

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 611.576

И. Б. Меликсетян, Дж. А. Мартиросян, А. М. Чилингарян

О реакционной способности ортофосфатов в различных структурах
мозга при разных сроках фиксации

(Представлено академиком НАН Армении В. В. Фанарджяном 15/IV 1992)

В предыдущих наших исследованиях (¹⁻³) удалось показать, что на срезах, полученных из фиксированного мозга, применяя закономерность концентрационного взаимоотношения (^{4,5}), клеточные ортофосфаты можно выявить не только в ядрах глиальных клеток и на стенках сосудов, но и в перикарионах и отростках нервных клеток.

Было также показано значительное отличие в реакционной способности нейронов различных отделов мозга. Установленные нами отдельные факты указывают, что реакционная способность ортофосфатов и сохранность их в клеточных структурах во многом зависит от условий и способов обработки материала. Поэтому в настоящем сообщении предпринята попытка выяснить влияние различных сроков фиксации мозга в формалине, который применялся в качестве основной фиксирующей смеси при выявлении клеточных ортофосфатов.

Объектом исследования служили головной и спинной мозг 12 половозрелых кошек. После легкого нембуталового наркоза животных декапитировали, извлекали головной и спинной мозг, которые разрезали острым лезвием на кусочки толщиной 3—5 мм и, согласно требованиям дальнейшей обработки, помещали в соответствующие фиксирующие смеси. Исследовался мозг, фиксированный в 5%-ном растворе нейтрального формалина после 1, 2, 5, 10, 30-дневной, 2—2,5-месячной фиксации. Из кусочков мозга готовили замороженные срезы, толщиной 50—60 мкм, которые после тщательной промывки в дистиллированной воде помещали в соответствующие инкубационные смеси.

Выявление ортофосфатов в нервных структурах мозга проводили по схеме А. М. Чилингаряна (¹). В наших исследованиях применялись умеренные концентрации свинца, т. е. 0,01 М (0,38%) раствор уксуснокислого свинца, приготовленный на освобожденной от CO₂ дистиллированной воде, к которому добавлялся 1 М ацетатный буфер при pH 5.6. В инкубационных смесях количество свинца оставалось неизменным, менялось только количество буфера, т. е. к 100 мл ра-

створа уксуснокислого свинца добавлялось разное количество буфера от 2 до 50 мл с интервалом 3—5 мл. Срезы в этих смесях инкубировали от 3 до 15 дней при 37°С, далее промывали в дистиллированной воде и проявляли в 0,5—1%-ном растворе сернистого натрия, повторно промывали и заключали в глицерин—желатин.

Проведенные исследования показали, что после фиксации материала 5%-ным раствором нейтрального формалина в течение 24—48 ч на срезах, инкубированных в смеси с 5 мл буфера при pH 5,6, преципитация продукта реакции происходит на стенках капилляров и сосудов. С 10—15 мл буфера осадок образуется в ядрах глиальных клеток. С 20—25 мл буфера в смеси ядерная реакция ослабевает и начинают реагировать осевые цилиндры нервных волокон. Очень часто с этими количествами буфера, в местах, где отсутствует реакция ядер глиальных клеток, образование осадка наблюдается в перикарионах единичных нервных клеток. Избирательное выявление нервных клеток в основном происходит с 35—40 мл буфера в смеси; они выявляются за счет черного мелкозернистого осадка, откладывающегося в перикарионах и отростках.

В коре больших полушарий осадок в основном образуется в перикарионах и коротких отростках мелких пирамидных клеток и мелких звездчатых клеток молекулярного и наружного зернистого слоя. На препаратах мозжечка обнаруживаются тела клеток Пуркинье с коротким основным дендритом и единичные интенсивно окрашенные клетки Гольджи. В белом веществе четко выступают нейроны центральных ядер. В среднем мозге равномерной реакцией отличаются нейроны ядер глазодвигательного, блокового нервов и красного ядра. В изученных нами отделах постоянной и четкой реакцией отличаются нейроны различных ядер варолиева моста и продолговатого мозга. Наиболее интенсивно окрашиваются нейроны ретикулярной формации, отростки которых прослеживаются на довольно длинном от тела расстоянии. Сходная реакция наблюдается также в нейронах ядер лицевого, подъязычного и блуждающего нервов, но отростки их окрашиваются на более коротком от тела расстоянии. В спинном мозге постоянной и равномерной реакцией отличаются мотонейроны.

При дальнейшем повышении количества буфера реакция нервных клеток ослабевает и с 50 мл буфера в смеси структурное окрашивание не происходит.

