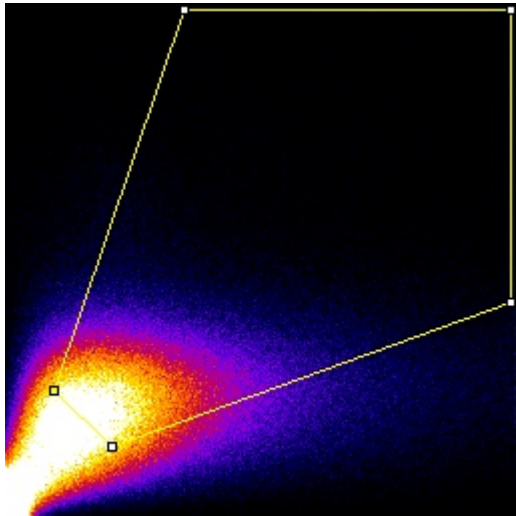
Для выявления колокализации необходимо создать изображения расширенного фокуса для каналов Alexa 488 (MAP2) и Texas Red (N200). Перевести оба изображения в 8-битный формат Image->Type->8-bit, открыть диалог дополнения для поиска локализации Plugins->Colocalization Finder... (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/colocalization-finder.html>). На диаграмме корреляции изображений выбрать область при помощи Polygon Selection. В комбинированном изображении (рис. 35) точки, соответствующие выбранной на диаграмме области будут иметь белый цвет.



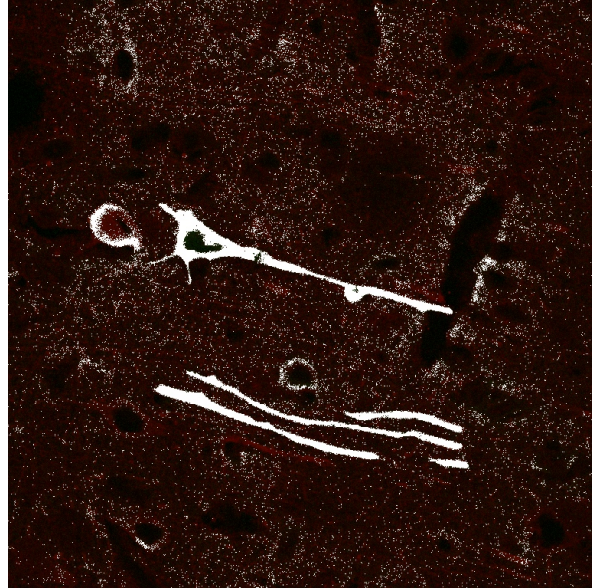
а



б



в



г

Рис. 35. а,б - Расширенный фокус для препарата мозга взрослой крысы, в — диаграмма корреляции двух изображений и выбранный для построения колокализации участок, г - колокализация MAP2 и N200.

Задача № 3. Гистологическое исследование шипиков нейронов коры мозга крысы

Постановка задачи

Дендриты – это воспринимающая часть нейрона. В постнатальном онтогенезе количество нервных клеток не увеличивается, развитие нервной системы происходит за счет ветвления дендритов и образования новых шипиков. Шипики — мембранные выросты на поверхности дендрита, постсинаптическая часть глутаматных синапсов. Шипики отличаются множеством форм, что отражается в их категоризации — различают филоподии, протошипики, грибовидные шипики, тонкие шипики, пеньковые шипики, разветвленные шипики и т. д. (рис. 36).

