

МИКРОСКОПИЯ РЕТРОГРАДНО МЕЧЕННЫХ ФЛЮОРОХРОМАМИ НЕЙРОНОВ В ТОНКИХ СРЕЗАХ МОЗГА

Новые направления в развитии современных нейроанатомических исследований связаны с внедрением методов прослеживания связей в мозге, основанных на аксонном транспорте веществ [6, 8]. Совершенствование этих методов привело к широкому использованию в качестве маркеров транспортно-специфичных люминесцентных красителей [5, 7]. Опубликованы первые результаты исследований дивергенции аксонных коллатералей в мозге с помощью двойного и тройного ретроградного мечения нейронов люминесцентными красителями. В ходе таких исследований было установлено, что люминесцентные красители (примулин, прочный голубой⁺, ядерный жёлтый⁺⁺, бисбензимида⁺⁺⁺, голубой Эванса⁺⁺⁺⁺) как маркеры являются более специфичными и чувствительными для ретроградного транспорта по сравнению с пероксидазой хрена [2, 3]. Общепринятая техника исследования меченных флюорохромами нейронов сводится к инъектированию в мозг красителей, перфузии животного формалином, изготовлению на замораживающем микротоме срезов мозга толщиной 25—60 мкм и анализу высушенных на предметных стеклах срезов в люминесцентном микроскопе [1, 5, 7].

В этой работе приводится описание метода с использованием известных люминесцентных красителей, когда наблюдение меченных флюорохромами нейронов проводится в очень тонких срезах мозга; толщина срезов составляет 1—10 мкм. Большинство рекомендаций разработано нами в процессе исследования локализации мезэнцефалических источников волоконных систем в неостриатум у крыс [1]. В данных исследованиях животным инъектировали в неостриатум 0,1—1,0 мкл 10 % водного раствора примулина или голубого Эванса и 1 % водного раствора бисбензимида. В некоторых случаях в мозг животных инъектировали следующие пары красителей: 10 % водный раствор примулина и 3 % водный раствор прочного голубого или 10 % водный раствор голубого Эванса и 1 % водный раствор ядерного желтого. При добавлении в водные растворы красителей 2 % диметилсульфоксида (ДМСО) наблюдался более эффективный их захват и ретроградный транспорт. Время, в течение которого животных выдерживали после микроинъекций в неостриатум прочного голубого, примулина или голубого Эванса, составляло 2—6 дней, а для бисбензимида и ядерного желтого — 1 день. Время переживания животных после микроинъекций зависит не только от скорости ретроградного аксонного транспорта комплекса красителя с цитоплазматическими или ядерными компонентами нейронов, но и от степени связывания самих красителей [4]. При длительных сроках удерживания красителей в клетках это время можно удлинить и получить за счет этого более интенсивное свечение меченных флюорохромами нейронов.

Перфузия животных проводилась под глубоким нембуталовым наркозом вначале физиологическим раствором с добавлением сосудо-

⁺ DC 253/50, University in Erlangen (Dr. Ilting), GER.
⁺⁺ S 769121 Hoechst Co., Frankfurt (Dr. Loewe), GFR.
⁺⁺⁺ 33258 Hoechst, Serva, Heidelberg, GFR.
⁺⁺⁺⁺ Evans Blue, Sigma, USA.

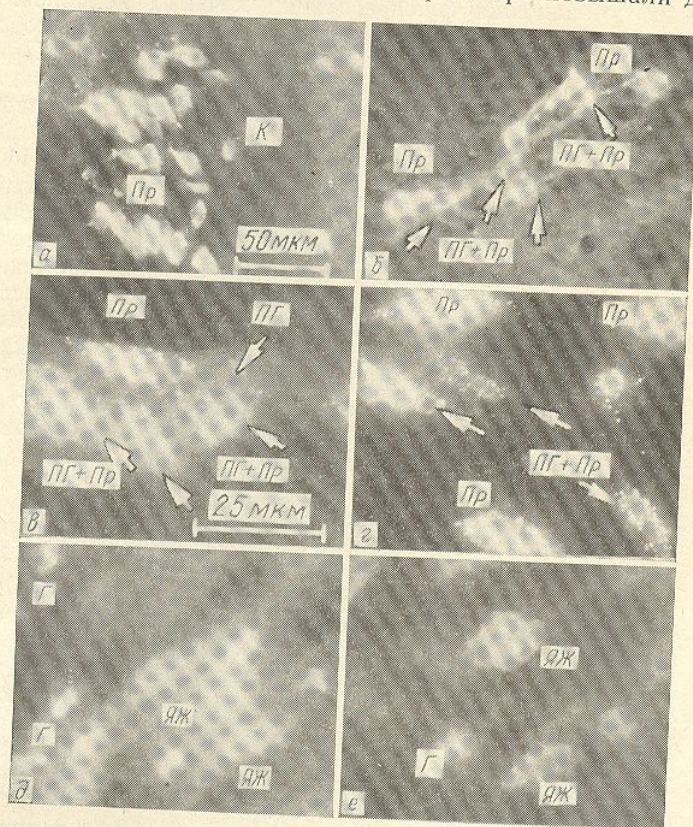
расширяющих средств охлажденным до 4 °С в фосфатном буфере, 0,01 М. Для крыс объем составляло 30 мин. Пошли на блоки толщиной 1 мм на холоду при потрату сахарозы в это



