

ловека.— М.: Просвеще-
ние, 1971.

— Л.: Наука, 1952.— 24 с.
ных свойств нервной си-
сти.— М.: Наука, 1971.

одика исследования под-
сти головного мозга по
процессов и профессио-

кспериментов на микро-
с. —
ей возбудимости // Журн.

Поступила 20.12.84

Методики

УДК 611.813:815

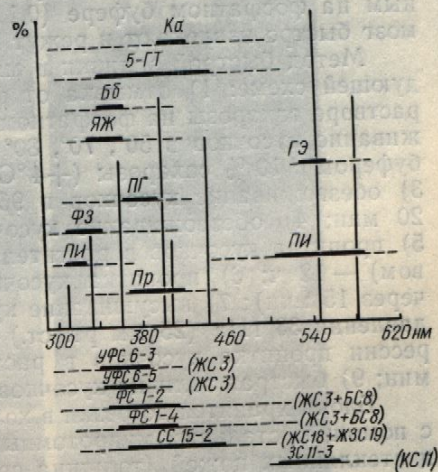
Сочетание методов флюоресценции катехоламинов и ретроградного мечения нейронов при быстрой заливке ткани мозга в парафин

В. А. Майский, И. Н. Пигарев, Н. З. Дорошенко

Новые направления в развитии современных нейроанатомических исследований связаны с внедрением методов прослеживания связей в мозгу химически идентифицированных нейронов при использовании в качестве маркера транспортно-специфических флюорохромов [1, 5]. Обнаружено, что некоторые флюоресцирующие органические красители — флюоресцирующий золотой (ФЗ)*, ядерный желтый (ЯЖ), бисбензимидазол (ББ), прочный голубой (ПГ), примулин (Пр)**, голубой Эванса (ГЭ), пропидиум йодит (ПИ) — как маркеры — являются высоко эффективными для изучения связей в мозге животных. Спектры возбуждения и эмиссии указанных флюорохромов сильно различаются

Рис. 1. Спектральные характеристики ртутной лампы ДРШ-250 и транспортно-специфических флюорохромов:

над осью абсцисс вертикальные линии — относительная интенсивность (%) различных эмиссионных пиков ртутной лампы в диапазоне длин волн 300—620 нм, горизонтальные сплошные и пунктирные линии — диапазоны длин волн возбуждающего света, вызывающего 90—100 или 5—90%-ную флюоресценцию красителя соответственно [5]; под осью абсцисс горизонтальные линии — полосы пропускания возбуждающих светофильтров (в скобках — соответствующие возбуждающим забирающие светофильтры). Остальные обозначения объяснены в тексте.



(рис. 1), что дает возможность использовать их для двойного мечения нейронов и изучения дивергенции аксонных коллатералей в центральной и периферической нервной системе. В наших экспериментах по изучению стволовых источников катехоламинергической иннервации [1, 2] установлено, что Пр обладает рядом преимуществ перед другими маркерами: эффективный захват примулина синаптическими окончаниями, длительное удержание его в теле нейрона, высокий квантовый выход, устойчивость к ультрафиолетовому облучению. Показано также, что быстрая заливка кусочков мозга в парафин не снижает яркости свечения меченных примулином нейронов [2]. Еще более уникальными свойствами обладает новый транспортно-специфический маркер ФЗ [4]. Механизмы, обеспечивающие эффективный захват, транспорт и аккумуляцию Пр и ФЗ, в настоящее время мало известны. Предполагают, что определенные реактивные группы облегчают активный эндоцитозный захват маркеров синаптическими терминалями с образованием везикул. Эти пиноцитозные везикулы, содержащие флюорохромы, ретро-

* Fluoro-Gold, Fluorochrome INC, США

** Primuline O, Reichert, Австрия

градно транспортируются к телам нейронов, аккумулируются в лизосомах и активно транспортируются в дистальные участки дендритов. Определенные физические свойства метчиков (заряд, водно-липидная растворимость, полярность, размеры молекулы и т. д.) замедляют диффузию их из клеток [3].

В настоящей работе описывается техника одновременного выявления в нейронах ретроградных маркеров (Пр или ФЗ) и флюоресцирующих комплексов катехоламинов (Ка) при использовании для перфузии животных подходящих формальдегид-глутаральдегидных фиксаторов с последующей заливкой ткани мозга под вакуумом в мягкий парафин (Paraffin Wax, BDH, Chemical Ltd, Англия) с температурой плавления 49 °C.

Техника эксперимента

Животным (крысы, кошки) инъецируют в мозг 0,05—5 мкл 10 %-ного водного раствора Пр (с добавлением в раствор 2 % диметилсульфоксида) или 2 %-ного водного раствора ФЗ. Через 5—30 сут животных под глубоким наркозом перфузируют через сердце вначале гипертоническим раствором солей натрия (2 % хлористого натрия и 0,4 % азотистокислого натрия), в который добавляют гепарин (25 000 ед/л). Затем перфузию продолжают холодным (+4 °C) фиксатором (3,5 % параформальдегида, 0,25 % глутаральдегида и 5 % сахарозы), приготовленным на фосфатном буфере (0,1 моль/л; pH 7,2). После 1 ч перфузии мозг быстро извлекают и режут на блоки толщиной около 4 мм.