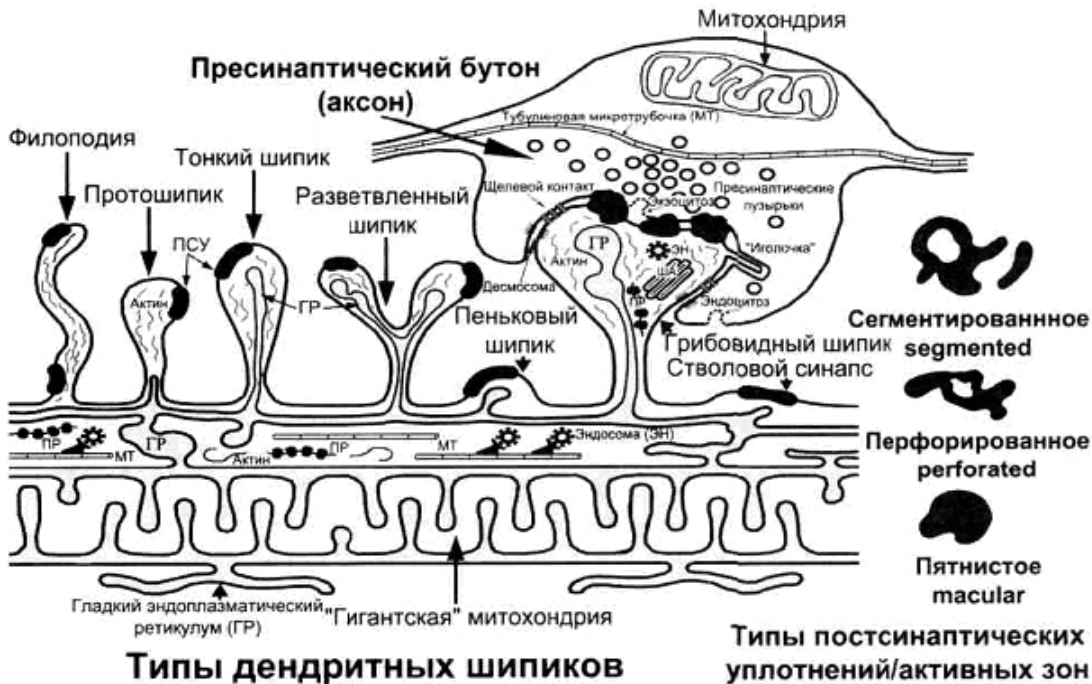


Рис. 36. Схема организации различных категорий дендритных шипиков и постсинаптических уплотнений, включая основные органеллы синапсов, где ГР - гладкий ретикулум; МТ - микротрубочки; ПР - свободные полирибосомы; ПСУ - постсинаптическое уплотнение; ША - шипиковый аппарат; ЭН - эндосома. (Попов В.И. и др., 2003)

Существуют свидетельства того, что эти формы шипиков соответствуют разным стадиям развития и эффективности синаптических соединений. В зависимости от типа синаптической стимуляции объём и форма шипиков может изменяться, а сами шипики могут поворачиваться в пространстве, появляться и исчезать, при этом наиболее устойчивыми являются грибовидные шипики. Развитие шипиков зависит от сигналов, поступающих из внешней среды, это доказано в экспериментах с крысами, которые росли в обогащенной или обедненной среде. На дендритах нейронов коры мозга крыс, которые воспитывались в обогащенной среде, шипиков было на 30 % больше, чем у тех, которые выросли в обедненной среде. Известно, что число шипиков резко снижается во время эпилептических приступов, при гипоксии, алкогольном, наркотическом отравлении, при болезни Дауна, Потау (Боголепов Н.Н., 1975, 1983). Несмотря на расширяющийся арсенал гистологических, иммуногистохимических методов, максимально полно выявить дендритные шипики удается только методом Гольджи.

Задача исследования структурного разнообразия и анализа плотности распределения шипиков пирамидных нейронов коры полушарий мозга крысы убедительно решаются методом Гольджи с применением конфокальной микроскопии.

Материал и методы

Характеристика материала

Поставленные задачи решаются при исследовании препаратов коры больших полушарий мозга крыс разного постнатального возраста и/или воспитанных в разных экспериментальных условиях, обработанных по методу Гольджи.

Фиксация, импрегнация материала, изготовление препаратов

Протокол 7. Импрегнация нервной ткани по методу Гольджи.

Вариант 1

1. Кусочки ткани извлеченного из черепа мозга объемом около 1 см³ фиксировать погружением в смесь из 4 частей 2,5% – 3,5% водного раствора бихромата калия и 1 части 1% четырёхокси осмия (OsO₄), выдержать при 20-25°C в течение 2 - 7 дней
2. Вынуть и осторожно обсушить блок кусочком фильтровальной бумагой
3. Сполоснуть блок 0,75% раствором азотнокислого серебра (AgNO₃) до исчезновения осадка
4. Поместить блок в тот же раствор азотнокислого серебра при температуре 35°C на 2-6 дней

Вариант 2, Модификация Бюбенета

1. Небольшой фиксированный в растворе формалина кусочек мозга размером около 1 см³ положить на ватку, залить 2,5% раствором бихромата калия, выдержать при 37°C в течение 2х дней.
2. Вынуть и осторожно обсушить блок кусочком фильтровальной бумагой.
3. Сполоснуть блок 2% раствором азотнокислого серебра.
4. Поместить блок в 2% раствор азотнокислого серебра при температуре 37°C на 2-4 дня.

Примечания к протоколу xx:

При отработки метода рекомендуется изготовить 10–15 образцов, варьируя время фиксации и импрегнации. Если кусочки очень маленькие, то для уменьшения осадков перед погружением в раствор AgNO₃, их рекомендуется желатинизировать.

