

УДК 611.813:815

В. А. Майский, Н. З. Дорошенко

СОЧЕТАНИЕ МЕТОДА ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ КАТЕХОЛАМИНОВ С ТЕХНИКОЙ РЕТРОГРАДНОГО МЕЧЕНИЯ НЕЙРОНОВ

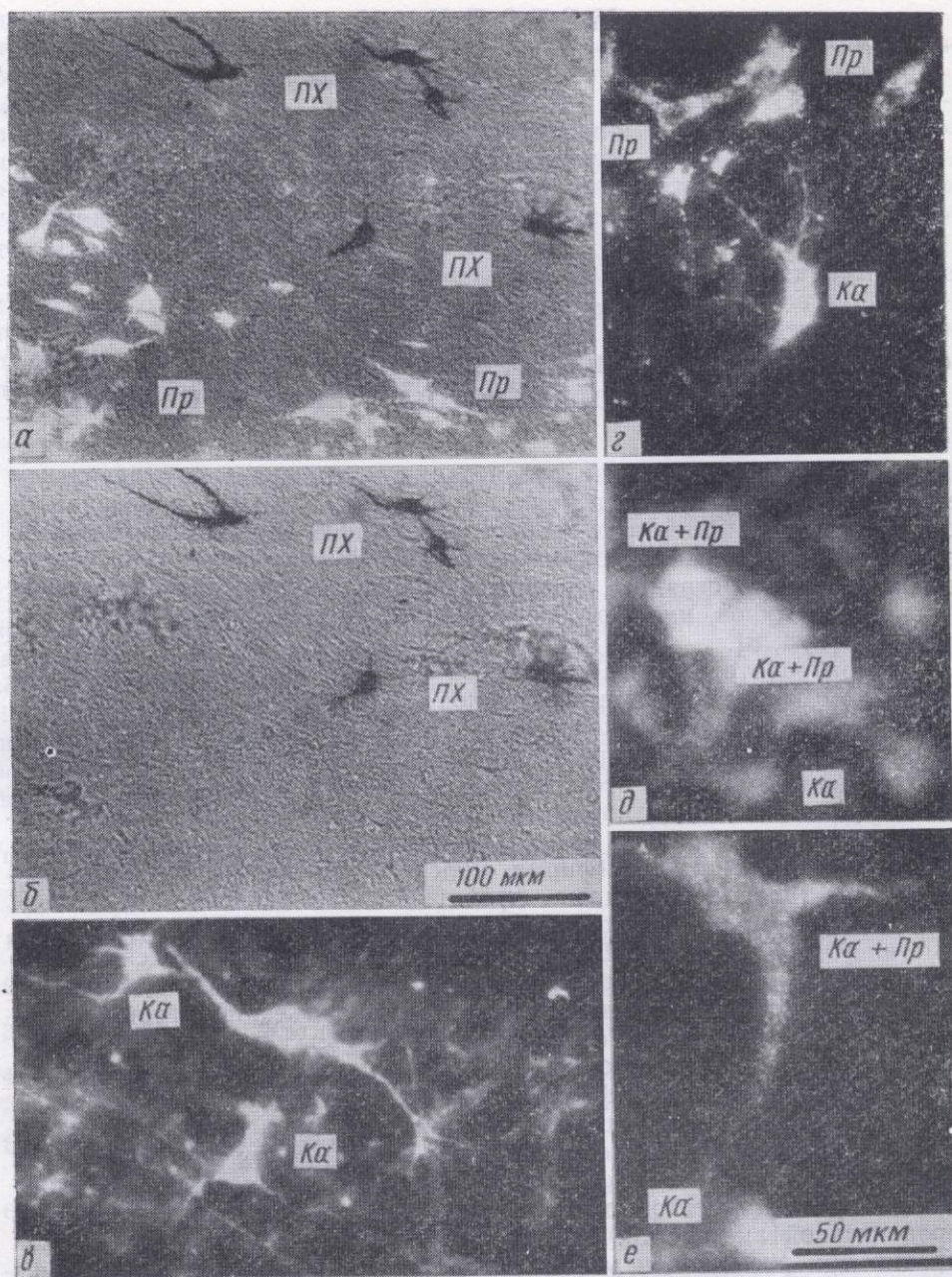
Новые этапы в изучении организации мозга связаны с развитием техники мечения нейронов пероксидазой хрена, а также ретроградного транспорта люминесцентных красителей с целью определения характера дивергенции аксонных коллатералей [6]. В настоящее время успешно сочетается ретроградное мечение нейронов с методами флюоресценции катехоламинов, иммунофлюоресценции, ацетилхолинэстеразной гистохимии [3, 4, 8].