Относительно сходные результаты были получены после 5—10-дневной фиксации мозга. При pH 5,6 с малыми количествами буфера (2—5 мл), в отличие от 1—2-дневной фиксации, реакция сосудов резко ослабевает, а местами полностью отсутствует. С этими количествами буфера образование осадка наблюдается в ядрах глиальных клеток. С 10—15 мл буфера в смеси начинают выявляться нервные волокна, которые продолжают четко реагировать с 35 мл буфера. С этими количествами буфера начинают реагировать и нервные клетки. В коре больших полушарий выявляются нейроны верхних слоев, единичные пирамидные клетки с короткими отростками и

многочисленные вершечные дендриты крупных пирамидных клеток, многие из которых покрыты шипиками (рис. 1). В мозжечке реагируют тела и короткие отростки клеток Пуркинье, местами заметны островки дендритного дерева. В белом веществе мозжечка окрашиваются только нервные волокна (рис. 2). Кортиковые нейроны и клетки Пуркинье окрашиваются менее интенсивно, чем при 24—48-часовой фиксации. Умеренно выявляются нейроны ствола мозга, однако реакция нервных волокон не исчезает, причем их количество неоднородно в различных участках (рис. 3). С увеличением количества буфера до 40 мл реакция нервных клеток и нервных волокон ослабевает и с 45 мл буфера в смеси образование осадка в нервных структурах не происходит.