Процедуру проводить в затенении, избегать попадания прямых солнечных лучей.

Протокол 8. Изготовление препаратов.

По окончании импрегнации кусочек достаточно сильно уплотняется, что позволяет провести его резку как без заливки в парафин, так и с заливкой в парафин по протоколу 1.

В случае резки без заливки в парафин, кусочек необходимо провести через батарею глицерина возрастающей концентрации, что позволит закрепить его парафином на блоке для микромирования.

Рекомендованная толщина срезов — от 50 до 100 мкм, такая толщина срезов позволит определить морфотип нейрона по характеру ветвления его отростков.

Полученные препараты рекомендуется заключать в канадский бальзам, т.к. коэффициент преломления канадского бальзама близок к коэффициенту преломления стекла, что позволит избежать сферической аберрации при микрофотографировании относительно толстых срезов.

Получение изображений

Для получения изображений препаратов, окрашенных по методу Гольджи необходимо использовать режим XYZ сканирования в проходящем свете. Необходимо подготовить микроскоп к сканированию для чего перевести микроскоп (см. раздел «Порядок работы с микроскопом») в режим проходящего света, найти интересующий участок, настроить освещение по Кёллеру и перевести микроскоп в конфокальный режим. Использование программного обеспечения микроскопа в этом режиме описано в главе «Настройка микроскопа для сканирования препарата в режиме проходящего света». Для препаратов импрегнированных серебром, заключённых в канадский бальзам рекомендуется использовать красный (635 нм) лазер. После настройки необходимо снять всю толщину выбранного участка препарата в режиме сканирования XYZ.

Режим сканирования препарата в проходящем свете не является конфокальным режимом, так как при регистрации перед детектором не используется пинхол диафрагма. То есть на детектор попадает не только свет, прошедший в точке фокуса объектива, но и свет, отраженный от других частей препарата. Импрегнация серебром приводит к тому, что окрашенные нейроны становятся непрозрачными, что делает невозможной визуализацию структур лежащих в области их тени. Однако такой режим имеет несомненные преимущества перед обычной микроскопией в проходящем свете: возможна точная настройка динамического диапазона детектора проходящего света путем корректировки его усиления и смещения, возможно изменение увеличения изображения в пределах возможностей выбранного объектива путем плавного изменения рамки сканирования, в результате чего может быть достигнуто максимальное разрешение. При использовании цветных гистологических красителей (например, окраска препаратов гемоксилин-эозином или тионином) возможно их разделение при использовании нескольких лазеров. Созданная таким путем пачка изображений может быть использована для создания трёхмерной реконструкции дендритов и шипиков (рис. 37). Для реконструкции можно использовать как специализированные платные (Huygens, Imaris), так и бесплатные (Slicer, Reconstruct) программные пакеты.

