

УДК 611.813:815

И. М. Прудников, В. А. Майский, Е. Н. Чепега

Идентификация на полутонких срезах катехоламинов и ретроградной метки в мозгу крысы и тканях моллюсков

В настоящее время в нейроанатомических исследованиях большое значение имеет разработка новых методов демонстрации ретроградной метки в нейронах с известной медиаторной природой [1, 3]. Такие методы можно использовать в изучении развития нейрональных структур у различных по систематическому положению животных. Наибольшая информация может быть получена при достижении значительного оптического разрешения в сочетании с высокой специфичностью гистофлюоресцентного метода и снижения уровня флюоресценции фона. Ранее были сделаны попытки изучения флюоресценции моноаминов и ретроградных меток в нейронах при быстрой заливке ткани мозга животных в парафин [1]. На классическом объекте биологии развития и нейробиологии *Lymnaea stagnalis* неоднократно изучали распределение биогенных аминов в тканях эмбрионов и дефинитивных особей [2, 5]. Однако такие работы проводились при исследовании криостатных срезов или тотальных препаратов под оптическим микроскопом.

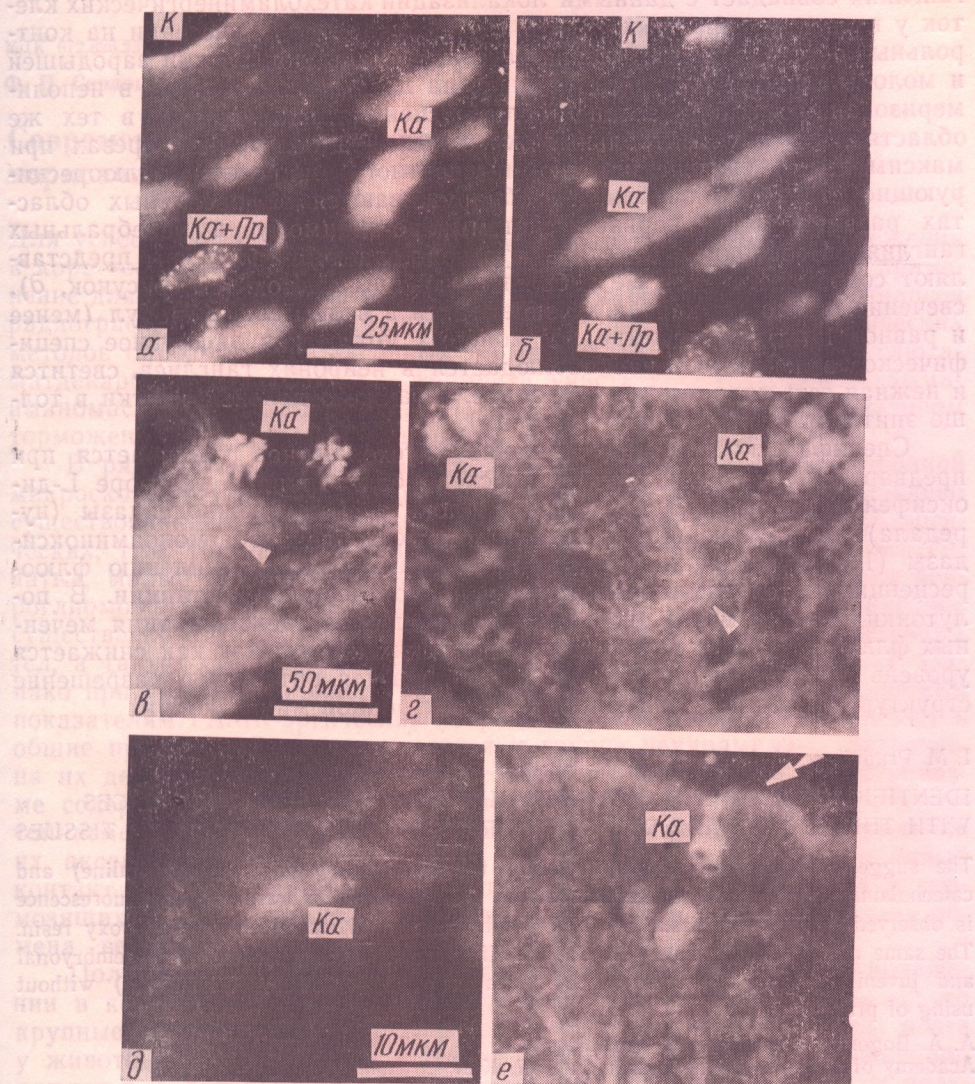
В нашей работе описывается гистофлюоресцентный метод выявления катехоламинов с использованием ретроградной метки, когда наблюдение меченных флюорохромом клеток проводится в очень тонких срезах ткани мозга или эмбриона, заключенных в эпоксидную смолу. Открывается возможность изучения катехоламинергических клеток при больших увеличениях в люминесцентном или электронном микроскопах. Идея такого подхода предложена ранее [6].

