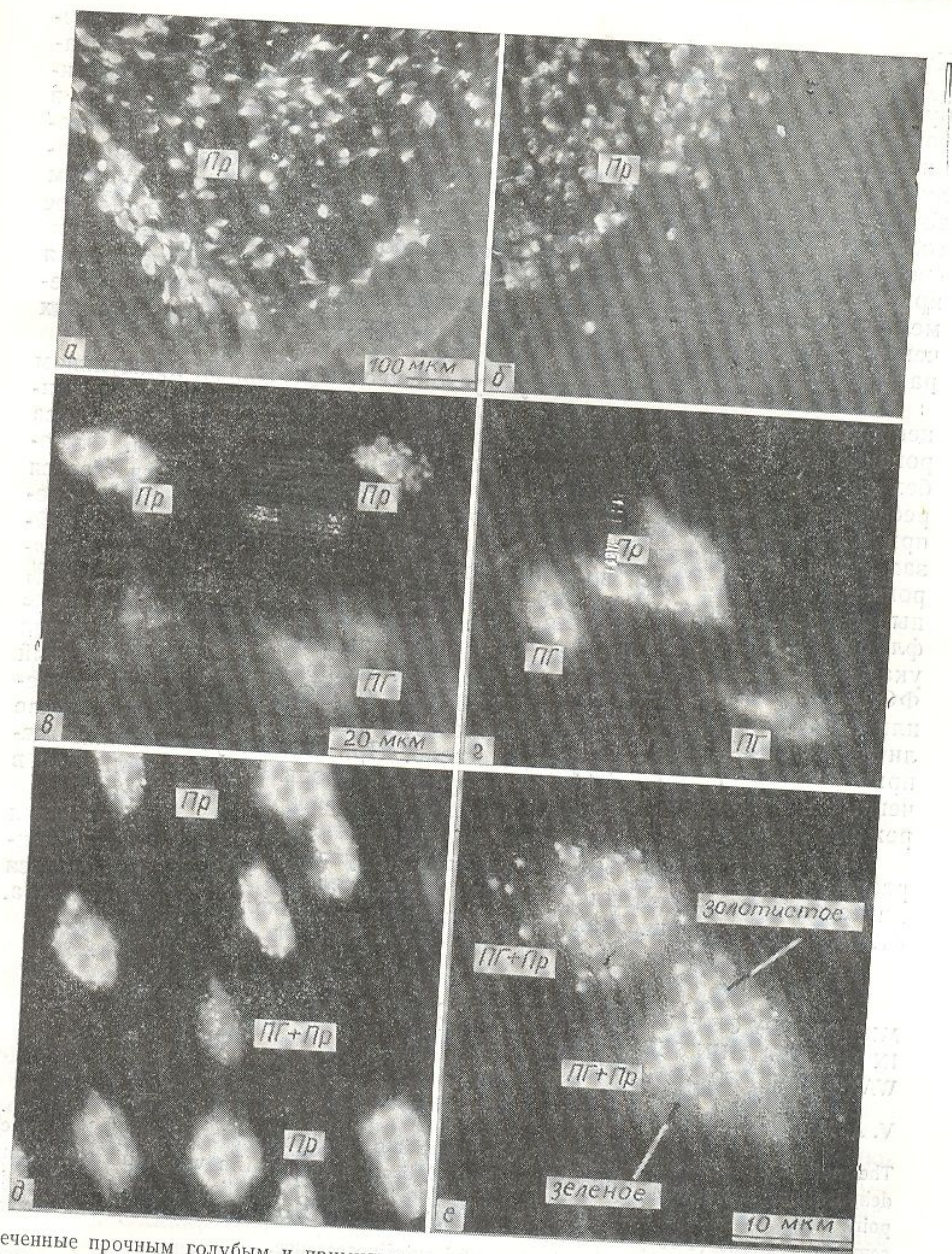




Меченные прочным голубым и примулином нейроны черной субстанции (а, в, е), миндалевидного комплекса (б), коры (д) и трансплантата (е) у крысы после микроинъекций флюорохромов в верхнее двухолмие и неостриатум. В нейронах с двойной меткой — меченных прочным голубым и примулином (ПГ+Пр) — наблюдается яркая люминесценция золотистых гранул на фоне диффузного зеленого свечения цитоплазмы (д, е). Трансплантированный кусочек темной коры эмбрионов, локализован в области бокового желудочка взрослой крысы. Масштаб 100 мкм (а, б), 20 мкм (в—д) и 10 мкм (е).

