

14. *Leontovich T. A., Zhukova G. P.* The specificity of the neuronal structure and topography of the reticular formation in the brain and spinal cord of carnivora // *J. Comp. Neurol.*—1963.—121, N 3.—P. 347—379.
15. *Odutola A. B.* Brain stem reticular projections to rat dorsal column nuclei // *Reticular formation revisited.*—New York: Raven press, 1980.—P. 99—104.
16. *Schneider G. E.* Two visual systems // *Sciences.*—1969.—163, N 3870.—P. 895—902.
17. *Siegel J. M.* Behavioral functions of the reticular formation // *Brain Res. Rev.*—1979.—1, N 1.—P. 69—105.
18. *Stein B. E., Arigbede M. O.* A parametric study of movement direction properties of neurons in the cat's superior colliculus // *Brain Res.*—1972.—45, N 2.—P. 437—454.
19. *Tokunaga A., Otani K.* Dendritic patterns of neurons in the rat superior colliculus // *Exp. Brain Res.*—1976.—52, N 2.—P. 189—205.

Ин-т физиологии им. И. С. Бериташвили
АН ГССР, Тбилиси

Поступила 27.02.87

УДК 591.089.84:612

Исследование межнейронных связей трансплантированной эмбриональной нервной ткани с головным мозгом у крыс

В. А. Майский, П. З. Дорошенко, В. Н. Клецинов, Л. В. Полежаев

Результаты экспериментальных исследований [6, 7] убедительно показали, что при аллотрансплантации эмбриональной нервной ткани головного и спинного мозга в головной и спинной мозг млекопитающих трансплантаты приживляются, дифференцируются в нервные и глиальные клетки, не отторгаются и сохраняются практически в течение всей жизни реципиентов. Более того, трансплантация эмбриональной нервной ткани позволяет восстановить нарушенные функции ЦНС [5, 8]. В этих исследованиях очень важно выяснить, образуются ли связи между нейронами трансплантата и реципиента, специфичны или неспецифичны образующиеся связи? Выявлению этих вопросов может способствовать применение новой нейроанатомической техники аксонного транспорта пероксидазы хрена или транспортно-специфических флюорохромов. Данная техника позволяет точно представить картину афферентных и эфферентных связей, а также может сочетаться с другими нейроанатомическими методами, например с тотальной окраской ткани или флюоресцентной гистохимией моноаминов [1].

Цель настоящей работы — исследование межнейронных связей трансплантированной ткани головного мозга крысиных эмбрионов с головным мозгом взрослых крыс методом ретроградного аксонного транспорта флюорохромов.

Методика

Эксперименты по трансплантации мозга были проведены на шести взрослых крысах-реципиентах, самках линии Вистар массой 100—110 г; донорами служили 17- и 18-суточные эмбрионы крыс той же популяции. Животных оперировали под гексеналовым наркозом в условиях стерильности. Кусочки коры больших полушарий мозга эмбрионов крысы в объеме 5—7 мкл трансплантировали в боковые желудочки левых полушарий мозга взрослых крыс. Все подробности техники трансплантации эмбриональной ткани и гистологической обработки материала описаны ранее [5, 6]. Через 100—107 сут после операции в мозг реципиентов на 2 мм роstralнее и 6 мм каудальнее от места трансплантации с помощью микрошприца и стеклянной микропипетки одновременно инъецировали по 0,3—0,5 мкл два флюорохрома с разными спектрами эмиссии: 10 %-ный водный раствор примулина (Пр) * и 3 %-ный водный раствор прочного

* Primuline O, Reichert, Австрия.

голубого (ПГ) *. Один краситель — в участок среднего мозга мов из паренхимы мозга в полость ки микроинъекции в каудато-пуа а в структурах среднего мозга — лей животных под глубоким нем физиологическим раствором с до ным (4 °С) фиксатором (6 %-ны фосфатном буфере; 0,07 моль/л, фиксатора составлял 1 л, а врем ленно извлекали и резали на блс 10 %-ный раствор сахарозы. Попр оженной или заключенной в па красителей синаптическими оконч 2 % диметилсульфоксида. Пр и чение флюорохромов в ретроград но в цитоплазме клеток. Меченн золотистых гранул в цитоплазме, диффузная зеленая флюоресценц но меченные Пр и ПГ нейроны в волны возбуждающего света 360 служил фильтр ЖС-3. В этих ус фоне зеленого свечения цитоплаз ретроградное мечение и на то, ч аксонных коллатералей, достигая (каудато-пуамена и среднего м флюорохромов инъецировали пер крыс перфузировали смесью пара замораживающем микротоме сре подвергали гистохимической окр тур [1]. Срезы последовательно. Каждый пятый из серийных сре том, нейтральным красным или д

