

УДК 597.82:611.813.3:578.65

МОРФОЛОГИЯ

Д. Н. КАВТАРАДЗЕ

## ОПЫТ ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ МОЗГА, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ИМПРЕГНИРОВАННЫХ ПО МЕТОДУ ГОЛЬДЖИ

(Представлено академиком И. С. Бериташвили 6 III 1974)

В последнее время все большее внимание морфологов привлекает возможность совмещения методов световой и электронной микроскопии. Изучение одного и того же препарата в световом, а затем в электронном микроскопе позволяет совместить представления о морфологии тех или иных структур, сложившиеся на протяжении истории световой микроскопии, с ультраструктурой тех же объектов, изученной лишь в последнее время (<sup>1, 2</sup>). Особенно велико значение таких методов в нейростологии. Поскольку нейроны являются наиболее морфологически дифференцированными клетками, соотношение их ультраструктурной организации с видимой под световым микроскопом имеет решающее значение. Светоэлектронные методы уже позволили разрешить ряд спорных случаев синапсоархитектоники и окончания дегенерировавших волокон (<sup>3-8, 11-14</sup>).

Наибольшую методическую сложность представляют собой методы электронного микроскопирования препаратов, импрегнированных по Гольджи. Эти методики были разработаны на гиппокампе и fascia dentata крысы (<sup>3, 4</sup>), на сетчатке рыб (<sup>11, 12</sup>) и белки (<sup>14</sup>). Наиболее целесообразно применение этих методик для идентификации под электронным микроскопом отдельных структурных элементов нервной ткани на значительном протяжении в их пространственном соотношении, в сочетании с экспериментальными разрушениями, для выяснения точной локализации контактов дегенерировавших волокон на теле нейрона и его отростках, вплоть до определения типа шипика на дендритах и аксонах.

Целью настоящей работы являлась разработка метода электронной микроскопии препаратов мозга, импрегнированных по Гольджи. Объектом исследования служили обонятельные луковицы травяной лягушки (*Rana temporaria*). Мозг лягушки после эфирного наркоза перфузировался физиологическим раствором с 0,01%  $\text{NaNO}_2$  30–45 сек. После промывки перфузия велась раствором 10% формалина на 0,1 *M* фосфатном буфере (рН 7,3) с 4% сахарозой в течение 15 мин. Мозг извлекался из черепа через 0,5–3 часа и помещался в смесь следующего состава: 2%  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , 1%  $\text{OsO}_4$ , рН которой доводился до 6,8–7,2 добавлением КОН. В этом растворе мозг сутки держали в холодильнике при 5–6°, а затем сутки при 18°. На третьи сутки раствор заменялся другим: 3,5%  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , 2%  $\text{OsO}_4$ , рН 6,8–7,2. Мозг находился в нем до конца третьих суток при 18°, а затем переносился в 4%  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  и сохранялся в нем 3,5 суток при 25°. Мозг кисточкой очищался от осадков, промывался 0,75% раствором азотнокислого серебра и оставлялся в нем на 18 час. После обезвоживания в спиртах (см. схему проводки) мозг монтировался на парафиновый блок с углублением, края которого осторожно заглавливались. Во время резки блока на срезы толщиной 30–70 мкм мозг непрерывно увлажнялся 100° спиртом, а срезы прямо с воя переносились в 100° спирт и после отбора под микроскопом проводились по той же схеме. Срезы заливались в ванночки из алюминиевой