Техника эксперимента

Использовали моллюсков (*Lymnaea stagnalis*) на разных стадиях развития, от 20-й и до выхода из яйцевых капсул и достижения ими размеров 3—5 мм (сроки развития определяли по методу Мещерякова [4]). Целые зародыши первой контрольной группы инкубировали на холоду в течение 1 ч в 2 %-ном растворе глиоксала натрия, приготовленном на 5 ммоль/л HEPES с добавлением 5 % сахарозы. Аналогичным образом обрабатывали ганглии, выделенные из моллюсков, достигших размеров 3—5 мм. Моллюсков второй контрольной группы инкубировали на холоду в течение 1 ч в параформальдегид-глутаральдегидном фиксаторе, приготовленном на фосфатном буфере (0,1 моль/л, pH 7,2; 4 % параформальдегида; 0,25 % глутаральдегида; 5 % сахарозы). Крысам предварительно инъецировали в мозг водный раствор флюоресцентного красителя (примулин); через 4 сут животных перфузировали вышеприведенным фиксатором [1].

Метод заключения в эпоксидную смолу осуществляется по следующей схеме: 1) обезвоживание объектов в серии 50°, 70°, 90° спиртов, которые разведены на 8 %-ном водном растворе параформальдегида (обезвоживание проводили в термостате при 60 °C не более 5—10 мин, в зависимости от размеров объектов); 2) обезвоживание объектов в течение 3—5 мин в абсолютном спирте при комнатной температуре; 3) проводка объектов через пропиленоксид в течение 10 мин; заключение объектов в эпоксидную смолу (эпон 812, аралдит) и полимеризация блоков при температуре 50—60 °C в течение 1—2 сут [6].

В изготовленных на ультрамикротоме полутонких (0,5—1 мкм) срезах ствола мозга крысы меченные и немеченные флюорохромом катехоламинергические клетки легко выявляются в люминесцентном микроскопе при длине возбуждающего света 360—420 нм (возбуждающие светофильтры ФС 1—2, ФС 1—4; запирающие светофильтры ФС 3+ +БС 8). Спектры эмиссии примулина и флюоресцирующих комплексов



Флюоресценция катехоламинов и ретроградной метки в мозгу крысы (а, б), эмбриональных и постнатальных тканях моллюска (в—е):

а, б — ретроградно меченные и немеченные примулином (Пр) катехоламинергические (К α) нейроны компактной части черной субстанции в полутонких срезах мозга крысы, толщина срезов 1 мкм, К — капилляр; в — тотальный препарат ганглия моллюска, обработка глиоксалью натрия, флюоресцирующий нейрон указан стрелкой; г — полутонкий срез ганглия, флюоресцирующая сеть в зародыше моллюска; е — светящиеся клетки в толще эпителия ноги моллюска, стенка тела указана двойной стрелкой. Увеличение на а, б, г, е одинаково, масштаб указан на позиции а.

