

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»
(ИЦиГ СО РАН)

УТВЕРЖДАЮ

Зам. Директора по науке ИЦиГ СО РАН



д.б.н. В.А. Мордвинов

«06» июня 2018 г.

**Визуализация нейрональных процессов методами магнитно-резонансной
томографии глубокого разрешения с оптическим контролем
морфологических изменений структур мозга на флуоресцентном
микроскопе**

Научные сотрудники ЦГР

ИЦиГ СО РАН

А.В. Ромашенко, к.б.н.

Н.Б. Илларионова, к.б.н.

Новосибирск, 2018

Содержание

1	Общие положения	4
2	Общие требования к условиям, обеспечению и проведению испытаний	4
3	Нормативные ссылки	4
4	Требования к погрешности измерений	5
5	Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы	5
6	Метод измерений	6
7	Требования безопасности, охраны окружающей среды	8
8	Требования к квалификации операторов	8
9	Требования к условиям измерений	8
10	Подготовка к работе и выполнение измерений	8
11	Обработка результатов измерений	10
12	Контроль точности результатов измерений	12
13	Оформление результатов измерений	12
14	Литература	14

ПРЕДИСЛОВИЕ

1. РАЗРАБОТАНА Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Руководитель ИЦиГ СО РАН: Врио директора Лаврюшев Сергей Вячеславович

Адрес: 630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 10, тел. +7(383) 3331278

ИСПОЛНИТЕЛЬ: Центр генетических ресурсов лабораторных животных, сформированный на базе ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН

2. Введена впервые

3. СВЕДЕНИЯ ОБ АТТЕСТАЦИИ

В соответствии с п.2 статьи 5 Закона «Об обеспечении единства измерений» от 26.06.2008 № 102-ФЗ настоящая методика измерений не подлежит аттестации, поскольку основана на прямом измерении ядерного магнитного резонанса и оптического сигнала.

Настоящая методика не может быть полностью или частично воспроизведена, тиражирована и распространена без разрешения ИЦиГ СО РАН.

1 Общие положения

1.1 Настоящая методика описывает процесс исследования нейрональной активности в головном мозге мелких лабораторных животных за счет характеристики распределения марганца по структурам мозга методом марганец-усиленной магнито-контрастной томографии (МУ-МРТ) с использованием криогенной катушки и изучения после иммуногистохимического окрашивания антителами на специфичные антигены морфологического и нейрофизиологического состояния мозга с помощью флуоресцентной микроскопии (ФМ). Метод флуоресцентной микроскопии образцов тканей после иммуногистохимического окрашивания на специфичные антигены – это необходимый инструмент в биологии, позволяющий с помощью различных флуорохромов и антител идентифицировать морфологические структуры ткани, клетки и клеточные компоненты с высокой степенью специфичности.

1.2 Назначение и область применения метода – ФМ широко используется для выявления опухолей, и их нозологического варианта, позволяет диагностировать метастазы и первичные опухолевые очаги, обнаруживать злокачественную трансформацию клеток, делать прогноз относительно течения опухолевого заболевания и возможностей таргетной терапии, а также выявлять наличие резистентности клеток опухоли к лучевой терапии и химическим препаратам.

1.2 Данная методика включает перечень необходимых операций и служит общим руководством для визуализации нейрональных процессов методами магнито-резонансной томографии глубокого разрешения с оптическим контролем морфологических изменений структур мозга с использованием флуоресцентного микроскопа.

2 Общие требования к условиям, обеспечению и проведению испытаний

Исследования в соответствии с данной методикой требуют специальных помещений. Томографические работы проводятся в помещениях с разделением на отдельные зоны (участки): операторская; зону размещения томографического оборудования и криогенной катушки; участок для передержки лабораторных животных, включающий стеллажи с клетками и манипуляционную зону. Для ФМ требуется участок подготовки образцов тканей и темная комната для размещения микроскопического оборудования.

3 Нормативные ссылки

В настоящей методике использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений;

ГОСТ Р 51350-99 Безопасность электрических контрольно-измерительных приборов и лабораторного оборудования. Общие требования;

ГОСТ 12.1.005-88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны;

ГОСТ 12.1.045-84 Система стандартов безопасности труда. Электростатические поля.

4 Требования к погрешности измерений

Пределы допускаемой относительной погрешности (измерение концентрации марганца в нервной ткани с помощью МРТ) по данной методике составляют $\pm 5\%$.

Пределы погрешности измерений линейных размеров отделов мозга составляет ± 10 мкм в соответствии с наименьшим делением на слайде со шкалой для калибровки микроскопа.

Пределы разрешения флуоресцентной микроскопии – 200 нм, что обусловлено дифракционным пределом оптических микроскопов, который не позволяет получить пятно рассеяния меньше 200 нм из-за дифракции электромагнитных волн.

5 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы

При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства и материалы:

5.1 Сверхвысокопольный магнитно-резонансный томограф BioSpec 117/16 USR фирмы Bruker (Германия) с напряженностью магнитного поля 11,7 Тесла. Калибровка магнитно-резонансного томографа производится фирмой изготовителем (Bruker).

5.2 Криогенная радиочастотная катушка ^1H MRI CryoProbe™.

5.3 ПК – персональный компьютер.

5.4 Специализированная программа ParaVision 5.0.

5.5 Специализированная программа TopSpin.

5.6. Совместимая с МРТ система дозированной подачи запахов.

5.7 Аппарат для наркотизации животных.

5.8. Раствор хлорида марганца (10 мМ).

5.9. Флуоресцентный микроскоп Axio Imager M2 фирмы Zeiss

5.10. Криомикротом Microm HM 550 фирмы Thermo scientific

5.11. Антитела с флуоресцентной меткой

5.12. Раствор 4 % параформальдегида.

6 Метод измерений

Ионы Mn^{2+} являются агонистами потенциал-зависимых кальциевых каналов и через них способны проникать внутрь клетки. Поскольку марганец является парамагнетиком, с помощью МРТ возможно оценивать его накопление в исследуемой ткани. В первом приближении уровень активности клеток ткани в ответ на стимул будет прямо пропорционален уровню МРТ сигнала, который будет зависеть от уровня активности кальциевых каналов. Информацию о распределении марганца по структурам мозга животного получают путем использования результатов T1-взвешенных изображений с методами FLASH (Fast Low Angle SHot) с параметрами импульсной последовательности (TE = 2.5 мс, TR = 200 мс), параметрами изображения (размер 2.5×2.5 см; матрица 512×512 точек; толщина среза 0.5 мм; расстояние между срезами 0.5 мм; количество срезов 15; ориентация срезов – аксиальная), общее время сканирования 6 мин. Также для этих целей могут быть использованы следующие МРТ-методы: RARE (Rapid Acquisition with Refocused Echoes, (TE = 3,7 мс, TR = 800 мс), параметры изображения (размер 2.0×2.0 см; матрица 512×512 точек; толщина среза 0.5 мм; расстояние между срезами 0.5 мм; количество срезов 15; ориентация срезов – аксиальная); MSME (Multi Slice Multi Echo, (TE = 3,7 мс, TR = 800 мс), параметры изображения (размер 2.0×2.0 см; матрица 512×512 точек; толщина среза 0.5 мм; расстояние между срезами 0.5 мм; количество срезов 15; ориентация срезов – аксиальная) (Chow et al., 1999; Stockhorsta et al., 2004). Параметры TR подбирались исходя из двух противоположных установок – сократить время съемки и максимизировать качество получаемых сканов (Dhuria et al., 2010; Mistry et al., 2009). Поскольку данная методика предполагает измерение локальной концентрации ионов марганца в ткани в ответ на стимул, то чем выше разрешение, с которым мы производим сканирование, тем точнее мы можем описать паттерны накопления. Разрешающая способность МРТ сканеров ограничивается не только напряженностью магнитного поля, в которое помещен образец, но и тепловыми колебаниями в приемной катушке, определяющими соотношение сигнал/шум (signal-to-noise ratio, SNR). Даже увеличение количества накоплений не позволяет значительно повысить качество изображения. При использовании катушки 1H MRI CryoProbeTM SNR увеличивается в три раза, что позволяет кардинально увеличить разрешение получаемых МРТ сканов.

Для визуализации структур мозга на срезах специфично окрашенной ткани используется флуоресцентная микроскопия на приборе Axio Imager M2. Иммуногистохимия – это метод локализации специфических антигенов в тканях, основанный на распознавании антигена соответствующим антителом и выявления результатов этого связывания на светооптическом уровне. С помощью методов иммуногистохимии проводится окрашивание на клеточные маркёры с последующей визуализацией различных отделов мозга на клеточном и

субклеточном уровне с помощью флуоресцентной микроскопии (рисунок 1) (Lichtman J.W. & Conchello J.A., 2005).



Рисунок 1. Схематическое изображение этапов методики визуализации морфологии мозга с помощью методов иммуногистохимии и флуоресцентной микроскопии.

7 Требования безопасности, охраны окружающей среды

7.1 При выполнении измерений необходимо соблюдать правила электробезопасности в соответствии с ГОСТ Р 51350.

7.2 Необходимо соблюдать стандарты безопасности труда в соответствии с ГОСТ 12.1.005-8 и ГОСТ 12.1.045-84.

7.3 При выполнении измерений соблюдают требования безопасности в соответствии с документами производителей оборудования.

8 Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются лица:

- не моложе 18 лет;
- не имеющие медицинских противопоказаний;
- имеющие высшее образование;
- изучившие устройство и принцип работы магнитно-резонансной томографии;
- изучившие устройство и принцип работы флуоресцентной микроскопии;
- прошедшие и усвоившие соответствующий курс обучения работе в области магнитно-резонансной томографии;
- прошедшие инструктаж по охране труда на рабочем месте;
- изучившие настоящую методику измерений и эксплуатационную документацию на применяемое оборудование.

9 Требования к условиям измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- температура воздуха в рабочих помещениях от +18 до +22°C;
- относительная влажность воздуха, % не более 60 при температуре 22-24 °C;
- атмосферное давление, кПа – от 84 до 106,7;
- напряжение питания в сети, В – 220;
- частота электрической сети, Гц – 50 ± 5 .

10 Подготовка к работе и выполнение измерений

Методика усиленной марганцем магнитно-резонансной томографии (MEMRI) высокого разрешения с использованием криогенной катушки выполняется на горизонтальном томографе с напряженностью магнитного поля 11,7 Тесла (Bruker, BioSpec 117/16 USR, Германия) с использованием криогенной катушки ¹H MRI CryoProbeTM. Данная методика

была отработана на примере исследования активации нейронов ольфакторного эпителия мыши в ответ на запаховый стимул. При проведении исследования животным интраназально вводили 10 мкл 10 мМ раствора хлорида марганца. После чего животное помещали обратно в клетку и давали запаховый стимул сериями по 4 мин (1 мин стимул ON + 3 мин стимул OFF). Каждый запах экспонировался 4 раза (итоговое время: 16 мин), между предоставлениями клетка, в которой животное содержалось не менее суток до начала эксперимента, продувалась чистым воздухом, чтобы предотвратить сенситизацию нейронов основной обонятельной луковицы (ООЛ). Для подачи стимула использовали ольфактометр следующей конструкции: воздушный насос (Barbus SB-348A) с помощью силиконового шланга и пластикового носика на 1 мл соединялся с закрытой клеткой, в которой находилась тестируемая особь. В пластиковый носик, вставленный в отверстие для поилки в крышке клетки, помещали кусок фильтровальной бумаги (0.5 см × 2 см), на которую наносили 20 мкл мочи/раствора запахового стимула. Во время предъявления запахового стимула носик от автопипетки продували с помощью воздушного насоса со скоростью 200 мл/мин. Для тестирования каждой мыши использовали новый носик и новый кусок фильтровальной бумаги. Для каждого запахового стимула использовали новый силиконовый шланг. МУ-MPT проводили через 2 часа после ольфакторной стимуляции.

До начала тестирования мышей содержали по одному в стандартных клетках (35 × 25 × 12 см) при температуре 22-24 °С и искусственном световом режиме 14С:10Т. Брикетированный корм для лабораторных грызунов (SSNIFF-SPEZIALDIATEN-GMBH, Германия) и воду мыши получали *ad libitum*. В качестве подстилочного материала применяли обеспыленные древесные опилки. Накопление ионов марганца в структурах мозга мыши исследовали на горизонтальном томографе с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, BioSpec 117/16 USR, Германия) с использованием криогенной катушки ¹H MRI CryoProbeTM.

За 3 минуты до исследования мышей обездвиживали газовой смесью (4 %) изофлюрана (Isofluran, Baxter Healthcare Corp., USA) и воздуха при помощи наркозного аппарата (The Univentor 400 Anaesthesia Unit, Univentor, Malta). Температуру животных поддерживали с помощью водного контура в томографическом столике-кроватьке, имевшем температуру поверхности 30 °С. Под нижнюю часть туловища помещали пневматический датчик дыхания (SA Instruments, Stony Brook, N.Y., USA), что позволяло контролировать глубину наркоза.

При подготовке к визуализации структуры обонятельной луковицы методами ФМ мозг мышей был пермеабелизован параформальдегидом 4 % в течение суток при 4°С. Для приготовления срезов обонятельных луковиц мозг помещали в 30 % раствор сахарозы на 24 часа, после чего фиксировали в криогеле Neg 50™ для замораживания срезов и нарезке на

криотоме (Microm HM 550). Внутри криотома температура поддерживается на уровне -20°C для приготовления замороженных срезов. Срезы толщиной 20 мкм снимались на холодное предметное стекло, покрытое полиорнитинном, и фиксировались в момент таяния. После высушивания на стекле в течение 30 минут для лучшей фиксации срезы промывались раствором PBS (7.7 mM Na_2HPO_4 , 2.3 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl) с последующей пермеабиллизацией клеточных мембран 0.3 % раствором Triton X-100 в течение получаса. Далее образцы инкубировали 24 часа с 5 % BSA в PBS с первичными антителами к белкам-маркерам. Срезы промывали 3 раза по 5 минут раствором PBS. Затем добавляли вторичные антитела, меченные флуорохромом, и промывали срезы 3 раза по 5 минут раствором PBS. Срезы фиксировались раствором Immu-Mount (Thermo Scientific Shandon™) под покровным стеклом.

Далее визуализация морфологии мозга на клеточном уровне проводится с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager M2. Люминесцентный светодиодный источник возбуждения был выбирается в соответствии с длиной волны возбуждения флуорохрома. После установки препарата срезов мозга мыши на столик микроскопа проводятся необходимые корректировки для настройки фокуса, выбора световых фильтров и требуемого увеличительного объектива. Съемка микрофотографий образца производится с помощью монохромной цифровой камеры для микроскопа AxioCam 506.

11 Обработка результатов измерений

Предварительную обработку МРТ сканов проводили в программе ImageJ, которая состояла из нескольких этапов: выравнивание изображений по горизонтали, выделение границ мозга мыши, изменение размеров изображения. Выравнивание геометрии и размеров мозга позволило проводить автоматическое сравнение уровня МРТ сигнала в отдельных областях основной ольфакторной луковицы (ОЛ) у разных особей. Для проведения анализа полученных результатов глобулярный слой обонятельных луковиц на каждом срезе был условно разделен на 12 областей. Всего на ОЛ приходилось 5 срезов (рисунок 2). Таким образом, исходное разрешение МРТ скана было уменьшено до $250\ \mu\text{m} \times 250\ \mu\text{m} \times 0.5\ \text{mm}$. В пределах этих 12 областей уровень МРТ сигнала усреднялся, после чего проводили различные межгрупповые сравнения и, таким образом, оценивали изменения нейрональной активности в ответ на запаховый стимул. Далее для визуализации полученных результатов использовали двухмерную «карту» ольфакторной луковицы, где по оси абсцисс располагали номер области (1-12), а по оси ординат – номер среза (1-5); с помощью псевдоокрашивания кодировали значение *t*-критерия Стьюдента, характеризующего достоверность отличий двух групп

(рисунок 2). Для характеристики паттернов активации ООЛ использовали следующие параметры: суммарное количество областей, в которых накопление марганца достоверно отличается между двумя группами; среднее значение *t*-критерия и его дисперсию.

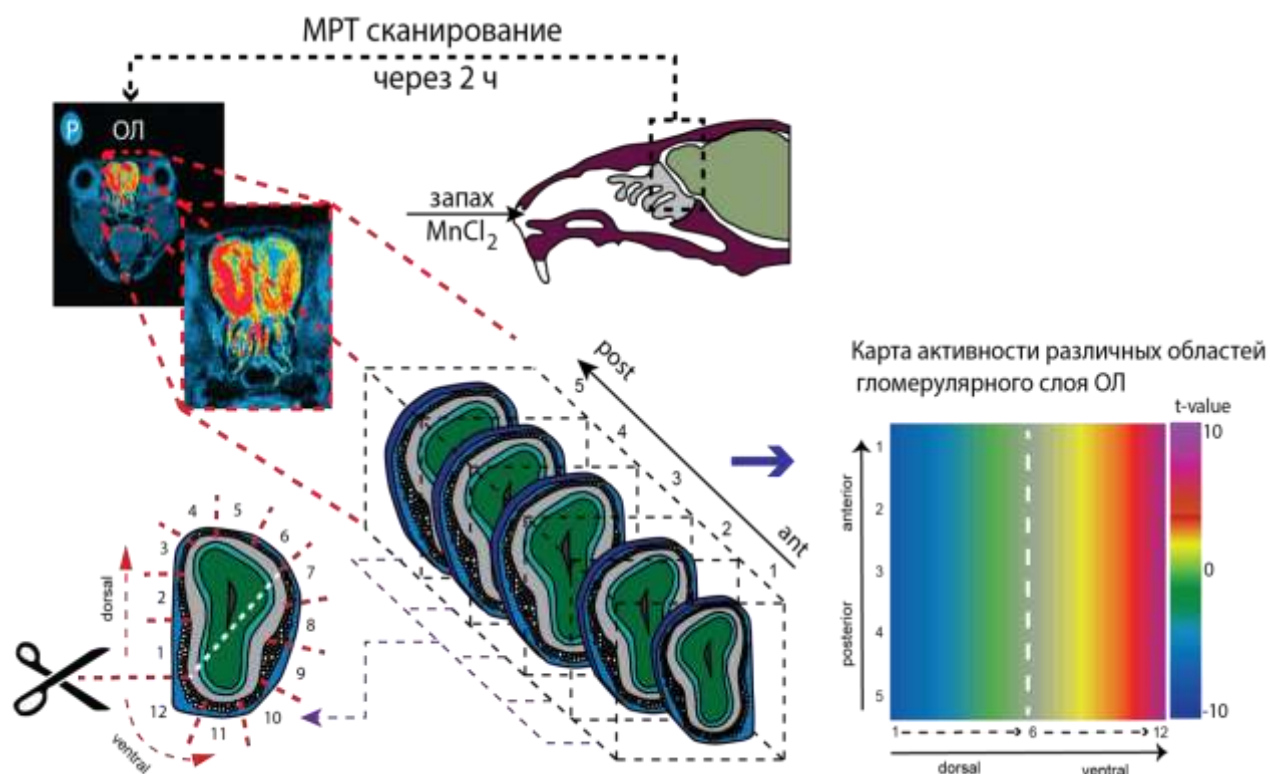


Рисунок 2. Схематичное изображение процедуры обработки МРТ сканов, полученных с помощью МУ МРТ, и генерирования карты активности основной обонятельной луковицы мыши в ответ на запаховый стимул.

Обработка флуоресцентных микрофотографий обонятельных лукович проводится в доступной для использования в сети Интернет программе ImageJ. Интенсивность сигнала окрашивания соответствовала относительному уровню экспрессии выбранного маркера – фактора инициации трансляции eIF3 η (рисунок 3). Измерения размеров морфологических структур и отдельных клеток и их элементов возможен при использовании слайда со шкалой для калибровки микроскопа.

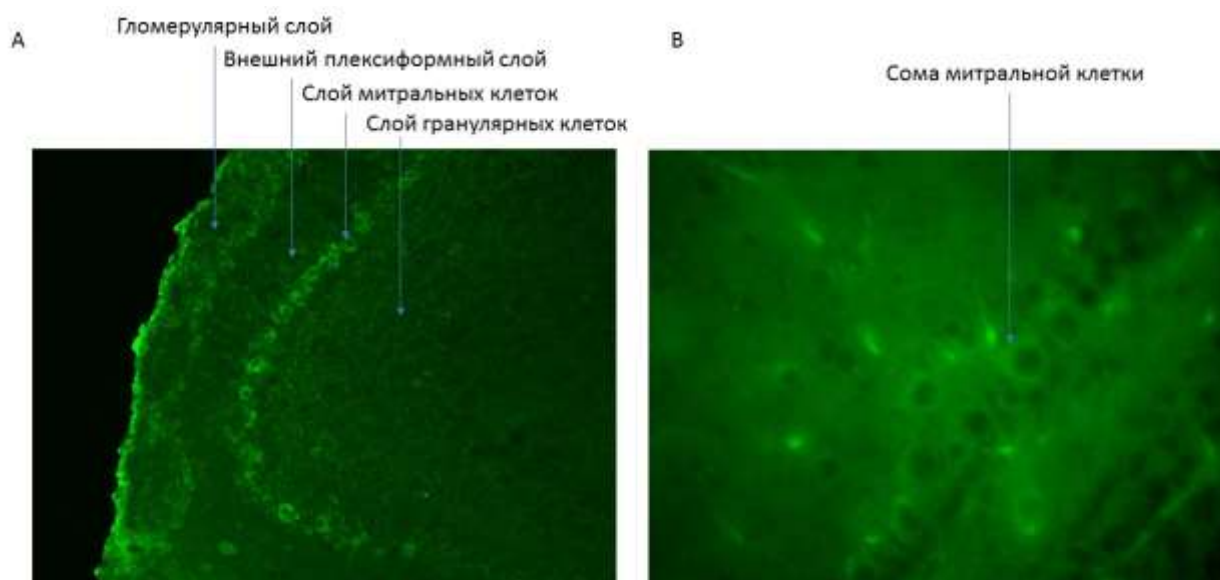


Рисунок 3. Микрофотографии срезов обонятельной луковицы мыши флуоресцентно окрашенных специфичными антителами на фактор инициации трансляции eIF3η.

А. Аксиальный срез обонятельной луковицы мозга мыши с 10-кратным объективом.

В. Клеточные структуры обонятельной луковицы с использованием объектива с 40-кратным увеличением.

12 Контроль точности результатов измерений

В магниторезонансной томографии и флуоресцентной микроскопии основным показателем является качество получаемого изображения, зависящее от разрешающей способности и контрастности получаемого изображения. Отношение контраст/шум – отношение разности интенсивностей сигналов двух областей к уровню шума. Необходимо, чтобы модуль разности этих сигналов был больше среднеквадратической амплитуды шума. Повышение отношения контраст/шум улучшает восприятие различий между двумя исследуемыми клиническими областями.

$$|S_1 - S_2| \geq n.$$

13 Оформление результатов измерений

Для оценки реакции клеток обонятельного эпителия (ОЭ) мы использовали метод марганец-усиленной МРТ с использованием криокатушки, основанный на магнито-контрастных свойствах ионов марганца и их способности накапливаться во внутриклеточном пространстве нейрона при деполяризации мембраны. ОЭ и ООЛ являются анатомически

связанными областями, на основании этого возможно охарактеризовать паттерны реакции клеток ОЭ, исходя из сравнения паттернов накопления марганца в различных областях ООЛ при предъявлении запахового стимула и без него. Поскольку при предварительной обработке МРТ сканов мы проводили аппроксимацию размеров структур мозга мыши, возможно проводить попиксельные межгрупповые сравнения уровня МРТ сигнала и рассчитывать значение t -критерия, которое будет > 0 , если концентрация марганца в данной конкретной области ООЛ выше при предоставлении запахового стимула по сравнению с контролем, и будет < 0 , если наоборот. Визуализация распределения полученных значений t -критерия по поверхности ООЛ представлена в виде «тепловых» карт (рисунок 4). Для численных оценок реакции мышей на запаховый стимул использовали общее число областей ОЛ, статистически достоверно отличавшихся по уровню МРТ сигнала, и, соответственно, по концентрации марганца, по сравнению с контролем.

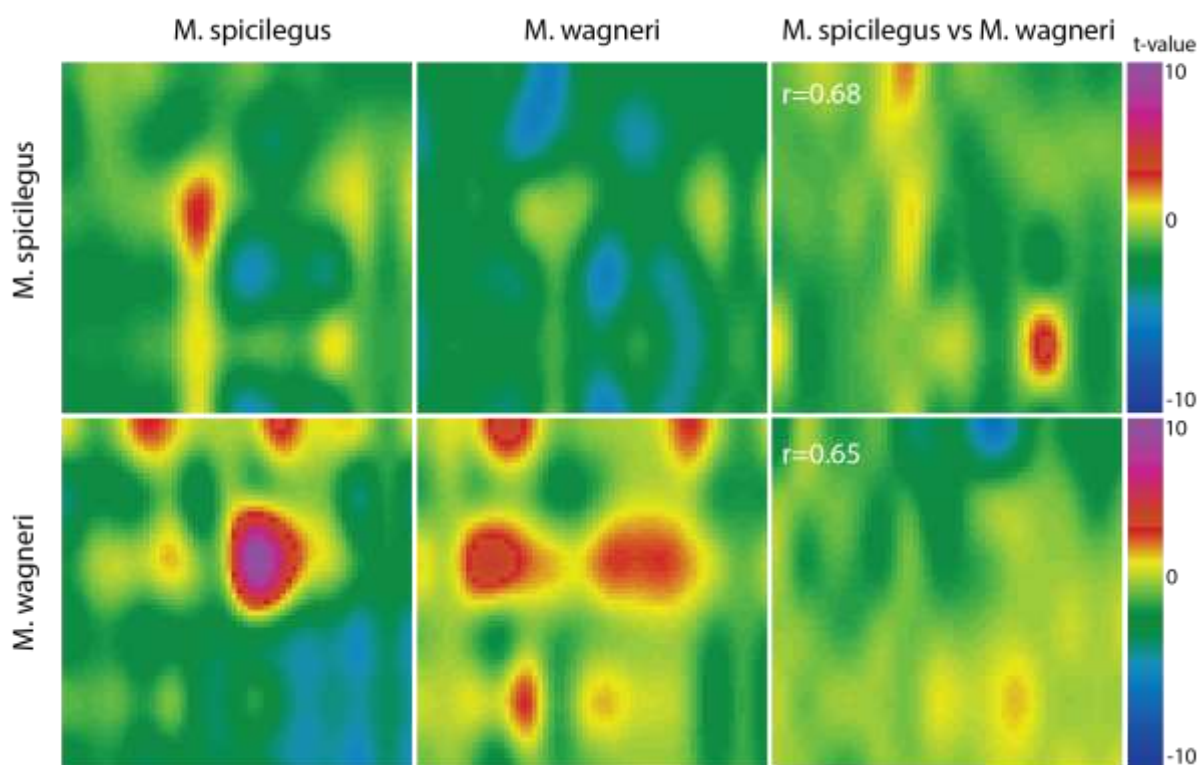


Рисунок 4. Паттерны накопления ионов марганца в различных отделах основной обонятельной луковицы (ООЛ) самцов разных видов мышей – *M.m. spicilegus* и *M.m. wagneri* в ответ на предъявление запаха мочи кон- и гетероспецифичных самок. Псевдоокрашивание отражает достоверность увеличения ($t > 0$) или уменьшения ($t < 0$) интенсивности накопления контраста в различных отделах ООЛ в ответ на ольфакторный стимул по сравнению контрольной группой без запаха. Для каждого вида на рисунке приведены значения коэффициента корреляции паттернов реакции на запах *M.m. spicilegus* и *M.m. wagneri*.