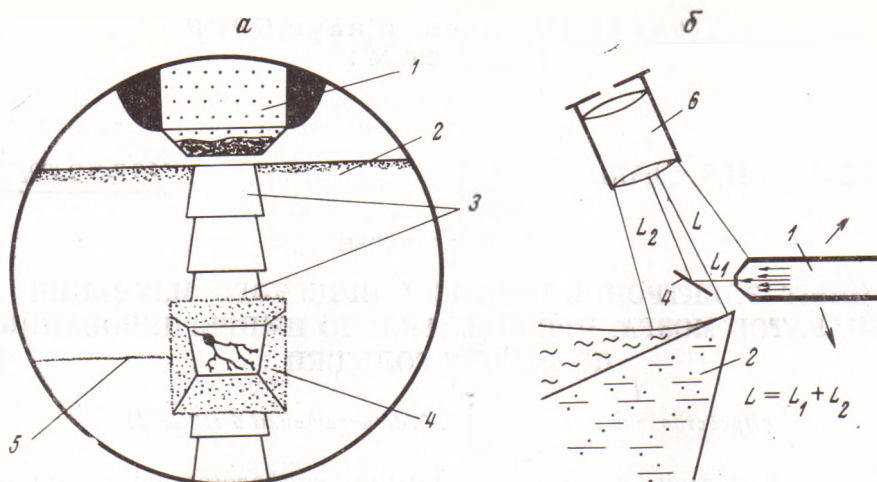


Рис. 1. а — картина, наблюдаемая в окуляре микроскопа ультратома, б — схема хода световых лучей ( $L$ ,  $L_1$ ,  $L_2$ ) при использовании зеркальной приставки. 1 — блокодержатель с блоком, 2 — нож с мениском жидкости над ним, 3 — срезы, 4 — зеркальце, 5 — держатель зеркальца, 6 — микроскоп

фольги, дно ванночки при этом на 2–2,5 мм было заполнено заполимеризованным эпоном. По окончании заливки получалась прямоугольная пластина, удобная для изучения и фотографирования в световом микроскопе (рис. 2а). Нужные срезы выпиливались и зажимались в плоскопараллельный держатель ультратома.

Поскольку приготовление и изучение ультратонких срезов препаратов по Гольджи достаточно трудоемко, важно работать только со срезами, содержащими строго определенную структуру исследуемого нейрона: тот или иной участок дендрита, аксона, шипик и т. д. Для непрерывного наблюдения процесса и глубины резки блока нами была разработана зеркальная приставка, сущность работы которой показана на рис. 1. Приставка зажимом прикрепляется к держателю ножа ультратома LKB и состоит из механизма перемещения и зеркальца наружного напыления (покрывного стекла 2×3 мм). Зеркальце приклеивается к стержню диаметром 0,3 мм, который проходит внутри фрикционной втулки механизма, перемещающего зеркальце. Микроскоп ультратома настраивают так, чтобы резко была видна режущая кромка ножа и прилежащая часть мениска жидкости. Затем в поле зрения микроскопа вводится зеркальце и настраивается так, чтобы резко был виден блок с импрегнированными структурами. Угол наклона зеркальца регулируется вращением стержня в зависимости от задачи наблюдения. Зеркальная приставка не препятствует снятию срезов на бленды и сетки. Блок с тканью освещается проходящим светом <sup>(4)</sup>, нужен тепловой фильтр. Применение микроскопа, имеющего оптику с повышенной разрешающей способностью по сравнению с оптикой из комплекта ультратома, позволяет видеть в зеркальце тонкие детали исследуемого нейрона.

Особенность методики позволяла в каждом отдельном случае отбирать срезы, содержащие только исследуемую структуру. При резке импрегнированной по Гольджи ткани приходилось преодолевать трудность резки ткани, содержащей кристаллические образования, и избегать вымывания преципитата хромистого серебра.

Для предотвращения вымывания преципитата в металлическую ванночку ножа наливался 3,5% раствор  $K_2Cr_2O_7$  (не давать высыхать кромке ножа!). Полученные срезы переносились на бленды с формваровой пленкой, промывались и иногда контрастировались уранилацетатом и лимонно-