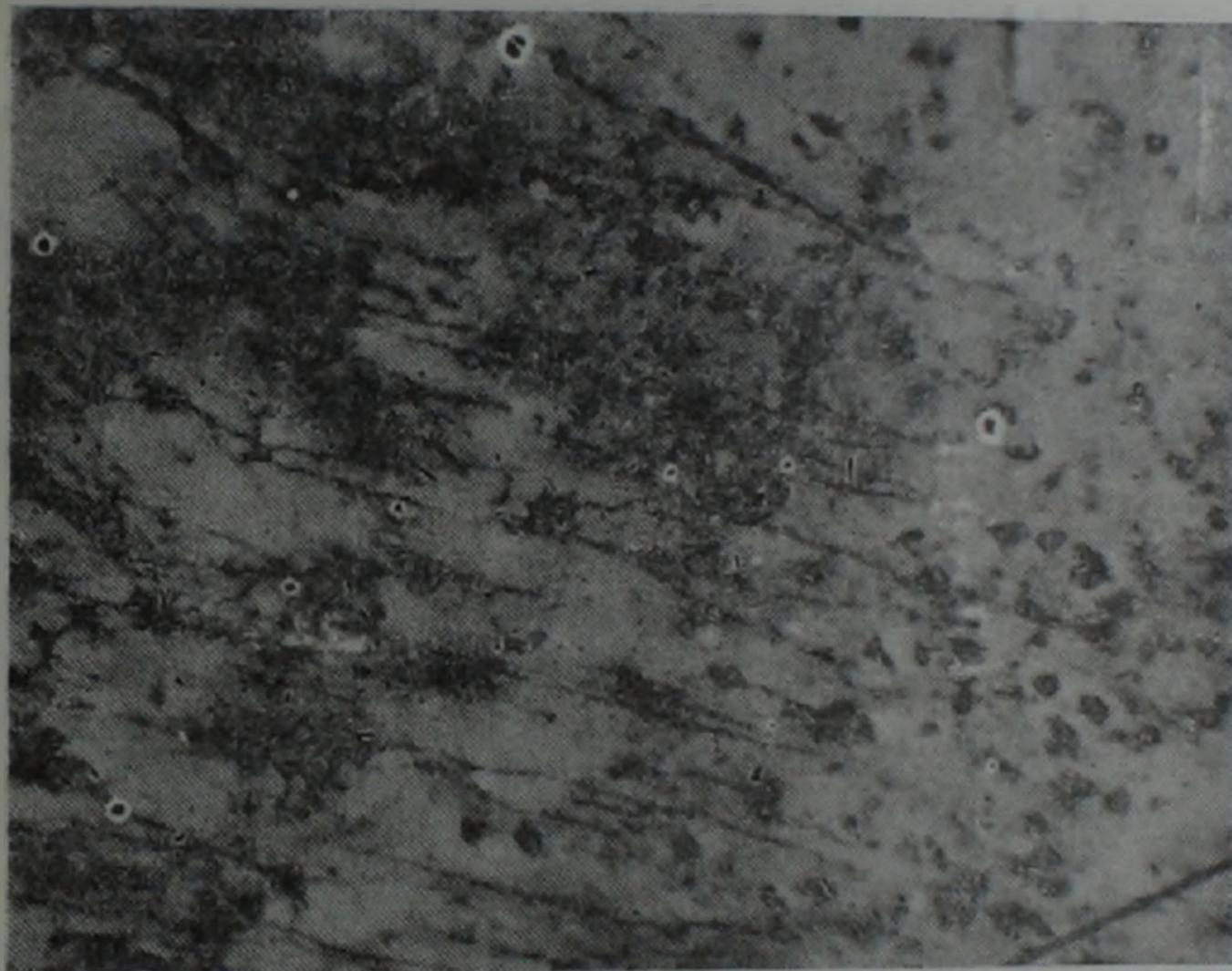


Рис 1. Кора больших полушарий головного мозга кошки. Показана реакция отдельных пирамидных клеток с вершечными дендритами, покрытыми шипиками, выявление ортофосфатов, 10-дневная формалиновая фиксация; ок. 3X, об. 8X.

После 30-дневной фиксации при рН 5,6 с малыми количествами буфера в смеси сосудистая реакция полностью исчезает, а образование осадка наблюдается только в ядрах глиальных клеток, интенсивность которых усиливается с 10 мл буфера. С 15 мл буфера в смеси начинают реагировать осевые цилиндры нервных волокон, которые равномерно и интенсивно окрашиваются с 20—25 мл буфера. Однако с дальнейшим повышением количества буфера их реакция становится неравномерной и с 30 мл буфера в смеси нервные волокна выявляются местами. С этими количествами буфера очень часто на препаратах видны контуры перикарионов нервных клеток. В коре больших полушарий четко выступают вершечные дендриты

крупных пирамидных клеток. С 40 мл буфера в смеси образование осадка в структурах не происходит.

