

МЕТОД ЗАТОЧКИ ПИРАМИДКИ С ПОМОЩЬЮ СТЕКЛЯННЫХ НОЖЕЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БОЛЬШИХ СЕРИЙ УЛЬТРАТОНКИХ СРЕЗОВ

© *В. В. Рогачевский*

*Институт биофизики клетки РАН, Пущино;
электронный адрес: vadim_rogachevsky@synapsis.ru*

Анализ ультраструктуры ткани с использованием 3D-реконструкции на основе серийных ультратонких срезов является одним из наиболее адекватных методов в исследованиях пространственной организации биообъектов. Подготовка образца для 3D-реконструкции включает в себя две технически наиболее сложные процедуры: получение стабильной ленточки серийных срезов и монтирование этой ленточки на пленку-подложку. Для монтирования серии срезов предложены и хорошо себя зарекомендовали специальные подходы и технические приспособления. Получению большой и стабильной серии срезов уделено не меньше внимания, но в основном оно касается выбора эпоксидных заливочных сред. Критическим же условием получения ровной и стабильной ленточки срезов является строгая параллельность верхней и нижней граней пирамидки, падающей на режущую кромку ножа. Соблюдение этого условия позволяет заточка пирамидки с помощью сухого алмазного ножа для криоультратомии. В настоящем сообщении предложен способ получения параллельных граней пирамидки с помощью двух форм стеклянных ножей.

Ключевые слова: электронная микроскопия, 3D-реконструкция, ультратонкие серийные срезы, алмазный нож, стеклянный нож, заточка пирамидки методом мезы.

Анализ структуры ткани с использованием «объемного дисектора» — на основе серийных срезов (Sorra et al., 1998; Fiala, Harris, 2001) — по праву считается одним из наиболее адекватных методов анализа пространственной организации биологических структур, а последующий количественный анализ на основе объемной (3D) реконструкции именуют «золотым стандартом» в морфометрии (Von Bartheld, 2001). (Объемный дисектор (volume disector) — метод количественного анализа, разработанный в ряде работ (Harris et al., 1992; Sorra et al., 1998) для непредвзятой оценки плотности расположения и процентного соотношения различных типов синапсов в единице объема ткани).

Одни из первых 3D-реконструкций на ультраструктурном уровне, в частности синапсов центральной нервной системы, выполнены в 1950—1960-е годы на вырезанных из восковых пластинок профилях исследуемых структур (Sjöstrand, 1958; Westrum, Blackstad, 1962). В настоящее время методы 3D-реконструкции остаются приоритетными не только в исследовании мозга, и продолжают выходить публикации с усовершенствованием и облегчением техники приготовления серийных срезов (Harris et al., 2006). Несмотря на достижения высокоразрешающей электронной томографии (Frank, 2006) и успехи в развитии SBF (serial block-face scanning electron microscopy) (Denk, Horstmann, 2004; Gatan Inc., США) и электронно-ионной (Knott et al., 2008; Bushby et al., 2011; FEI Company, США) сканирующей микроскопии, исследование на серийных срезах остается адекватным методом анализа ультраструктуры большого объема ткани (Hoffrauer et al., 2007). (SBF — метод получения серии изобра-

жений, который заключается в сканировании поверхности блока с тканью, последовательно срезаемого на глубину с заданным шагом при помощи алмазного ножа непосредственно в камере микроскопа).

С использованием серийных срезов нами было впервые показано наличие одиночных вкусовых рецепторных клеток во вкусовом эпителии млекопитающих (Lindemann, 2001). Недавно в совокупности с анализом больших серий полутонких срезов мы получили первые данные об ультраструктуре дендритных синапсов идентифицированных темных и светлых пирамидных нейронов в глубоких слоях нейропилия гиппокампа (Клименко, Рогачевский, 2012).

Традиционно считается, что использование 3D-реконструкции на ультратонких срезах ограничено необходимостью хирургической точности при работе со срезами, трудоемкостью метода, значительными временными и финансовыми затратами. Многолетние исследования с применением 3D-реконструкций, проводимые в нашей лаборатории, позволили нам разработать хорошо воспроизводимые методы получения серий срезов с минимальными затратами. Данное сообщение предоставляет нам возможность этот опыт опубликовать.

Процесс подготовки к анализу структуры биообъектов с использованием 3D-реконструкции на серийных ультратонких срезах требует соблюдения нескольких ключевых правил. Состоят они в необходимости: 1) качественной химической фиксации ткани, 2) адекватно подобранной заливочной среды из смеси эпоксидных смол, 3) наличия качественных ножей, 4) специальной подготовки пирамидки на блоке с тканью, 5) получения доста-

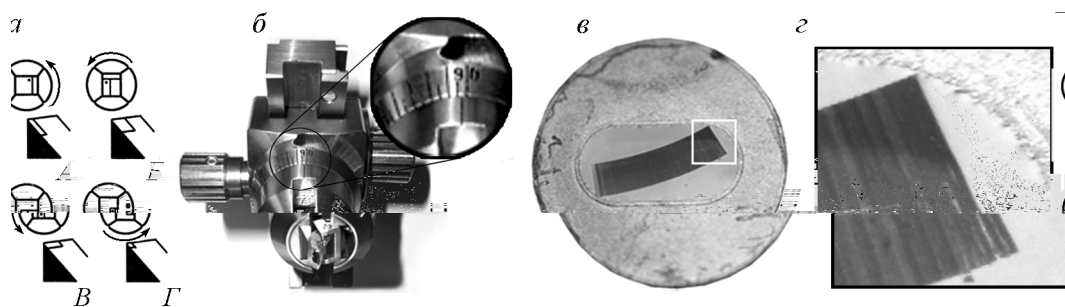


Рис. 1. Иллюстрация метода заточки пирамидки с использованием поворота объектодержателя и результирующей серии срезов. а — способ заточки меза-пирамидки с последовательными (А—Г) поворотами блока на 90° (по: Миронов и др., 1994, с изменениями); б — внешний вид объектодержателя ультратома Leica EM UC6 со шкалой для поворота образца на заданный угол; в — изогнутая ленточка из 90 срезов, получена алмазным ножом Diatome Ultra 45° и монтирована на пленку-подложку, близкие к параллели грани пирамидки были получены с разворотом объектодержателя на 180° , угол отклонения граней пирамидки от параллели составлял меньше 0.5° ; г — увеличенная область той же ленточки срезов, очевидна неоднородность их толщины и отрыв срезов друг от друга (справа внизу).

