УДК 611.818:611.8-018:004.38

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА КОМПЬЮТЕРНОГО СОВМЕЩЕНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЙ ДЛЯ ТОПОХИМИЧЕСКОГО КАРТИРОВАНИЯ НЕЙРОНОВ МОЗГА

В.М. Черток, А.Е. Коцюба, М.С. Старцева

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: *ретикулярное латеральное ядро, норадреналинергические и нитроксидергические нейроны.*

USE OF THE METHOD OF COMPUTER IMAGES COMBINING FOR TOPOCHEMICAL CARTING OF THE BRAIN NEURONS

V.M. Chertok, A.E. Kotsyuba, M.S. Startseva

Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation)

Background. Absence of accessible and objective methods for studying of the dimensional neuron organization of various mediator usage leads to inconsistent estimations of the type of the relations between these cells in unique or multiple nucleus in any brain formation.

Methods. On consecutive cuts of the longitudinal brain the neural structure of reticular lateral nucleus is studied by methilene blue coloring and also by the methods for revealing of norepinephrinergic and nitroxodergic neurons. The received nucleus images displayed on the monitor screen then were combined and on the basis of the received data the topochemical neuron carting was done.

Results. At combination of the nucleus images received on the consecutive cuts after their coloring by the proper methods not only the features of the dimensional neuronal organization were revealed but also rather distinctively the differences of the form, the sizes and numbers of each cell population.

Conclusions. The suggested method is accessible and simple in use, allows obtaining quickly the objective data for exact and detailed topochemical carting of the various mediator systems in one or several structural brain formations.

Keywords: *reticular lateral nucleus, norepinephrinergic and nitroxodergic neurons.*

Pacific Medical Journal, 2014, No. 3, p. 77–79.

Бурное развитие морфологических методов идентификации медиаторной принадлежности клеток, наблюдающееся в последние годы, привело к появлению важной методической проблемы: каким образом изучать пространственные отношения нескольких популяций клеток в структурном образовании, например, нейронов в ядрах головного или спинного мозга?

Представлено большое количество доказательств наличия локальных особенностей в распределении нейронов, участвующих в обмене различных медиаторов, пептидов и других биологически активных веществ в одноименных ядрах [2–4, 10]. Однако отсутствие доступных и точных методов для изучения пространственной организации разнообразной популяции нейронов приводит к противоречивым оценкам взаимоотношений различного типа клеток между собой в отдельно взятом ядре или их совокупности в каком-то образовании мозга [5, 6, 7].

Черток Виктор Михайлович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой анатомии человека ТГМУ; e-mail: chertokv@mail.ru

Целью настоящего исследования явились разработка и использование метода компьютерного совмещения изображения для топохимического картирования нескольких типов нейронов в ядре головного мозга.

Материал и методы. Работа выполнена на 6 крысах линии Вистар массой 200–250 г, содержавшихся в условиях лабораторного вивария на стандартном рационе. Внутривенным введением раствора нембутала (5 мг на 100 г массы) животных забивали, из полости черепа извлекали головной мозг, отделяли от него продолговатый мозг, который фиксировали при 4°С в течение 4 часов в 4 % растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1М натрий фосфатном буфере (pH 7,4), в течение 24 часов промывали в 0,1М фосфатно-солевом буфере (pH 7,4). Из фиксированного материала на криостате изготавливали серию последовательных срезов толщиной 30–40 мкм, один из которых окрашивали 0,5 % раствором метиленового синего по Нисслю, два других – для иммуноцитохимического выявления нейронов, содержащих тирозингидролазу (норадреналинергические нейроны), – фермента, участвующего в синтезе катехоламинов, и нейрональную нитроксидсинтазу (нитроксидергические нейроны), которая в физиологических условиях является морфологическим маркером оксида азота [8].

На последовательных срезах продолговатого мозга, изучали нейронный состав ретикулярного латерального ядра. Для более точного определения пространственной организации медиторноспецифических нейронов в этом ядре срезы исследовали раздельно в двух микроскопах, в окуляры которых помещали одинаковые координатные сетки: на предметный столик одного из них всегда помещали срез, окрашенный метиленовым синим, другого – срез, обработанный для визуализации норадреналинергических или нитроксидергических нейронов. Препараты просматривали под световым микроскопом Carl Zeiss Jena (Германия) со встроенным осветителем, соединенным с фотокамерой Sony Cyber-shot DSC-HX5V (с разрешением матрицы 10 мегапикселей) в положении трансфокатора – 3×.

Полученные изображения совмещали в программе Adobe Photoshop путем точного наложения друг на друга в соответствии с положением относительно координат сетки, используя в качестве ориентиров характерные признаки структурной организации ядра. Первый слой в совмещенном изображении занимал снимок препарата, полученный, в данном случае, при

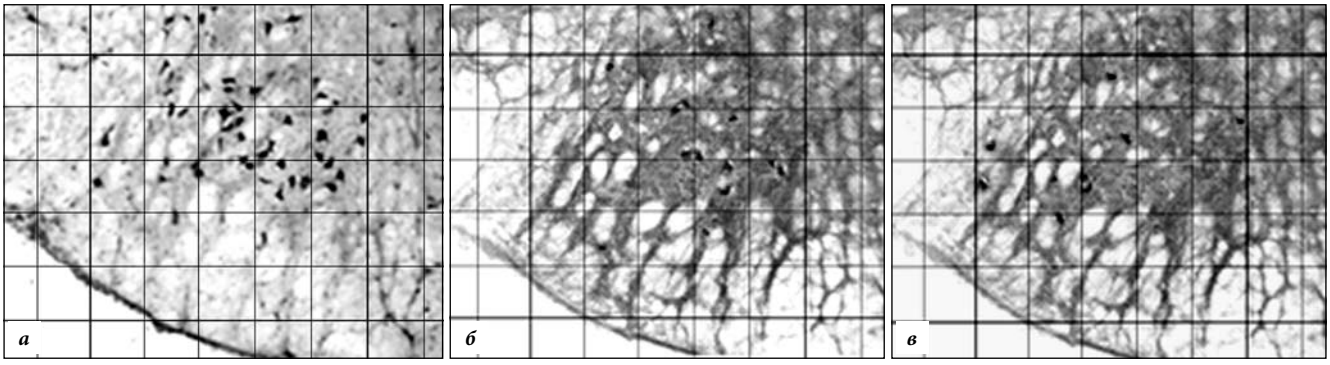

Рис. 1. Последовательные срезы, сделанные из центральной части ретикулярного латерального ядра:
а – окраска метиленовым синим, б – окраска на нитроксидергические нейроны, в – окраска на норадреналинергические нейроны. ×70.

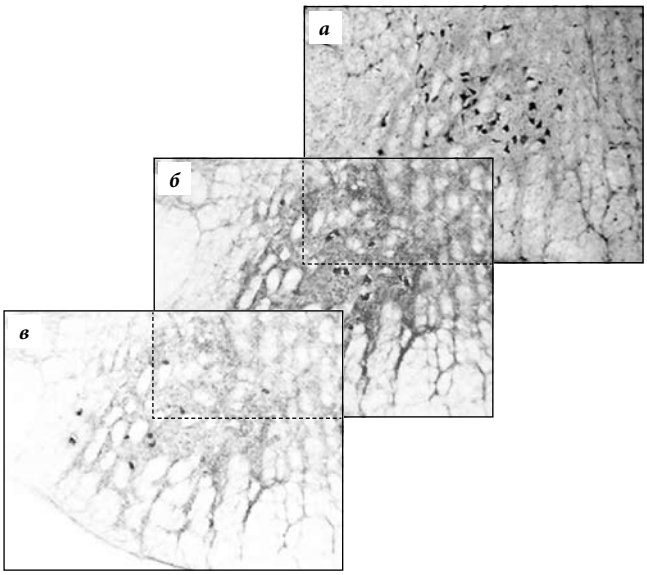

Рис. 2. Совмещение изображений ядра на снимках последовательных срезов:
а – окраска метиленовым синим, б – окраска на нитроксидергические нейроны, в – окраска на норадреналинергические нейроны.

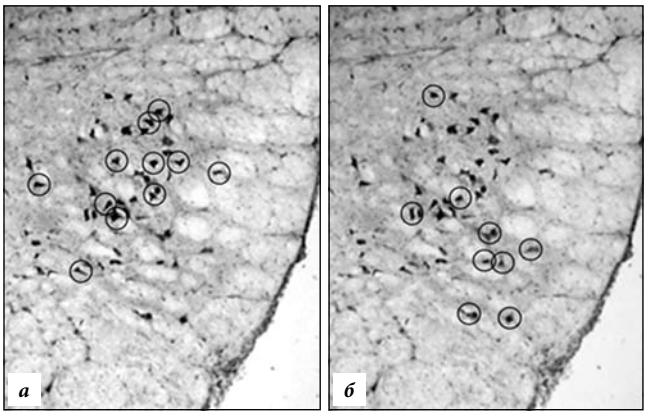

Рис. 3. Особенности локализации нитроксидергических (а) и норадреналинергических нейронов (б) в ретикулярном латеральном ядре среди клеток, маркированных метиленовым синим:
кружками отмечены иммунопозитивные нейроны. Метод компьютерного совмещения изображений.

окраске метиленовым синим, второй слой – снимок, окрашенный для визуализации норадреналинергических нейронов, третий слой – снимок с выявленными нитроксидергическими нейронами. В ядре определяли точное местоположение каждой популяции клеток, их общее число при выявлении метиленовым синим, а также долю, приходящуюся отдельно на каждый вид нейронов. Топохимическое картирование осуществляли в точном соответствии с полученными данными.

Количественную обработку материала проводили с использованием компьютерной программы АСАИ Allegro-MC [1] при обработке не менее 12 срезов образцов каждого животного.

Результаты исследования. При окраске препаратов различными методами цитоархитектоническая картина соответствующих участков ретикулярного латерального ядра в значительной степени отличалась. Отличия касались размеров, формы и численности каждой популяции нейронов (рис. 1, а–в).

При совмещении изображений, полученных на смежных срезах после их окраски соответствующими методами (рис. 2), можно отметить не только особенности пространственной организации каждой популяции нейронов, но и ряд других отличий (рис. 3). Отчетливо видно, что окраской метиленовым синим в проекции ядра выявлялись многочисленные, различные по форме и размерам нервные клетки (рис. 1, а). Большая часть медиаторноспецифических нейронов имела треугольную или полигональную форму. При этом среди нитроксидергических нейронов встречались крупные редко расположенные клетки, которые были сосредоточены преимущественно в центральной части ядра (рис. 1, б; 3, а). Норадреналинергические нейроны концентрировались в основном в его вентромедиальной части, где наряду с крупными часто выявлялись клетки небольшого размера (рис. 1, в; 3, б). Количество медиаторноспецифических нейронов в ретикулярном латеральном ядре не было связано с численностью клеток, маркированных метиленовым синим. На долю нитроксидергических нейронов приходится 17,9 %, на долю норадреналинергических – 10,7 % от общего числа клеток, выявленных метиленовым синим.

Располагая качественными и количественными характеристиками клеточного состава ядра, полученными методом совмещения изображений на комплектах

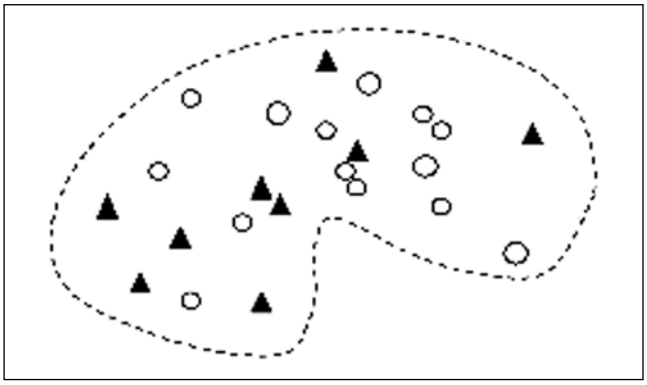

Рис. 4. Схема, основанная на результатах топохимического картирования нейронов в ретикулярном латеральном ядре:
○ – *нитроксидергические нейроны,* ▲ – *норадреналинергические нейроны (размеры символов характеризуют величину клеточных скоплений). Метод компьютерного совмещения изображений.*

серийных срезов, сделанных на разных уровнях сечения ядра у нескольких животных, легко построить обобщенную схему топохимического картирования нейронов разной медиаторной принадлежности (рис. 4).

Обсуждение полученных данных. Приведенные выше данные показывают, что в функциональные связи в ретикулярном латеральном ядре, как и в других ядрах мозга, вовлечены нейроны различной медиаторной принадлежности [3–5, 7]. Они отличаются между собой не только формой, размерами или количеством, т.е. параметрами, которые обычно используют морфологи при проведении сравнительных исследований этих структур, но и локализацией в различных участках ядра. Именно вопросы пространственной организации нейронов различного типа, ответы на которые являются основой для понимания характера взаимоотношений между нейротрансмиттерными системами, долгое время оставались нерешенными. По заключению специалистов, единого представления о механизмах интеграции различных нейромедиаторных систем в головном мозге в настоящее время не может быть сформировано, в том числе потому, что отсутствует простой, доступный, но объективный метод изучения пространственных отношений между нейронами в структурах мозга [2, 4, 9, 10]. Методы двойного маркирования, которые обычно применяются для этих целей, имеют ряд существенных ограничений, главным из которых, помимо редкой капризности и трудоемкости, является невозможность создания цельной картины организации пространственных отношений даже для двух медиаторных систем. Поэтому границы их применения ограничиваются, как правило, демонстрацией солокализации двух медиаторов в каком-либо одном нейроне [5–7].

Предлагаемый нами метод позволяет достаточно быстро провести элементарные процедуры, обязательные для точного и детального топохимического картирования необходимого количества медиаторных систем в одном или нескольких структурных образованиях мозга, даже теми работниками, которые не имеют глубоких познаний в компьютерной технике.

References:

1. Afanasiev A.A., Kotsyuba A.E., Chertok V.M. The system for automated image analysis of micro and macrostructures Allegro-MC // Pacific Medical Journal. 2002. No. 4. P. 65–68.
2. Kotsyuba A.E., Chertok V.M. The spatial organization of serotonergic neurons and nitrergic in some bulbar nuclei parts in a cardiovascular center of a human// Pacific Medical Journal. 2010. No. 4. P. 43–46.
3. Chertok V.M., Kotsyuba A.E., Kotsyuba E.P. Serotonin and nitroxidergic neurons of the medulla oblongata in rats // Morphology. 2011. Vol. 139, No. 1. P. 32–37.
4. Chertok V.M., Kotsyuba A.E. Structural organization of a bulbar part of a cardiovascular center. Vladivostok: Medicine FE, 2013. P. 164.
5. Benarroch E.E., I.L., P.A. Localization and possible interactions of catecholamine-and NADPH-diaphorase neurons in human medullary autonomic regions // Brain Res. 1995. Vol. 684, No. 2. P. 215–220.
6. Dun N.J., Dun S.L., Förstermann U. Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat pontine medullary neurons // Neuroscience. 1994. Vol. 59, No. 2. P. 429–245.
7. Ma S-X., Fang Q., Morgan B. [et al.]. Cardiovascular regulation and expressions of NO synthase – tyrosine hydroxylase in nucleus tractus solitaries of ovine fetus // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2003. Vol. 284, No. 4. P. 1057–1063.
8. Milner T.A., Joh T.H., Pickel V.M. Tyrosine hydroxylase in the rat parabrachial region: ultrastructural localization and extrinsic sources of immunoreactivity // Neuroscience. 1986. Vol. 6, No. 9. P. 2585–2603.
9. West M.J. New stereological methods for counting neurons // Neurobiol. Aging. 1993. Vol. 14. P. 287–293.
10. Yun K.Ch., Jinji Z., Gyu-seong C. [et al.] Correlative changes of endothelial nitric oxide synthase and choline acetyltransferse in the hippocampus after exercise // The Korean J. Anat. 2008. Vol. 41, No. 3. P. 185–192.

Поступила в редакцию 20.12.2013.

Применение метода компьютерного совмещения изображений для топохимического картирования нейронов мозга

В.М. Черток, А.Е. Коцюба, М.С. Старцева

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Резюме. На последовательных срезах продолговатого мозга изучали нейронный состав ретикулярного латерального ядра ствола мозга при окраске препаратов метиленовым синим, а также методами для выявления норадреналинергических и нитроксидергических нейронов. Полученные изображения ядер отображали на экране монитора, затем совмещали, используя в качестве ориентиров положение структур ядра относительно координатной сетки. На основании полученных данных проводили топохимическое картирование нейронов. При совмещении изображений ядра, полученных на смежных срезах после их окраски соответствующими методами, выявлены не только особенности пространственной организации, но и весьма отчетливо – отличия формы, размеров и численности каждой популяции нейронов. Предложенный метод позволяет быстро собрать объективные данные, необходимые для детального топохимического картирования различных медиаторных систем в одном или нескольких структурных образованиях мозга.

Ключевые слова: *ретикулярное латеральное ядро, норадреналинергические и нитроксидергические нейроны.*