Основным результатом визуализации с помощью флуоресцентной микроскопии является микрофотография. При выборе различного увеличительного объектива можно получить микрофотографию, описывающую основную морфологию ткани, и при более высоком увеличении на клеточном уровне посмотреть распределение в клетке маркера. Результаты измерений морфологических структур предоставляются в виде микрофотографий со шкалой измерений, при необходимости есть возможность оценить размер видимых структур (рисунок 5).

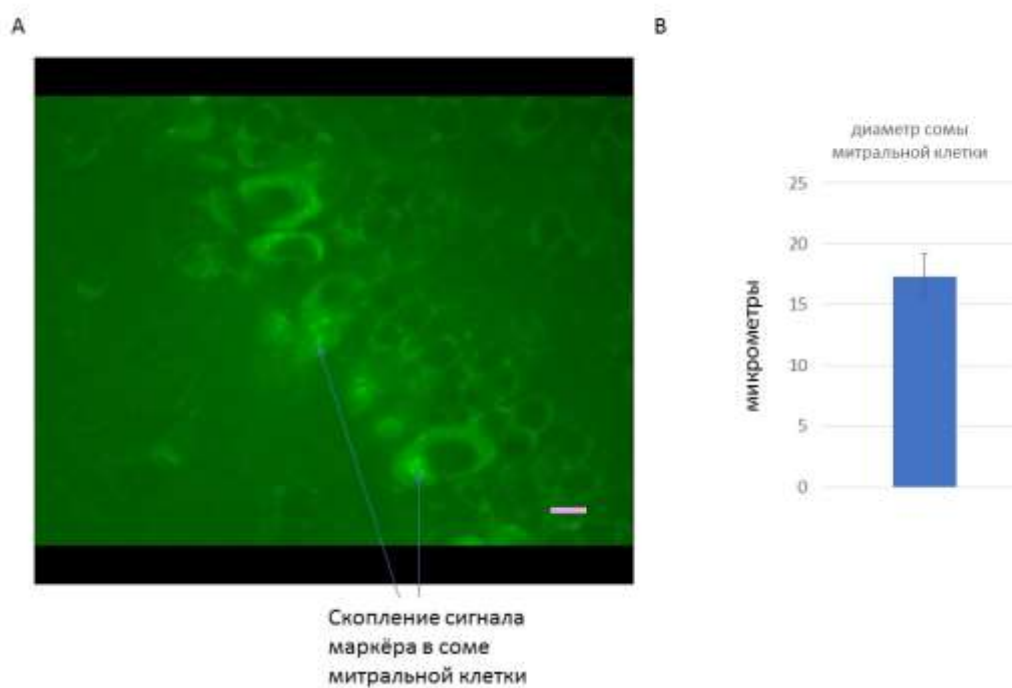


Рисунок 5. Представление и обработка результатов флуоресцентной микроскопии.

- А. Микрофотография митрального слоя клеток обонятельной луковицы мозга мыши. Шкала 10 мкм. Окрашивание антителами на маркер фактора инициации трансляции eIF3η. Наблюдается скопление сигнала в соме митральной клетки, что свидетельствует о формировании стресс гранул. В. Гистограмма измерения размера сомы митральных клеток.

14 Литература

1. Chow H.-H.S., Chen Z., Matsuura G.T. Direct transport of cocaine from the nasal cavity to the brain following intranasal cocaine administration in rats // J. Pharm. Sci. 1999, 88 (8): 754-758.
2. Dhuria S.V., Hanson L.R., Frey W.H. Intranasal Delivery to the Central Nervous System: Mechanisms and Experimental Considerations // J. Pharm. Sci. 2010, 99 (4): 1654-1672.
3. Mistry A., Glud S.Z., Kjems J., Randel J., Howard K.A., Stolnik S., Illum L. Effect of physicochemical properties on intranasal nanoparticle transit into murine olfactory epithelium // J. Drug Target. 2009, 17 (7): 543-552.

4. Stockhorsta U., Friesa de D., Steingruebera H.-J., Scherbaumb W.A. Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans // *Physiol. Behav.* 2004, 83 (1): 47-54.
5. Lichtman J.W., Conchello J.A. Fluorescence microscopy // *Nature Methods.* 2005, 2: 910–919.