затем на 6 мин для освобождения от парафина в толуол; срезы заключают под покровными стеклами в слабо флюоресцирующее масло или эпоксидную смолу (эпон 812). Срезы также могут длительное время (до 1 г) храниться в холодильнике при температуре 4 °С без заметного уменьшения свечения флюорохромов или усиления автофлюоресценции фона.

На рисунке, а—е приведены микрофотографии меченных флюорохромами нейронов в черной субстанции, миндалине и коре мозга крыс.



Примулин и прочный голубой — цитоплазматические красители, поэтому свечения флюорохромов при ретроградном мечении нейронов, обнаруживаются исключительно в цитоплазме клеток. Меченные примулином нейроны четко выделяются ярким свечением золотистых гранул в цитоплазме (см. рисунок, а, б). В ретроградно меченных прочным голубым нейронах наблюдается диффузная зеленая флюоресценция цитоплазмы (см. рисунок, в, г). У небольшого числа меченных прочным голубым нейронов в цитоплазме отмечается также серебристо-голубое свечение мелких гранул. При двойном ретроградном мечении нейронов примулином и прочным голубым наблюдается яркая люминесценция мелких золотистых гранул на фоне слабого диффузного зеленого свечения цитоплазмы (см. рисунок, д, е). Отростки метятся на коротких расстояниях от тела клетки.

Необходимо отметить высокую устойчивость меченных примулином нейронов при ультрафиолетовом облучении. Наблюдение и фотографирование меченных примулином нейронов можно проводить более часа без заметного снижения яркости свечения золотистых гранул. Флюоресценция меченных прочным голубым нейронов заметно снижается при ультрафиолетовом облучении уже через 5 мин. В полутонких срезах мозга ретроградно меченные примулином и прочным голубым нейроны легко выявляются в люминесцентном микроскопе при длине волны возбуждающего света 340—460 нм. Для возбуждения 90—100 % флюоресценции красителей [8] сине-фиолетовыми лучами в диапазоне указанных волн использовались возбуждающие светофильтры типа ФС-1 или СС-15-2 (BG 3/4, BG 12/2), а запирающими были желтый или оранжевый светофильтры ЖС-3 (GG 9, OG1). При больших увеличениях срезы изучаются в режиме падающего света, в этом случае применяют нефлюоресцирующее масло. При малых увеличениях меченные примулином и прочным голубым нейроны можно наблюдать в режиме люминесценции в темном поле.

При заливке ткани в мягкий парафин значительно улучшается разрешение структур, наблюдаемых в полутонких срезах мозга; усиливается флюоресценция меченных красителями клеток, повышается отношение: специфическая флюоресценция — автофлюоресценция фона.

#### MICROSCOPY OF FLUORESCENT RETROGRADE-LABELLED NEURONS IN THE SEMITHIN SECTIONS OF PARAFFIN WAX-EMBEDDED BRAIN TISSUE

V. A. Maisky, N. Z. Doroshenko, V. N. Kleshchinov

The method of rapid embedding of brain tissue into paraffin wax is described. It includes dehydration, impregnation and embedding of tissue into paraffin wax with congealing point at 49 °C. Such a tissue preparation results in better resolution of the structures in semithin sections (1-10 μm) due to enhanced fluorescence of labeled neurons and increased ratio of specific fluorescence-background autofluorescence.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

1. Майский В. А., Кузовкова С. Д. Микроскопия ретроградно меченных флюорохромами нейронов в тонких срезах мозга // Физиол. журн.—1985.—31, № 4.—С. 500—503.
2. Albanese A., Bentivoglio M. Retrograde fluorescent neuronal tracing combined with acetylcholinesterase histochemistry // J. Neurosci. Meth.—1982.—6, N 2.—P. 121—127.
3. Bentivoglio M., Kuypers H. G. J. M., Catsman-Berrevoets C. E. Retrograde neuronal labeling by means of bisbenzimidazole and nuclear yellow (Hoechst S 769121). Measures to prevent diffusion of the tracers out of retrogradely labeled neurons // Neurosci. Lett.—1980.—18, N 1.—P. 19—24.
4. Björklund A., Skagerberg G. Simultaneous use of retrograde fluorescence histochemistry for convenient and precise mapping of monoaminergic projections and collateral arrangements in the CNS // J. Neurosci. Meth.—1979.—1, N 3.—P. 261—277.

