

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 57.032;577.175.82;611.81.013

ПРИЖИЗНЕННОЕ ОКРАШИВАНИЕ МОНОАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ С ПОМОЩЬЮ 4-[4-(ДИМЕТИЛАМИНО)СТИРИЛ]-N-МЕТИЛПИРИДИНИЙ ИОДИДА КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИХ ТОПОГРАФИИ И ФУНКЦИИ

© 2022 г. В. Е. Блохин¹, Т. С. Пронина¹, С. А. Сурков¹, А. Р. Муртазина¹, М. В. Угрюмов¹, *

¹Лаборатория нервных и нейроэндокринных регуляций, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.11.2021 г.

После доработки 23.12.2021 г.

Принята к публикации 18.01.2022 г.

Изучение топографии и функциональной активности центральных и периферических моноаминергических нейронов является одним из приоритетов нейронаук, поскольку эти нейроны играют ключевую роль в регуляции важнейших функций мозга и внутренних органов. После разработки в 60–80-е годы методов обнаружения моноаминергических нейронов (гистофлуоресценция, иммуноцитохимия) были проведены многочисленные морфологические исследования по картированию моноаминергических нейронов и оценке их фенотипа в головном мозге и на периферии. Принципиально новые возможности для исследования моноаминергических нейронов появились в последнее десятилетие, когда был синтезирован флуоресцирующий лиганд мембранных транспортеров моноаминов — 4-[4-(диметиламино)стирил]-N-метилпиридиний иодид (4-ди-2-АСП или АСП⁺), который позволяет прижизненно окрашивать моноаминергические нейроны. Целью данной работы явилось расширение спектра использования АСП⁺ в исследованиях центральных и периферических моноаминергических нейронов. В процессе выполнения этой работы мы (1) разработали метод окрашивания с помощью АСП⁺ живых дофаминергических нейронов в первичной культуре мезенцефалона эмбрионов мыши, который может быть использован для тестирования антипаркинсонических лекарственных средств на клеточных моделях болезни Паркинсона; (2) разработали с использованием АСП⁺ метод оценки проницаемости ликвор-энцефалического барьера для моноаминов и картирования моноаминергических нейронов, участвующих в обмене моноаминов между ликвором и мозгом; (3) показали, что при системном введении АСП⁺ возможно прижизненное картирование периферических моноаминергических нейронов и клеток периферических органов, экспрессирующих транспортеры моноаминов; (4) показали, что АСП⁺ нельзя использовать для оценки формирования гемато-энцефалического барьера в онтогенезе.

Ключевые слова: мозг, культура клеток, ликвор-энцефалический барьер, АСП⁺

DOI: 10.31857/S1027813322020042

ВВЕДЕНИЕ

Изучение топографии и функциональной активности центральных и периферических моноаминергических нейронов является одним из приоритетов нейронаук — нейробиологии, неврологии и нейрофармакологии, поскольку эти нейроны играют ключевую роль в регуляции важнейших функций мозга и внутренних органов [1, 2]. Так, например, центральные дофаминергические нейроны в составе туберо-инфундибулярной и нигростриатной системы являются ключевым звеном регуляции соответственно репродукции и двигательной функ-

ции [1, 3–6]. Нарушение функций этих нейронов, в первую очередь в результате их гибели, приводит к развитию таких нейродегенеративных заболеваний как гиперпролактинемия и болезнь Паркинсона [7–11]. Не менее важную роль в регуляции центральных и периферических функций играют другие катехоламинергические нейроны — норадренергические нейроны. Эти нейроны в мозгу сосредоточены в “голубом пятне” ствола, а на периферии в симпатических ганглиях — источнике иннервации внутренних органов. Ряд заболеваний, в том числе болезнь Паркинсона, сопровождаются гибелью периферических норадренергических нейронов и десимпатизацией внутренних органов, что приводит к нарушению их метаболизма и функций [2].