катехоламинов (золотисто-желтый и зеленый соответственно) четко отличаются (см. рисунок, а, б). На тотальных препаратах зародышей прудовика контрольной группы яркое зеленое свечение в люминесцентном микроскопе при тех же условиях наблюдается с 20-й стадии развития в двух локальных областях, которые расположены по обе стороны стомодеума, ближе к глазам эмбриона. В ходе дальнейшего развития личинки зеленое свечение обнаруживается в более глубоких слоях тела выше глотки. При этом наблюдаются светящиеся отростки, которые прослеживаются от указанных выше внутренних областей тела

зародыша к поверхности тела в районе губных щупалец. На контрольных препаратах ЦНС 3—5 мм прудовиков отчетливое свечение катехоламинов в отдельных нервных клетках обнаруживается в церебральных, педальных и буккальных ганглиях. Во всех ганглиях в нейропиле хорошо видна флуоресцирующая катехоламинергическая сеть отростков (см. рисунок, в). Распределение катехоламинергических клеток в ганглиях совпадает с данными локализации катехоламинергических клеток у взрослых животных [5]. Во всех случаях при нанесении на контрольные образцы воды свечение исчезает. В опытной партии зародышей и молодых прудовиков, заключенных на предметных стеклах в неполимеризованную смолу, зеленая флуоресценция наблюдается в тех же областях, что и у контрольных животных. На полутонких срезах при максимальных увеличениях люминесцентного микроскопа флуоресцирующие структуры зародышей обнаруживаются в дорсальных областях развивающейся нервной системы, по-видимому, в церебральных ганглиях. Необходимо отметить, что наблюдаемые структуры представляют собой две отдельные небольшие группы клеток (см. рисунок, д), свечение в которых как диффузное, так и в виде мелких гранул (менее и равное 1 мкм в диаметре). У молодых моллюсков диффузное специфическое зеленое свечение наблюдается в нейронах ганглиев, светится и нежная сеть отростков в нейропиле, а также отдельные клетки в толще эпителия ноги (см. рисунок, г—е).

Специфическое зеленое свечение катехоламинов усиливается при предварительной инкубации моллюсков обеих групп в растворе L-диоксифенилаланина (10^{-5} моль/л) и блокатора моноаминоксидазы (нуредала). Внутривентрикулярная инъекция крысам блокатора моноаминоксидазы (100 мг/кг) также приводила к значительному усилению флуоресценции катехоламинергических нейронов черной субстанции. В полутонких срезах мозга значительно улучшается идентификация меченых флюорохромами катехоламинергических клеток, так как снижается уровень флуоресценции фона и увеличивается оптическое разрешение структур, что можно использовать в электронной микроскопии.

I. M. Prudnikov, V. A. Maisky, E. N. Chepega

IDENTIFICATION OF THE CATECHOLAMINES ON THE SEMI-THIN CLICES WITH THE RETROGRADE DYE IN THE RAT'S BRAIN AND MOLLUSC'S TISSUES

The suggested technique allows revealing the transport-specific dye (primuline) and catecholamine fluorescence simultaneously in the same cell of brain. Intense fluorescence is observed when brain tissue is quickly dehydrated and embedded in the epoxy resin. The same method is suggested for the identification of catecholamines in the embryonal and juvenile tissues of gastropod *Lymnaea stagnalis* (Mollusca Pulmonata) without using of primuline dye.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дорошенко Н. З., Майский В. А., Лигарев И. Н. Применение примулина и флуоресцирующего золотого для мечения моноаминергических нейронов при заливке ткани мозга в парафин // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии.— 1988.— 44, № 3.
2. Круглянская З. Я., Сахаров Д. А. Появление биогенных аминов в развивающейся нервной системе зародышей моллюска *Lymnaea stagnalis* // Онтогенез.— 1975.— 6, № 2.— С. 194—197.
3. Майский В. А., Дорошенко Н. З. Сочетание метода флуоресценции катехоламинов с техникой ретроградного мечения нейронов // Физиол. журн.— 1986.— 32, № 3.
4. Мещеряков В. Н. Прудовик *Lymnaea stagnalis* // Объекты биологии развития // М.: Наука.— 1975.— С. 53—127.
5. Сахаров Д. А. Генеалогия нейронов // М.: Наука.— 1974.— 183 с.
6. Yamamoto T., Katpoka K., Shimizu K., Ochi J. Monoamine-containing subependymal cells of the Lomprey: evidence from combined fluorescence histochemistry and electron microscopy // Histochemistry.— 1983.— 79, N 1, P. 17—22.

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

Материал поступил в редакцию 16.05.89