точно длинной ленточки из 100—200 серийных срезов, б) аккуратного монтирования этой серии на бленду с пленкой-подложкой и 7) контрастирования срезов, исключающего их загрязнение.

Вне зависимости от типа исследуемой ткани (объекта), способа ее фиксации, свойств заливочной среды, использования алмазного или стеклянного ножа стабильность ленточки срезов способствует поддержанию их однородной толщины и обеспечивает удобство переноса серии с поверхности жидкости в ванночке ножа на пленку-подложку без потери срезов, сохраняя, таким образом, целостность серии.

В настоящем сообщении, адресованном исследователям с уже имеющимся опытом в ультрамикротомии, рассмотрен ключевой этап подготовки образца для получения большой серий ультратонких срезов, а именно способ подготовки пирамидки для получения стабильной ленточки срезов без необходимости использования для этого дорогостоящего алмазного ножа. Именно поэтому этот способ доступен любой микроскопической лаборатории. При этом наличие найфмейкера (knifemaker) — станка для изготовления стеклянных ножей — не является обязательным.

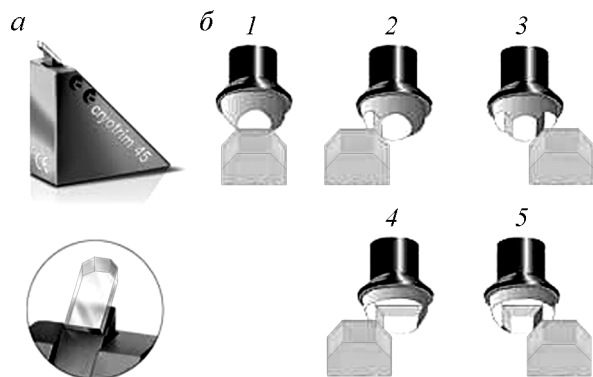


Рис. 2. Внешний вид сухого ножа CryoTrim 45° (а) и процедура получения с его помощью пирамидки с параллельными гранями (б).

а — внешний вид ножа и профиль его алмазной режущей кромки (круглая вставка); б — этапы приготовления пирамидки: 1 — стачивание фронтальной поверхности блока, 2 — получение левой грани пирамидки, 3 — получение параллельной правой грани пирамидки, 4 — объект развернут на 90° для получения верхней грани пирамидки, 5 — получение параллельной нижней грани пирамидки (из: www.diatomeknives.com с изменениями).

Условия получения стабильной серии срезов и способы их реализации

Стабильности серии срезов можно достичь несколькими способами — адекватным подбором заливочной среды или использованием адгезивов, наносимых на боковые грани пирамидки (Harris et al., 2006; Ruthensteiner, 2008). Но ключевым фактором является параллельность верхней и нижней граней пирамидки, падающей на режущую кромку ножа. Если в рутинной ультратомии для получения усеченной пирамидки вручную достаточно воспользоваться лезвием от безопасной бритвы, то качественную пирамидку для серийных срезов можно приготовить только на ультрамикротоме с использованием стеклянного или алмазного ножа в качестве резца или фрезы триммера. Использование же триммеров, таких как Reichert/Leica Ultratrim, Leica EM TRIM и Leica EM TRIM2 (Австрия/США), для этой цели исключено. Поскольку любые неоднородности поверхности пирамидки являются причиной быстрого притупления режущей кромки ножа, для сохранения режущих свойств ножа при получении длинной серии срезов боковые грани пирамидки должны быть гладкими настолько, насколько это возможно. Достичь этого можно только заточкой пирамидки при помощи ультратома в автоматическом режиме микроподачи (Galey, 1963). Поверхности пирамидки, полученные с помощью триммера, более неоднородны.

Миронов с соавторами (1994) описали способ получения двух параллельных граней пирамидки стеклянным ножом. Для этого держатель ножа в горизонтальной плоскости поворачивают по часовой стрелке на 30° и обтачивают одну из граней, затем держатель ножа поворачивают против часовой стрелки на 30° и повторяют процедуру, получая 2 параллельные грани. Недостатком такого подхода являются скошенные грани пирамидки, что ведет к увеличению площади срезов в процессе увеличения длины серии срезов и, следовательно, изменению условий резки. Для однородности условий резки в начале и в конце серии пирамидка должна иметь отвесные боковые грани под прямым углом к ее лицевой поверхности. Получение такой пирамидки (меза-пирамидки; от англ. mesa — столовая гора; форма рельефа с плоской вершиной и крутыми склонами, широко распространена на юго-западе США и в Мексике), обычно имеющей форму прямоугольного параллелепипеда, выступающего над поверхностью блока с тканью, называется «заточкой пира-