5. Illert M., Fritz N., Aschoff J. A. cers compared with horseradish peroxidase in the peripheral motor system of the rat // Brain Res.—1980.—200, P. 127—135.
6. Kuypers H. G. J. M., Catsman-Berrevoets C. E. Retrograde neuronal labeling by means of bisbenzimidazole and nuclear yellow (Hoechst S 769121). Measures to prevent diffusion of the tracers out of retrogradely labeled neurons // Neurosci. Lett.—1980.—18, N 1.—P. 19—24.
7. Kuypers H. G. J. M., Bentivoglio M. Retrograde fluorescent neuronal tracing combined with acetylcholinesterase histochemistry // J. Neurosci. Meth.—1982.—6, N 2.—P. 121—127.
8. Scirboll L., Hökfelt T., Norell M. Retrograde labeling of retrogradely labeled neurons // Brain Res. Rev.—1980.—4, P. 1—10.

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

УДК 612.014.42

#### Ферментативная изоляция гиппокампа крысы

Е. М. Ключко, А. Я. Цыдренко

Использование изолированных биологических экспериментальных мембранных механизмов методических подходов и patch-clamp [7], невозможность изоляции клеток ЦНС культур [3, 4, 5]. Полученные клетки не всегда методом внутриклеточной фиксации, их большой количеством элементами.

Опираясь на уже разработанный способ получения гиппокампа крысы для исследования и patch-clamp. Наилучший выход свежих в суспензии своих биологических элементов. Традиционно изолированные клетки [4, 8, 10]. Однако этот метод с коротким временем диссоциации велась в неэффективных ферментов клеток, 2-е — разработана энзиматической обработки.

Электронно- и хемоуплотненные клетки исследовали метаболиты потенциала на мембранном растворе раст 2—3 нед). Выбор в основном заканчивающийся в то же время более рапидной капитализации животного раствора следующего с KCl — 4, HEPES-NaOH



5. Illert M., Fritz N., Aschoff A., Holländer H. Fluorescent compounds as retrograde tracers compared with horseradish peroxidase (HRP). II. A parametric study in the peripheral motor system of the cat // *Ibid.*—1982.—6, N 2.—P. 193—218.
6. Kuypers H. G. J. M., Catsman-Berrevoets C. E., Padt R. E. Retrograde axonal transport of fluorescent substances in the rat's forebrain // *Neurosci. Lett.*—1977.—6, N 3.—P. 127—135.
7. Kuypers H. G. J. M., Bentivoglio M., Catsman-Berrevoets C. E., Bharos A. T. Double retrograde neuronal labeling through divergent axon collaterals, using two fluorescent tracers with the same excitation wavelength which label different features of the cell // *Exp. Brain Res.*—1980.—40, N 4.—P. 383—392.
8. Scirboll L., Hökfelt T., Norell G. et al. A method for specific transmitter identification of retrogradely labelled neurons: immunofluorescence combined with fluorescence tracing // *Brain Res. Rev.*—1984.—8, N 2/3.—P. 99—127.

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

Поступила 19.02.86

УДК 612.014.42

## Ферментативная изоляция пирамидных нейронов гиппокампа крысы

Е. М. Ключко, А. Я. Цыдренко

Использование изолированных нервных клеток ЦНС млекопитающих в биологическом эксперименте позволяет детально исследовать целый ряд мембранных механизмов клеточной активности. Применение таких методических подходов, как метод внутриклеточной перфузии [8] и patch-clamp [7], невозможно без одновременного развития техники изоляции клеток. Основные приемы механической и ферментативной изоляции клеток ЦНС разработаны для получения диссоциированных культур [3, 4, 5]. Полученные с помощью этих приемов свежеизолированные клетки не всегда оказываются пригодными для исследования методом внутриклеточной перфузии по причинам малого выхода живых клеток, их большой повреждаемости, загрязненности соединительнотканными элементами.