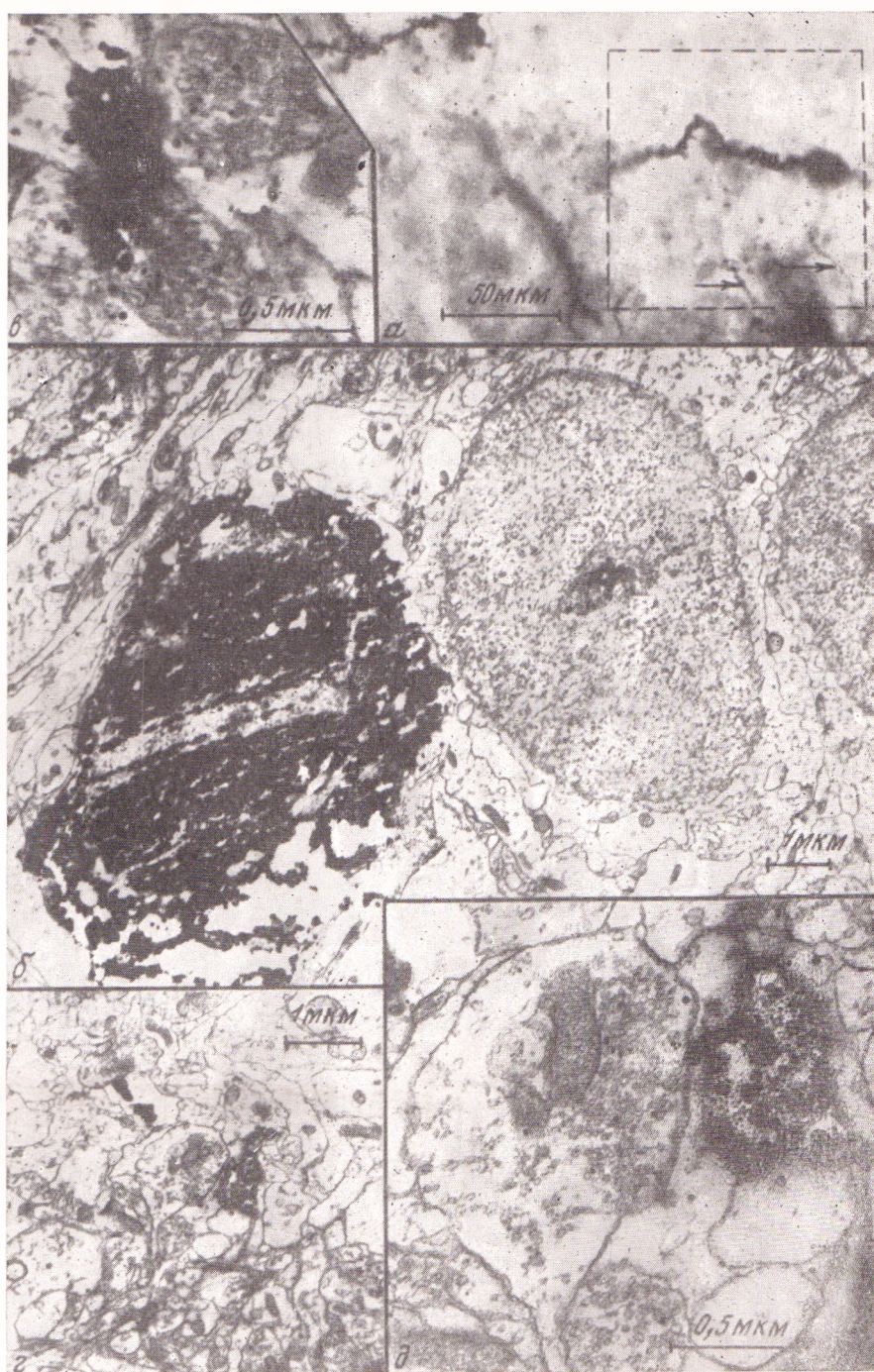


Рис. 2. *а* — зернистые клетки внутреннего зернистого слоя обонятельной луковицы лягушки. Стрелками указаны аксонные волокна, пунктиром — размеры пирамидки для ультрамикротомирования. Импрегнация по Гольджи, световая микроскопия, 300 $\times$ . *б* — импрегнированная сома зернистой клетки, показанной на *а*, в пунктирной рамке. Рядом видны две неимпрегнированные клетки. *в* — аксо-аксональные синапсы; постсинаптический аксон, один из импрегнированных, обозначенных на *а* стрелкой. *г* — аксо-дендритный синапс. Частично импрегнированный дендрит принадлежит клетке, показанной на *а*, *б*. *д* — тот же синапс при большем увеличении. Срезы не контрастировались



кислым свинцом (<sup>10</sup>). Важна быстрота их промывки (5–7 сек.) и сушки для сохранности преципитата. Среды закрывались второй формваровой пленкой для снижения сублимации преципитата под действием электронного пучка в микроскопе. Изучение проводилось в микроскопах Hitachi-11 b, JEM-7.