* Адресат для корреспонденции: 119334 Россия, Москва, ул. Вавилова, 26, тел./факс +7(499)135-88-42; e-mail: michael.ugrumov@mail.ru

После появления методов выявления моноаминергических нейронов — в 60-ые годы прошлого века — по наличию в них флуоресцирующего комплекса параформальдегида-моноаминов (метод Фалька-Хилларпа), а затем иммуноцитохимического выявления ферментов синтеза моноаминов и самих моноаминов, широким фронтом развернулись морфологические исследования по картированию и оценке фенотипа моноаминергических нейронов в мозге и на периферии [13]. Качественно новые возможности для исследования моноаминергических нейронов появились в прошлом десятилетии, когда был синтезирован флуоресцирующий лиганд мембранных транспортеров моноаминов — 4-[4-(диметиламино)стирил]-N-метилпиридиний иодид (АСП⁺), и было предложено использовать его для прижизненного выявления моноаминергических нейронов [14]. Этот подход открывает широкие перспективы не только для оценки локализации и содержания моноаминергических нейронов в центральной и периферической нервной системе в норме и при патологии на срезах фиксированной ткани, но и для прижизненного изучения функциональной активности моноаминергических нейронов в сложных нейрональных системах, включающих различные типы нейронов. Однако до сих пор исследования с использованием АСП⁺ в основном ограничиваются оценкой свойств моноаминовых транспортеров и лишь в единичных работах АСП⁺ используется для визуализации нейронов [15–20].

Целью данной работы явилась попытка расширить спектр использования АСП⁺ в исследованиях центральных и периферических моноаминергических нейронов как *in vitro*, так и *in vivo*. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: (1) Разработать метод окрашивания живых дофаминергических нейронов АСП⁺ в первичной культуре мезенцефалона эмбрионов мыши как основы для тестирования антипаркинсонических лекарственных средств на клеточной модели болезни Паркинсона; (2) Разработать метод оценки с помощью АСП⁺ проницаемости ликвор-энцефалического барьера для моноаминов и картирования нейронов, участвующих в обмене моноаминами между ликвором и нервной тканью мозга; (3) Оценить возможность использования системно вводимого АСП⁺ для оценки проницаемости гемато-энцефалического барьера и картографии симпатической нервной системы и клеток внутренних органов, экспрессирующих мембранные транспортеры моноаминов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В работе использованы самцы крыс популяции Вистар на четвертый постнатальный

день (П4), П9 и П30, а также самцы мышей C57Bl/6 на 13-й эмбриональный день (Э13). Для получения датированной беременности использованы самки мышей, к которым вечером подсаживали самцов, а утром у самок проверяли наличие вагинальной пробки, как показателя 1-го дня беременности. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде и 12-ти часовом режиме день–ночь. Манипуляции с животными проводили под наркозом-хлоралгидрат (Sigma, США) в дозе 400 мг/кг.

Получение и окрашивание АСП⁺ первичной культуры эмбрионального мезенцефалона мыши. На 13-ый день беременности самкам мышей под наркозом проводили лапаротомию и извлекали эмбрионы. Эмбрионов декапитировали и вырезали мозг. Затем в охлажденном стерильном буфере Хенкса без Ca²⁺ и Mg²⁺ из мозга выделяли ventральный мезенцефалон и диссоциировали его согласно ранее опубликованному протоколу [21]. Для этого вырезанную нервную ткань помещали в микропробирку со средой DMEM/F12 с бессывороточными добавками — В-27 27 (2% v/v) и 0.5 мМ L-глутамин (Gibco, США) и диссоциировали путем пипетирования. Полученную суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр (поры — 70 мкм) и центрифугировали при 200 g в течение 5 мин при +4°C. Супернатант убирали, а осадок ресуспендировали в среде культивирования (Neurobasal medium, Gibco, США) с бессывороточными добавками — В-27 (2% v/v), 0.5 мМ L-глутамина, 100 нг/мл фактора роста нервов и 10 нг/мл фактора роста фибробластов мыши с добавлением гентамицина (10 мкг/мл) (все реактивы — Gibco, США). Клеточную суспензию окрашивали трипановым синим и подсчитывали мертвые (окрашенные) клетки в гемоцитометре. Выживаемость составляла 80–90%. Затем клетки высаживали в предварительно обработанные поли-L-лизинем 8-луночные камеры с основанием в виде покровного стекла (Eppendorf, США) — по 250 тыс. клеток на лунку, и культивировали в атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. Среду культивирования заменяли каждые 2 дня. На четвертый день культивирования в среду добавляли 10 мкМ цитарабина (Sigma, США) на 24 ч для подавления пролиферации глии. На 7-й день культивирования клетки использовали для исследования.