Результаты и их обсуждени

В результате исследований ресажженная эмбриональная ференцируется в нормаль трансплантата пронизана плантаты (Т) находились (III) желудочках мозга, т случая при установлении га хозяина. Большая част салась с эпендимальной вы сращения развивающейся 1—3). В этих местах нару и в них наблюдались кров менты, включая нейроны. мидные нейроны с крупны ны различной формы. Че трансплантата уже хорош ные и глиальные элемент к местам сращения зонах ткани мозга трансплантата направлены в сторону обра В большинстве случа дваемые сроки обнаружива транспорт и накопление ф

* DC 253/50, University in I

ity of the neuronal structure and topography of the brain and spinal cord of carnivora // J. Comp. Neurol. — 1969. — 163, N 3870. — P. 895—902. Cerebral formation // Brain Res. Rev. — 1970. — 1, N 1. — P. 1—104.

ly of movement direction properties of neurons in the rat superior colliculus // Brain Res. — 1972. — 45, N 2. — P. 437—454.

Поступила 27.02.87

ой нервной ткани

а, Л. В. Полежаев

ваний [6, 7] убедительно подтверждают, что эмбриональная нервная ткань и спинной мозг млекопитающих дифференцируются в нервные и глиальные клетки практически в течение первых 24 часов после зачатия. Трансплантация эмбриональной нервной ткани нарушает функции ЦНС, что можно объяснить, образуются ли реципиента, специфичны или нет. Ответ на эти вопросы может дать применение анатомической техники аксонного транспорта специфических меток. Это может точно представить картину дифференцировки и также может сочетаться с другими методами, например с тотальной окраской нейронами [1].

Изучение межнейронных связей в мозге крысы эмбрионального периода с помощью ретроградного аксонного

проведены на шести взрослых крысах-донорах; донорами служили 17- и 18-суточные оперированные под гексеналовым наркозом крысы. Из больших полушарий мозга эмбрионального периода выделены боковые желудочки левых полушарий. Трансплантация эмбриональной нервной ткани описана ранее [5, 6]. Через 100—120 мм роstralнее и 6 мм каудальнее от места инъекции микропипетки одноцветного флюорохрома с разными спектрами эмиссии в 3%-ный водный раствор прочного

голубого (ПГ) *. Один краситель инъецировали в каудато-путамен или таламус, другой — в участок среднего мозга таким образом, чтобы исключить выход флюорохромов из паренхимы мозга в полость желудочков. Диффузия красителей в ткани от точки микроинъекции в каудато-путамене распространялась на расстояние не более 0,5 мм, а в структурах среднего мозга — 1 мм. Через 3—4 сут после микроинъекций красителей животных под глубоким нембуталовым наркозом перфузировали вначале теплым физиологическим раствором с добавлением сосудо расширяющих средств, затем холодным (4 °C) фиксатором (6 %-ный раствор параформальдегида, приготовленный на фосфатном буфере; 0,07 моль/л, pH 7,2), в который добавляли 5 % сахарозы. Объем фиксатора составлял 1 л, а время перфузии — 1—1,5 ч. После перфузии мозг немедленно извлекали и резали на блоки толщиной 3—4 мм, которые переносили на 2 ч в 10 %-ный раствор сахарозы. Поперечные срезы (10—30 мкм) изготавливали из замороженной или заключенной в парафин ткани мозга [2, 3]. Для увеличения захвата красителей синаптическими окончаниями в водные растворы флюорохромов добавляли 2 % диметилсульфоксида. Пр и ПГ — «цитоплазматические» красители, поэтому свечение флюорохромов в ретроградно меченных нейронах обнаруживается исключительно в цитоплазме клеток. Меченные Пр нейроны четко выделяются ярким свечением золотистых гранул в цитоплазме. В ретроградно меченных ПГ нейронах наблюдается диффузная зеленая флюоресценция цитоплазмы. В полутонких срезах мозга ретроградно меченные Пр и ПГ нейроны наблюдались в люминесцентном микроскопе при длине волны возбуждающего света 360—400 нм (фильтры: ФС-1 или СС-15-2). Запирающим служил фильтр ЖС-3. В этих условиях одновременное свечение золотистых гранул на фоне зеленого свечения цитоплазмы в одной и той же клетке указывало на двойное ее ретроградное мечение и на то, что данная клетка является источником дивергентных аксонных коллатералей, достигающих двух инъецированных флюорохромами областей (каудато-путамена и среднего мозга). В некоторых опытах животным вместо двух флюорохромов инъецировали пероксидазу хрена (ПХ) и флюорохром. В этом случае крысы перфузировали смесью параформальдегида и глутаральдегида; изготовленные на замораживающем микротоме срезы мозга перед монтированием на предметные стекла подвергали гистохимической окраске для выявления пероксидазно активных структур [1]. Срезы последовательно просматривали в обычном и ультрафиолетовом свете. Каждый пятый из серийных срезов головного мозга крыс окрашивался крезил-виолетом, нейтральным красным или другим гистологическим красителем.

