

Д.Э. Коржевский¹, О.В. Кирик¹, Е.Г. Сухорукова¹, А.В. Гиляров¹, К.В. Соловьев² и
Н.А. Грудина²

ИЗУЧЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ АСТРОЦИТОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ПОМОЩИ КОНФОКАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОСКОПИИ

¹ Отдел общей и частной морфологии (руков. — академик РАМН В.А. Нагорнев), ²отдел молекулярной генетики (руков. — проф. В.Б. Васильев) Института экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Объемная реконструкция цитоархитектонических взаимоотношений основных компонентов нервной ткани представляется актуальной, но чрезвычайно сложной проблемой нейроморфологии. Цель настоящего исследования состояла в разработке метода, обеспечивающего четкую визуализацию астроцитов головного мозга крысы в срезах толщиной более 30 мкм, создании адекватного алгоритма изучения полученных препаратов при помощи конфокального микроскопа и проведении трехмерной реконструкции астроцитов по группе оптических срезов. Исследованы различные варианты приготовления препаратов (просветляющие реагенты, флюорохромы, заключающие среды), режимы работы конфокального микроскопа, методы обработки цифрового изображения и др. Рекомендованы методические подходы, которые можно успешно применять при объемной реконструкции и определении пространственных взаимоотношений астроцитов в головном мозге млекопитающих.

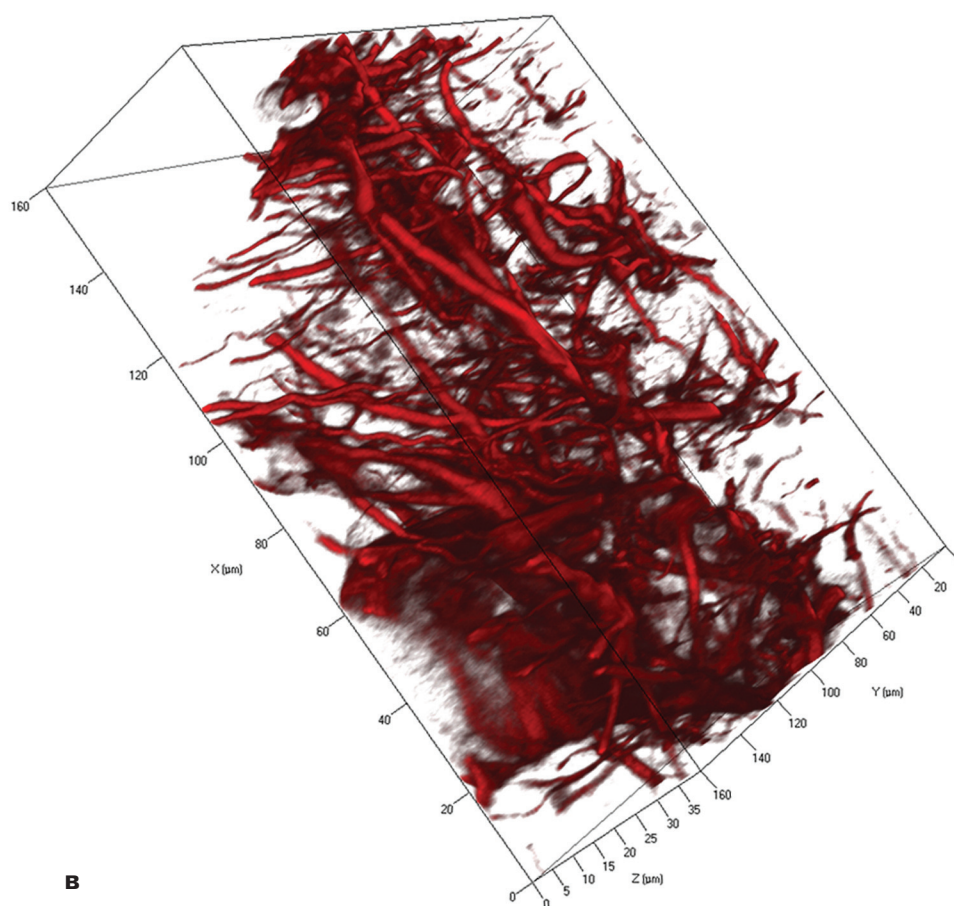
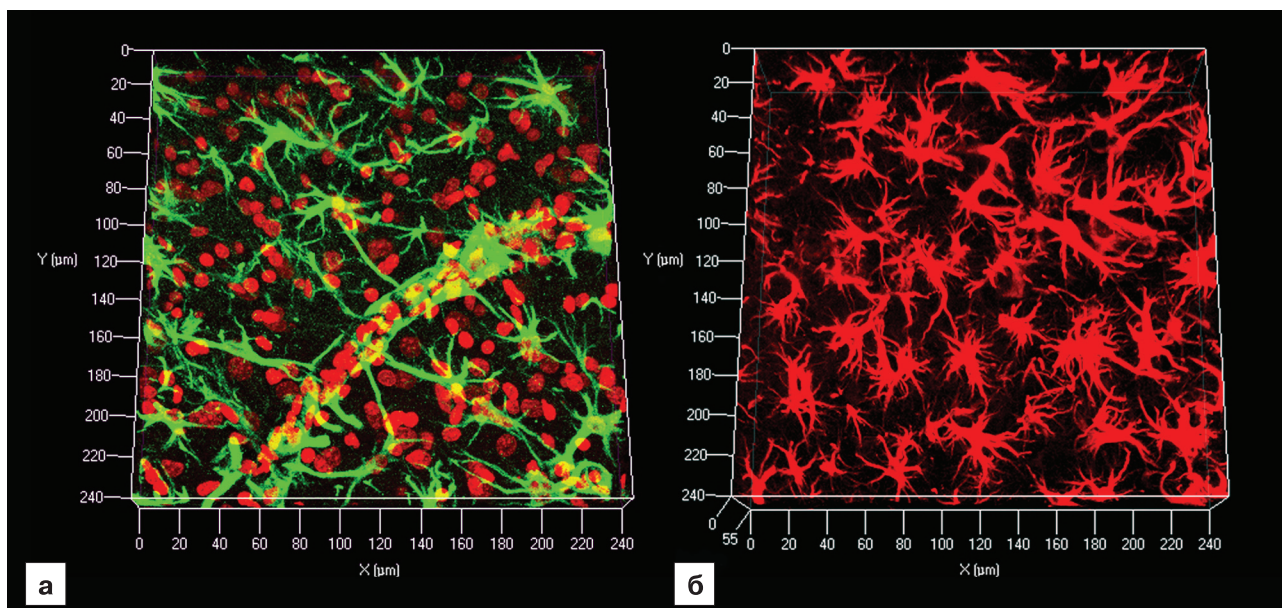
Ключевые слова: головной мозг, астроциты, конфокальная лазерная микроскопия, трехмерная реконструкция.