На 7-ой день культивирования эмбрионального мезенцефалона среду культивирования заменяли на искусственную спинномозговую жидкость (ИСМЖ), содержащую: 126 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, 1.2 мМ NaH₂PO₄, 2.4 мМ CaCl₂, 1.2 мМ MgCl₂, 25 мМ NaHCO₃, 11 мМ глюкозу, 0.15 мМ аскорбиновую кислоту, 20 мМ HEPES (Все реактивы Sigma-Aldrich, США) (pH 7.4). Эту среду использовали при всех дальнейших инкубациях и для промывки клеток. Затем клетки инкубировали в ИСМЖ с

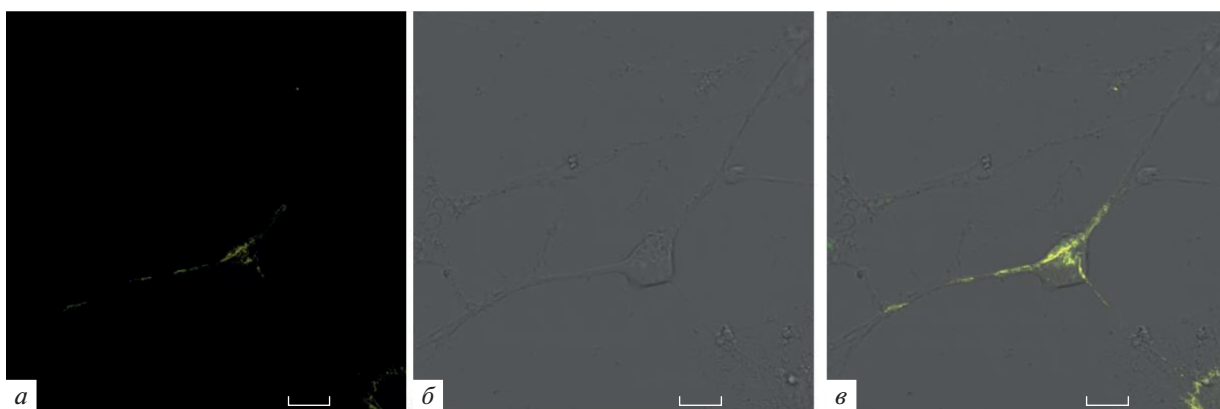


Рис. 1. Микрофотография диссоциированной клеточной культуры мезенцефалона мыши на 7-й день дифференцировки после 30 мин инкубации с 0.1 мкМ АСП⁺: а – окрашивание АСП⁺, б – проходящий свет, в – совмещение фотографий. Увеличение $\times 63$.

100 нМ АСП⁺ (Sigma, США) 30 мин при 37°C и анализировали при микроскопии.

Введение АСП⁺ в желудочки мозга крыс на 30-й постнатальный день. Крысам на П30 под наркозом (хлоралгидрат) в боковой желудочек мозга стереотаксически (1.4 мм латеральнее брегмы, 0.4 мм каудальнее брегмы и 3 мм в глубину) вводили стеклянную микроканюлю с диаметром кончика 50 мкм. Канюля была заполнена буфером Кребса–Рингера (БКР) (мМ: NaCl 120, KCl 4.8, CaCl₂ 2, MgSO₄ 1.3, NaHCO₃ 25, d-глюкоза 10, HEPES 20, аскорбиновая кислота 0.1, pH 7.4), содержащим АСП⁺ в концентрации 0.1, 5 или 8.3 мкМ. В желудочек мозга с помощью гамильтоновского шприца вводили 10 мкл этого раствора со скоростью 2 мкл/мин. В контроле в инъецируемый раствор добавляли GBR-12909 – ингибитор обратного захвата моноаминов, в конечной концентрации 10 мкМ. Через 30 мин после инъекции, животных декапитировали, извлекали мозг и на вибраторе (Vibratome 1000 plus Sectioning system, Германия) приготавливали срезы диэнцефалона толщиной 150 мкм, которые помещали на покровные стекла (Erpendorf, США) и заключали в 70% глицерол для дальнейшей микроскопии.