Результаты и их обсуждение

В результате исследований установлено, что у большинства крыс пересаженная эмбриональная ткань мозга хорошо приживляется и дифференцируется в нормальные нервные и глиальные клетки. Ткань трансплантата пронизана множеством кровеносных сосудов. Трансплантаты (Т) находились в разных участках боковых (V) и третьем (III) желудочках мозга, что требовало анализа каждого отдельного случая при установлении межнейронных связей трансплантата и мозга хозяина. Большая часть поверхности трансплантатов не соприкасалась с эпендимальной выстилкой желудочков, хотя отмечались места сращения развивающейся донорской ткани с мозгом хозяина (рис. 1, 1—3). В этих местах нарушалась целостность эпендимальной выстилки и в них наблюдались кровеносные сосуды и различные клеточные элементы, включая нейроны. Среди популяций клеток встречались пирамидные нейроны с крупными отходящими дендритами и мелкие нейроны различной формы. Через 100—107 сут после пересадки клетки трансплантата уже хорошо были дифференцированы в зрелые нервные и глиальные элементы. Необходимо отметить, что в прилежащих к местам сращения зонах наблюдалась переориентация нейронов в ткани мозга трансплантата и в мозгу хозяина. Отростки нейронов были направлены в сторону образовавшихся контактов.

В большинстве случаев пересадок (четыре из шести) в исследуемые сроки обнаруживались эффективный ретроградный аксонный транспорт и накопление флюорохромов в нейронах трансплантирован-

* DC 253/50, University in Erlangen (Dr. Illing), ФРГ.

ной ткани мозга. В свете люминесценции меченные красителями нейроны легко выявлялись в срезах мозга по ярко флюоресцирующим золотистым гранулам и диффузному зеленому свечению. Схема фронтальных планов срезов мозга (см. рис. 1) вычерчена в определенном масштабе полуавтоматическим способом. Локализация меченных красителями нейронов в структурах мозга и трансплантатах отмечена различными знаками. Как видно на схеме, меченные Пр и ПГ нейроны — источники эфферентных путей трансплантатов в мозг реципиентов, локализуются главным образом в поверхностных участках пересаженных кусочков коры. В представленном случае ПГ локально инъецирован в каудато-путамен (CP) (см. рис. 1, 4, 5), а Пр в боль-