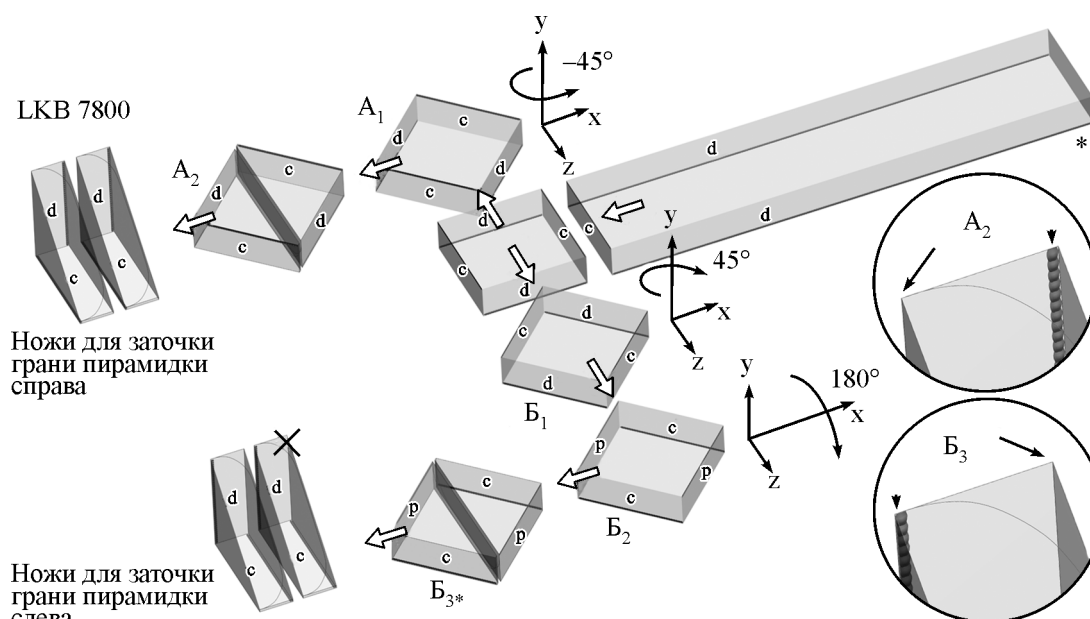


Рис. 3. Схема получения двух типов стеклянных ножей на найфмейкере LKB 7801.

A_1 , A_2 — стандартные процедуры приготовления ножей согласно инструкции, прилагаемой к найфмейкеру; B_1 — B_3 — процедуры приготовления ножа с зеркальным профилем; один из двух ножей, как правило, имеет сколотый правый уголок и непригоден для заточки пирамидки (*перечеркнут* на стадии B_3). Для наглядности плоскости квадратов и ножей помечены буквами d (грязная поверхность) и c (чистая поверхность, полученная на найфмейкере); положение букв на каждом этапе изменено согласно изменению положения квадрата. Стеклянная полоса на найфмейкере исходно располагается так, чтобы след от стеклореза при производственном разломе стекла на полосы располагался внизу (отмечено *звездочкой*). Остальные объяснения в тексте. Цветные иллюстрации с высоким разрешением доступны в качестве дополнительного материала по адресу: www.synapsis.ru.

мидки методом мезы» (Миронов и др., 1994; Bozzola, Russell, 1999).

Отвесные грани меза-пирамидки можно получить, обтачивая блок с тканью острым уголком стеклянного ножа (Galey, 1963; De Bruijn, McGee-Russell, 1966; Миронов и др., 1994), последовательно разворачивая образец на угол 90 или 180° (рис. 1, *a*). Современные ультратомы оборудованы объектодержателями со шкалой, позволяющей поворачивать образец на определенный угол (рис. 1, *b*). Но на практике развернуть образец точно на заданный угол не удастся. Даже если подготовленные таким образом грани пирамидки и окажутся близки к параллели, разница между ними даже в 0.5° даст изгиб полученной ленточки из 100 срезов на угол около 40—50° (рис. 1, *в*). Отклонение граней от параллели также является одной из причин неодинаковой толщины срезов и разрыва ленточки срезов еще до ее монтажа на пленку-подложку (рис. 1, *з*). Кроме того, манипулировать изогнутой ленточкой срезов в ванночке ножа и тем более монтировать ее по центру пленки-подложки крайне затруднительно. Изогнутая ленточка создаст дополнительные проблемы при поиске и фотографировании одного и того же участка на последовательных срезах в электронном микроскопе и последующее взаимное выравнивание серийных изображений для 3D-реконструкции.

Для переноса срезов из ванночки ножа и монтажа серии срезов на сеточки и пленки-подложки давно предложены зарекомендовавшие себя специальные технические приспособления и подходы, такие как «идеальная петля» (perfect loop), метод Гея—Андерсона (Gay, Anderson, 1954), приспособление Барнс и Чамберса (Barnes, Chambers, 1961), устройство Вестфала—Хили (Westfall, 1961; Westfall, Healy, 1962), «третья рука» Ростгаарда (Behnke, Rostgaard, 1964) или изящный метод Галлея—Нильсона (Galey, Nilsson, 1966), модифицирован-

ный Вегнером (Wegner, 1971) и позднее Мироновым (Mironov et al., 2008). Получению же большой и в то же время стабильной серии срезов уделено не меньше внимания, но в основном оно касается выбора эпоксидных заливочных сред (Hayat, 2000). При этом критическому условию, параллельности верхней и нижней граней пирамидки, а также способу его реализации практически не уделяется внимания (Hayat, 2000).

В зарубежной практике серийной ультратомии, например в лидирующей в данной области лаборатории проф. Кристен Харрис (Harris et al., 2006; www.synapsis.clm.utexas.edu), для этих целей рекомендуют заточку граней пирамидки с использованием сухого алмазного ножа для криоультратомии CryoTrim 45° (Diatome US, Inc., США). Такой нож имеет режущие кромки и с левой и с правой стороны (рис. 2, *a*). При заточке параллельных граней пирамидки ножом CryoTrim 45° положение образца остается неизменным, меняется лишь положение ножа. Сначала стачивается плоскость пирамидки слева, а затем плоскость справа, получаются 2 параллельные грани (рис. 2, *б*, этапы 2, 3). Затем образец разворачивают на 90° по длинной оси штанги объектодержателя и процедуру повторяют (рис. 2, *б*, этапы 4, 5). Стоит новый CryoTrim 45° довольно дорого, от 60 до 120 тыс. рублей, да и старый такой нож, уже непригодный для криоультратомии, найдется далеко не в каждой лаборатории. Если же исследование предполагает анализ микробиологических препаратов, клетки которых имеют минерализованные клеточные стенки, то и новый алмазный нож быстро придет в негодность. Поэтому для подготовки пирамидки использование стеклянных ножей, стоимость которых на 3 порядка ниже алмазных, вне сомнений остается актуальным. Хэнсен с соавторами для получения параллельных граней меза-пирамидки использовали стеклянный нож с двумя острыми уголками (Hanssen et al., 2010). Для