Внутрибрюшинное введение АСП⁺ крысам на 4 и 9 постнатальные дни. Крысам на П4, П9 внутрибрюшинно вводили АСП⁺, а в контроле смесь 8.3 мкМ АСП⁺ и 200 мкМ GBR12909. Через 30 мин после инъекции животных декапитировали и извлекали надпочечники для микроскопии.

Микроскопия. Живые клетки после инкубации с АСП⁺ изучали при помощи конфокального микроскопа Leica SP5 (Leica, Германия) с программным обеспечением LAS AF, используя иммерсионный объектив с увеличением $\times 63$ (HCX PL APO CS 63.0 $\times$ 1.40 OIL UV). Флуоресценцию АСП⁺ возбуждали лазером с длиной волны 561 нм

и детектировали в диапазоне от 573 до 605 нм. Анализ изображений осуществляли с помощью программного обеспечения LAS AF.

Срезы мозга после введения в боковые желудочки и надпочечники после внутрибрюшинного введения АСП⁺ изучали при помощи конфокального микроскопа Zeiss LSM 880 (Zeiss, Германия) с программным обеспечением Zen Black, используя иммерсионный объектив с увеличением $\times 40$ (Plan-Apochromat 40 $\times$ /1/4 Oil DIC M27). Флуоресценцию АСП⁺ возбуждали лазером с длиной волны 561 нм и детектировали в диапазоне от 573 до 605 нм. Анализ изображений осуществляли с помощью программного обеспечения Zen Blue.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках решения первой задачи было показано, что через 30 мин инкубации с АСП⁺ происходит окрашивание культивируемых клеток эмбрионального мезенцефалона, зачатка черной субстанции, содержащей дофаминергические нейроны (рис. 1). Действительно, как нами ранее было показано иммуногистохимически, эти нейроны иммунопозитивны по тирозингидроксилазе и мембранному транспортеру дофамина, но иммунонегативны по дофамин-бета-гидроксилазе и серотонину [21, 22]. Данные полученные при решении первой задачи подтверждают наше предположение о том, что прижизненное окрашивание дофаминергических нейронов нигростриатной системы с помощью АСП⁺ может быть использовано для тестирования эффективности действия антипаркинсонических лекарств на живых клетках эмбрионального мезенцефалона при моделировании *in vitro* болезни Паркинсона.

В рамках решения второй задачи было показано, что через 30 минут после введения АСП⁺ в желудочки мозга крысам на П30 окрашиваются

нервные волокна и тела нейронов, а также их скопления в перивентрикулярной области мозга. Интенсивность окрашивания нейронов носит дозо-зависимый характер — при наименьшей из используемых в данной работе концентраций АСП⁺ 0.1 мкМ были выявлены лишь единичные нервные волокна и тела нейронов, причем они были слабо окрашены. При увеличении дозы АСП⁺ в 50 раз — до 5 мкМ, количество окрашенных волокон и тел нейронов также, как и интенсивность окрашивания, заметно увеличились (рис. 2б, г). Однако наибольшее число нервных волокон и тел нейронов было выявлено при последующем относительно небольшом увеличении дозы АСП⁺ — до 8.3 мкМ (рис. 2в, д). Это также привело к увеличению интенсивности свечения меченых структур. Через 30 мин после внутрижелудочкового введения АСП⁺ совместно с GBR-12909 — ингибитором обратного захвата моноаминов, флуоресцирующие структуры в мозге практически не выявляются. Эти данные подтверждают вывод, который был нами сделан при изучении окрашивания первичной культуры эмбрионального мезенцефалона мыши — АСП⁺ поступает в моноаминергические нейроны после связывания с моноаминовым транспортером. Дополнительным доказательством этого вывода является выявленная нами дозозависимость окрашивания моноаминергических нейронов.