Опираясь на уже известные методы изоляции клеток ЦНС, мы разработали способ получения изолированных нейронов гиппокампа крысы для исследования их свойств методом внутриклеточной перфузии и patch-clamp. Наша задача состояла в следующем: получить высокий выход свежеизолированных нейронов гиппокампа, сохраняющих в суспензии свои морфологические признаки и обладающих стабильными электро- и хемоправляемыми трансмембранными токами. Традиционно изолированные клетки ЦНС получают трипсинизацией [4, 8, 10]. Однако этот способ дает очень малый выход живых клеток с коротким временем жизни после диссоциации. Разработка техники диссоциации велась в двух направлениях: 1-е — подбор наиболее эффективных ферментов для диссоциации и наименее повреждающих клетки, 2-е — разработка условий (химических, температурных и др.) энзиматической обработки клеток, а также условий их переживания.

Электро- и хемоправляемые трансмембранные ионные токи этих клеток исследовали методом внутриклеточной перфузии в режиме фиксации потенциала на мембране в сочетании с методом быстрой смены внеклеточного раствора [2]. Эксперименты проводили на крысах (возраст 2—3 нед). Выбор возраста определялся тем, что к этому периоду в основном заканчивается дифференцировка пирамидных клеток [1], в то же время более ранний возраст облегчает диссоциацию. После декапитации животного гиппокамп быстро извлекали и переносили в раствор следующего состава (в миллимоль на литр): NaCl — 150, KCl — 4, HEPES-NaOH — 20, глюкоза — 10 (раствор А, pH 7,4).





Рис. 1. Микрофотографии изолированных нейронов гиппокампа: а — внешний вид изолированного нейрона; б — группа диссоциированных нейронов.

В этом растворе тонким лезвием под микроскопическим контролем готовили поперечные срезы гиппокампа толщиной от 300 до 400 мкм. Срезы помещали в раствор ферментов, содержащий (в миллимоль на литр)  $\text{NaCl}$  — 150,  $\text{KCl}$  — 4,  $\text{NaHCO}_3$  — 26, глюкозы — 10,  $\text{CaCl}_2$  — 0,9, ЭГТА — 1,0 (концентрация свободных ионов кальция в растворе при этом составила  $5 \cdot 10^{-7}$  ммоль/л) и насыщенный карбогеном: 5 %  $\text{CO}_2$ , 95 %  $\text{O}_2$  (раствор Б, pH 7,4). При подборе различных ферментов для обработки нервной ткани оптимальными оказались следующие: комплекс протеолитических ферментов *Aspergillus oryzae* (0,5 %-ный их раствор) и комплекс проназы (0,2 %) с коллагеназой (0,1 %). Ферментативная обработка происходила при 37 °C в течение 1–2 ч. Через раствор постоянно пропускали карбоген.

Затем срезы длительно отмывали от фермента и инактивировали его остаток. Этому процессу сопутствовало градуальное повышение концентрации двухвалентных катионов в отмывочном растворе до их физиологических значений. При быстром переносе срезов из раствора без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , в котором осуществляется ферментативная обработка, в растворы с физиологической концентрацией  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  клетки ЦНС быстро погибают. Поэтому на этапе отмывки клеток от

фермента мы подбирали катионов в растворе. Сначала срезы переносили в него в течение 20 мин, а затем в раствор с повышенной концентрацией  $\text{CaCl}_2$  и в втором повышении  $\text{MgCl}_2$ , при третьем — еще через 10–15 мин. Еще через 10–15 мин в раствор добавляли 5 % бора для инактивации остатков фермента. Изолированные нейроны микроскопическим контролем пропускания в раствор А с добавлением

Рис. 2. Пример ионного туннелирования нейрона гиппокампа при поляризации до  $-60$  мВ. Потенциал составляет  $-100$  мВ. Клетка перфузируется раствором и трис-Ф (30 ммоль/л).

$\text{CaCl}_2$ , 0,55 ммоль/л. Диаметр около 100 мкм. Минимальную среду И. В этой среде клетки не испытывают изменений своих морфологических характеристик. Часть срезов пропускали карбоген, а часть — изолированных клеток.

Описанная послеоперационная обработка позволила получить пирамидные нейроны в форме. У них — характерные базальные дендриты и аксоны. При исследовании клеток, но, что они электрически возбудимы, возникают входящие калиевые токи (рис. 2). Известным медиатором тапату. Стабильность хранения у пирамидных.

Описанную методику в сочетании с бором целого ряда режимов. Так, при исследовании как трипсин (PM 14) геназа (1 А «Sigma») результаты. Оптимальная смесь 0,2 %-ной (тип IV «Sigma»), а *Aspergillus oryzae* (полностью выпускается объединением).