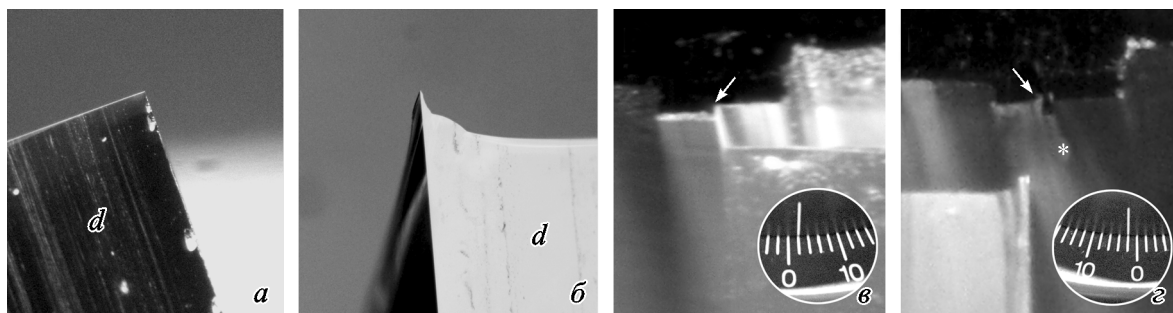


Рис. 4. Фотография обычного ножа (*d*) и ножа с зеркальным профилем (*б*), режущая кромка создана на поверхности *d*.

a — острый левый уголок ножа для заточки грани пирамидки справа (вид сзади); *б* — острый правый уголок ножа для заточки грани пирамидки слева (вид сзади); *в* — заточка грани пирамидки справа (*стрелка*), заточку следует проводить ножом, чуть развернутым против часовой стрелки (*круглая вставка*); *г* — заточка грани пирамидки слева (*стрелка*), заточку следует проводить ножом, чуть развернутым по часовой стрелке (*круглая вставка*). Поскольку уголок ножа на панели *б* имеет заостренный пик, угол наклона ножа при заточке пирамидки слева следует уменьшить до 2—1.5°. Полученная меза-пирамидка с параллельными гранями отмечена *звездочкой*.

получения такого ножа линия разлома стеклянного квадрата была смещена от центра квадрата, что требует изменения настроек найфмейкера.

Ниже приведен простой метод получения 2 стеклянных ножей с «зеркальными» профилями для заточки пирамидки с параллельными гранями (заявка на патент № 2012157496 от 27.12.2012). Предлагаемый метод не требует изменения настроек найфмейкера. Он основан только на изменении положения стеклянного квадрата перед разломом на 2 ножа, поэтому реализуем даже в отсутствие найфмейкера.

Суть метода

Приготовление ножей на найфмейкерах LKB серии 7800. Процедура приготовления ножей с углом в 45° согласно инструкции к найфмейкеру LKB серии 7800 (Швеция; аналог найфмейкеров серии LKB 7800 выпускал в СССР Ждановский завод медицинского приборостроения под маркой ССН-1) состоит в том, что отрезанный от стеклянной полосы квадрат поворачивают

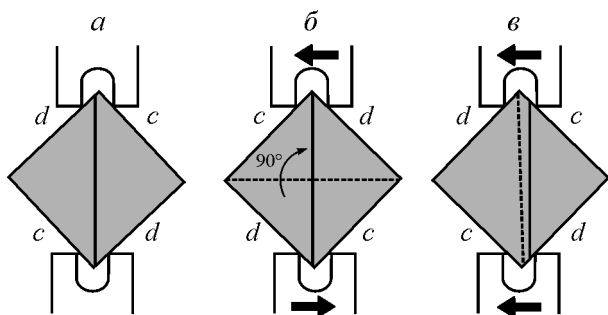


Рис. 5. Схема изменений настроек найфмейкера LKB серии 7800 для получения ножей с зеркальным профилем.

a — 1-й тип ножей можно приготовить согласно инструкции к найфмейкеру; *б* — для получения 2-го типа ножей с «зеркальным» профилем необходимо развернуть стеклянный квадрат на 90° и изменить положение фиксирующих вилок (направление показано *стрелками*); *в* — получение стеклянного ножа для заточки меза-пирамидки с параллельными гранями согласно методу Ханссена (Hanssen et al., 2010). *Вертикальные диагональные линии* — плоскости разлома квадратов на два ножа. На панелях *б* и *в* *штриховой линией* отмечены положения плоскостей разлома квадратов, соответствующие плоскости разлома на панели *a*; *d* и *c* — плоскости производственного разлома и разлома стеклянной полосы на квадраты соответственно.

против часовой стрелки на 45°, надрезают стеклорезом и разламывают на 2 ножа по диагонали (рис. 3, процедуры A_1 и A_2). Такие ножи будут иметь острый ровный уголок слева (рис. 3, *стрелка на верхней круглой вставке* (A_2); рис. 4, *a*), а режущая кромка будет образована плоскостью *d* (*dirty*), полученной при производственном разломе стекла на полосы. Нож такого профиля мы использовали для обточки грани пирамидки справа (рис. 4, *в*). Режущая кромка ножа справа заканчивается на неровной поверхности плоскости *d*, имеющей след от стеклореза, и непригодна для заточки грани пирамидки слева (рис. 3, *головка стрелки на круглой вставке сверху* (A_2)).

Чтобы приготовить нож с «зеркальным» профилем, с острым уголком справа, для заточки грани пирамидки слева, можно поменять положения вилок найфмейкера, фиксирующих стеклянный квадрат перед разломом (рис. 5, *б*). Однако, как и в случае способа Ханссена (Hanssen et al., 2010) (рис. 5, *в*), эта процедура потребует возвращения положения вилок, а затем и кропотливой длительной настройки найфмейкера с проверкой качества получаемых ножей и со значительными затратами стекла. Именно поэтому после раз проведенной тщательной регулировки положения прижимных вилок настройки найфмейкера не меняют годами.