В этой работе описывается способ одновременного выявления в нейронах мозга ретроградных метчиков (пероксидазы хрена, примулина) и флюоресцирующих комплексов катехоламинов. Предлагаемые ниже рекомендации мы выработали в процессе исследований источников волоконных путей в неостриатум на крысе и кошке [1, 2].

Экспериментальным животным инъецировали в различные структуры головного и спинного мозга 0,1—5 мкл 10 %-ного водного раствора примулина оранжевого (фирма «Reichert», Австрия), или 30 %-ного водного раствора пероксидазы хрена (ПХ; Объединение «Олайн», Латв. ССР). Только при добавлении в водный раствор примулина 2 % диметилсульфоксида $pH > 10,0$ («Реахим», СССР) наблюдался его эффективный захват и ретроградный транспорт у кошек. Время, в течение которого животных выдерживали после микроинъекций транспортно-специфических красителей, составляло 2—6 дней.

Двойное мечение нейронов пероксидазой хрена и примулином. В срезах фиксированного формалином мозга примулин легко выявляется в результате люминесценции золотистых гранул в цитоплазме меченых нейронов. Однако люминесценция меченных примулином клеток гасится при традиционной фиксации тканей глютаральдегидом и последующей гистохимической окраске срезов, проводимой для выявления пероксидазной активности. Кроме того, в процессе гистохимической окраски при разложении молекул перекиси водорода выделяющийся атомарный кислород окисляет флюорохром, что также приводит к гашению люминесценции меченных примулином клеток. Использование для фиксации мозга только формалина мало эффективно, так как формалин — слабый фиксатор ткани.

Для успешного осуществления двойного ретроградного окрашивания нейронов ферментом и флюорохромом существует специальный способ [9]. Он заключается в том, что фиксация мозга и гистохимическая окраска срезов производится холодным концентрированным раствором формальдегида, а концентрация субстрата (тетраметилбензидина) и перекиси водорода в красящем растворе понижается. Это дает возможность получить достаточно яркое свечение меченных флюорохромом нейронов даже после гистохимической окраски срезов (рисунк, а, б). Наблюдение ретроградно окрашенных пероксидазой хрена нейронов в этом случае производится при освещении обычным светом, а меченных примулином — светом длиной волны 340—460 нм. Возбуждающими люминесценцию могут быть сине-фиолетовые лучи, для чего



Различные популяции нейронов мозга крысы и кошки, выявляемые формальдегид-глутаральдегидным методом флюоресценции катехоламинов:

а, б — меченные пероксидазой хрена (ПХ) и примулином (Пр) мезэнцефалические источники волоконных путей в неостриатум у крысы при люминесценции и обычном свете соответственно; в, г — катехоламинергические (Ка) нейроны группы А1 у вентролатеральной поверхности продолговатого мозга кошки и крысы соответственно (примулин инъецировали в спинной мозг); д, е — меченные примулином моноаминергические нейроны группы А6 и А5 соответственно (примулин инъецировался крысе в спинной мозг). Масштаб 100 мкм (а, б) и 50 мкм (в-е).