Есть все основания считать, что выявленные нами окрашенные нейроны после введения в желудочки мозга АСП⁺ являются дофаминергическими. Действительно, мы оценивали окрашивание АСП⁺ только на срезах диэнцефалона, в котором, как известно, из всех моноаминергических нейронов, содержатся только дофаминергические нейроны [23]. В отличие от окрашенных АСП⁺ тел нейронов, нервные волокна, обнаруженные в диэнцефалоне, могут принадлежать не только дофаминергическим нейронам, но также норадренергическим нейронам и серотонинергическим нейронам, содержащимся в стволе мозга [24, 25]. Количественная оценка содержания тех или иных моноаминергических нервных волокон в различных отделах мозга может быть дана путем оценки числа АСП⁺-окрашиваемых волокон, которые теряют способность к окрашиванию в результате предварительной инкубации нервной ткани с ингибиторами обратного захвата соответствующих моноаминов, например, в результате инкубации с флуоксетином — ингибитором обратного захвата серотонина [26].

Наряду с возможностью картировать моноаминергические нейроны в перивентрикулярной области мозга после введения в желудочки мозга АСП⁺, этот же подход позволяет в определенной степени прояснить роль моноаминергических нейронов в нейроэндокринной регуляции нейронов мозга — мишеней для моноаминов. Так, окра-

шивание перивентрикулярно расположенных моноаминергических нейронов после введения АСП⁺ в желудочки мозга свидетельствует об отсутствии барьера на пути моноаминов из нервной ткани в желудочки мозга, что подтверждается высоким содержанием моноаминов в ликворе [27, 28]. С другой стороны, полученные нами данные о поступлении АСП⁺ из желудочков мозга в моноаминергические нейроны, свидетельствуют о том, что содержащиеся в ликворе моноамины могут участвовать в регуляции нейронов мозга — мишеней, включая сами моноаминергические нейроны, что согласуется с данными литературы [28, 29].

Учитывая то, что в регуляции функций периферических органов — сердца, надпочечников, желудочно-кишечного тракта — помимо центральных моноаминергических нейронов, также участвуют и периферические моноаминергические нейроны [30–32], в рамках третьей задачи предполагалось проверить, можно ли с помощью АСП⁺ прижизненно окрашивать и картировать периферические моноаминергические нейроны и ненейрональные клетки, экспрессирующие транспортеры моноаминов. В качестве тест-объекта были использованы надпочечники, секретирующие катехоламины и получающие катехоламинергическую иннервацию [33]. В данной работе показано, что внутрибрюшинное введение АСП⁺ взрослым и неонатальным крысам приводит к окрашиванию клеток и нервных волокон надпочечников (рис. 3а, б). Это окрашивание претовращается при использовании GBR-12909 — ингибитора обратного захвата моноаминов. Полученные данные означают, что предложенный нами подход можно использовать и для картирования моноаминергической иннервации и других внутренних органов.

И наконец, последний вопрос, на который предполагалось ответить в этой работе, можно ли использовать АСП⁺ для определения времени формирования гематоэнцефалического барьера для моноаминов в онтогенезе. Учитывая то, что моноамины в перинатальном периоде являются индукторами развития [34–36], решение вопроса о проницаемости гематоэнцефалического барьера в это время, позволит выяснить, могут ли моноамины мозгового происхождения, помимо участия в регуляции развития мозга, также участвовать и в регуляции развития периферических органов-мишеней и наоборот, могут ли периферические моноамины, помимо участия в регуляции внутренних органов, также участвовать в регуляции развития мозга. Начиная с 70-ых годов предпринимались многочисленные попытки определить время формирования гематоэнцефалического барьера для моноаминов у грызунов, однако для этого были использованы не прямые подходы [37]. Тем не менее, считается, что гемато-