Объемная реконструкция цитоархитектонических взаимоотношений основных компонентов нервной ткани представляется актуальной, но чрезвычайно сложной проблемой нейроморфологии. Это обусловлено как сложностью формы нервных и глиальных клеток, так и исключительной трудоемкостью классических подходов, которые принято использовать для пространственной реконструкции гистологических объектов [5]. Современные достижения в области конфокальной лазерной микроскопии и компьютерных технологий [6, 7, 9, 10] создают основу для решения этой проблемы. Тем не менее, до сих пор в арсенале нейробиологов отсутствуют достаточно простые и хорошо воспроизводимые методы, позволяющие успешно решать задачу трехмерной реконструкции цитоархитектоники нервной ткани головного мозга.

Цель настоящего исследования состояла в разработке метода, обеспечивающего четкую визуализацию астроцитов головного мозга крысы в срезах толщиной более 30 мкм, создании адекватного алгоритма изучения полученных препаратов при помощи конфокального микроскопа и проведении трехмерной реконструкции астроцитов по группе оптических срезов.

В работе использован материал, полученный от 4 половозрелых белых крыс-самцов. При умерщвлении животных руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ

СССР №755 от 12.08.1977 г.). Головной мозг фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде [2], который обеспечивает лучшее сохранение антигенов, в сравнении с другими методами фиксации. После фиксации и обезвоживания объекты просветляли и хранили в метилсалицилате [1]. Срезы толщиной 100–300 мкм изготавливали из материала, находившегося в метилсалицилате или этаноле при помощи одноразовых микротомных ножей с держателем (Feather, Япония). В дальнейшем срезы отмывали от метилсалицилата в 96° этаноле (2–12 ч), регидратировали и помещали в фосфатно-солевой буфер pH 7,4 (ФСБ), содержащий 1% детергента — Triton X-100 (Serva, Германия). Для выявления астроцитов применяли иммуноцитохимическую реакцию на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) [3]. При этом использовали различные варианты обработки препаратов с целью наилучшего выявления астроцитов, как в поверхностных, так и в глубоких слоях толстых срезов. После постановки иммуноцитохимической реакции часть срезов заключали без предварительного обезвоживания в водорастворимые заключающие среды [Fluorescence mounting medium (Dako, Дания), водные растворы сахарозы и фруктозы]. Другую часть срезов обезвоживали, просветляли в ксилоле и заключали в полистирол. Исследование полученных препаратов проводили при помощи конфокальных лазерных микроскопов LSM 510 Meta (Zeiss, Германия) и Leica MP TCS SP 5 (Leica, Германия; Coherent Inc, США).