Для получения ножа с «зеркальным» профилем без изменения настроек найфмейкера отрезанный от стеклянной полосы квадрат следует повернуть по часовой стрелке на 45° и по длинной оси найфмейкера на 180° (рис. 3, процедуры B_1 — B_3). При разломе квадрата по диагонали один из двух ножей будет иметь острый уголок справа (рис. 3, *стрелка на нижней круглой вставке* (B_3); рис. 4, *б*). В отличие от первого типа ножей острый уголок имеет форму заостренного пика. Этот нож мы использовали для обточки грани пирамидки слева (рис. 4, *г*). Левая сторона режущей кромки этого ножа ограничена неровной поверхностью плоскости *d*, имеющей след от стеклореза, и непригодна для заточки грани пирамидки справа (рис. 3, *головка стрелки на круглой вставке внизу* (B_3)).

При приготовлении ножа с «зеркальным» профилем во избежание лишних действий процедуру B_2 (рис. 3) можно было бы опустить и после поворота квадрата по часовой стрелке (рис. 3, B_1) разломить квадрат на 2 ножа. Но в таком случае, как и в случае метода Ханссена, режущая кромка окажется на поверхности *c* (*clean*). При этом создание острого уголка поверхностью *c* даже в случае сбалансированного разлома с задержкой далеко не всегда

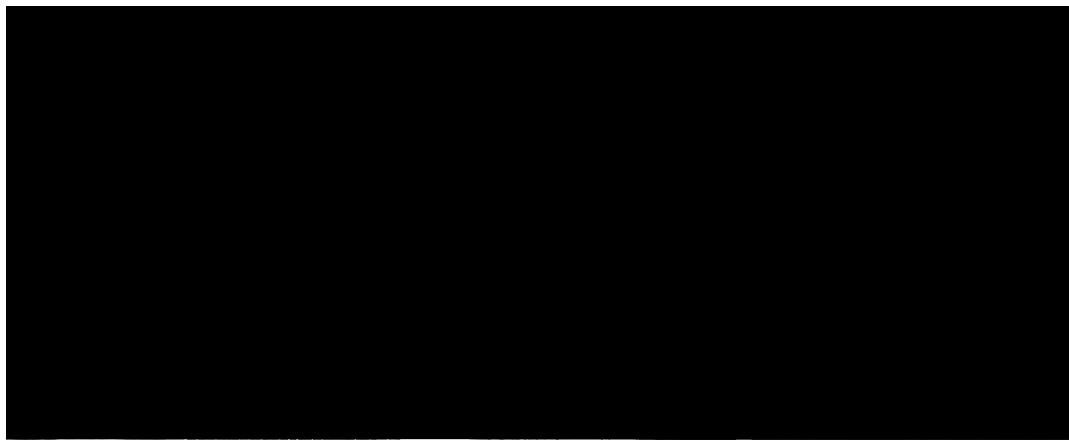


Рис. 6. Пример пирамидки и стабильной серии срезов, полученных при помощи стеклянных ножей.

a — фотография меза-пирамидки с параллельными гранями, приготовленной двумя стеклянными ножами зеркального профиля, площадь $\approx 250 \times 45$ мкм (отмечена стрелками); *б* — серия срезов, полученная стеклянным ножом с меза-пирамидки, представленной на панели *a*; *в* — та же ленточка срезов вблизи кромки ножа при большем увеличении. Ленточка на поверхности воды длиной более 9 мм состоит более чем из 200 срезов. Инструменты и параметры представленной серии: объект — осмированный гиппокамп, заливочная среда — Embed812/NMA/DDSA (соотношение смесей А : В = 3 : 7; по: Luft, 1961), ультрамикротом — Leica EM UC6, стеклянный нож 45° (ширина 6 мм), найфмейкер — LKB 7801, угол наклона ножа — 6° ванночка с дистиллированной водой, толщина срезов — 60 нм, скорость резки — 1.6 мм/с.

дает удовлетворительный результат (см. ниже рис. 8 и объяснение в тексте).

Заточка пирамидки двумя ножами с «зеркальным» профилем. Процесс заточки меза-пирамидки аналогичен вышеописанному методу с использованием сухого алмазного ножа CryoTrim 45° . В процессе заточки пирамидки положение блока с тканью также не меняется, что позволяет получить параллельные грани.

Оптимальной формой поверхности пирамидки для монтирования большой серии ультратонких срезов на одну сеточку является удлиненный параллелограмм. Так, при ширине пирамидки между длинными параллельными гранями в 20 мкм на одну сеточку (бленду) с отверстием 1×2 мм помещается до 100 срезов. Степень деформации пирамидки при падении на кромку ножа зависит от расстояния между длинными параллельными гранями. Если ширина пирамидки между ними составляет лишь 20 мкм, то для уменьшения деформации пирамидки в ходе ультратомной фронтальной плоскости блока с тканью целесообразно стачивать на глубину не более 20 мкм (рис. 4, *в*, *г*). Заточка пирамидки на ультратоме Leica EM UC6 (Австрия) с подачей по 20—50 нм и скоростью падения объекта на нож около 80—100 мм/с дает удовлетворительный результат (рис. 6, *a*). При указанных условиях двумя стеклянными ножами с «зеркальными» профилями можно заточить до десятка и более эпоновых пирамидок высокой твердости; соотношение смесей А : В = 3 : 7 по Люфту (Luft, 1961). С приготовленной описанным образом пирамидки, при соблюдении общих правил ультратомии не составит сложности получить стабильную ленточку из 100—200 срезов хоть алмазным, хоть стеклянным ножом (рис. 6, *б*, *в*). На начальном этапе получения серии, после того как сделаны первые срезы, захватывающие всю площадь поверхности пирамидки, целесообразно создать условия, исключающие температурные и воздушные флуктуации вблизи ультратома. В зарубежной практике для этой цели на антивибрационном столе монтируют прозрачный бокс, закрывающий ультратом (Hargis et al., 2006). В отсутствие такого бокса достаточно просто отойти от ультратома и сесть за него только тогда, когда серия срезов достигнет необходимой длины.