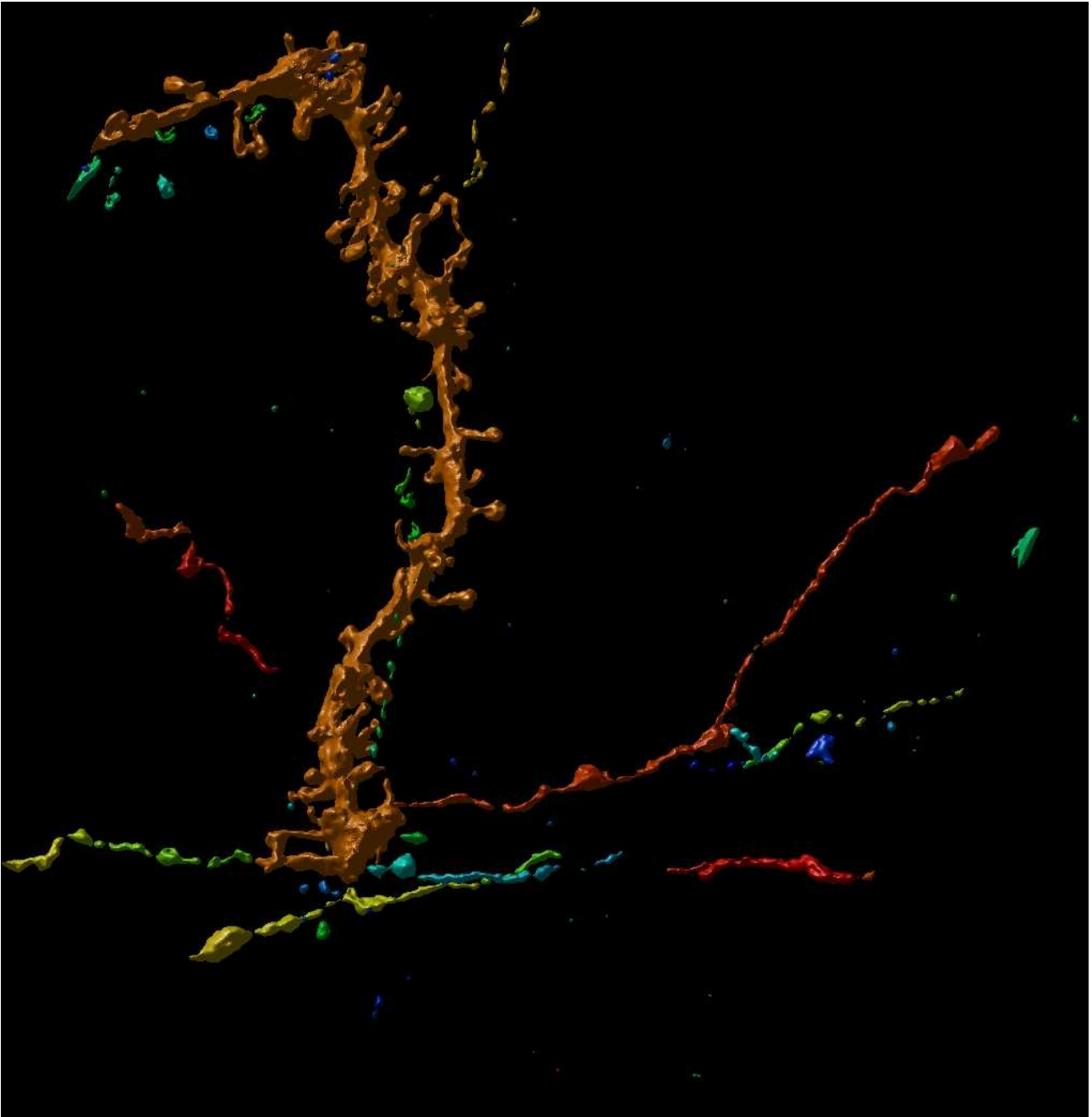


Рис. 37. 3D реконструкция одного из дендритов с шипиками (коричневый). Видны проходящие аксоны (красный, зеленый), один из них обвивает дендрит и, возможно, образует синаптические контакты с шипиками.

Обработка изображения

Метод Гольджи совместно со сканированием позволяет исследовать импрегнированные нейроны и их отростки с высокой степенью детализации, включая исследование шипиков и аксонов. Использование толстых до 100 мкм срезов позволяет определить морфотип нейрона, базируясь на форме тела и характере ветвления его отростков

(рис. 38). Тип и количество шипиков может изменяться в ответ на экспериментальные воздействия. Трёхмерная реконструкция и метод «расширенного фокуса» позволяют произвести подсчёт шипиков, а также определить их тип для всей толщины препарата. Полученная при использовании детектора проходящего света пачка изображений будет иметь меньшее разрешение по Z, чем для конфокального режима, однако может быть использована для целей трёхмерной реконструкции (рис. 37). Для получения «расширенного фокуса» в программе ImageJ надо выбрать Image->Stacks->Z Project, и выбрать минимальную проекцию. В этом случае в результирующую картинку попадут только самые тёмные точки из пачки, так как в этом методе сигналом (наличием окраски) для нас будет отсутствие света, а не его наличие, как в случае с флуоресцентными препаратами.