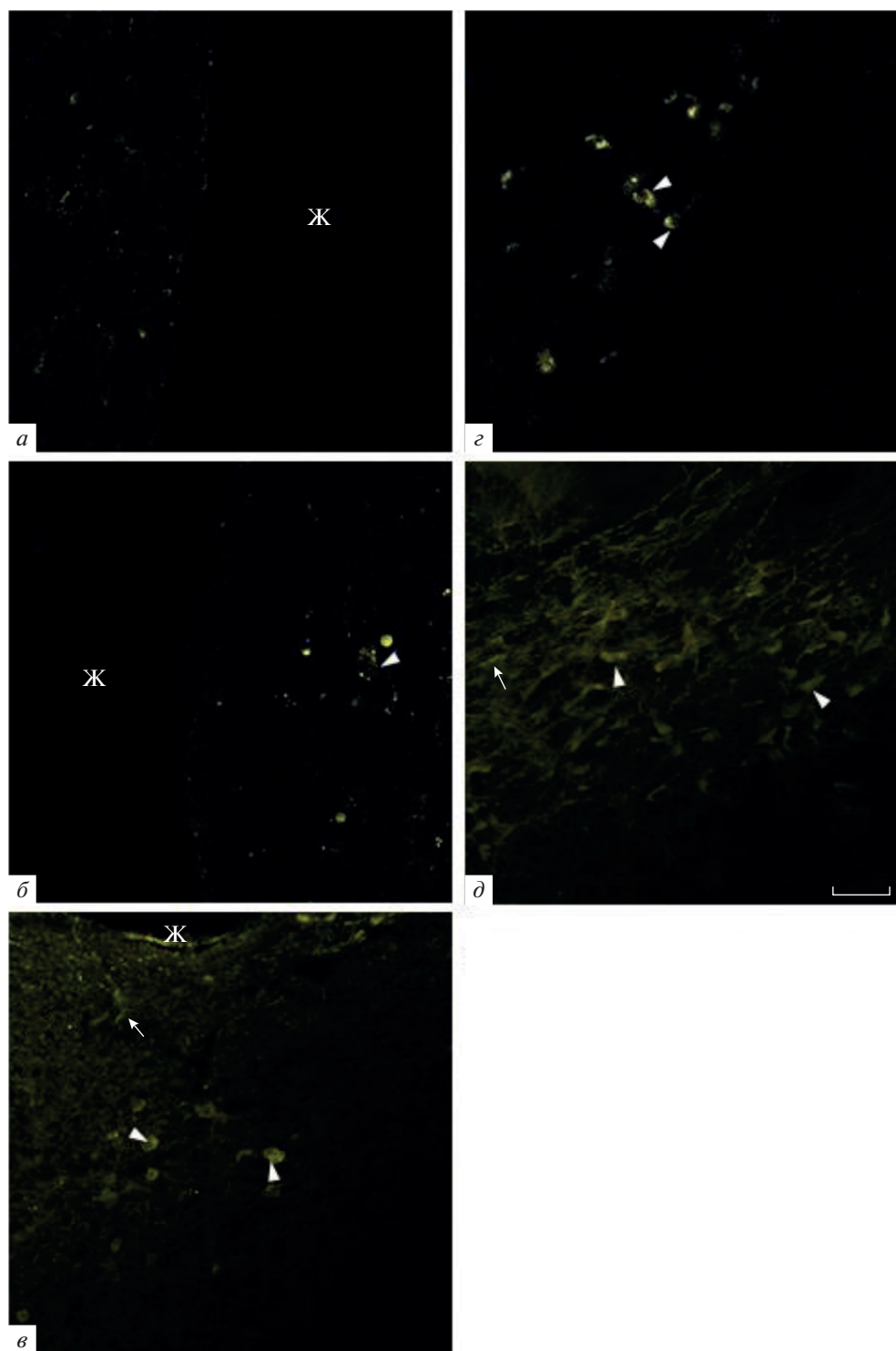


Рис. 2. Микрофотография области 3-го желудочка (*а, в, д*) и зоны инсерта (*б, г, е*) после введения АСП⁺ в боковой желудочек в концентрации 0.1 (*а, б*), 5 (*в, г*), 8.3 мкМ (*д, е*). Увеличение ×40.

энцефалический барьер для моноаминов у грызунов формируется в течение второй недели постнатального периода [38]. С этими представлениями не согласуются наши данные, полученные при ис-

пользовании АСП⁺ в качестве маркера проницаемости гемато-энцефалического барьера. Так, после системного введения АСП⁺ крысам на П4 и П9 нами не было обнаружено его включения в нейроны