Практическое применение. Мы исследовали объемную ультраструктуру синапсов апикальных дендритов темных (гиперхромных) и светлых нейронов в *Str. radiatum* CA1-области гиппокампа крыс в нейропиле на глубине около 150 мкм от тел нейронов, где располагается основная масса возбуждающих синапсов от проекций трисинаптической петли гиппокампа (Клименко, Рогачевский, 2012). Морфология темных нейронов характеризуется тем, что по мере погружения апикальных дендритов в слой нейропиля их хроматичность теряется, что делает сечения дендритов неотличимыми от сечений дендритов светлых нейронов. Для определения принадлежности дендритов к темному или светлому нейрону мы использовали серии 200—300 срезов большой площади CA1-области гиппокампа толщиной 1 мкм в плоскости сечения, параллельной слою нейронов (перпендикулярной апикальным дендритам). На глубине 150 мкм диаметр сечения дендритов составляет около 2 мкм, что позволяет в взаимовыровненных изображениях срезов проследить ход дендрита от тела нейрона до последнего среза в серии.

Для анализа структуры синапсов данного дендрита на соответствующей области поверхности блока с тканью готовили пирамидки для получения серий ультратонких срезов. Поскольку направление хода апикального дендрита исходно неизвестно, для того чтобы сечения дендритов не вышли за границы изображений, требовалось получать с полутонких срезов изображения большой площади. В конечном итоге это сказывалось на времени их обработки. В каждом случае весь процесс от получения серии полутонких срезов до определения место положения дендрита идентифицированного нейрона на поверхности блока занимал не менее 1 мес. Поэтому с определенных описанным образом участков поверхностей блоков необходимо было получить ленточки серийных срезов, стабильность которых полностью исключала бы вероятность потери срезов в процессе ультратомии и разрыв серии при переносе и монтировании ее на сеточки.

В описанной работе (Клименко, Рогачевский, 2012) мы не использовали алмазных ножей типа CryoTrim 45° . Для подготовки пирамидок площадью $15/30 \times$

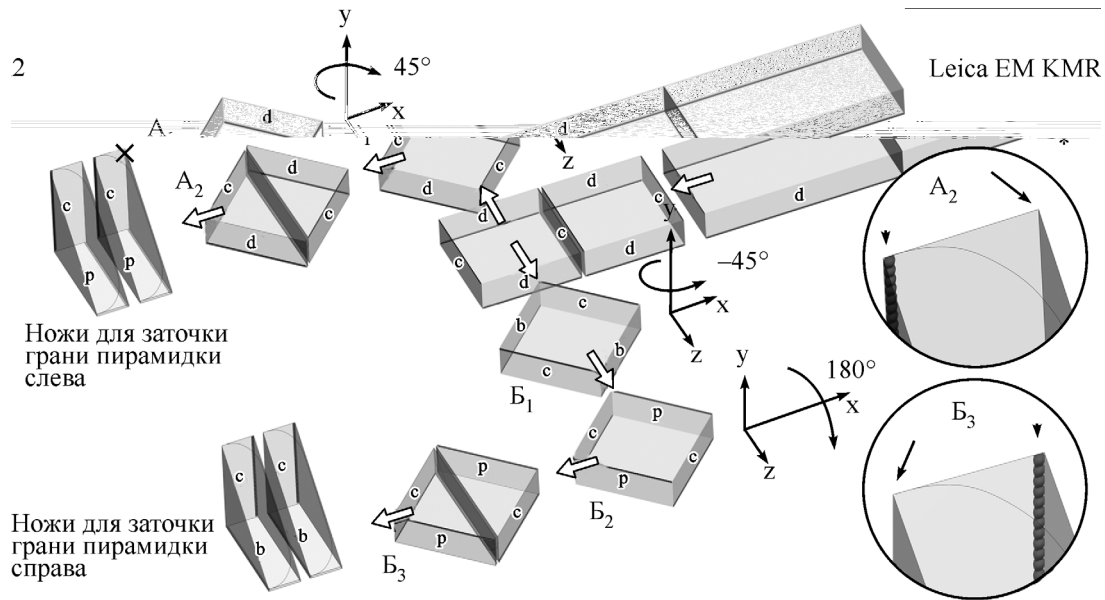


Рис. 7. Схема получения двух типов стеклянных ножей на найфмейкере Leica EM KMR2.

A_1 , A_2 — стандартные процедуры приготовления ножей; один из двух ножей, как правило, имеет сколотый правый уголок и непригоден для заточки пирамидки (*перечеркнуто* на стадии A_2). B_1 — B_3 процедуры приготовления ножа с «зеркальным» профилем. Обозначения те же, что и на рис. 3.

100/250 мкм мы использовали 2 типа стеклянных ножей с «зеркальными» профилями, приготовленных на найфмейкере LKB 7801 (Швеция) согласно предложенному в настоящей работе методу.

Приготовление двух типов ножей на найфмейкерах нового поколения. Процедура приготовления стеклянных ножей на более современных моделях найфмейкеров отличается. В моделях Reichert-Jung серии 705202 (Reichert-Jung, Австрия), Leica EM KMR2 (Австрия) и конструктивно наиболее совершенных Leica EM KMR3 (Leica Microsystems, США) и GKM-2 (RMC, Voeckeler Instruments, Inc., США) метод приготовления ножей основан на принципе сбалансированного разлома (balanced break) по Токуясу для получения стеклянных

ножей для криоультратомии (Tokuyasu, Okamuga, 1959; Griffiths et al., 1983). Процесс приготовления ножей начинают с разлома стеклянной полосы на равновесные фрагменты, вплоть до получения стеклянных квадратов (рис. 7). Метод отличается еще и тем, что в процессе разлома квадратов на два ножа режущая кромка образуется плоскостью c . Для этого полученный из стеклянной полосы квадрат поворачивают на 45° по часовой стрелке, надрезают и разламывают на два ножа (рис. 7, процедуры A_1 , A_2). Один из двух ножей будет иметь острый уголок справа, которым можно обточить грань пирамидки слева. Левая сторона режущей кромки этого ножа ограничена неровной поверхностью плоскости c , имеющей след от стеклореза, и непригодна для заточки грани пирамидки справа (рис. 7, *головка стрелки на круглой вставке сверху* (A_2)). Второй нож, как правило, имеет сколотый правый уголок и непригоден для заточки пирамидки. Чтобы получить нож с «зеркальным» профилем без изменения настроек найфмейкера для обточки пирамидки справа, можно использовать правило, аналогичное тому, что предложено выше для приготовления двух типов ножей на найфмейкерах LKB серии 7800, а именно перед разломом на 2 ножа стеклянный квадрат следует развернуть на 45° против часовой стрелки и на 180° вдоль длинной оси найфмейкера (рис. 7, процедуры B_1 , B_3). Приготовленный таким образом нож будет иметь острый уголок слева (рис. 7, *круглая вставка внизу* (B_3)), им можно получить грань параллельную первой, обточить пирамидку справа.