При изоляции и проназы с коллагеназой и проназой с коллагеназой характеристики и не с. Однако их электрофизиологические. При сравнении оказалось, что после обработки *Aspergillus oryzae* с ботки проназой и ко



фермента мы выбрали такой режим повышения концентрации этих катионов в растворе, при котором клетки переживали наиболее долго. Сначала срезы переносили в раствор Б без ферментов и выдерживали в нем в течение 20 мин. Затем в этом растворе трижды повышали концентрацию  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{MgCl}_2$  с интервалами 10—15 мин: при первом и втором повышении добавляли по 0,5 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  и 0,22 ммоль/л  $\text{MgCl}_2$ , при третьем — по 0,25 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  и 0,11 ммоль/л  $\text{MgCl}_2$ . Еще через 10—15 мин в этот же раствор добавляли 5 % бычьей сыворотки для инактивации остатка фермента. Изолированные нейроны получали под микроскопическим контролем многократным пропусканием срезов в растворе А с добавлением 1,25 ммоль/л

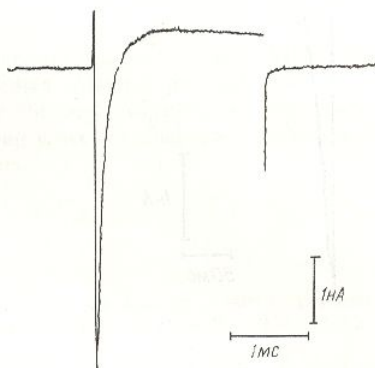


Рис. 2. Пример ионного тока через мембрану нейрона гиппокампа при ее ступенчатой деполяризации до  $-60$  мВ. Поддерживаемый потенциал составляет  $-100$  мВ.

Клетка перфузируется раствором KF (100 ммоль/л) и трис-F (30 ммоль/л).

$\text{CaCl}_2$ , 0,55 ммоль/л  $\text{MgCl}_2$  через отверстие стеклянной микропипетки диаметром около 100 мкм. Свежеизолированные клетки переносили в минимальную среду Игла (МСИ) содержащую 5 % бычьей сыворотки. В этой среде клетки могли находиться в течение 3—4 ч без заметных изменений своих морфологических и электрофизиологических характеристик. Часть срезов оставляли в отмывочном растворе при постоянном пропускании карбогена. Эти срезы можно использовать для получения изолированных клеток в течение 6—8 ч.

Описанная последовательность обработки срезов гиппокампа позволила получить пирамидные нейроны, четко идентифицируемые по форме. У них — характерное вытянутое тело, сохраняются апикальный и базальные дендриты второго и даже третьего порядка. Диаметр таких клеток — около 15—20 мкм, длина — около 20—40 мкм (рис. 1). При исследовании клеток методом внутриклеточной перфузии показано, что они электрически возбудимы, при деполяризации их мембраны возникают входящий ТТХ-чувствительный натриевый и выходящий калиевый токи (рис. 2). Нейроны обладают хемочувствительностью к известным медиаторам — гамма-аминомасляной кислоте, глицину, глутамату. Стабильность хемоактивируемых трансмембранных токов сохранялась у пирамидных клеток в течение 0,5—2,0 ч (рис. 3).

Описанную методику удалось оптимизировать тщательным перебором целого ряда ферментов и вариацией параметров указанного режима. Так, при использовании таких ферментов (или их сочетании), как трипсин (PM 14 «Serva», 1:250 «Serva», тип 11 «Sigma»), коллагеназа (1 А «Sigma»), нам не удалось добиться удовлетворительных результатов. Оптимальными для ферментативной обработки оказались только смесь 0,2 %-ной проназы Е («Serva») и 0,1 %-ной коллагеназы (тип IV «Sigma»), а также 0,5 %-ный протеолитический комплекс *Aspergillus oryzae* (получен в Институте биохимии им. А. В. Палладина, выпускается объединением «Химреактив», г. Олайне).

При изоляции клеток комплексами протеолитических ферментов и проназы с коллагеназой клетки имеют сходные морфологические характеристики и не отличаются временем переживания их в суспензии. Однако их электрофизиологические характеристики несколько различны. При сравнении максимальной амплитуды хемоактивируемых токов оказалось, что после обработки клеток протеолитическим комплексом *Aspergillus oryzae* она примерно на порядок выше, чем после обработки проназой и коллагеназой. Так, амплитуда глутаматактивируемых