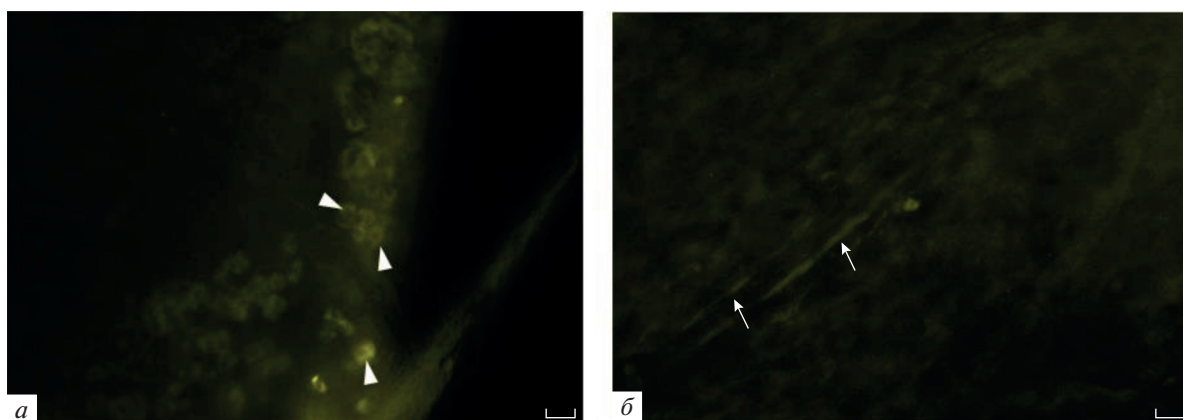


Рис. 3. Микрофотография клеток надпочечников (а) и нейрональных волокон в надпочечниках (б) после интраперитонеального введения АСП⁺ в концентрации 8.3 мкМ. Масштабный отрезок 20 мкм.

мозга, хотя при этом были окрашены надпочечники. Не исключено, что поступление АСП⁺ из крови в мозг ингибируется независимо от гематоэнцефалического барьера.

Выводы:

(1) Прижизненное окрашивание с помощью АСП⁺ первичной культуры моноаминергических нейронов мозга может быть использовано при скрининге лекарственных веществ;

(2) Введение АСП⁺ в желудочки мозга позволяет картировать моноаминергические нейроны, секретирующие моноамины в ликвор и являющиеся мишенями к моноаминам, содержащимся в ликворе;

(3) Системное введение АСП⁺ позволяет картировать периферические моноаминергические нейроны и клетки, экспрессирующие моноаминовые транспортеры;

(4) Маловероятно, что АСП⁺ можно использовать для определения периода формирования гематоэнцефалического барьера для моноаминов онтогенезе.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 20-14-00325.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с национальными

и международными требованиями и правилами, утвержденными комитетом по охране животных ФГБУН Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Мыши — протокол № 39 от 10.09.2020; крысы — протокол № 44 от 24.12.2020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Girault J.-A., Greengard P. // Arch. Neurol. 2004. V. 61. P. 641–644.
2. Klein M.O., Battagello D.S., Cardoso A.R., Hauser D.N., Bittencourt J.C., Correa R.G. // Cell Mol. Neurobiol. 2019. V. 39. P. 31–59.
3. Moore K.E. // Biol. Reprod. 1987. V. 36. P. 47–58.
4. Voigt J.L., Lee Y., Yang S., Arbogast L. // Prog. Brain Res. 2001. V. 133. P. 173–185.
5. Hodaie M., Neimat J.S., Lozano A.M. // Neurosurgery. 2007. V. 60. P. 17–30.
6. Fitzgerald P., Dinan T.G. // J. Psychopharmacol. 2008. V. 22. P. 12–19.
7. Agid Y. // Lancet. 1991. V. 337. P. 1321–1324.
8. Crosignani P.G. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2006. V. 125. P. 152–164.
9. Liu X., Tang C., Wen G., Zhong C., Yang J., Zhu J., Ma C. // Front. Endocrinol. 2019. V. 9. P. 768.
10. Jankovic J., Tan E.K. // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2020. V. 91. P. 795–808.
11. Ugrumov M.V. // CNS Neurosci. Ther. 2020. V. 26. P. 997–1009.
12. Goldstein D.S. // Compr. Physiol. 2014. V. 4. P. 805–826.
13. Hökfelt T. // Prog. Neurobiol. 2010. V. 90. P. 101–18.
14. Mehrens T., Lelleck S., Çetinkaya I., Knollmann M., Hohage H., Gorboulev V., Bokník P., Koepsell H., Schlatter E. // J. Am. Soc. Nephrol. 2000. V. 11. P. 1216–1224.
15. Blakely R.D., DeFelice L.J. // Mol. Pharmacol. 2007. V. 71. P. 1206–1208.
16. Zapata A., Kivell B., Han Y., Javitch J.A. et al. // J. Biol. Chem. V. 282. P. 35842–35854.