Мы не имели возможности опробовать метод на последних моделях найфмейкеров, но работоспособность метода и идентичность результата проверена и подтверждена на двух предшествующих моделях — Reichert-Jung серии 705202 и Leica EM KMR2. Конструкция найфмейкера GKM-2 отличается положением ролика стеклореза (он расположен снизу), но ориентация стеклянных полос и квадратов при приготовлении ножей на найфмейкерах KMR2, KMR3 и GKM-2 идентична.

Выбор плоскости, формирующей режущую кромку. При приготовлении двух типов стеклянных

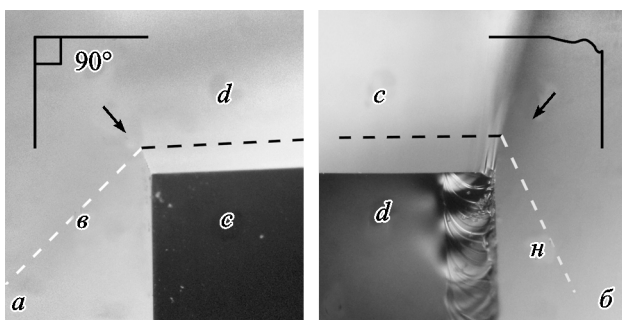


Рис. 8. Выбор плоскостей стеклянных квадратов d и c для получения режущей кромки ножа.

a — квадрат получен стандартной процедурой на найфмейкере LKB 7801. Профиль плоскости d образует на ребре прямой угол (*стрелка*). Режущая кромка (*черные штрихи*), полученная на плоскости d , образует на ребре острый уголок, пригодный для заточки грани пирамидки; e — верхняя плоскость квадрата; b — квадрат получен сбалансированным разломом с задержкой (3 мин) на найфмейкере Reichert-Jung серии 705202. Профиль поверхности c не образует прямого угла на ребре (*стрелка*). Режущая кромка (*черные штрихи*), полученная на плоскости c будет непригодна для заточки грани пирамидки; n — нижняя плоскость квадрата. Верхние части рисунков дополнены схематичными изображениями поперечных сечений ребер квадратов.

ных ножей для получения режущей кромки мы использовали поверхность *d*. Это связано с профилем задней поверхности ножа вблизи острого уголка (рис. 3, 7, *стрелки на круглых вставках*). Чем эта поверхность ближе к плоскости (рис. 8, *a*), тем выше будет качество заточенной пирамидки. Профиль этой плоскости может зависеть как от настроек найфмейкера (взаиморасположения опорных и ломающих штырей), так и от производства стеклянных полос. Режущая кромка высокого качества, образованная на поверхности *c*, и наименьшая кривизна этой поверхности получаются при сбалансированном разломе стекла с задержкой (Hagler, 2007). Однако даже при использовании такого способа вблизи нижней границы разлома полосы стекла на квадраты поверхность *c* далеко не всегда образует прямой угол с нижней поверхностью квадрата (рис. 8, *b*). В случае если поверхность *c* вблизи острого уголка, полученная по методу Токуясу (Tokuyasu, Okamura, 1959; Griffiths et al., 1983) (рис. 7), далека от плоскости, получить ножи «зеркального» профиля на найфмейкерах нового поколения для заточки пирамидки можно используя правило рис. 3. В таком случае режущие кромка и уголок будут созданы поверхностью *d*.

Заключение

Описан способ заточки параллельных граней пирамидки для получения стабильной серии ультратонких срезов двумя стеклянными ножами «зеркального» профиля. Способ проверен на найфмейкерах LKB 7800 (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пушино), LKB 7801 (Институт биофизики клетки РАН, Пушино), Reichert-Jung серии 705202 (филиал Института биоорганической химии РАН, Пушино), Leica EM KMR2 (ЦНИЛ Научно-исследовательского института прикладной и фундаментальной медицины Нижегородской государственной медицинской академии) и может быть реализован на найфмейкерах нового поколения, Leica EM KMR3 и RMC GKM-2 без изменения их настроек.

Два ножа, приготовленных описанным способом, позволяют подготовить до 10 и более пирамидок мягких тканей, залитых в смеси эпоксидных смол, при этом они на 3 порядка дешевле алмазных. Представленный метод прост, основан лишь на изменении ориентации стеклянного квадрата при разломе на два ножа и реализуем с использованием практически любого доступного на сегодняшний день найфмейкера и даже при приготовлении стеклянных ножей вручную.

Автор выражает благодарность М. Л. Бугровой (ЦНИЛ НИИ ПФМ НижГМА, Нижний Новгород) за техническую поддержку в апробации предложенного метода на найфмейкере Leica EM KMR2.

Список литературы

Клименко О. А., Рогачевский В. В. 2012. Объемная ультраструктура дендритных синапсов идентифицированных темных и светлых нейронов гиппокампа крыс. В кн.: Тезисы докладов XXIV Российской конференции по электронной микроскопии (РКЭМ-2012). 29 мая—1 июня, 2012. Черноголовка. 427—428.

Миронов А. А., Комиссарчик Я. Ю., Миронов В. А. 1994. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. Методическое руководство. СПб.: Наука. 400 с.