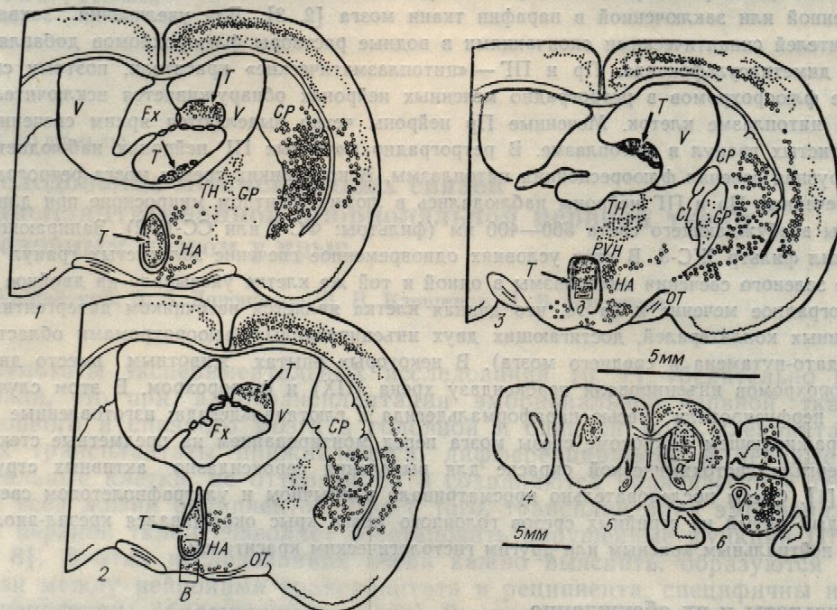


Рис. 1. Распределение меченных прочным голубым (точки) и примулином (кружочки) нейронов в трансплантатах и мозгу реципиента после инъекций красителей в каудато-путамен и покрышку среднего мозга:

1, 2 — схемы роstralных планов срезов мозга; 3 — схема каудального плана среза мозга; 4, 5 — планы срезов мозга на уровнях инъекций прочного голубого; 6 — инъекций примулина. Стрелками показаны трансплантаты (T), заключенные в рамки области а, д и а, представлены на рис. 2, а, д, а. Обозначения и объяснения в тексте.

шем объеме введен в черную субстанцию, покрышку среднего мозга и верхние бугорки четверохолмия, кору головного мозга на этом фронтальном уровне (см. рис. 1, 6). При таких микроинъекциях ретроградный транспорт наблюдался не только к клеткам трансплантатов, но и к нейронам ипсилатеральной половины мозга. Меченные флюорохромами нейроны локализовались в каудато-путамене (CP), бледном шаре (GP), передней гипоталамической области (HA), особенно в паравентрикулярном ядре (PVH), а также в таламусе (TH) и коре головного мозга реципиента. Причем в коре меченные флюорохромами нейроны обнаруживались на ипси- и контралатеральной половинах мозга. Локализация ретроградно меченных нейронов в мозгу реципиента полностью совпадала с таковой ранее описанной у крыс [3].

Необходимо отметить, что большинство нейронов в кусочках пересаженного мозга ретроградно метились ПГ, введенным в неостриатум роstralного отдела мозга реципиента. Однако вблизи меченных ПГ клеток обнаружено небольшое число нейронов, аккумуляировавших Пр или одновременно два красителя (см. рис. 1, 1, 2). Пересаженные кусочки эмбриональной коры во многих местах приросли к ткани мозга взрослой крысы-реципиента (к тракту свода, Fx, или стенке

третьего мозгового желудочка, томографии зоны микроинъекции трансплантата. Представ-

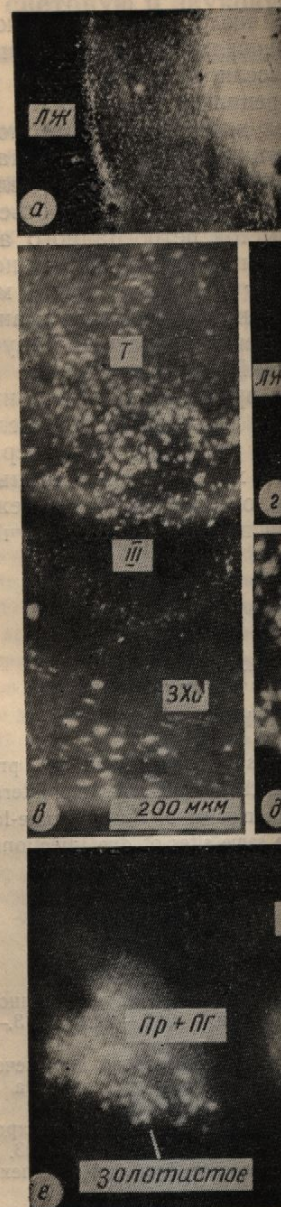
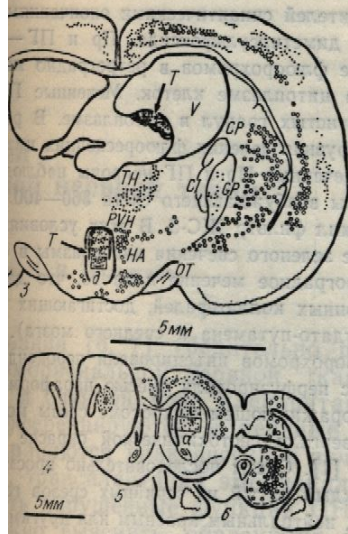


Рис. 2. Микрофотографии меченных нейронов в трансплантатах и мозгу реципиента после инъекций красителей в каудато-путамен и покрышку среднего мозга.

Нейроны трансплантатов с двойной меткой по золотистым гранулам и флюоресценции. Стрелка — место сращения трансплантата с мозгом. ЗД — зона дорсальной хиазматической области. Масштаб на а; увеличение на 2-масштаб на ж.

с локализованными в рис. 4, в, д, а) соответствующими фронтальными планами срезов мозга.

ии меченные красителями нейрона по ярко флуоресцирующим еленому свечению. Схема фронт. 1) вычерчена в определенном м. Локализация меченных кра- га и трансплантатах отмечена еме, меченные Пр и ПГ нейро- ансплантатов в мозг реципиен- в поверхностных участках пере- вленном случае ПГ локально (см. рис. 1, 4, 5), а Пр в боль-



им (точки) и примулином (кружочки) после инъекций красителей в каудато- путамин. Схема каудального плана среза мозга: 4, 5 — инъеци- убого; 6 — инъециций примулина. Стрелками асти в, д и а, представлены на рис. 2, в, д, а.

ию, покрышку среднего мозга головного мозга на этом фронт- их микроинъекциях ретроград- клеткам трансплантатов, но и к зга. Меченные флуорохромами тамеце (СР), бледном шаре асти (НА), особенно в пара- таламусе (ТН) и коре голов- меченные флуорохромами ней- латеральной половине мозга. ронов в мозгу реципиента пол- ной у крыс [3].

ство нейронов в кусочках пе- сь ПГ, введенным в неостри- ента. Однако вблизи меченных о нейронов, аккумуляировавших и. рис. 1, 1, 2). Пересаживаемые х местах приотстали к ткани тракту свода, Fx, или стенке

третьего мозгового желудочка). На рис. 2, а—ж приведены микрофо- тографии зоны микроинъекции ПГ и меченных красителями нейронов трансплантата. Представленные на микрофотографиях области мозга

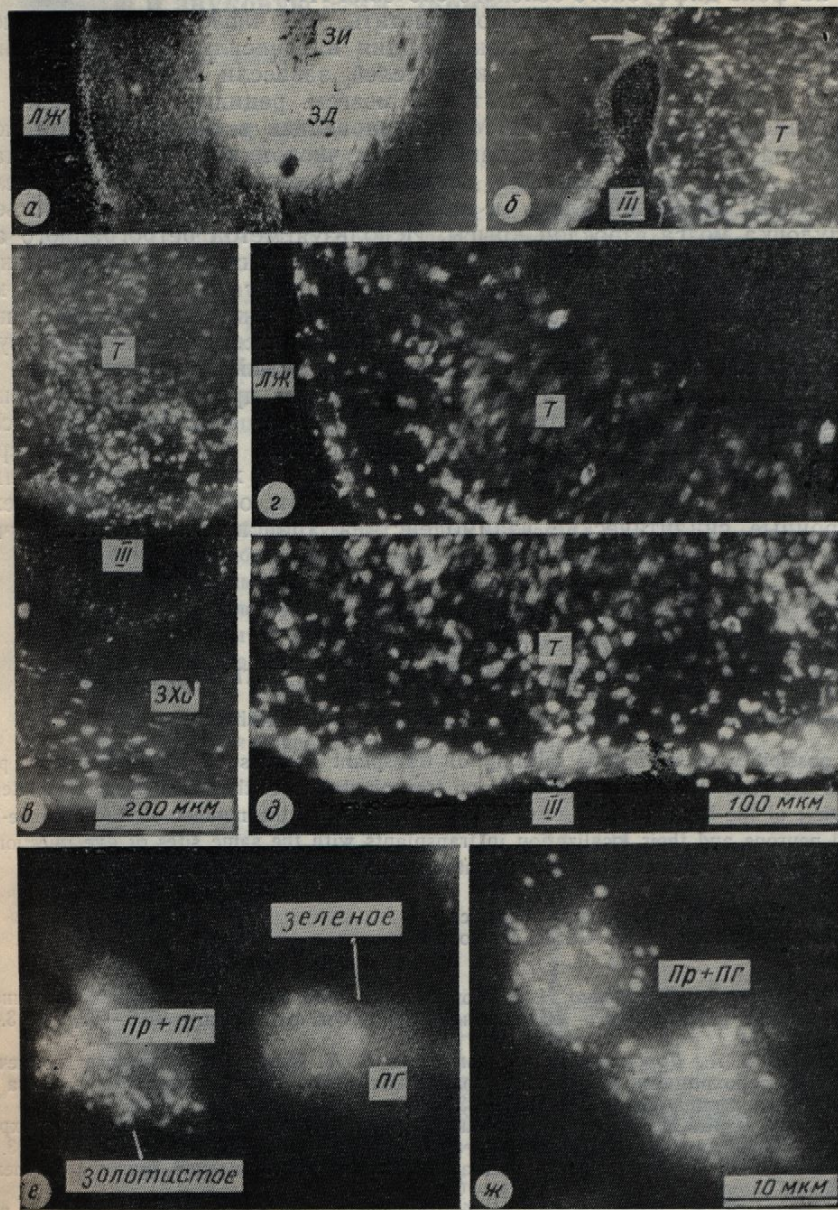


Рис. 2. Микрофотографии меченных прочным голубым и примулином нейронов в транс- плантатах и мозгу реципиента после инъекций флуорохромов в каудато-путамин и покрышку среднего мозга.

Нейроны трансплантатов с двойной флуоресцентной меткой легко идентифицировались в срезах мозга по золотистым гранулам и диффузному зеленому свечению цитоплазмы (Пр+ПГ) (е, ж). Стрелка — место сращения трансплантата, ЛЖ — левый желудочек мозга, ЗД — зона инъециций прочного голубого, ЗД — зона диффузии прочного голубого, ПГ — третий желудочек мозга, ЗХО — задняя хиазматическая область гипоталамуса, Т — трансплантат. Увеличение на а—в — одинаковое, масштаб на а; увеличение на в, д — одинаковое, масштаб на в; увеличение на е, ж — одинаковое, масштаб на ж.

с локализованными в них меченными красителями нейронами (см. рис. 4, в, д, а) соответствуют заключенным в рамку областям на фронтальных планах срезов (см. рис. 1, 2, 3, 5).

Небольшое число нейронов трансплантатов аккумулировало одновременно оба инъецированных флюорохрома (см. рис. 2, е, ж). В цитоплазме этих клеток отчетливо выделялись золотистые гранулы. При этом на фоне диффузного зеленого свечения ПГ.

В заключение необходимо отметить, что число меченных флюорохромами нейронов и их локализация в трансплантатах при одних и тех же местах инъекций красителей зависели исключительно от числа контактов трансплантатов с мозгом реципиента, а также от направления роста волокон. Мы остановились в данной работе подробно на анализе случая с наибольшим числом контактов трансплантата с тканью мозга хозяина, когда трансплантаты кусочков зрительной коры обнаруживались в области левого желудочка и третьего желудочка мозга взрослой крысы. Используя метод ретроградного аксонного транспорта флюорохромов при трансплантации эмбриональной ткани зрительной коры мозга в головной мозг взрослых крыс, мы установили образование эфферентных связей между нейронами трансплантата и нейронами мозга реципиента. В трансплантатах существует гетерогенная организация источников проекций в ростральные и каудальные отделы мозга хозяина. При этом преобладают нейроны, образующие пути в ростральном направлении. У небольшого числа нейронов трансплантатов отмечена дивергенция аксонных коллатералей в ростральные и каудальные отделы мозга хозяина. Выявленные связи могут служить анатомическим субстратом, обеспечивающим межнейронные синаптические взаимодействия трансплантированного участка мозга и мозга хозяина.