Ткань в целом достаточно сохранна. Четко обнаруживаются мембранные системы клетки: цитоплазматический ретикулум с рибосомами, комплекс Гольджи, ядерная и клеточная мембраны. В митохондриях отчетливо различается наружная и внутренняя мембраны, кристы и матрикс. Хорошо определяется тип синапсов, размеры синаптической щели, постсинаптическое утолщение, обычные и гранулярные пузырьки (рис. 2в–д). Вместе с тем плохо различимы микроглубочки и нейрофиламенты.

В электронном микроскопе импрегнированные структуры: тела клетки, дендриты, аксоны, шипики — оказываются конгломератом электронно-непроницаемых гранул различной формы и размеров. Существенно отметить два обстоятельства: импрегнация не выходит за пределы плазматической мембраны клетки, внутри импрегнированной области встречаются участки, свободные от гранул преципитата, с хорошо различной ультраструктурой (рис. 2б). На том же рисунке отчетливо видно, что гранулы преципитата ориентированы параллельными рядами. Полное или частичное растворение преципитата на месте импрегнированной структуры происходит довольно часто.

Важно отметить, что синапс легко определяется, если импрегнированная структура является постсинаптической (рис. 2в, г). Если же она пре-синаптическая, то синапс уверенно можно определить, если прилежащая мембрана утолщена.

В этом методе качество получаемой импрегнации по Гольджи — отсутствие осадков и гиперимпрегнации клеток — особенно важно, так как они осложняют интерпретацию наблюдаемых картин. Неожиданное достоинство метода состоит в том, что ткань хорошо контрастируется осмием во время нахождения мозга в растворе хром-осмия и поэтому отпадает необходимость в обычном контрастировании, подчас дающем грубые осадки.

Наша методика наиболее близка к методике Блэкстеда (<sup>3</sup>, <sup>4</sup>). Однако мы использовали собственную пропись импрегнации по Гольджи, заметно повысили осмотичность растворов сахарозой и применили ряд новых приемов в микротехнике. В частности, разработанная нами зеркальная при-

#### Схема проводки мозга

Вид обработки	Время, мин	Вид обработки	Время, мин
Мозг целиком		Ацетон — спирт 100°	
Спирты		1 : 1	25
30°	30	Ацетон — эпон 812	
50°	60	2 : 1	15
70°	60	1 : 1	25
96°	60	1 : 2	15
100°	90	Эпон с катализатором	
Срезы 30–70 мкм		37°	1 сутки
Спирт 100°	2 × 30	60°	2 суток

ставка позволяла наблюдать импрегнированную структуру в процессе ее резки на ультратоме. Внесенные изменения делают нашу методику более простой и улучшают сохранность ультраструктуры ткани мозга.

Можно предположить, что электронная микроскопия препаратов Гольджи в ряде случаев сделает ненужной объемную реконструкцию структуры изучаемых объектов и будет способствовать большему пониманию процессов, идущих при импрегнации мозга солями металлов.

Совмещение классического изучения мозга по методу Гольджи с современными исследованиями ультраструктуры ц.н.с. открывает принципиально новые возможности для исследования нейрональных связей.

Институт мозга  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

Поступило  
6 III 1974

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Н. А. Перов, Ю. С. Ченцов, Сборн. Приборы и методы электронной микроскопии, М., 1969. <sup>2</sup> Д. Стронг, Техника физического эксперимента, Л., 1948. <sup>3</sup> T. W. Blackstad, Zs. Zellforsch., B. 67, 819 (1965). <sup>4</sup> T. W. Blackstad, In: Contemporary Research Methods in Neuroanat., N. Y., 1970. <sup>5</sup> R. W. Guillery, *ibid.* <sup>6</sup> L. Heimer, *ibid.* <sup>7</sup> L. Heimer, Brain Res., v. 12, 1, 246 (1969). <sup>8</sup> L. Heimer, A. Peters, Brain Res., v. 8, 2, 337 (1968). <sup>9</sup> H. Hollander, J. L. Vaaland, Brain Res., v. 10, 120 (1968). <sup>10</sup> E. S. Reynolds, J. Cell Biol., v. 67, 202 (1963). <sup>11</sup> W. K. Stell, Anat. Rec., v. 153, 389 (1965). <sup>12</sup> W. K. Stell, Am. J. Anat., v. 121, 421 (1967). <sup>13</sup> F. Walberg, Brain Res., v. 36, 2, 353 (1972). <sup>14</sup> W. West, J. Dowling, Science, v. 178, 4060, 510 (1972).