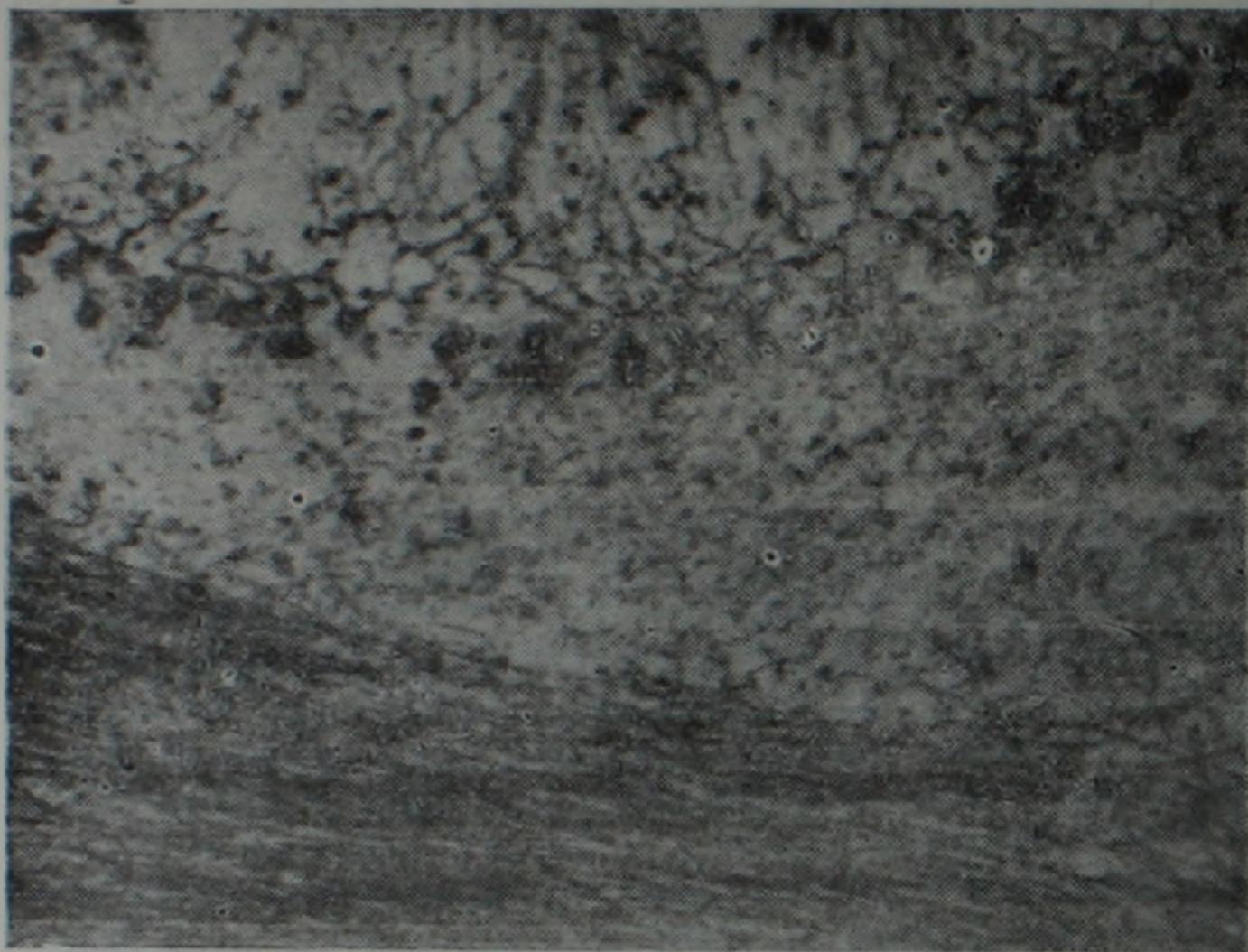


Рис. 2. Мозжечок кошки. Показана реакция клеток Пуркинью и осевых цилиндров нервных волокон. Выявление ортофосфатов, 10-дневная формалиновая фиксация, ок. 8х, об. 8х