Объемная реконструкция астроцитов головного мозга крысы.

а–в — иммуноцитохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок. а — визуализация с помощью флюоресцеин-изотиоцианата, ядра окрашены йодидом пропидия. Препарат заключен в сироп фруктозы. Величина Z-серии — 27 мкм, количество оптических срезов — 28. Объемная реконструкция в «прозрачном» режиме; б, в — визуализация с помощью тетраметилпродамин изотиоцианата. Препараты заключены в полистирол. б — величина Z-серии 55 мкм, количество оптических срезов — 34. Объемная реконструкция в «прозрачном» режиме; в — величина Z-серии — 40 мкм, количество оптических срезов — 58. Объемная реконструкция в «непрозрачном» режиме. Размеры изображений указаны в микрометрах (нанесены на оси x, y, z).

Обработку полученных изображений и трехмерную реконструкцию объектов проводили с применением компьютерных программ LSM 510, LSM Image Browser (Zeiss, Германия).

Установлено, что сканирование полученных препаратов в мультифотонном режиме с использованием инфракрасного лазера (780 нм), которое рекомендуют для визуализации структур в толстых срезах [8], не позволяет получить приемлемого для трехмерной реконструкции изображения из глубоких (25–100 мкм) слоев исследованных объектов в связи с недостаточным качеством и появлением неспецифического фона. Заключение же объектов в среды, не обеспечивающие их достаточного просветления, ведет к значительному рассеиванию лазерного луча и не позволяет получать изображений высокого качества уже на глубине 15–20 мкм. Частичного просветления срезов можно добиться, используя для заключения препаратов сиропа сахарозы и фруктозы [4]. Заключение в 60% раствор фруктозы (по Лилли [4] — показатель преломления $n=1,44$) препараты удастся исследовать на глубине до 45 мкм (рисунок, а). При этом оптические срезы глубоких слоев препарата содержат значительный уровень фона, связанного с рассеиванием луча аргонного лазера (488 нм), использовавшегося для возбуждения свечения FITC (флюоресцеин-изотиоцианат).

При обезвоживании и просветлении срезов в ксилоле было установлено, что эта обработка ведет к исчезновению флюоресценции FITC, но не оказывает существенного влияния на флюоресценцию TRITC (тетраметилродамин-изотиоцианат). Полученные при использовании TRITC препараты (см. рисунок б, в) можно просматривать на глубину до 130 мкм при незначительном ослаблении свечения объектов в глубоких слоях, которое можно откорректировать при съемке при помощи автоматического пошагового увеличения мощности лазера или степени усиления фотодетектора. При съемке на глубине до 40 мкм коррекция необязательна.

Проведение трехмерной реконструкции астроцитов по серии перекрывающихся и неперекрывающихся оптических срезов показало, что оптимальным для этих целей является использование объективов LD Plan-Neofluar 40x/NA0,6 (рабочее расстояние 2,9 мм), C-Apochromat 40x/NA1,2 (водная иммерсия, рабочее расстояние 0,28 мм) и Plan-Apochromat 63x/NA1,4 (масляная иммерсия, рабочее расстояние 0,19 мм) (Zeiss, Германия). Размеры серии срезов по оси Z должны составлять 30–50 мкм. При меньшей Z-серии значительная часть астроцитов визуализируется фрагмен-

тарно, тогда как при большом реконструируемом объеме препарата отдельные клетки заслоняют друг друга, что затрудняет анализ их взаиморасположения.

Рекомендуемый протокол обработки свободно-плавающих регидратированных срезов головного мозга крысы следующий:

1. Срезы из воды переносят в ФСБ, содержащий 1% Triton X-100, и оставляют на 40 мин при 40 °C.

2. Инкубация срезов в первичных антителах к GFAP (N1506, Dako) с ФСБ, содержащем 1% Triton X-100 (1:1), в течение 3–5 сут при 40 °C.

3. Промывка в ФСБ, содержащем 1% Triton X-100 — 2,5 ч при 40 °C.

4. Промывка в ФСБ без детергента — 1 ч при 40 °C.

5. Инкубация срезов со вторичными антителами, конъюгированными с TRITC (1:25, R0156, Dako) в течение ночи при 40 °C.

6. Промывка в ФСБ — 1,5 ч при 40 °C.

7. Промывка в дистиллированной воде 1 ч при 27 °C.