Меченные примулином, прочным голубым (Пр) и голубым Эванса (ПГ+Пр) нейроны (ПГ+Пр); б, в — меченные ядрами глиальных клеток

Метод быстрой заморозки:
1) отмывка от фиксатора в фосфатном буфере кусочков в 50 ° спирте, добавляли 10 % сахарозы, 70 ° спирте, разведенном 10 % сахарозы (4 °С) — 2 ч, разведенном на фосфатном буфере (комнатная температура) в 96 ° спирте — 2 ч; 2) промывка в 100 % спирте — 20 мин; 3) просветления; 4) промывка в соотношениях 2:1, 3:1, 4:1 в каждой порции рафина (57 °С) — 2 ч (с расплавленным парафином)

расширяющих средств, затем физиологический раствор заменяли охлажденным до 4 °С фиксатором (6 % раствор параформальдегида на фосфатном буфере, 0,07 М рН 7,2), в который добавляли 5 % сахарозы. Для крыс объем фиксатора равнялся 0,6 л, а время перфузии составляло 30 мин. После перфузии мозг немедленно извлекали и резали на блоки толщиной 3—4 мм, которые дополнительно фиксировались на холоду при постоянном перемешивании в течение 2 ч. Концентрацию сахарозы в этом фиксирующем растворе повышали до 10 %.



Меченные примулином, прочным голубым и ядерным желтым нейроны черной субстанции у крысы после микроинъекций красителей в неостриатум.

а — меченные примулином (Пр) нейроны вблизи капилляра (К); б — меченные примулином и прочным голубым (ПГ) нейроны, стрелкой показаны клетки с двойной флуоресцентной меткой (ПГ+Пр); в, г — меченные примулином и прочным голубым нейроны, стрелкой показаны клетки с двойной флуоресцентной меткой (ПГ+Пр); д, е — меченные ядерным желтым (ЯЖ) нейроны, наблюдается флуоресценция ядер глияльных клеток (Г). Масштаб 50 мкм (а, б) и 25 мкм (в—е).

Метод быстрой заливки в парафин проведен по следующей схеме: 1) отмывка от фиксатора кусочков мозга в 10 % растворе сахарозы на фосфатном буфере при температуре 4 °С — 2 ч; 2) обезвоживание кусочков в 50° спирте, разведенном на фосфатном буфере, в который добавляли 10 % сахарозы (4 °С) — 1 ч; 3) обезвоживание кусочков в 70° спирте, разведенном на фосфатном буфере, в который добавляли 10 % сахарозы (4 °С) — 12 ч; 4) обезвоживание кусочков в 80° спирте, разведенном на фосфатном буфере, в который добавляли 10 % сахарозы (комнатная температура) — 30 мин; 5) обезвоживание кусочков в 96° спирте — 20 мин; 6) обезвоживание кусочков в абсолютном спирте — 20 мин; 7) пропитка кусочков в толуоле — 20 мин (до просветления); 8) пропитка кусочков в смеси толуола с парафином в соотношениях 2:1, 1:1, 1:2 при температуре 37 °С — 1,5 ч (по 30 мин в каждой порции); 9) пропитка кусочков в расплавленном парафине (57 °С) — 2 ч (одна смена через 1 ч); 10) заливка кусочков в расплавленный парафин (57 °С).

После быстрого охлаждения парафиновые блоки хранятся до резки в холодильнике. Их резку можно производить как с помощью стальных микротомных ножей, так и с помощью стеклянных ножей. Высушенные на предметных стеклах срезы переносят на несколько минут для отмывки от сахарозы в 96° спирт, а затем для освобождения от парафина в толуол; срезы заключали под покровными стеклами в слабо флюоресцирующую эпоксидную смолу (эпон 812). Такие срезы могли храниться в холодильнике при температуре 4°С до 1 года без заметного уменьшения флюоресценции меченых нейронов.

На рисунке приведены микрофотографии меченных флюорохромами нейронов в черной субстанции среднего мозга крыс. Примулин, прочный голубой накапливается исключительно в цитоплазме клеток. В окрашенных прочным голубым нейронах наблюдалась диффузная зеленая флюоресценция цитоплазмы. В некоторых случаях в цитоплазме отмечалось серебристо-голубое свечение мелких гранул. Меченные примулином нейроны четко выделялись по якому свечению золотистых гранул (рисунок, в, г). При совместной метке нейронов прочным голубым и примулином наблюдалась яркая люминесценция мелких золотистых гранул на фоне слабого диффузного зеленого свечения цитоплазмы (рисунок, б—г). Отростки метились на коротких расстояниях от тела клетки. Специфичные к связыванию с аденин-тиминовыми структурными элементами дезоксирибонуклеиновой кислоты, бисбензимидаз и ядерный желтый метят преимущественно ядра клеток [4]. При удлинении сроков выдерживания животных после микроинъекций этих красителей в срезах мозга наблюдалось яркое свечение ядер глиальных клеток, окружающих меченные флюорохромами нейроны (рисунок, д, е).