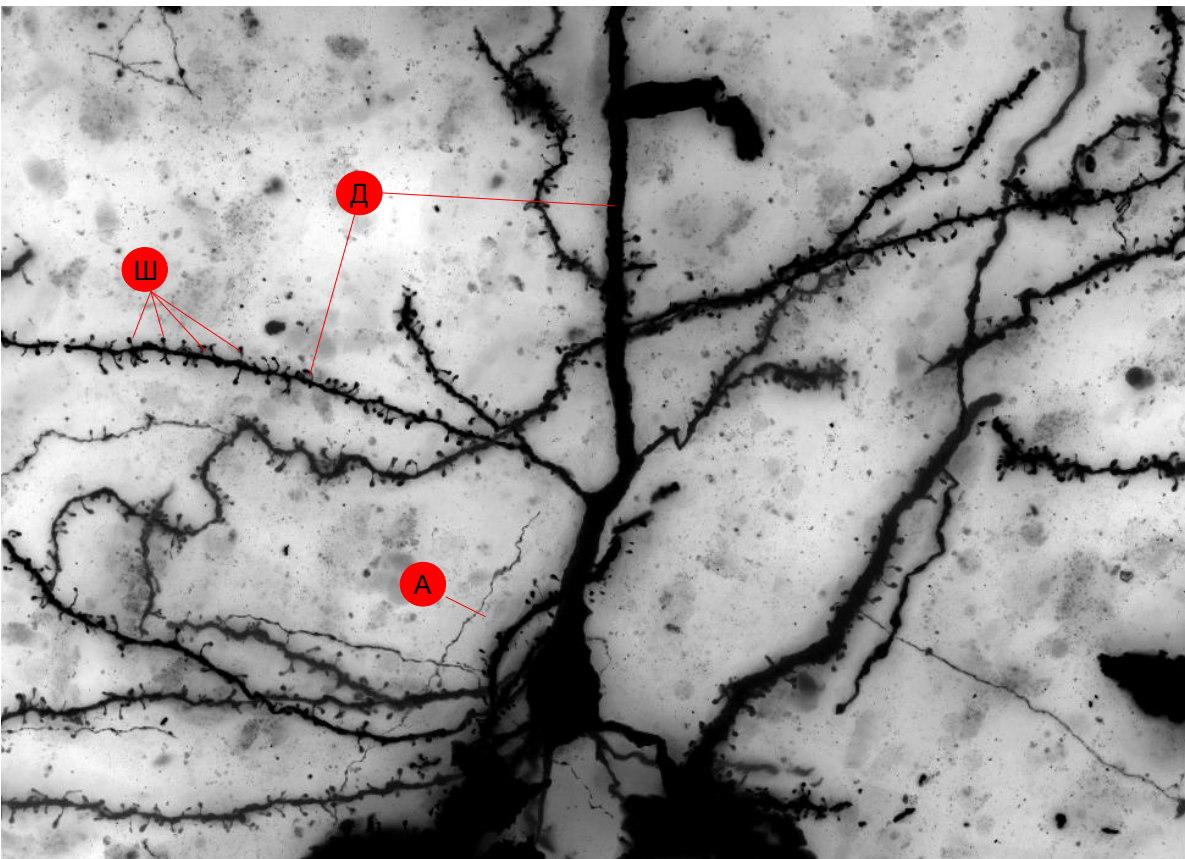


Рис. 38. Нейрон импрегнированный серебром по методу Гольджи. Изображение получено с использованием детектора проходящего света. Обработка - метод расширенного фокуса (минимальная проекция). Д-дендриты, А-аксон, Ш-шипики.

Литература

Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М. Высшая школа. 1991.

Полак Дж., Ван Норден С. Введение в иммуноцитохимию: современные методы и проблемы, Мир, М., 1987.

Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Иностранная литература, 1953, 718с.

Угрюмов М.В. Современные методы гистохимии. Изд. ВИНТИ, М. 1991.

Abramoff M.D. Image Processing with ImageJ / M.D. Abramoff, P.J. Magelhaes, S.J. Ram // Biophotonics International. - 2004 - V.11, N7. - P.36-42.

Allendoerfer, K.L., and Shatz, C.J. The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex// Annu. Rev. Neurosci. 1994. №17. P. 185–218.

Andres M., Veronique M. Andre V.M., Nguyen S. Human cortical dysplasia and epilepsy: an ontogenetic hypothesis based on volumetric MRI and NeuN neuronal density and size measurements// Cerebral Cortex. 2005. V. 15. № 2. P.194-210.

Blomgren K., Hagberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia–ischemia in the developing brain. //Free Radical Biology & Medicine 2006, 40, p. 388 – 397

Harada A, Teng J, Takei Y, Oguchi K, Hirokawa N. MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. J Cell Biol. 2002 Aug 5;158(3):541-9. Epub 2002 Aug 5.

Hibbs A.R. Confocal Microscopy for Biologists / A.R. Hibbs .- : Springer, 2004 .- 467 p.

Köbbert C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S. Current concepts in

neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol.* 2000 Nov;62(4):327-51.

Molnár Z, Cheung AF. Towards the classification of subpopulations of layer V pyramidal projection neurons. *Neurosci Res.* 2006 Jun;55(2):105-15.

Murphy D.B. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging* / D.B. Murphy .- New York: John Wiley & Sons, LTD, 2001 .- 368 p.

Voelker CC, Garin N, Taylor JS, Gähwiler BH, Hornung JP, Molnár Z. Selective neurofilament (SMI-32, FNP-7 and N200) expression in subpopulations of layer V pyramidal neurons in vivo and in vitro. *Cereb Cortex.* 2004 Nov;14(11):1276-86.