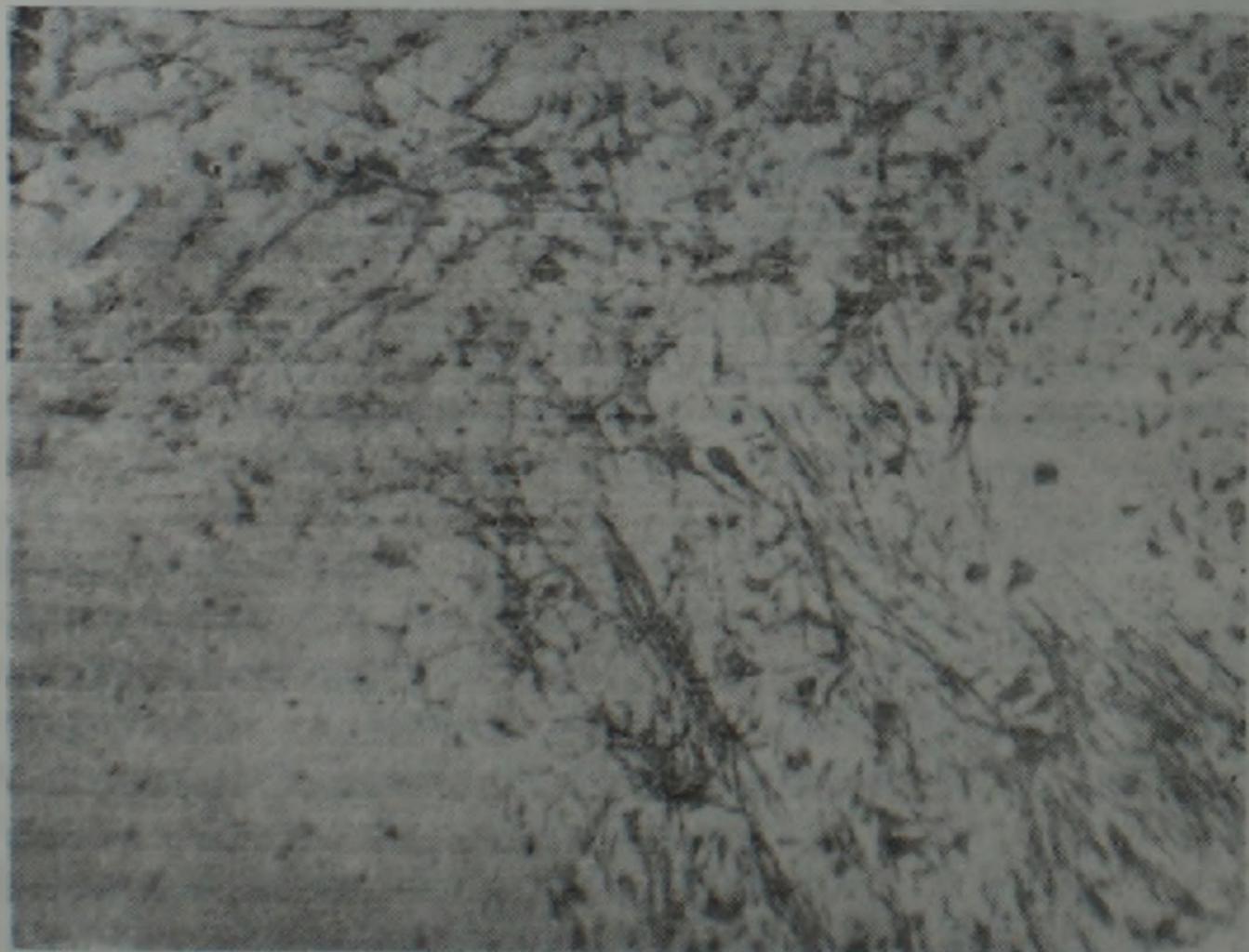


Рис. 3. Варолиев мост кошки. Видны многоугольные клетки ядра Дейтерса и пучки нервных волокон. Выявление ортофосфатов, 10-дневная формалиновая фиксация; ок. 8х, об. 8х

Различные отделы мозга исследовались также в количественном буферном ряду после 2—2,5-месячной фиксации. Полученные данные показывают, что при рН 5,6 с малыми количествами буфера происходит неравномерное окрашивание осевых цилиндров нервных волокон. Реакция последних становится более равномерной с 20 мл буфера в смеси, однако интенсивность окрашивания не усиливается. С 30 мл буфера в смеси реакция осевых цилиндров нервных волокон исчезает. При подобной фиксации мозга реакция нервных клеток во всех отделах отсутствует.

При анализе полученных данных нетрудно заметить, что реакционноспособность клеточных ортофосфатов существенным образом зависит от сроков фиксации материала. Длительность фиксации по-разному меняет реакционноспособность ортофосфатов в различных структурах. Преципитация ортофосфатов на стенках сосудов и в нервных клетках в основном происходит при 24—48-часовой фиксации и резко ухудшается или исчезает при более длительных сроках фиксации. Наиболее устойчивой реакцией отличаются осевые цилиндры нервных волокон, и при длительных сроках фиксации на срезах реагируют только осевые цилиндры нервных волокон, в то время как в других структурах (сосуды, ядра глиальных клеток, нервные клетки) образование осадка не наблюдается.

Таким образом, полученные данные показывают, что при гистохимическом изучении клеточных ортофосфатов выявление последних зависит не только от их реакционноспособности, но и от особенностей структур, на которых они осаждаются.

Институт физиологии им. Л. А. Орбели
Национальной академии наук Армении

Ի. Բ. ՄԵԼԻՔՍԵՏՅԱՆ, Զ. Հ. ՄԱՐՏԻՐՈՍՅԱՆ, Հ. Մ. ՉԻԼԻՆԳԱՐՅԱՆ

Ֆիբրոպրոպեոլիտի տարրեր ժամկետներում ուղեղի տարրեր կառուցվածքներում
օրթոֆոսֆատների ռեակցիոնունակության մասին

Կատվի դիսուլֆիդի և ողնուղեղի տարրեր հատվածների վրա կատարված փորձի արդյունքները ցույց տվեցին, որ բջջային օրթոֆոսֆատների ռեակցիոնունակությունը կապված է ուղեղի ֆիբրոպրոպեոլիտի հետ:

Պարզվել է, որ օրթոֆոսֆատների նստեցումը անոթի պատում և ներվային բջիջներում տեղի է ունենում կարճատև ֆիբրոպրոպեոլիտի հետո: Երկարատև ֆիբրոպրոպեոլիտի պայմաններում, ընդհակառակը, աստիճանաբար ուժեղանում է ներվաթելերի ռեակցիան և նկատելի վատանում և նույնիսկ վերանում ներվային բջիջների և անոթային ռեակցիան:

ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԱՇԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1 А. М. Чилингарян, Дж. А. Мартиросян, И. Б. Меликсетян, II Закавказская конференция морфологов, 1985. 2 А. М. Чилингарян, Дж. А. Мартиросян, И. Б. Меликсетян, ДАН АрмССР, т. 85, № 2 (1987). 3 А. М. Чилингарян, Дж. А. Мартиросян, И. Б. Меликсетян, ДАН АрмССР, т. 86, № 5 (1988). 4 А. М. Чилингарян, ДАН АрмССР, т. 40, № 2 (1965). 5 А. М. Чилингарян, Микроскопическое изучение кровеносных сосудов и нервной ткани, основанное на применении соединений свинца. Докт. дисс., Л., 1968.