8. Обезвоживание и просветление препаратов:

- абсолютный этанол — 30 мин при комнатной температуре;
- 99% изопропиловый спирт — 1 ч при комнатной температуре;
- изопропиловый спирт — ксилол (1:1) — 30 мин при комнатной температуре;
- ксилол I (орто-ксилол) — 30 мин при комнатной температуре;
- ксилол II (орто-ксилол) — 30 мин при комнатной температуре.

9. Заключение срезов в полистирол (при этом могут быть использованы предметные стекла с лунками).

Окрашенные препараты следует хранить в темноте, чтобы избежать преждевременного ослабления флюоресценции.

Дальнейшая работа с препаратом состоит в съемке Z-серий (серий оптических срезов) из участков, намеченных для трехмерной реконструкции. Для возбуждения флюоресценции TRITC могут быть использованы лазеры с длиной волны 543 и 561 нм. Для отсечения автофлюоресценции желательно использовать эмиссионный светофильтр BP575-615. Для достижения высокого качества получаемого изображения и минимизации электронных помех, связанных с работой аппаратуры, следует проводить съемку изображений размером 1024×1024 пикселя с линейным усреднением. «Время пикселя» (параметр, характеризующий скорость сканирования) должно находиться в интервале 1,28–3,20 мкс. Проведение трехмерной

реконструкции (см. рисунок, в) производится в программе LSM 510 (той же программе, которая управляет и работой конфокального микроскопа).

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что предлагаемые методические подходы можно успешно применять при объемной реконструкции и определении пространственных взаимоотношений астроцитов в головном мозгу млекопитающих.

Авторы статьи приносят благодарность научному сотруднику Зоологического института РАН Анатолию Александровичу Петрову за помощь в работе с микроскопом Leica MP TCS SP5.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д.Э. и Гиляров А.В. Иммуноцитохимическое выявление тканевых антигенов после длительного хранения объектов в метилсалицилате. *Морфология*, 2008, т. 134, вып. 6, с. 76–78.
2. Коржевский Д.Э., Григорьев И.П. и Отеллин В.А. Применение обезживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях. *Морфология*, 2006, т. 129, вып. 1, с. 85–87.
3. Коржевский Д.Э. и Отеллин В.А. Иммуноцитохимическое выявление астроцитов в срезах головного мозга в сочетании с окраской по Нисслю. *Морфология*, 2004, т. 125, вып. 3, с. 100–102.
4. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М., Мир, 1969.
5. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М., Изд-во иностр. лит-ры, 1954.
6. Феофанов А. В. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях. *Успехи биол. химии*, 2007, т. 47, с. 371–410.
7. Lindig T.M., Kumar V., Kikinis R. et al. Spiny versus stubby: 3D reconstruction of human myenteric (type I) neurons. *Histochem. Cell Biol.*, 2009, v. 131, № 1, p. 1–12.
8. Periasamy A., Skoglun P., Noakes C. and Keller R. An evaluation of two-photon excitation versus confocal and digital deconvolution fluorescence microscopy imaging in *Xenopus* morphogenesis. *Microsc. Res. Tech.*, 1999, v. 47, p. 172–181.
9. Stachs O., Knappe S., Zhivov A. et al. 3D-konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie der kornealen epithelialen Nervenstruktur. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.*, 2006, Bd. 223, H. 7, S. 583–588.
10. Vuksic M., Del Turco D., Bas Orth C. et al. 3D-reconstruction and functional properties of GFP-positive and GFP-negative granule cells in the fascia dentata of the Thy1-GFP mouse. *Hippocampus*, 2008, v. 18, № 4, p. 364–375.

Поступила в редакцию 25.03.09

THE STUDY OF CEREBRAL ASTROCYTE SPATIAL ORGANIZATION USING CONFOCAL LASER MICROSCOPY

D.Ye. Korzhevskiy, O.V. Kirik, Ye.G. Sukhorukova, A.V. Giliarov, K.V. Solovyov and N.A. Grudinina

Three-dimensional reconstruction of cytoarchitectonic relations of the main components of the nervous tissue appears to be an important, yet an extremely laborious task of neuromorphology. The aims of the present study were: to develop the method permitting accurate visualization of astrocytes in rat brain slices thicker than 30 μm , to create an adequate algorithm for the study of the slides received using a confocal microscope and to perform the three-dimensional reconstructions of astrocytes from Z-series of confocal images. Different variants of slide preparation (various clearing reagents, fluorochromes, mounting media) were investigated, together with the operating modes of confocal microscope, methods of digital image processing etc. The methodical approaches are recommended that may be successfully applied for three-dimensional reconstruction and detection of spatial relations of astrocytes in mammalian brain.

Key words: *brain, astrocytes, confocal laser microscopy, three-dimensional reconstruction.*

Department of General and Special Morphology, and Department of Molecular Genetics, RAMS Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg.