

MICHAŁ STAWARSKI¹, BŁAŻEJ RUSZCZYCKI², MONIKA BIJATA¹, AGNIESZKA WALCZAK³, GRZEGORZ WILCZYŃSKI³, JAKUB WŁODARCZYK¹

¹*Pracownia Biofizyki Komórki*

²*Pracownia Obrazowania Struktury i Funkcji Tkanek*

³*Pracownia Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej*

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

E-mail: g.wilczynski@nencki.gov.pl

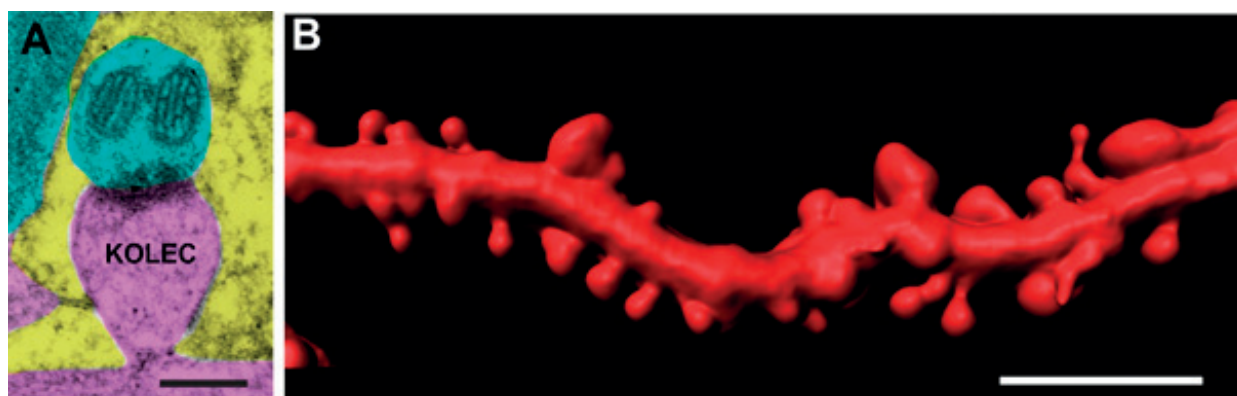
j.wlodarczyk@nencki.gov.pl

ILOŚCIOWA ANALIZA OBRAZU W BADANIACH STRUKTURALNEJ PLASTYCZNOŚCI SYNAPTYCZNEJ

STRUKTURALNA PLASTYCZNOŚĆ NEURONALNA

Plastyczność mózgu jest definiowana jako reorganizacja sieci neuronowej, która prowadzi do zmiany odpowiedzi na czynnik pobudzający pochodzący ze środowiska (w kontekście poprzednich doświadczeń). Zjawisko to jest podstawą takich funkcji kognitywnych jak uczenie się i pamięć, a także zaburzeń takich jak epilepsja, upośledzenia umysłowe i uzależnienia. Na poziomie komórkowym plastyczność mózgu jest uwarunkowana zmianami w połączeniach pomiędzy neuronami i w ich pobudliwości, które z kolei są regulowane zmianami neuronów i komórek glijowych na poziomie molekularnym. Synapsy są wyspecjalizowanymi domenami błony komórkowej, będącymi miejscami kontaktu i komunikacji między neuronami (YAMADA i NELSON 2007) (Ryc. 1a). Typowa synapsa składa się z domen pre- i postsynaptycznej oddzielonych od siebie szeroką na około 20 nm szczeliną synaptyczną (HARRIS i WEINBERG 2012). Impuls elektryczny przekazywany jest z domeny presynaptycznej do domeny postsynaptycznej przez cząsteczki neuroprzekazników. Najważniejszymi neuroprzekaznikami w mózgach ssaków są: glutaminian (pobudzający) i kwas γ -aminomasłowy (hamujący) (ALEXANDER 2009). U ssaków ponad 90% synaps pobudzających znajduje się na małych (0,2–2 μ m) wypustkach nazy-

wanych kolcami dendrytycznymi, które zlokalizowane są na dendrytach (NIMCHINSKY i współaut. 2002, MCKINNEY i THOMPSON 2009) (Ryc. 1b). Uważa się, że kluczową rolę w plastyczności odgrywają synapsy, ze względu na ich dużą wrażliwość na krótkotrwałe modyfikacje. Część kolców dendrytycznych i kolbek presynaptycznych zlokalizowanych w różnych regionach mózgu charakteryzuje się dużą dynamiką – nowe kolce pojawiają się, stare znikają (obróć kolców dendrytycznych, ang. turnover), a te utrzymujące się ulegają ciągłym zmianom wielkości. Zdolność zmiany połączeń synaptycznych (nazywana plastycznością synaptyczną) obejmuje zarówno zmiany na poziomie morfologicznym, jak i na poziomie funkcjonalnym. Badania wykazały związek między zmianami w dynamice obrotu kolców oraz ich stabilnością a plastycznością synaptyczną i pamięcią (HOLTMAAT i SVOBODA 2009, XU i współaut. 2009, YANG i współaut. 2009). Pamięć krótkoterminowa regulowana jest zmianami siły transmisji istniejących synaps poprzez zmianę struktury populacji receptorów postsynaptycznych (NEVES i współaut. 2008, HOFER i BONHOEFFER 2010). Pamięć długoterminowa z kolei wymaga reorganizacji struktury, takiej jak formowanie nowych synaps i utrata istniejących połączeń (BAILEY i KANDEL 1993,



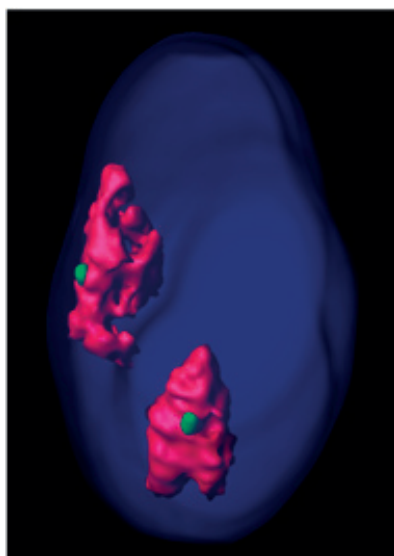
Ryc. 1. Dendryty i kolce dendrytyczne.

A) Tkanka mózgowa szczura zobrażowana przy pomocy mikroskopii elektronowej. Widoczna jest synapsa pobudzająca umiejscowiona na kolcu dendrytycznym. Poszczególne przedziały komórki zaznaczono fałszywymi barwami: dendryt i kolec dendrytyczny na fioletowo, kolbka presynaptyczna na niebiesko, wypustki perysynaptyczne astrocytów na żółto. B) dendryt neuronu hodowanego w hodowli pierwotnej neuronów szczura zobrażowany przy pomocy mikroskopii konfokalnej; zwracają uwagę liczne kolce dendrytyczne wyrastające z dendrytu; skala: A, 500 nm; B, 10 μ m.

HOER i BONHOEFFER 2010). Opracowano modele eksperymentalne podobne w pewnych aspektach do plastyczności – długoterminowe wzmocnienie synaptyczne (LTP) i długoterminowe osłabienie synaptyczne (LTD) (LÜSCHER i FRERKING 2009, SWEATT 2009b).

Poza zmianami strukturalnymi synaps, długotrwała plastyczność synaptyczna obejmuje również zmianę ekspresji genów zachodzącą pod wpływem aktywacji pewnych ścieżek sygnałowych i powiązanych z nimi czynników transkrypcyjnych (COHEN i GREENBERG 2008). Kontrola ekspresji genów umożliwia czasową i przestrzenną regulację syntezy białek koniecznych do modyfikacji struktury synaps i/lub utrzymania tych zmian. W procesie tym odgrywają rolę sekwencje DNA zlokalizowane cis i trans wobec regulowanych genów, a także, zgodnie z wynikami najnowszych badań, mechanizmy epigenetyczne (SWEATT 2009a). Liczne badania wskazują, że kowalencyjne modyfikacje chromaty (metylacja DNA, metylacja i acetylacja histonów) oraz niekodujące RNA odgrywają kluczową rolę w plastyczności synaptycznej będącej podstawą procesów kognitywnych i patogenezy chorób centralnego układu nerwowego (SWEATT 2009a, URDINGUIO i współaut. 2009). Co ciekawe, niedawno wykazano istnienie nowego mechanizmu kontroli epigenetycznej, jakim jest przebudowa jądra komórkowego (DUNDR i współaut. 2007, BROWN i współaut. 2008). Od dawna wiadomo, że jądro komórkowe nie jest homogenne, a wręcz

przeciwnie, można wyróżnić w nim szereg domen strukturalnych (MONNERON i BERNHARD 1969). Pomimo to, przez dekady budowa molekularna oraz funkcja tych domen, z wykluczeniem chromatyny i jąderka, były w dużej mierze nieznane. Dopiero niedawno, dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik molekularnych, udało się zrozumieć znaczenie ultrastruktury jądra komórkowego. Prawdopodobnie najważniejszym odkryciem było ustalenie, że chromosomy interfazowe nie są przemieszane, ale w istocie zajmują określone, choć nieregularne domeny chromosomowe (CREMER i CREMER 2010) (Ryc. 2). Geny, zlokalizowane na peryferiach różnych domen chromosomowych, mogą ulegać wypętlaniu i zbliżać się do siebie, tworząc w ten sposób wielocząsteczkowe fabryki, w których transkrypcja i procesowanie mRNA przebiegają równocześnie. Takie fabryki umożliwiają wydajniejsze korzystanie ze związków chemicznych dostępnych w jądrze komórkowym. Innym istotnym elementem strukturalnym jądra komórkowego, regulującym ekspresję genów, jest lamina, białko tworzące włóknistą macierz podtrzymującą otoczkę jądrową. U kręgowców lamina hamuje ekspresję genów zlokalizowanych w jej pobliżu (ANDRULIS i współaut. 1998). Większość danych na temat architektury jądra komórkowego neuronów pochodzi z badań nad neuronami układu współczulnego oraz neuronami zlokalizowanymi we wzgórzu (VILLAGRA i współaut. 2008 i prace tam cytowane). Nie wiadomo



Ryc. 2. Domeny chromosomowe.

Trójwymiarowa rekonstrukcja (w oparciu o zestaw przekrojów optycznych z mikroskopu konfokalnego) domen chromosomu 3 (czerwony) w jądrze komórkowym neuronu hipokampalnego szczura; na zielono zaznaczono region zajmowany przez gen kodujący czynnik wzrostu *bdnf*; zarys jądra komórkowego zaznaczono na niebiesko w oparciu o znakowanie specyficzne dla DNA.

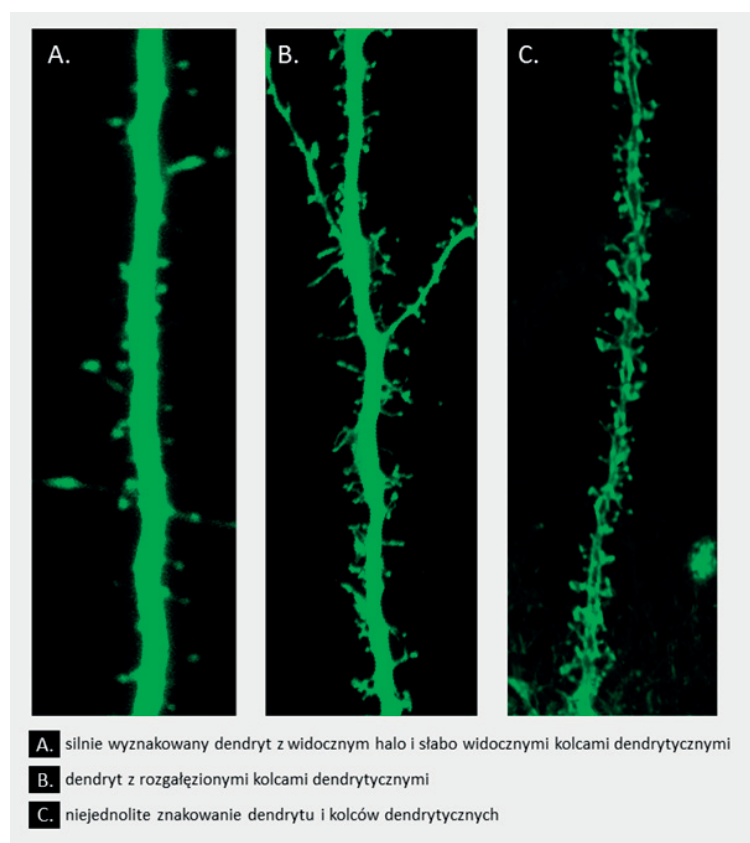
natomiast nic o dynamice architektury jądra komórkowego neuronów w regionach mózgu zaangażowanych w funkcje kognitywne i zaburzenia patologiczne takich jak kora mózgowa i hipokamp. Podobnie na prowadzi się badań nad dynamiką architektury jądra komórkowego w kontekście plastyczności synaptycznej. Pomimo ogromnego postępu jaki dokonał się w badaniach nad plastycznością synaptyczną, zrozumienie molekularnych mechanizmów kierujących zmianami budowy synaps jest dalekie od pełnego, a architektura jądra komórkowego neuronów pozostaje całkowicie niezbadana. Dlatego też konieczne jest stałe ulepszanie metod umożliwiających badanie zmian strukturalnych tych przedziałów komórkowych neuronu. W niniejszym tekście przybliżymy współczesne osiągnięcia ilościowej analizy morfometrycznej kolców dendrytycznych i jąder komórkowych wykorzystującej obrazy zebrane przy pomocy zaawansowanej mikroskopii konfokalnej. Zagadnienia te odgrywały fundamentalną rolę w naszej pracy badawczej nad rolą zewnątrzkomórkowej proteolizy (MICHALUK i współaut. 2011) oraz modyfikacjami architektury jądra komórkowego w plastyczności synaptycznej (WALCZAK i współaut. 2013).

OBRAZOWANIE TKANKI NERWOWEJ

Analiza morfologii kolców dendrytycznych przy użyciu mikroskopii konfokalnej jest powszechnie stosowana we współczesnej neuronauce (HOSOKAWA i współaut. 1995; YUSTE i DENK 1995; DAILEY i SMITH 1996; ZIV i SMITH 1996; FIALA i współaut. 1998; KORKOTIAN i SEGAL 1999; SORRA i HARRIS 2000; HERING i SHENG 2001; KORKOTIAN i SEGAL 2001; SALA i współaut. 2001; YUSTE i BONHOEFFER 2001; GRUTZENDLER i współaut. 2002; KASAI i współaut. 2003, 2010; MATSUZAKI i współaut. 2004; HOLTMAAT i współaut. 2005; ORAY i współaut. 2006; HUNG i współaut. 2008; YASUMATSU i współaut. 2008; XU i współaut. 2009; SEGAL 2010). Pojedynczy eksperyment może obejmować analizę tysięcy (lub więcej) kolców dendrytycznych lub jąder komórkowych neuronów. Ręczna analiza tak dużej liczby obiektów jest czasochłonna, dlatego też wykorzystywane jest do tego celu wyspecjalizowane oprogramowanie komputerowe. Ponieważ poszukiwane zmiany morfologii kolców dendrytycznych mogą być niewielkie, wnioski wyciągane z danych tego

typu są ściśle uzależnione od wydajności zastosowanego oprogramowania komputerowego. Wybór właściwej techniki może mieć zatem istotny wpływ na ostateczne wyniki eksperymentu.

Znakowanie fluorescencyjne kolców dendrytycznych jest podstawowym narzędziem stosowanym w badaniach plastyczności synaptycznej z użyciem mikroskopii konfokalnej. Jednakże różne metody znakowania i obrazowania, a także samo zróżnicowanie neuronów powodują, że powierzchownie podobne obrazy mogą różnić się w znaczący sposób w detalach. Stanowi to poważny problem dla zautomatyzowanych algorytmów analizy obrazu, które mogą być niewystarczająco elastyczne, by poradzić sobie ze skomplikowanymi strukturami. To z kolei prowadzi do konieczności ręcznej analizy zebranych obrazów. Na Ryc. 3 zaprezentowano zróżnicowanie neuronów znakowanych fluorescencyjnie. Bez problemu można zauważyć obecność takich artefaktów jak halo wokół dendrytu, złożona i często rozgałęziająca



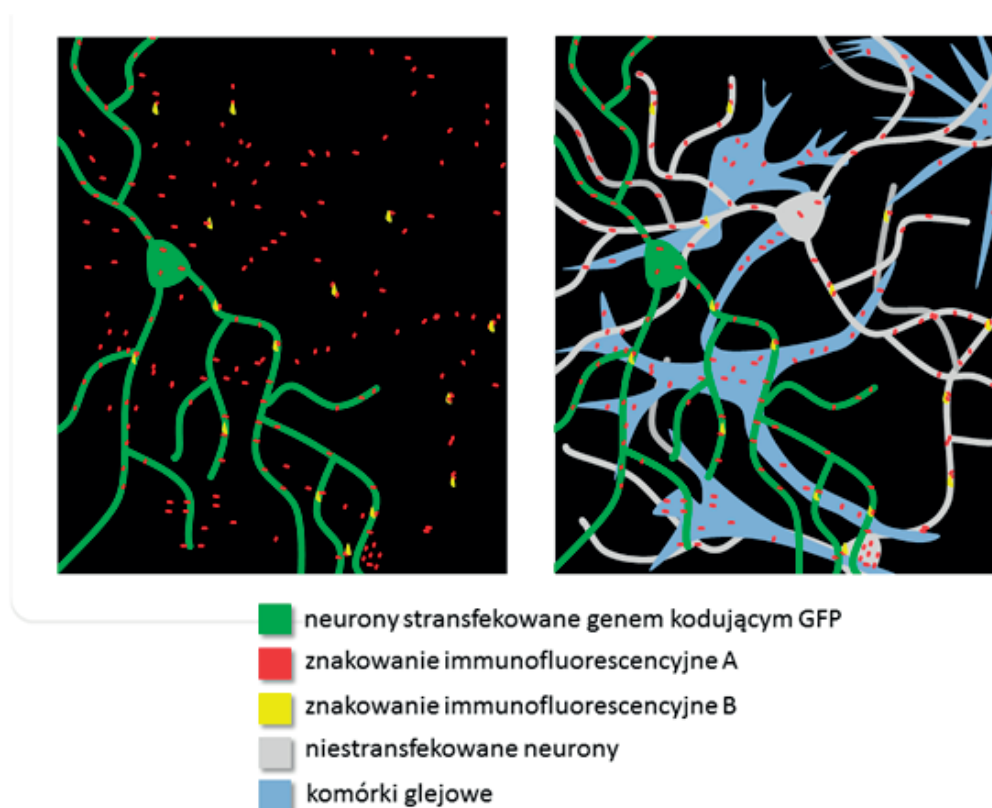
Ryc. 3. Fragment dendrytu z kolcami dendrytycznymi; na wstawkach zaprezentowano możliwe warianty struktury dendrytów i ich znakowania.

A) hodowla organotypowa skrawków mózgu wyznakowana czerwonym białkiem fluorescencyjnym (Red Fluorescent Protein – RFP) – kolor zmieniono w trakcie obróbki obrazu, B) komórka z hodowli pierwotnej dysocjowanej neuronów wyznakowana zielonym białkiem fluorescencyjnym, C) komórka z grubych skrawków znakowanych DiI. Pomimo podobieństwa wszystkich obrazów, mogą się one istotnie różnić w szczegółach struktury kolców dendrytycznych.

się struktura kolców dendrytycznych, a także nierównomierne wyznakowanie dendrytu i kolców dendrytycznych.

Do wprowadzenia znacznika fluorescencyjnego (barwnika lub białka fluorescencyjnego) stosuje się szereg metod, takich jak transfekcja, elektroporacja, mikroiniekcja, transformacja wektorem wirusowym, lipofekcja i metoda biolistyczna. Technika biolistyczna, czyli transfekcja z wykorzystaniem strzelby genowej, polega na wprowadzeniu do preparatu mikrocząsteczek pokrytych barwnikiem lub DNA kodującym białko fluorescencyjne. Jednym ze stosowanych w tym celu barwników jest lipofilny barwnik indokarbocyanina (DiI), który po wnikięciu rozpływa się wzdłuż dendrytów na zasadzie dyfuzji, znakując kolce dendrytyczne. Inną, często stosowaną metodą jest lipofekcja, gdzie transgen jest wprowadzany do komórki w liposomie, pęcherzyku zbudowanym z dwuwarstwy lipidowej, zdolnym ulegać fuzji z błoną komórkową. W praktyce jednak badacze rzadko ograniczają do jednej, określonej techniki znakowania i metody obrazowania, dlatego też oprogramowanie do analizy obrazu musi być w stanie poradzić sobie z obrazami różnego typu. Wszystkie metody znakowa-

nia cierpią też z powodu ograniczonej wydajności znakowania. W praktyce objawia się to tym, że wyznakowany neuron otoczony jest wieloma innymi, niewidocznymi, a ze skomplikowanej sieci połączeń między neuronami widoczne jest zaledwie kilka dendrytów (Ryc. 4). Z punktu widzenia algorytmów analizy obrazu jest to korzystne, ze względu na łatwość segmentacji (proces podziału obrazu na części, które są jednolite pod względem pewnych wybranych własności) i detekcji, jednak z perspektywy późniejszej analizy danych stanowi dodatkowe wyzwanie – systemowy efekt może być „ukryty w szumie”, gdy analizowana populacja neuronów jest mała. Ponadto, w przypadku jednoczesnej analizy rezultatów immunofluorescencji zbieranych w innych kanałach detekcyjnych mikroskopu, często ograniczamy sygnał do pewnego rejonu zainteresowania, w naszym przypadku kolców dendrytycznych. Jednakże znakowanie immunofluorescencyjne obecne jest również poza tym regionem zainteresowania, w kolcach dendrytycznych niestransfekowanych neuronów (zatem niewidocznych). W takiej sytuacji nie jest łatwe ustalenie tła dla sygnału analizowanego w kanale immunofluorescencji. Ponadto kwantyfikacja sy-



Ryc. 4. Wielokanałowe obrazy łączące obserwację neuronu transfekowanego zielonym białkiem fluorescencyjnym (GFP) z jednoczesną detekcją sygnału immunofluorescencyjnego.

gnału immunofluorescencji w obrębie kolców dendrytycznych może zostać zaburzona sygnałem pochodzącym z innych obiektów w pobliżu kolców dendrytycznych, np. komórek glejowych.

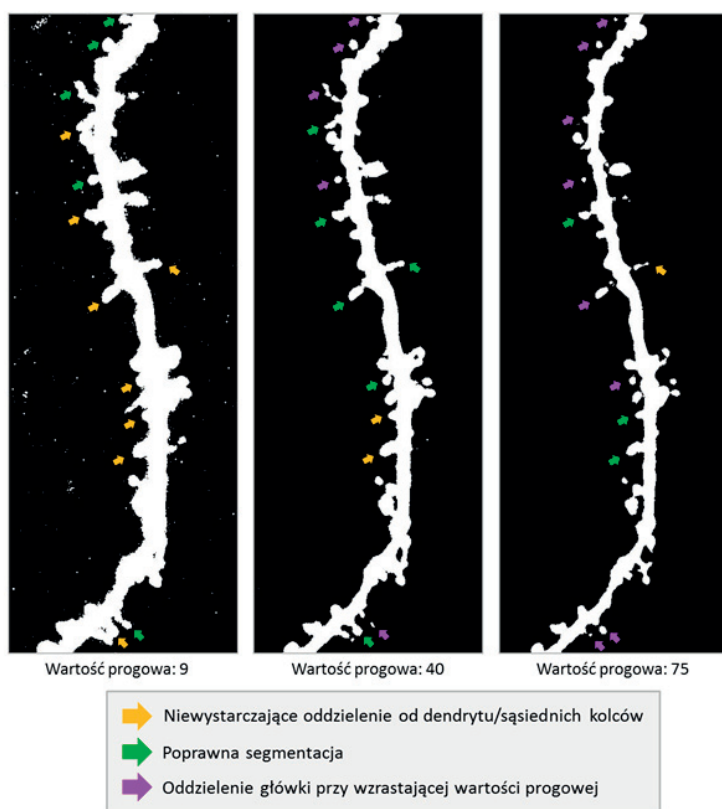
tów w pobliżu kolców dendrytycznych, np. komórek glejowych.

REKONSTRUKCJA POWIERZCHNI KOLCA DENDRYTYCZNEGO

Niezbędnym elementem analizy obrazu jest rekonstrukcja powierzchni kolca dendrytycznego i rozróżnienie obiektów znajdujących się wewnątrz kolca dendrytycznego od tych będących w jego pobliżu (którymi może być przestrzeń zewnątrzkomórkowa, aksony, dendryty i kolce dendrytyczne należące do innych neuronów, komórki glejowe). Większość ze stosowanych metod rekonstrukcji opiera się na pomiarze intensywności lub analizie gradientu. Jeśli kolec dendrytyczny ma na obrazie dobrze zdefiniowaną krawędź i jest jednolicie wybarwiony, to naturalne jest zastosowanie metod wykorzystujących analizę gradientu. Niestety, w przypadku obrazów mikroskopii konfokalnej taka sytuacja rzadko ma miejsce. Brak wyraźnej granicy kolca dendrytycznego nie ma tak wielkiego wpływu na analizę wykorzystującą pomiar intensywności, która obejmuje ustalenie war-

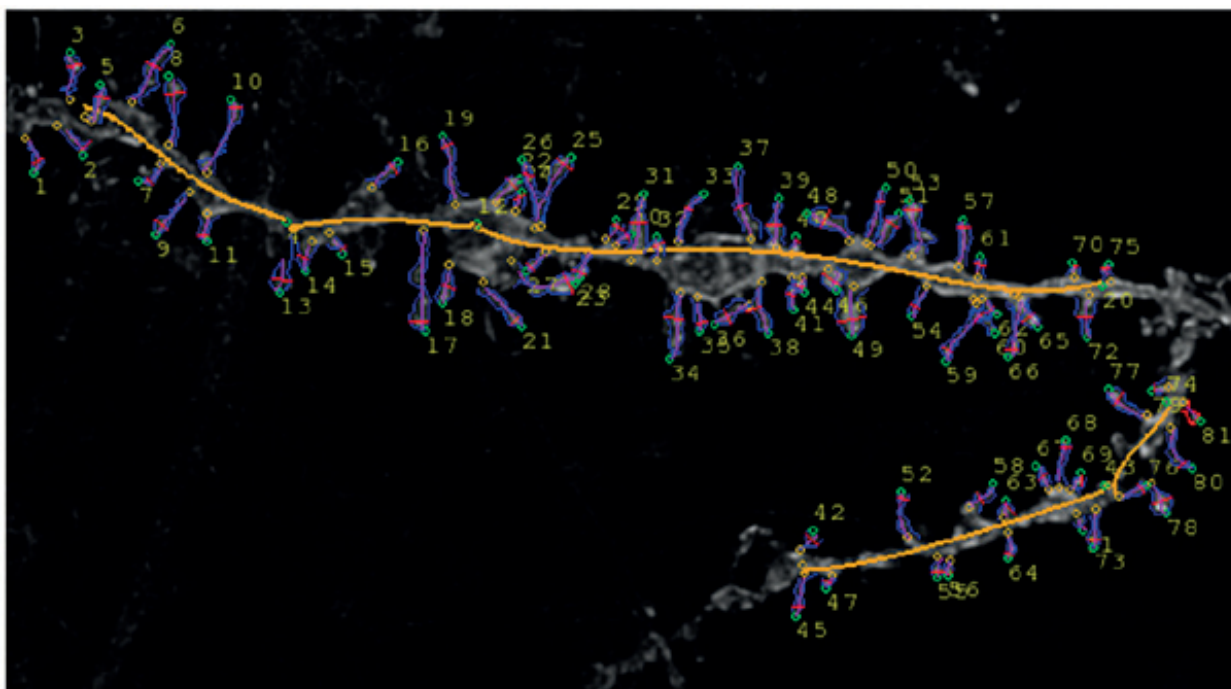
tości progowej i binaryzację obrazu i może być ułatwiona przez wstępną obróbkę obrazu. Obraz binarny jest bez wątpienia łatwiejszy w analizie, jednakże ustalenie progu globalnego w obrazach mikroskopii konfokalnej prowadzi często do pojawienia się różnego rodzaju artefaktów (zaprezentowanych na Ryc. 5). Dobrze widoczne jest zjawisko odcepienia się główki kolca dendrytycznego w przypadku zastosowania wysokiej wartości progowej (fioletowe strzałki). Obniżenie wartości progowej może zapobiec temu zjawisku, jednakże kosztem zaniku szczegółów struktury kolca w pobliżu dendrytu (żółte strzałki), gdzie intensywność fluorescencji jest wyższa.

Dlatego też algorytmy wykonujące binaryzację obrazu wymagają dodatkowej obróbki obrazu w celu usunięcia powstałych artefaktów. Problem ten może być rozwiązany



Ryc. 5. Binarystacja obrazu prowadzi do pojawienia się artefaktów.

Procedurę przeprowadzono stosując trzy różne wartości progowe (9, 40 i 75 jednostek). Niemożliwe jest znalezienie globalnej wartości progowej, która pozwala na prawidłową segmentację.



Ryc. 6. Przykład segmentacji dendrytu pokrytego kolcami dendrytycznymi z wykorzystaniem techniki adaptacyjnej wartości progowej.

Pozycje wierzchołka główki kolca dendrytycznego (zielone okręgi) oraz podstawy (pomarańczowe okręgi) wybrano ręcznie. Zastosowany algorytm wyznaczył szkielet dendrytu i kontur kolca dendrytycznego. Czerwone linie wyznaczają szerokość główki kolca dendrytycznego.

przez zastosowanie adaptacyjnej wartości progowej (Ryc. 6). W pracy KOHA i współaut. (2002) dokonano na przykład detekcji główek kolców dendrytycznych i połączono je ponownie z dendrytem.

Opracowano szereg algorytmów przeprowadzających rozpoznawanie i segmentację kolców dendrytycznych. Stosowane w nich metody to m.in. binaryzacja obrazu, identyfikacja szkieletu, detekcja konturów z użyciem

linii geodezyjnych oraz izolacja punktów stosowana w metodach analizy gradientu.

Niestety większość algorytmów opisanych w literaturze nie ma ogólnodostępnej implementacji, co utrudnia przeprowadzenie ich niezależnej oceny. Jest też możliwe, że dany algorytm może poprawnie wykrywać kolce dendrytyczne tylko na określonych typach neuronów, zawodząc w innych przypadkach.

OGRANICZONA ROZDZIELCZOŚĆ W OSI Z MIKROSKOPII KONFOKALNEJ PROWADZI DO ZABURZENIA DYSTRYBUCJI PRZESTRZENNEJ KOLCÓW DENDRYTYCZNYCH

Rozdzielczość standardowego mikroskopu konfokalnego w osi Z (do obiektywu) jest około 3 razy gorsza niż w płaszczyźnie XY. Ponieważ wymiary kolców dendrytycznych są zbliżone do rozdzielczości mikroskopu (rozdzielczość w osiach XY i Z jest odpowiednio równa około 0,25 μm i 0,7 μm , natomiast szerokość główki kolca dendrytycznego ma zazwyczaj wartość 1 μm , a szyjki 0,2–0,6 μm), szczegóły kształtu kolca dendrytycznego zostają utracone w czasie zbierania obrazu. Ponadto rozdzielczość typowego mikroskopu konfokalnego w osi Z jest niewystarczająca do uzyskania obrazów o wysokiej jakości. Zastosowanie mikroskopii superrozdzielczej może rozwiązać ten problem, jednakże konieczność stosowania laserów wysokiej mocy ogranicza użyteczność tej techniki w obrazowaniu przeżyciowym. Postęp w stosowaniu technik superrozdzielczych (NAGERL i współaut. 2008, IZEDDIN i współaut. 2011) daje nadzieję na przezwyciężenie opisanych trudności w przyszłości.

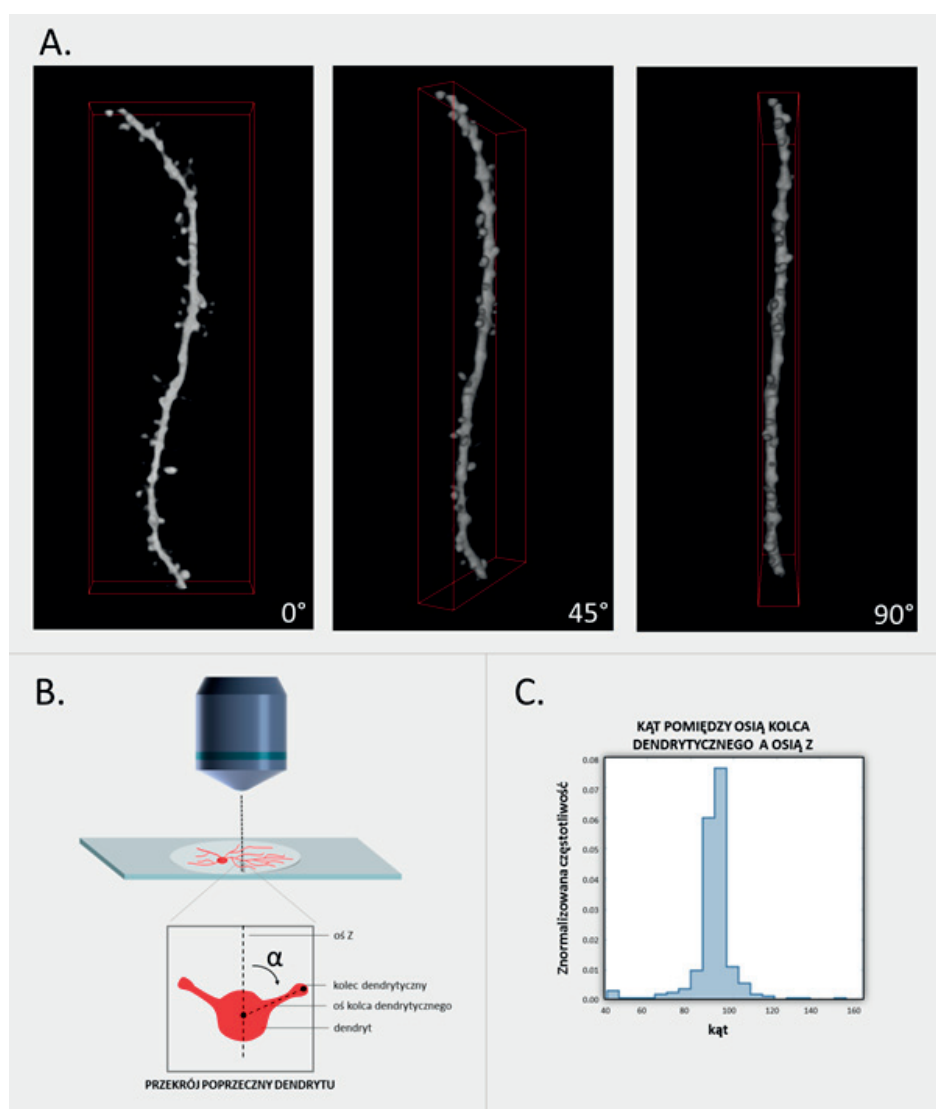
Analiza wzrokowa obrazów zebranych mikroskopem konfokalnym ujawnia dużą anizotropowość dystrybucji kolców dendrytycznych (większość obserwowanych kolców dendrytycznych wystaje w płaszczyźnie XY). Jednym z wytłumaczeń tego zjawiska

jest rozplaszczanie komórki spowodowane hodowlą na szkiełku nakrywkowym (w przypadku obrazowania komórek z hodowli dysocjowanej). Jednakże wspomniana anizotropowość jest również obecna w hodowlach organotypowych, gdzie efekt spłaszczenia jest nieobecny: Ryc. 7 przedstawia projekcje tego samego fragmentu dendrytu w kierunku każdej z 3 osi przestrzennych. Zauważalny jest prawie całkowity brak kolców dendrytycznych w osi Z. W celu kwantyfikacji tego zjawiska wykonaliśmy analizę kąta dystrybucji kolców dendrytycznych (kąt pomiędzy osią kolca dendrytycznego, czyli prostą łączącą wierzchołek z podstawą kolca dendrytycznego na dendrycie, a osią Z). Analiza ta ujawniła, że kąt ten zbliżony jest do 90°. Z tego powodu w pełni trójwymiarowa analiza nie niesie dodatkowych korzyści w porównaniu z analizą dwuwymiarową. W literaturze zauważalna jest preferencja analizy dwuwymiarowej, prawdopodobnie ze względu na wspomniane wcześniej trudności. Zjawisko anizotropii (choć mniejsze niż zaobserwowana przez nas) dystrybucji kąta kolców dendrytycznych zostało też opisane w (RODRIGUEZ i współaut. 2008). Autorzy tej publikacji ustalili, że 65% kolców ma orientację poziomą, 35% natomiast pionową.

WYBÓR REPREZENTATYWNEGO ZESTAWU PARAMETRÓW

Najczęściej badanymi parametrami opisującymi morfologię kolca dendrytycznego jest wielkość główki (szerokość lub pole powierzchni), całkowita powierzchnia kolca, długość kolca i szerokość szyjki kolca dendrytycznego. Wybór tych parametrów podyktowany jest głównie ich intuicyjnością oraz łatwością wykonywania pomiarów. Jednakże precyzyjne zdefiniowanie większości para-

metrów morfologicznych nie jest sprawą trywialną. Na przykład uznanie za długość kolca dendrytycznego odległości w prostej linii główki od podstawy będzie źródłem systematycznych błędów pomiarowych w przypadku zagiętych kolców. Definicja wielkości główki jest również niejednoznaczna, ze względu na jej wysoce nieregularny kształt (gdy kolec dendrytyczny jest niesymetryczny). Gdy już



Ryc. 7. Ograniczona rozdzielczość w osi Z (do obiektywu) mikroskopów konfokalnych prowadzi do dużej anizotropii w rozkładzie kąta dystrybucji kolców dendrytycznych.

A) fragment trójwymiarowej rekonstrukcji dendrytu w 3 różnych orientacjach – kąt 0° odpowiada płaszczyźnie XY. B) pomiar kąta dystrybucji kolca dendrytycznego, C) rozkład wartości kąta dystrybucji kolców dendrytycznych.

uda nam się ustalić zestaw precyzyjnie zdefiniowanych parametrów, napotykamy kolejny problem – jaka liczba parametrów wystarczy, by opisać kształt kolca dendrytycznego.

CEYHAN i współaut. (2007) zaproponowali interesujące podejście. W celu detekcji zmian kształtu kolców dendrytycznych przeprowadzili oni analizę bazującą na Mapowaniu Metryki Dyfeomorficznej Dużych Deformacji (ang. Large Deformation Diffeomorphic Metric Mapping, LDDMM). Rozważali oni następującą sytuację: przyjmijmy istnienie dwóch populacji kolców dendrytycznych, grupy kontrolnej i grupy należącej do osobników chorych. Głównym źródłem obserwowanych

różnic w analizie porównawczej jest rozkład wielkości kolców dendrytycznych. Różnice kształtu kolców pomiędzy osobnikami chorymi i zdrowymi mogą być niewielkie i niknąć w naturalnym zróżnicowaniu wymiarów kolców, gdy analizuje się dowolny jeden z parametrów: długość, pole powierzchni kolca czy wielkość główki. Dopiero kombinacja parametrów opisujących kolec dendrytyczny ujawnia zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych osobników chorych. W celu znalezienia właściwej miary zaproponowano zastosowanie Analizy Głównych Składowych (ang. Principal Component Analysis, PCA). Jest to jedna ze statystycznych metod anali-

zy czynnikowej. Zbiór danych składający się z N obserwacji, z których każda obejmuje K zmiennych, można interpretować jako chmurę N punktów w przestrzeni K -wymiarowej. Celem PCA jest taki obrót układu współrzędnych, aby maksymalizować w pierwszej kolejności wariancję pierwszej współrzędnej, następnie wariancję drugiej współrzędnej, itd. Tak przekształcone wartości współrzędnych nazywane są ładunkami wygenerowanych czynników (składowych głównych). W ten sposób konstruowana jest nowa prze-

strzeń obserwacji, w której najwięcej zmienności wyjaśniają początkowe czynniki; za Wikipedią). Nie było do tej pory systematycznych badań, które wykorzystywałyby to potencjalnie owocne podejście. Wraz z najnowszymi osiągnięciami w dziedzinie obrazowania i technikach segmentacji obrazu wzrosła znacząco ilość danych na temat wpływu różnych czynników na morfologię kolców dendrytycznych. Umożliwiło to zastosowanie Analizy Głównych Składowych w badaniach nad plastycznością synaptyczną.

WYBÓR ODPOWIEDNIEGO ROZMIARU PRÓBY EKSPERYMENTALNEJ I PODEJŚCIA STATYSTYCZNEGO

W większości eksperymentów, w których analizowana jest morfologia kolców dendrytycznych, stosuje się metodologię porównawczą, tzn. morfologia kolców dendrytycznych porównywana jest pomiędzy dwoma lub więcej grupami, np. między osobnikami zdrowymi i chorymi albo pomiędzy komórkami pobudzonymi określonymi związkami chemicznymi i niepobudzonymi. W każdym z tych przypadków stawiane jest następujące pytanie: czy widzimy istotne statystycznie różnice w wartości badanego parametru? Do tej pory nie przyjęto reguł, które pozwalałyby ocenić, czy obserwowane zmiany mają jeszcze charakter funkcjonalny. Biorąc pod uwagę stopień złożoności maszynierii molekularnej zaangażowanej w procesy plastyczności synaptycznej jest to praktycznie niemożliwe. Badanie dużych populacji pozwala zwiększyć szansę na znalezienie statystycznie istotnych różnic, jednakże różnice te mogą stanowić efekty wtórne, artefakty powstałe w czasie procedury eksperymentalnej lub ciąg powiązanych ze sobą procesów. Wiarygodna interpretacja tak subtelnych zmian morfologicznych jest zazwyczaj niemożliwa. Trudność w ustaleniu orientacyjnych zakresów wartości, które pozwalają na interpretację istotnych statystycznie zmian morfologicznych niestety nie pozwala na ustalenie jednolitego standardu.

Inną istotną kwestią jest ustalenie wielkości próbki doświadczalnej pozwalającej osiągnąć istotność statystyczną w sytuacji, gdy obserwujemy faktyczny wpływ danego czynnika na morfologię kolców dendrytycznych. Jeśli próbka jest zbyt mała, analiza danych może nie wykazać zmian określonej wielkości; kształty kolców dendrytycznych są bardzo zróżnicowane, z czego wynika duża

zmienność w obrębie próbki. W celu porażenia sobie z tym problemem przeprowadzono symulacje Monte-Carlo. Wyniki tych symulacji wskazały konieczną liczebność próbek i rozmiar populacji kolców dendrytycznych, które pozwoliłyby uzyskać istotnie statystyczne potwierdzenie wpływu symulowanego czynnika.

Zagadnienie wyboru właściwej wielkości próbki doświadczalnej jest uniwersalne i pojawia się w każdym eksperymencie, w którym oczekuje się osiągnięcia istotności statystycznej w grupie osobników. W przypadku kolców dendrytycznych problem ten jest szczególnie istotny, ze względu na duże zróżnicowanie ich wielkości. Brak ogólnie przyjętych kryteriów może doprowadzić do sytuacji, gdzie wynik doświadczenia (pozytywny lub negatywny) odzwierciedla głównie wielkość badanej próbki. Weźmy na przykład dwóch badaczy zajmujących się wpływem dwóch różnych typów chemicznego pobudzenia neuronów. Załóżmy, że oba typy pobudzenia prowadzą do 10% wzrostu szerokości główek kolców dendrytycznych. Jeśli badacz A użył 15 próbek na grupę, wykryje wpływ pobudzenia z 95% prawdopodobieństwem, stosując test t Studenta z p -wartością 0,05. Badacz B, używając tylko 7 próbek na grupę, ma ponad 50% prawdopodobieństwo, że nie wykryje wpływu pobudzenia, stosując tę samą analizę statystyczną.

Do tej pory najczęściej opisywanymi w literaturze zmianami morfologicznymi były zmiany wielkości główki, a zmienną drugorzędną była długość kolca dendrytycznego. Łatwość rejestracji zmian szerokości główki może być przyczyną tego stanu rzeczy (co zaobserwowano w symulacjach Monte-Carlo (RUSZCZYCKI i współaut. 2012)), ze względu

na brak ogonów w rozkładzie tej zmiennej. Wyniki symulacji wskazują także, że wykrycie zmian w podpopulacji kolców dendrytycznych zależy w istotny sposób od zastosowanego testu: zmiany występujące w licznych małych kolcach dendrytycznych są znacznie prostsze do wykrycia poprzez porównywanie rozkładu wielkości kolców dendrytycznych przy pomocy testu Kolmogorova-Smirnova niż testu t Studenta czy testu u , które za argumenty biorą średnie wartości zmiennej obliczone dla każdego osobnika lub komórki. Przeciwna sytuacja ma miejsce, gdy zmiany

ograniczone są do podpopulacji niewielu dużych kolców dendrytycznych.

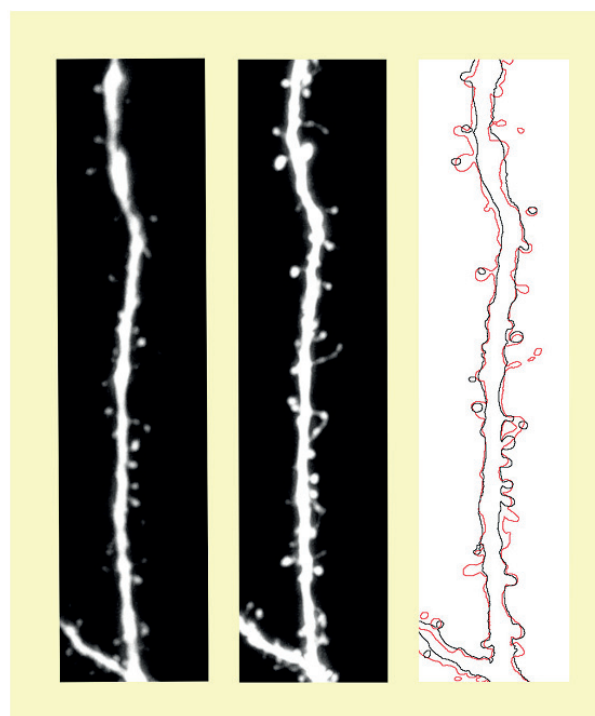
Powszechnie stosowanym sposobem klasyfikacji kolców dendrytycznych jest ich podział na kilka klas takich jak filopodia, kolce krótkie i grube, grzybkowate oraz cienkie. Morfologiczny rozkład wielkości kolców dendrytycznych może być opisany ułamkami kolców należących do każdej z tych klas, jednakże symulacje Monte-Carlo wskazują, że analiza zmian parametrów morfologicznych jest czulsza niż porównywanie liczebności klas pomiędzy badanymi grupami.

OBRAZOWANIE PRZEŻYCIOWE

Główną zaletą obrazowania przeżyciowego, z punktu widzenia statystyki, jest wyeliminowanie wpływu zróżnicowania wynikającego z różnorodności morfologii kolców dendrytycznych. Porównując zmiany morfologiczne tych samych kolców obserwowanych w różnych momentach, można oczekiwać wzrostu czułości, kosztem jednak dodatkowych trudności technicznych. Pierwszą z nich jest identyfikacja tego samego kolca dendrytycznego na dwóch kolejnych obrazach. Jeśli oba obrazy zebrano wkrótce po sobie (odstęp rzędu minut) i pobudzenie neuronów nie daje dużego efektu, będzie to proste. Jednak, gdy obrazy zebrano w dużym odstępie czasu, część kolców dendrytycznych może zniknąć, nowe kolce się pojawią, a utrzymujące się kolce zmienią kształt i orientację. Identyfikacja tego samego kolca dendrytycznego może w tej sytuacji nie być trywialna (Ryc. 8). Ponadto, zmiana orientacji kolców może skutkować dodatkowymi artefaktami, jeśli badane są dwuwymiarowe projekcje – niemożliwe jest wtedy rozróżnienie zmiany długości kolca dendrytycznego od zmiany jego orientacji. Analiza obrazów trójwymiarowych pozwala na to rozróżnienie, jednakże rolę zaczyna odgrywać wtedy zróżnicowana rozdzielczość mikroskopu w różnych osiach, która prowadzi do pozornych zmian morfologii przy zmianie orientacji kolca dendrytycznego (bez zmiany kształtu). Dlatego też przy w pełni trójwymiarowej analizie morfometrycznej konieczna jest ocena i uwzględnienie wpływu rozdzielczości mikroskopu.

W artykule Sona i współaut. (SON i współaut. 2011) zaprezentowano metodę śledzenia zmian kolców dendrytycznych w szeregu obrazów dwuwymiarowych zebranych w czasie.

Metoda ta polega głównie na wykrywaniu konturów kolca dendrytycznego z użyciem modelu aktywnych konturów wykorzystującego linie geodezyjne (ang. geodesic active contour model), uzupełnionego o algorytm wododziałowy (ang. watershed algorithm; każdy obraz zapisany w stopniach szarości można interpretować jako mapę topograficzną; analogicznie do pojęcia hydrologicznego algorytm wododziałowy



Ryc. 8. Przeżyciowe obrazowanie dendrytu pierwszorzędowego w czasie.

Lewy panel: przed pobudzeniem z zastosowaniem protokołu chemicznego LTP. Środkowy panel: 40 minut po pobudzeniu zgodnie z protokołem chemicznego LTP. Prawy panel: porównanie konturów przed i po pobudzeniu.

wy pozwala ustalić granice zlewni w obrębie obrazu, tzn. wyznaczyć granice regionów obrazu, w których osiągnięte jest minimum lokalne).

Śledzenie zmian między dwoma kolejnymi obrazami w serii czasowej przeprowadza się po wykryciu kolców dendrytycznych.

ILOŚCIOWA ANALIZA ARCHITEKTURY JĄDER KOMÓRKOWYCH NEURONÓW

Głównym wyzwaniem analizy architektury jądra komórkowego jest jego właściwa segmentacja, konieczna do rekonstrukcji otoczki jądrowej, a także wyróżnienia obiektów wewnątrz jądra komórkowego. W obrazach tkanki mózgowej jądra komórkowe są rozmieszczone bardzo blisko siebie i często pozornie się nakładają, co wprowadza dodatkową trudność na etapie segmentacji. Tradycyjnie stosowany algorytm wododziału jest zawodny i może prowadzić do dużej liczby błędnie przeanalizowanych jąder komórkowych. By poradzić sobie z tym problemem, opracowaliśmy algorytm, który rozpoczyna segmentację na tym przekroju optycznym, gdzie jest duża szansa, że analizowane jądro komórkowe będzie dobrze oddzielone od pozostałych. Przy przejściu do kolejnych przekrojów

optycznych wykorzystujemy fakt ciągłości powierzchni jądra komórkowego. Warunek ciągłości jest pomocny w analizie tych przekrojów optycznych, gdzie jądra komórkowe nie są już dobrze oddzielone od swoich sąsiadów. Przykład poprawnie zrekonstruowanego jądra komórkowego znajduje się na Ryc. 2.

PODZIEKOWANIA

Podziękowania: Autorzy dziękują Ani Wilczyńskiej za pomoc w przygotowaniu Ryc. 1 i Marcelinie Hajnrych za analizę obrazów. Artykuł ten powstał dzięki pomocy Narodowego Centrum Nauki Dec-2011/01/D/NZ3/00163, 7873/B/P01/2011/40 i Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego POIG 01.01.02-00-008/08.

ILOŚCIOWA ANALIZA OBRAZU W BADANIACH STRUKTURALNEJ PLASTYCZNOŚCI SYNAPTYCZNEJ

Streszczenie

Analiza obrazów mikroskopowych odgrywa obecnie dominującą rolę w badaniach nad strukturą mózgu. Wgląd w strukturalną plastyczność synaptyczną może być kluczem do zrozumienia podstaw wielu zaburzeń neurodegeneracyjnych. Prawie w każdym eksperymencie niezbędna jest ilościowa analiza obrazów tkanki mózgowej, wymagająca często

wyspecjalizowanego oprogramowania komputerowego ze względu na złożoność struktur analizowanych obrazów. W niniejszym tekście dokonamy przeglądu najważniejszych problemów towarzyszących analizie obrazów zebranych mikroskopem konfokalnym. Każdy z tych problemów wymaga zastosowania dedykowanych algorytmów.

QUANTITATIVE IMAGE ANALYSIS IN THE STRUCTURAL SYNAPTIC PLASTICITY STUDIES

Summary

The analysis of confocal microscopy images has started to play a significant role in the brain structure analysis. An insight into structural synaptic plasticity may be the key to elucidate the molecular basis of many neurodegenerative disorders. Almost every experiment demands a quantitative analysis of

brain tissue images, which requires specialized software able to cope with the structural complexity of the data. In the following text we will review common issues arising while performing the confocal image analysis and dedicated algorithms designed to overcome those problems.

LITERATURA

ALEXANDER S. P. H., 2009. *Glutamate*. [W:] *Encyclopedia of neuroscience*. LARRY R. S. (red.). Academic Press, Oxford.

ANDRULIS E. D., NEIMAN A. M., ZAPPULLA D. C., STERNGLANZ R., 1998. *Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing*. Nature 394, 592-595.

BAILEY C. H., KANDEL E. R., 1993. *Structural changes accompanying memory storage*. Ann. Rev. Physiol. 55, 397-426.

BROWN J. M., GREEN J., DAS NEVES R. P., WALLACE H. A., SMITH A. J., HUGHES J., GRAY N., TAYLOR S., WOOD W. G., HIGGS D. R., IBORRA F. J., BUCKLE V. J., 2008. *Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by*

- chromatin environment*. J. Cell Biol. 182, 1083–1097.
- CEYHAN E., ÖLKEN R. Ç., FONG L., TASKY T. N., HURDAL M. K., BEG M. F., MARTONE M. E., RATNANATHER J. T., 2007. *Modeling metric distances of dendrite spines of mice based on morphometric measures*. Int. Symp. Health Informat. Bioinformat.
- COHEN S., GREENBERG M. E., 2008. *Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease*. Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 24, 183–209.
- CREMER T., CREMER M., 2010. *Chromosome territories*. Cold Spring Harbor Perspect. Biol. 2, doi: 10.1101/cshperspect.a003889.
- DAILEY M. E., SMITH S. J., 1996. *The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices*. J. Neurosci. 16, 2983–2994.
- DUNDR M., OSPINA J. K., SUNG M. H., JOHN S., UPENDER M., RIED, T., HAGER G. L., MATERA A. G., 2007. *Actin-dependent intranuclear repositioning of an active gene locus in vivo*. J. Cell Biol. 179, 1095–1103.
- FIALA J. C., FEINBERG M., POPOV V., HARRIS K. M., 1998. *Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1*. J. Neurosci. 18, 8900–8911.
- GRUTZENDLER J., KASTHURI N., GAN W. B., 2002. *Long-term dendritic spine stability in the adult cortex*. Nature 420, 812–816.
- HARRIS K. M., WEINBERG R. J., 2012. *Ultrastructure of synapses in the mammalian brain*. Cold Spring Harbor Perspect. Biol. 4, doi: 10.1101/cshperspect.a005587.
- HERING H., SHENG M., 2001. *Dendritic spines: structure, dynamics and regulation*. Nature Rev. Neurosci. 2, 880–888.
- HOFER S. B., BONHOEFFER T., 2010. *Dendritic spines: the stuff that memories are made of?* Current Biol., CB 20, R157–R159.
- HOLTMAAT A., SVOBODA K., 2009. *Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain*. Nature Rev. Neuroscience 10, 647–658.
- HOLTMAAT A. J., TRACHTENBERG J. T., WILBRECHT L., SHEPHERD G. M., ZHANG X., KNOTT G. W., SVOBODA K., 2005. *Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo*. Neuron 45, 279–291.
- HOSOKAWA T., RUSAKOV D. A., BLISS T. V., FINE A., 1995. *Repeated confocal imaging of individual dendritic spines in the living hippocampal slice: evidence for changes in length and orientation associated with chemically induced LTP*. J. Neurosci. 15, 5560–5573.
- HUNG A. Y., FUTAI K., SALA C., VALTSCHANOFF J. G., RYU J., WOODWORTH M. A., KIDD F. L., SUNG C. C., MIYAKAWA T., BEAR M. F., WEINBERG R. J., SHENG M., 2008. *Smaller dendritic spines, weaker synaptic transmission, but enhanced spatial learning in mice lacking Shank1*. J. Neurosci. 28, 1697–1708.
- IZEDDIN I., SPECHT C. G., LELEK M., DARZACQ X., TRILLER A., ZIMMER C., DAHAN M., 2011. *Super-resolution dynamic imaging of dendritic spines using a low-affinity photoconvertible actin probe*. PLoS ONE 6, e15611.
- KASAI H., FUKUDA M., WATANABE S., HAYASHI-TAKAGI A., NOGUCHI J., 2010. *Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition*. Trends Neurosci. 33, 121–129.
- KASAI H., MATSUZAKI M., NOGUCHI J., YASUMATSU N., NAKAHARA H., 2003. *Structure-stability-function relationships of dendritic spines*. Trends Neurosci. 26, 360–368.
- KOH I. Y., LINDQUIST W. B., ZITO K., NIMCHINSKY E. A., SVOBODA K., 2002. *An image analysis algorithm for dendritic spines*. Neural Computation 14, 1283–1310.
- KORKOTIAN E., SEGAL M., 1999. *Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 12068–12072.
- KORKOTIAN E., SEGAL M., 2001. *Regulation of dendritic spine motility in cultured hippocampal neurons*. J. Neurosci. 21, 6115–6124.
- LÜSCHER C., FRERKING M., 2009. *Long-Term Depression (LTD): Metabotropic glutamate receptor (mGluR) and NMDAR-dependent forms*. [W:] *Encyclopedia of neuroscience*. LARRY R. S. (red.). Academic Press, Oxford.
- MATSUZAKI M., HONKURA N., ELLIS-DAVIES G. C., KASAI H., 2004. *Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines*. Nature 429, 761–766.
- MCKINNEY R. A., THOMPSON S. M., 2009. *Glutamate regulation of dendritic spine form and function*. [W:] *Encyclopedia of neuroscience*. LARRY R. S. (red.). Academic Press, Oxford.
- MICHALUK P., WAWRZYNIAK M., ALOT P., SZCZOT M., WYREMBEK P., MERCIK K., MEDVEDEV N., WILCZEK E., DE ROO M., ZUSCHRATTER W., MULLER D., WILCZYNSKI G. M., MOZRZYMAS J. W., STEWART M. G., KACZMAREK L., WŁODARCZYK J., 2011. *Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology*. J. Cell Sci. 124, 3369–3380.
- MONNERON A., BERNHARD W., 1969. *Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells*. J. Ultrastr. Res. 27, 266–288.
- NAGERL U. V., WILLIG K. I., HEIN B., HELL S. W., BONHOEFFER T., 2008. *Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 18982–18987.
- NEVES G., COOKE S. F., BLISS T. V., 2008. *Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality*. Nature Rev. Neurosci. 9, 65–75.
- NIMCHINSKY E. A., SABATINI B. L., SVOBODA K., 2002. *Structure and function of dendritic spines*. Ann. Rev. Physiol. 64, 313–353.
- ORAY S., MAJEWSKA A., SUR, M., 2006. *Effects of synaptic activity on dendritic spine motility of developing cortical layer v pyramidal neurons*. Cerebral Cortex 16, 730–741.
- RODRIGUEZ A., EHLENBERGER D. B., DICKSTEIN D. L., HOF P. R., WEARNE S. L., 2008. *Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images*. PLoS ONE 3, e1997.
- RUSZCZYCKI B., SZEPESI Z., WILCZYNSKI G. M., BIJATA M., KALITA K., KACZMAREK L., WŁODARCZYK J., 2012. *Sampling issues in quantitative analysis of dendritic spines morphology*. BMC Bioinform. 13, 213.
- SALA C., PIECH V., WILSON N. R., PASSAFARO M., LIU G., SHENG M., 2001. *Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer*. Neuron 31, 115–130.
- SEGAL M., 2010. *Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability*. Europ. J. Neurosci. 31, 2178–2184.
- SON J., SONG S., LEE S., CHANG S., KIM M., 2011. *Morphological change tracking of dendritic spines based on structural features*. J. Microscopy 241, 261–272.
- SORRA K. E., HARRIS K. M., 2000. *Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines*. Hippocampus 10, 501–511.
- SWEATT J. D., 2009a. *Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system*. Biological psychiatry 65, 191–197.

- SWEATT J. D. 2009b. *Long-term potentiation (LTP)*. [W:] *Encyclopedia of neuroscience*. LARRY R. S. (red.). Academic Press, Oxford.
- URDINGUIO R. G., SANCHEZ-MUT J. V., ESTELLER M., 2009. *Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies*. *Lancet Neurol.* 8, 1056–1072.
- VILLAGRA N. T., BENGOCHEA R., VAQUE J. P., LLORCA J., BERCIANO M. T., LAFARGA M., 2008. *Nuclear compartmentalization and dynamics of the poly(A)-binding protein nuclear 1 (PABPN1) inclusions in supraoptic neurons under physiological and osmotic stress conditions*. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 622–633.
- WALCZAK A., SZCZEPANKIEWICZ A. A., RUSZCZYCKI B., MAGALSKA A., ZAMLYNSKA K., DZWONEK J., WILCZEK E., ZYBURA-BRODA K., RYLSKI M., MALINOWSKA M., DABROWSKI M., SZCZEPINSKA T., PAWLOWSKI K., PYSKATY M., WŁODARCZYK J., SZCZERBAL I., SWITONSKI M., CREMER M., WILCZYNSKI G. M., 2013. *Novel higher-order epigenetic regulation of the Bdnf gene upon seizures*. *J. Neurosci.* 33, 2507–2511.
- XU T., YU X., PERLIK A. J., TOBIN W. F., ZWEIG J. A., TENNANT K., JONES T., ZUO Y., 2009. *Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories*. *Nature* 462, 915–919.
- YAMADA S., NELSON W. J., 2007. *Synapses: sites of cell recognition, adhesion, and functional specification*. *Ann. Rev. Biochem.* 76, 267–294.
- YANG G., PAN F., GAN W. B., 2009. *Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories*. *Nature* 462, 920–924.
- YASUMATSU N., MATSUZAKI M., MIYAZAKI T., NOGUCHI J., KASAI H., 2008. *Principles of long-term dynamics of dendritic spines*. *J. Neurosci.* 28, 13592–13608.
- YUSTE R., BONHOEFFER T., 2001. *Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity*. *Ann. Rev. Neurosci.* 24, 1071–1089.
- YUSTE R., DENK W., 1995. *Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration*. *Nature* 375, 682–684.
- ZIV N. E., SMITH S. J., 1996. *Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation*. *Neuron* 17, 91–102.