Метод быстрой заливки в мягкий парафин осуществляется по следующей схеме: 1) отмычка от фиксатора кусочков мозга в 10 %-ном растворе сахарозы на фосфатном буфере (+4 °C) — 20 мин; 2) обезвоживание кусочков в 50°, 70°, 80° спирте, который разводят фосфатным буфером с 10 % сахарозы (+4 °C) — 1 ч (по 20 мин в каждом спирте); 3) обезвоживание кусочков в 96° спирте (комнатная температура) — 20 мин; 4) обезвоживание кусочков в абсолютном спирте — 20 мин; 5) пропитка кусочков в растительном масле (персиковом или касторовом) — 12 ч; 6) пропитка кусочков в гексане — 30 мин (одна смена через 15 мин); 7) высушивание кусочков под вакуумом при остаточном давлении 33 гПа (25 мм рт. ст.) — 10 мин; 8) без последующей компрессии пропитка кусочков в расплавленном парафине (+55 °C) — 10 мин; 9) быстрая заливка кусочков в расплавленный парафин (+55 °C).

Блоки хранятся до резки в холодильнике. Резку можно производить с помощью стальных микротомных ножей (толщина срезов 6—10 мкм) и стеклянных ножей (толщина срезов 1—3 мкм). Срезы вылавливают на предметные стекла из теплого (+50 °C) фосфатного буфера, в который предварительно добавляют сахарозу (10 %) и желатин (0,1 %). Высушенные на предметных стеклах на холоду (+4 °C) срезы переносят на 30 с в 96° спирт, а затем для освобождения от парафина на 6 мин в толуол; срезы заключают под покровными стеклами в слабо флюоресцирующую эпоксидную смолу (эпон 812) или вазелиновое масло. Такие срезы могут храниться в холодильнике при температуре +4 °C несколько месяцев без заметного уменьшения интенсивности флюоресценции ретроградных метчиков и комплексов катехоламинов.

В тонких срезах мозга ретроградно меченные и немеченные флюорохромами катехоламинергические нейроны легко выявляются в люминесцентном микроскопе при длине волны возбуждающего света 360—420 нм (возбуждающие светофильтры — ФС 1-2, ФС 1-4; запирающие светофильтры ЖСЗ+БС8; см. рис. 1). Спектры эмиссии флюоресцирующих комплексов катехоламинов и красителей (зеленый, золотистый) сильно отличаются, что позволяет легко идентифицировать различные популяции нейронов (рис. 2, а—д). Одновременное свечение золотистых гранул на фоне зеленого свечения цитоплазмы в одной и той же клетке указывает на то, что ретроградно меченный флюорохромом нейрон является источником катехоламинергических проекций (рис. 2, е).

Специфичность д-
быстрой заливке тка
флюоресценции всех из

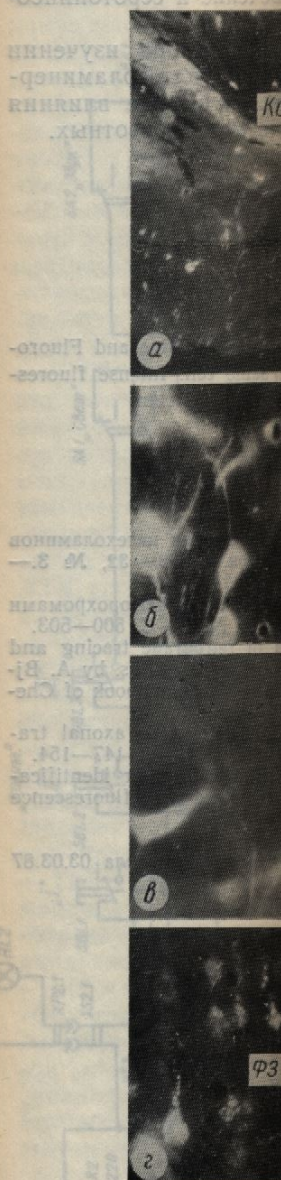


Рис. 2. Катехоламинергич-
мозгу крысы:

а, б — катехоламинергические
инъецированным в таламус ф-
нейроны коры (наблюдается ф-
ченные стрелкой, и вторичные,
е — меченные инъецированным
+Пр) голубого пятна. Толщина
на е.

(А1—А14). Кроме тог
ческие пробы на спец
лось угнетение флюор
после внутрибрюшинн

мулируются в лизосо-
е участки дендритов.
аряд, водно-липидная
г. д.) замедляют диф-

новременного выявле-
ФЗ) и флюоресциру-
зовании для перфузии
егидных фиксаторов с
ом в мягкий парафин
температурой плавле-

0,05—5 мкл 10 %-ного
% диметилсульфокси-
—30 сут животных под
чале гипертоническим
и 0,4 % азотистокис-
000 ед/л). Затем пер-
атором (3,5 % пара-
харозы), приготовлен-
После 1 ч перфузии
ой около 4 мм.