В тонких срезах мозга ретроградно меченные флюорохромами нейроны легко выявлялись в люминесцентном микроскопе при длине волны возбуждающего света 360—400 нм (фильтры ФС-1, СС-15-2), использовался желтый запирающий светофильтр (ЖС-3). При больших увеличениях срезы изучали под люминесцентным микроскопом в режиме падающего света, и применяли нефлюоресцирующее масло. При малых увеличениях меченные нейроны наблюдали в режиме люминесценции в темном поле, при освещении сине-фиолетовым светом. В этом случае можно воспользоваться конденсором темного поля для больших увеличений и при наличии люминесцентного осветителя наблюдать и фотографировать меченные нейроны с помощью простого оптического микроскопа (рисунок, а, б).

В тонких срезах мозга (1—5 мкм), которые легко получить с помощью стеклянных ножей на ультрамикротоме, значительно улучшается идентификация меченных флюорохромами нейронов, так как снижается уровень флюоресценции фона и увеличивается разрешение структур. Необходимо отметить, что быстрая заливка кусочков мозга в парафин не снижает яркости свечения меченных флюорохромами нейронов. В то же время открывается возможность длительно (до 1 года) хранить заключенные в парафин блоки, получать серийные и очень тонкие срезы мозга, исключается ряд трудоемких подготовительных операций, связанных с приготовлением замороженных срезов.

Список литературы

1. Майский В. А., Кебало Т. Г., Савоскина Л. А., Кузовкова С. Д. Исследование методом двойной флюоресцентной метки локализации мезэнцефалических нейронов, проецирующихся в неостриатум.— Докл. АН СССР, 1981, 259, № 5, с. 1230—1232.
2. Серков Ф. Н., Олешко Н. Н., Майский В. А. Прямые неостриато-кортикальные связи мозга кошки, выявленные методом ретроградного аксонного транспорта флюорохромов.— Там же, 1984, 278, № 5, с. 1265—1268.
3. Aschoff A., Holländer H. Fluorescent compounds as retrograde tracers compared with horseradish peroxidase (HRP). I. A. parametric study in the central visual system of albino rat.— J. Neurosci. Meth., 1982, 6, N 2, p. 179—197.

4. Bentivoglio M., Kuypers H. G. J. M. Fluorescent retrograde neuroanatomical labeling by means of bisbenzimidazole dyes to prevent diffusion.— J. Neurosci. Lett., 1980, 18, N 1, p. 25—27.
5. Bentivoglio M., Kuypers H. G. J. M. Fluorescent retrograde neuroanatomical labeling by means of bisbenzimidazole dyes to prevent diffusion.— Ibid., 1980, 18, N 1, p. 25—27.
6. Kristensson K., Olsson K.-E. Fluorescent retrograde neuroanatomical labeling by means of bisbenzimidazole dyes to prevent diffusion.— Ibid., 1980, 18, N 1, p. 25—27.
7. Kuypers H. G. J. M., Catlow D. C. Fluorescent retrograde neuroanatomical labeling by means of bisbenzimidazole dyes to prevent diffusion.— Ibid., 1980, 18, N 1, p. 25—27.
8. La Vail J. H., La Vail J. H. Fluorescent retrograde neuroanatomical labeling by means of bisbenzimidazole dyes to prevent diffusion.— Science, 1972, 176, p. 127—135.

Ин-т физиологии им. А. А. БРЮХОВИЧА
АН УССР, Киев

УДК 577.15.154.4.082

ФОТОЭЛЕКТРООПРЕДЕЛЕНИЯ ГИДРОКСИДОВ

Активность карбонильных телем состояния газообразного вещества. Карбонидрида нервной системы, пищеварения нешироко из-за мн. Важнейшими из них являются по времени (в секундах) смеси при колориметрической установке в электроде.

Принцип метода. В скрининг принцип определения углекислотного рН, а следовательно, и 4]. Но переходная точка с помощью фотоэлектродных и опытные параметры фотоэлектроколовую трубку, регулятор, диционных условиях и пользоваться выдыхаемым ≈5,5 % углекислого газа элементы определения авторами [1, 2, 4, 5, 9].

Реактивы: 1) индикатором опыта. К 99,5 мл 0,1% спиртового раствора феррихлорида буре (тетраборат на 20,0 мл борной кислоты хранить в холодильнике СО₂ в азоте) в газовом присутствии баллонного газларным» воздухом, содействующим.

Оборудование и процедура. 2) секундомер; 3) газовый (те) с регулятором расхода