используют светофильтры типа ФС-1 или СС-15-2 (BG3/4, BG12/2), а запирающим эти лучи может быть желтый (оранжевый) светофильтр ЖС-3 (GG9, OG1).

Флюоресценция катехоламинов (формальдегид-глутаральдегидный метод). Хорошо известны методы обнаружения катехоламин-содержащих структур в мозге животных, основанные на явлении стабильной флюоресценции комплексов конденсации формальдегида на молекулах норадrenalина и дофамина [5], и техника гистофлюоресценции кате-

холаминов с применением глиоксиловой кислоты [7]. Упомянутые методы высоко чувствительны и специфичны, однако они трудоемки и требуют особо чистых реактивов и специального оборудования. Их пытались упростить путем использования подходящих формальдегид-глутаральдегидных фиксаторов для перфузии животных [4].

В результате наших экспериментов с применением техники двойного ретроградного мечения нейронов мозга пероксидазой хрена и примулином было замечено, что добавление в фиксирующий раствор формальдегида небольшого количества глутаральдегида приводило к появлению яркой зеленой флюоресценции катехоламин-содержащих структур в получаемых на замораживающем микротоме срезах мозга (рисунок, в). Было также установлено, что для появления флюоресценции катехоламинов принципиальное значение имеют концентрация глутаральдегида в фиксирующем растворе (0,2—0,5 %) и температура самого фиксатора (2—4 °C). При таких условиях фиксации интенсивность свечения примулина не ухудшается, а интенсивность гистохимической реакции на пероксидазу хрена даже усиливается. Таким образом, открывается возможность в одно и то же время, в одной и той же клетке мозга выявлять ретроградные метчики и флюоресцирующие комплексы катехоламинов (рисунок, г—е).

Техника эксперимента

Сочетание формальдегид-глутаральдегидного метода определения катехоламинов с техникой ретроградного аксонного транспорта пероксидазы хрена и примулина заключается в следующем.

Животному (кошка, крыса) инъецируют в мозг 0,1—5 мкл 30 %-ного водного раствора пероксидазы хрена и 10 %-ного водного раствора примулина с добавлением 2 % диметилсульфоксида. Через 2—6 дней животное под глубоким нембуталовым наркозом перфузируют через сердце вначале гипертоническим (2 %-ным) раствором хлористого натрия с добавлением гепарина (25 000 ед/л), а затем холодным (2 °C) фиксатором (3,5 %-ный раствор параформальдегида, 0,25 %-ный глутаральдегида и 5 %-ный сахарозы), приготовленном на фосфатном буфере, концентрации 0,1 моль/л; продолжительность фиксации составляет 1,5—2 ч. Отмывка от фиксатора достигается путем дальнейшей перфузии животного в течение 0,5—1 ч холодным (2 °C) 10 %-ным раствором сахарозы, приготовленном на аналогичном описанному фосфатном буфере. После перфузии мозг быстро извлекают и режут на блоки толщиной около 1,5 см, которые отмывают в холодном растворе сахарозы в течение 2 ч, а затем на замораживающем микротоме изготавливают срезы мозга толщиной 25—30 мкм. Гистохимическую окраску срезов проводят по методу Мезулама в модификации Езерского и Бовкера [9], при этом концентрация тетраметилбензидина понижается до 0,004 % в красящем растворе, а концентрация перекиси водорода не превышает 0,003 %. Срезы промывают в холодном ацетатном (рН 3,3), а затем в фосфатном (рН 7,2) буфере с сахарозой (10 %), быстро натягивают на предметные стекла и высушивают в холодильнике при температуре 2—4 °C. Высушенные на предметных стеклах срезы последовательно переносят в 96°-ный и абсолютный спирты, выдерживая их по 10 с в каждом, а затем в толуол на 2—3 мин и заключают под покровными стеклами в слабо флюоресцирующую эпоксидную смолу (эпон 812).

Обработанные указанным выше способом срезы могут храниться в холодильнике при температуре 4 °C до 1 г без заметного изменения флюоресценции меченных примулином нейронов и катехоламин-содержащих. Необходимо отметить, что примулин и флюоресцирующие комплексы катехоламинов устойчивы к ультрафиолетовому облучению. В течение 30 мин наблюдения и фотографирования интенсивность свечения структур заметно не уменьшается. Спектры эмиссии красителей и флюоресцирующих комплексов катехоламинов (темно-синий, золотистый, зеленый) сильно отличаются, что позволяет легко идентифицировать различные популяции меченых нейронов.

Специфичность данного способа выявления катехоламинов в срезах мозга подтверждается наличием флюоресценции всех известных групп

катехоламин-содержащих нейронов (A1—A13). Кроме того, мы в дополнительных экспериментах проводили фармакологическую пробу [5] на специфичность флюоресцентной реакции: наблюдалось снижение или полное исчезновение флюоресценции катехоламин-содержащих нейронов во всех известных группах после внутрибрюшинных инъекций резерпина.

Описанная техника может успешно использоваться при изучении нервных центров и характера дивергенции аксонных коллатералей, когда необходимы данные о медиаторной природе изучаемых нейронов, а также при оценке влияния биологически активных веществ (включая лекарственные) на обмен катехоламинов в мозге животных.

V. A. Maisky, N. Z. Doroshenko

COMBINATION OF THE METHOD OF CATECHOLAMINE FLUORESCENCE WITH THE TECHNIQUE OF RETROGRADE LABELLING OF NEURONS

The method is described for simultaneous detection of retrograde labels (horseradish peroxidase and primulin) and fluorescent complexes of catecholamines in the brain neurons. Stable fluorescence of the complexes of formaldehyde condensation on the catecholamine and primulin molecules as well as preservation of horseradish peroxidase activity in the labelled neurons are attained by the brain perfusion with cooled solution of paraformaldehyde and glutaraldehyde. This technique permits observing for a long time transport-specific dyes and catecholamine fluorescence in the same cell at the same time.

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

1. Дорошенко Н. З., Майский В. А., Карцева А. Г. Новые данные об организации нисходящих гипоталамических путей, полученные методом двойного ретроградного мечення нейронов флюорохромами // Докл. АН СССР.—1985.—282, № 1.—С. 232—235.
2. Майский В. А., Кебало Т. Г., Савоськина Л. А. и др. Исследование методом двойной флюоресцентной метки локализации мезэнцефалических нейронов, проецирующихся в неостриатум // Там же.—1981.—259, № 5.—С. 1230—1232.
3. Albanese A., Bentivoglio M. Retrograde fluorescent neuronal tracing combined with acetylcholinesterase histochemistry // J. Neurosci. Meth.—1982.—6, N 2.—P. 121—127.
4. Blessing W. W., Jaeger C. B., Ruggiero D. A., Reis D. J. Hypothalamic projections of medullary catecholamine neurons in the rabbit: A combined catecholamine fluorescence and HRP transport study // Brain Res. Bull.—1982.—9, N 1/6.—P. 279—286.
5. Dahlström A., Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system // Acta physiol. scand.—1964.—62, Suppl. 232.—P. 1—55.
6. Kuypers H. G. J. M., Bentivoglio M., Catsman-Berrevoets C. E. et al. 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.
7. Lindvall O., Björklund A. The glyoxylic acid fluorescence histochemical method: a detailed account of the methodology for the visualization of central catecholamine neurons // Histochemistry.—1974.—39, N 2.—P. 97—127.
8. Skirboll 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.
9. Yezierski R. P., Bowker R. M. A retrograde double label tracing technique using horseradish peroxidase and the fluorescent dye 4,6-diamidino-2-phenylindole 2HCl (DAPI) // J. Neurosci. Meth.—1981.—4, N 1.—P. 53—62.

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

Поступила 21.11.85