существляется по сле-
гов мозга в 10 %-ном
—20 мин; 2) обезво-
разводят фосфатным
ин в каждом спирте);
итная температура —
ном спирте — 20 мин;
осиковом или касторо-
—30 мин (одна смена
уумом при остаточном
из последующей комп-
афине (+55 °C) — 10
ый парафин (+55 °C).
ку можно производить
на срезов 6—10 мкм)
Срезы вылавливают
итного буфера, в кото-
) и желатин (0,1 %).
(+4 °C) срезы перено-
от парафина на 6 мин
ами в слабо флюорес-
елиновое масло. Такие
мпературе +4 °C не-
сивности флюоресцен-
ламинов.

е и немеченные флюо-
о выявляются в люми-
сдающего света 360—
ФС 1-4; запирающие
миссии флюоресциру-
(зеленый, золотистый)
ицировать различные
ное свечение золотис-
мы в одной и той же
й флюорохромом ней-
проекций (рис. 2, е).

Специфичность данного способа выявления катехоламинов при
быстрой заливке ткани мозга в парафин подтверждается наличием
флюоресценции всех известных групп катехоламинсодержащих нейронов

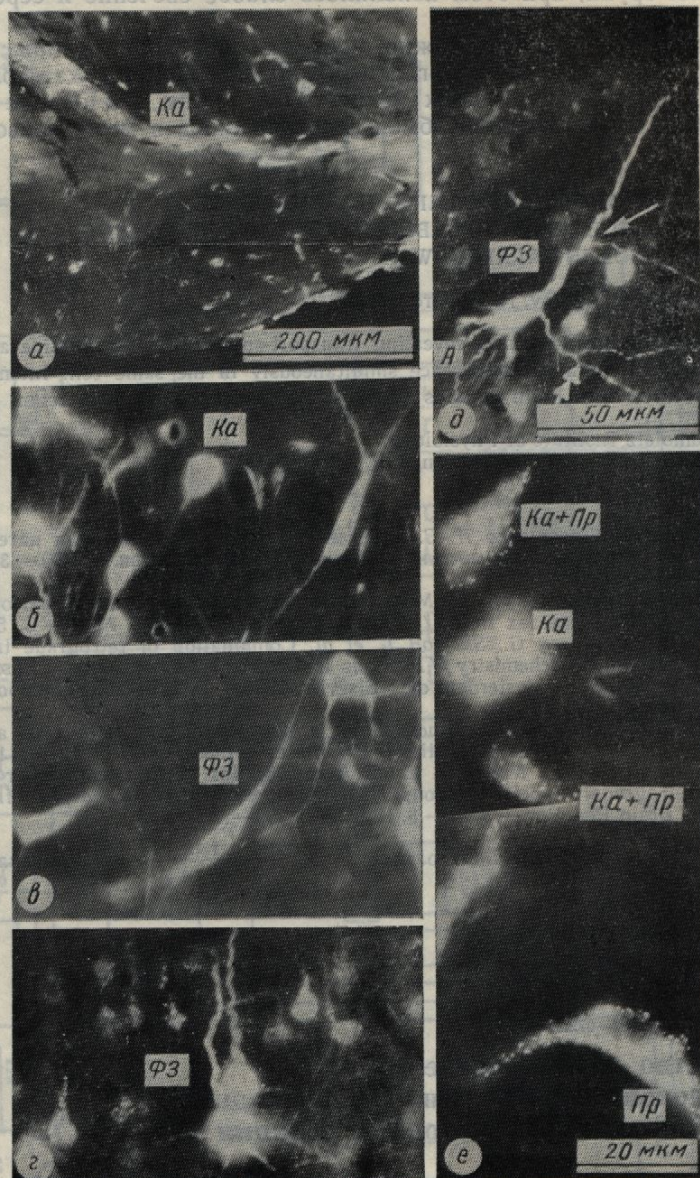


Рис. 2. Катехоламинергические и ретроградно меченные флюорохромами нейроны в мозгу крысы:

а, б — катехоламинергические (Ka) нейроны компактной части черной субстанции; в—д — меченные инъецированным в таламус флюоресцирующим золотом (ФЗ) клетки бледного шара и пирамидные нейроны коры (наблюдается яркое свечение начального сегмента аксона — А, первичные, обозначенные стрелкой, и вторичные, обозначенные двойной стрелкой, разветвления апикального дендрита); е — меченные инъецированным в спинной мозг примулином катехоламинергические нейроны (Ka+Pr) голубого пятна. Толщина срезов 6 мкм. Масштаб: 200 мкм на а, 50 мкм на в—д и 20 мкм на е.

(A1—A14). Кроме того, нами проведены дополнительные фармакологи-
ческие пробы на специфичность флюоресцентной реакции: 1) наблюда-
лось угнетение флюоресценции катехоламинсодержащих структур мозга
после внутрибрюшинного введения животному резерпина; 2) внутри-