STUDIES IN INTERNEURONAL CONNECTIONS OF TRANSPLANTED EMBRYONIC NERVOUS TISSUE WITH THE RAT BRAIN

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

The possibility of retrograde labeling of transplant neurons by stable blue and primumulin has been studied in experiments on transplantation of the brain tissue into lateral ventricle of the brain in adult rats. It is established that the number of fluorochrome-labeled neurons and their localization in transplants with the same sites of dye injections depend on the number of transplants' contacts with the recipient brain.

N. I. Vavilov Institute of General Genetics,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

1. Майский В. А., Дорошенко Н. З. Сочетание метода флюоресценции катехоламинов с техникой ретроградного мечения нейронов // Физиол. журн.—1986.—32, № 3.—С. 371—374.
2. Майский В. А., Дорошенко Н. З., Клешинов В. Н. Микроскопия ретроградно меченных флюорохромами нейронов в полутонких срезах при заливке ткани мозга в мягкий парафин // Там же.—1987.—33, № 2.—С. 111—115.
3. Майский В. А., Кузовкова С. Д. Микроскопия ретроградно меченных флюорохромами нейронов в тонких срезах мозга // Там же.—1985.—31, № 4.—С. 500—503.
4. Полежаев Л. В. Трансплантация ткани мозга и восстановление функций // Успехи соврем. биологии.—1985.—99, № 1.—С. 123—140.
5. Полежаев Л. В., Александрова М. А. Трансплантация ткани мозга в норме и патологии // М.: Наука.—1986.—152 с.
6. Alexandrova M. A., Polezhaev L. V. Transplantation of various regions of embryonic brain tissue into the brain of adult rats // J. Hirnforsch.—1984.—25, N 1.—P. 89—98.
7. Björklund A., Stenevi U. Neural grafting in the mammalian CNS // Amsterdam etc.: Elsevier., 1985.—709 p.
8. Polezhaev L. V., Alexandrova M. A., Vitvitsky V. N. et al. Morphological, biochemical and physiological changes in brain nervous tissue of adult intact and hypoxia-subjected rats after transplantation of embryonic nervous tissue // J. Hirnforsch.—1985.—26, N 3.—P. 281—289.

Ин-т общ. генетики им. Н. И. Вавилова
АН СССР, Москва

Поступила 11.02.87

УДК 612.825

Реакции нейронов теменной коры головного мозга бодрствующей на световую и звуковую стимуляцию

И. И. Кореньюк, Т. В. Ильичева

Известно, что теменная ассоциативная кора является источником информации о состоянии организма и окружающей среды. Однако эти данные в основном получены из экспериментов на животных лишь в определенных условиях. В настоящей работе изучены реакции нейронов теменной коры бодрствующей кошки на световую и звуковую стимуляцию.

Методика

Опыты проводились на трех бодрствующих кошках (35 мг/кг, внутривенно). Эксперимент проводился в условиях полной темноты. Кошки были крепко фиксированы в специальном устройстве. На черепе кошки с помощью винтов и болтов были установлены микроэлектроды для стимуляции и регистрации электрической активности нейронов. Конструкция микро-

Рис. 1. Схема микроманипулятора для отведения импульсной активности нейронов мозга бодрствующей кошки:

1 — корпус микроманипулятора; 2 — микрометрический винт, перемещающий каретку; 3 — контактная площадка для фиксации и распылки микроэлектрода; 4 — разъем для подключения предварительного усилителя; 5 — телескопическая направляющая микроэлектрода (направляющая большего диаметра закреплена в корпусе); 6 — винты для фиксации съемной части микроманипулятора; 7 — микроэлектрод; 8 — основание микроманипулятора; 9 — фиксирующие винты; 10 — основание микроманипулятора; 11 — быстротвердеющая пластмасса (протакрил); 12 — кость черепа; 13 — кора мозга.

Микроэлектрод для отведения импульсов микропровода диаметром 10—12 мкм. Его наружный диаметр составлял 50—60 мкм. Вертикальное перемещение микроэлектрода осуществлялось с помощью лимба, что позволяло вводить и выводить микроэлектрод из ткани мозга. К опытам приступали на 3—4-е

Физиол. журн.—1988.—34, № 2