Barnes B. G., Chambers T. C. 1961. A simple and rapid method for mounting serial sections for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9 : 724—725.

Behnke O., Rostgaard J. 1964. Your «Third hand» in mounting serial sections on grids for electron microscopy. *Biotech. Histotechnol.* 39 : 205—208.

Bozzola J. J., Russell L. D. 1999. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. 2nd ed. Jones & Bartlett Publishers. 670 p.

Bushby A. J., P'ng K. M. Y., Young R. D., Pinali C., Knupp C., Quantock A. J. 2011. Imaging three-dimensional tissue architectures by focused ion beam scanning electron microscopy. *Nature Protocols.* 6 : 845—858.

De Bruijn W. C., McGee-Russell S. M. 1966. Bridging a gap in pathology and histology. *J. Royal Microscop. Soc.* 85 : 77—90.

Denk W., Horstmann H. 2004. Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol.* 2 : 1900—1909 (e329).

Fiala J. C., Harris K. M. 2001. Extending unbiased stereology of brain ultrastructure to three-dimensional volumes. *J. Amer. Med. Inform. Ass.* 8 : 1—16.

Frank J. 2006. *Electron tomography: methods for three-dimensional visualization of structures in the cell*. Springer. 455 p.

Galey F. R. 1963. A mechanical technique for trimming tissue blocks in electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 9 : 139—142.

Galey F. R., Nilsson S. E. G. 1966. A new method for transferring sections from the liquid surface of the trough through staining solutions to the supporting film of a grid. *J. Ultrastruct. Res.* 14 : 405—410.

Gay H., Anderson T. F. 1954. Serial sections for electron microscopy. *Science.* 120 : 1071—1073.

Griffiths G., Simons K., Warren G., Tokuyasu K. T. 1983. Immunoelectron microscopy using thin, frozen sections: application to studies of the intracellular transport of Semliki Forest virus spike glycoproteins. *Methods Enzymol.* 96 : 466—485.

Hagler H. K. 2007. Ultramicrotomy for biological electron microscopy. *Methods Mol. Biol.* 369 : 67—96.

Hanssen E., Goldie K. N., Tilley L. 2010. Ultrastructure of the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *Methods Cell Biol.* 96 : 93—116.

Harris K. M., Jensen F. E., Tsao B. 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J. Neurosci.* 12 : 2685—2705.

Harris K. M., Perry E., Bourne J., Feinberg M., Ostroff L., Hurlburt J. 2006. Uniform serial sectioning for transmission electron microscopy. *J. Neurosci.* 26 : 12 101—12 103.

Hayat A. 2000. *Principles and techniques of electron microscopy: biological applications*. Cambridge Univ. Press. 543 p.

Hoffpauir B. K., Pope B. A., Spirou G. A. 2007. Serial sectioning and electron microscopy of large tissue volumes for 3D analysis and reconstruction: a case study of the calyx of Held. *Nature Protocols.* 21 : 9—22.

Knott G., Marchman H., Wall D., Lich B. 2008. Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling. *J. Neurosci.* 28 : 2959—2964.

Lindemann B. 2001. Receptors and transduction in taste. *Nature.* 413 : 219—225.

Luft J. H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9 : 409—414.

Mironov A. A., Polishchuk R. S., Beznoussenko G. V. 2008. Combined video fluorescence and 3D electron microscopy. *Methods Cell Biol.* 88 : 83—95.

Ruthensteiner B. 2008. Soft part 3D visualization by serial sectioning and computer reconstruction. *Zoosymposia.* 1 : 63—100.

Sjöstrand F. S. 1958. Ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea pig eye as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections. *J. Ultrastruct. Res.* 2 : 122—170.

Sorra K. E., Fiala J. C., Harris K. M. 1998. Critical assessment of the involvement of perforations, spinules, and spine bran-

ching in hippocampal synapse formation. *J. Comp. Neurol.* 398 : 225—240.

Tokuyasu K., Okamura S. 1959. A new method for making glass knives for thin sectioning. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6 : 305—308.

Von Bartheld C. S. 2001. Comparison of 2-D and 3-D counting: the need for calibration and common sense. *Trends Neurosci.* 24 : 504—506.

Wegner K. W. 1971. Easy and accurate collection of thin serial sections by means of a grid support. *Mikroskopie.* 27 : 289—293.

Westfall J. A. 1961. Obtaining flat serial sections for electron microscopy. *Biotechnic Histochem.* 36 : 36—37.

Westfall J. A., Healy D. L. 1962. A water control device for mounting serial ultrathin sections. *Biotechnic Histochem.* 37 : 118—121.

Westrum L. E., Blacksta, T. W. 1962. An electron microscopic study of the stratum radiatum of the rat hippocampus (regio superior, CA 1) with particular emphasis on synaptology. *J. Comp. Neurol.* 119 : 281—309.

Поступила 14 III 2013

A METHOD OF THE MESA TRIMMING WITH GLASS KNIVES FOR THE OBTAINING THE LARGE SERIES OF ULTRATHIN SECTIONS

V. V. Rogachevsky

Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino;
e-mail: vadim_rogachevsky@synapsis.ru

Ultrastructural analysis of tissue based on 3D reconstruction from serial ultrathin sections is one of the most adequate methods in the research of spatial organization of biological objects. Sample preparation technique for 3D reconstruction includes two technically the most difficult procedures: an obtaining of a stable ribbon of serial sections and the mounting of the ribbon onto a grid coated with support film. Both special approaches and technical tools for mounting of the ribbon onto the film have been proposed and well appreciated. Much attention has been paid to obtaining the large and stable ribbon of serial section but this mainly concerned the selection of epoxy embedding media. The critical condition for the obtaining the straight and stable ribbon is the precise parallelism of leading (bottom) and trailing (top) edges of the mesa falling onto the cutting edge. The trimming of mesa with dry diamond knife for cryoultratomy allows fulfilling this rule. In the given report, a method for obtaining parallel edges of mesa by means of two forms of glass knives is offered.

Key words: electron microscopy, 3D reconstruction, ultrathin serial sections, diamond knife, glass knife, mesa trimming.