17. Babu D.K., Diaz A., Samikkannu T. Rao K.K., Madhavan N. // Clin. Exp. Res. 2009. V. 33. P. 1731–1738.
18. Mayer F.P., Schmid D., Holy M., Yang J.-W., Salzer I., Boehm S., Chiba P., Sitte H.H. // BMC Pharmacology and Toxicology 2012. V. 13. P. 80.
19. Inyushin M.U., Arencibia-Albite F., de la Cruz A., Vázquez-Torres R., Colon K., Sanabria P., Jiménez-Rivera C. // J. Neurosci. Neuroeng. 2013. V. 2. P. 98–103.
20. Urrea J.A., Villaroel-Espíndola F., Covarrubias A.A., Rodríguez-Gil J.E., Ramírez-Reveco A., Concha I.I. // PLoS One. 2014. V. 9. P. 1–11.
21. Pruszk J., Just L., Isacson O., Nikkhah G. // In: Current Protocols in Stem Cell Biology, 1st Edition. John Wiley & Sons Inc., 2D.5.1–2D.5.21.
22. Сурков С.А., Мингазов Э.Р., Стурова А.И., Блохин В.Е., Угрюмов М.В. // Цитология. 2019. Т. 61. № 12. С. 978–986.
23. Smitsö S.M., Peter J., Burbach H., Smidt M.P. // Progress in Neurobiology. 2006. V. 78. P. 1–16.
24. Onaka T., Palmer J.R., Yagi K. // Neurosci. Res. 1996. V. 1. P. 67–75.
25. Charnay Y., Brain L.L. // Dialogues Clin. Neurosci. 2010. V. 12. P. 471–487.
26. Fuller R.W., Wong D.T., Robertson D.W. // Med. Res. Rev. 1991. V. 11. P. 17–34.
27. Scheinin M. // Med. Biol. 1985. V. 63. P. 1–17.
28. Муртазина А.Р., Бондаренко Н.С., Пронина Т.С., Чандрян К.И., Богданов В.В., Дильмухаметова Л.К., Угрюмов М.В. // Acta Naturae. 2021. V. 4.
29. Bjorefeldt A., Illes S., Zetterberg H. et al. // Front. Neural. Circuits. 2018. V. 12. P. 1–12.
30. Amann J.F., Constantinescu G.M. // Semin. Vet. Med. Surg. Small Anim. 1990. V. 1. P. 4–11.
31. Julius S., Valentini M. // Blood Press Suppl. 1998. V. 3. P. 5–13.
32. DiBona G.F. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2000. V. 279. P. 1517–1524.
33. Tóth I.E., Vizi E.S., Hinson J.P., Vinson G.P. // Microsc. Res. Tech. 1997. V. 36. P. 534–545.
34. Lau C., Ross L.L., Whitmore W.L., Slotkin T.A. // Neuroscience. 1987. V. 3. P. 1067–1075.
35. Ugrumov M.V. // Int. J. Dev. Biol. 1997. V. 41. P. 809–816.
36. Gaspar P., Cases O., Maroteaux L. // Nat. Rev. Neurosci. 2003. V. 4. P. 1002–1012.
37. Ugrumov M.V. // Neurochem. Res. 2010. V. 6. P. 837–850.
38. Loizou L.A. // Br. J. Pharmac. 1970. V. 40. P. 800–813.

Staining of Living Monoaminergic Neurons with 4-[4-(Dimethylamino)Styryl]-N-Methylpyridinium Iodide as a Tool for Studying Their Topography and Functions

V. E. Blokhin^a, T. S. Pronina^a, S. A. Surkov^a, A. R. Murtazina^a, and M. V. Ugrumov^a

^a Laboratory of Neural and Neuroendocrine Regulations, Institute of Developmental Biology, Moscow, Russia

The study of the topography and functional activity of central and peripheral monoaminergic neurons is one of the priorities of neurosciences, since these neurons play a key role in the regulation of the most important functions of the brain and internal organs. After the development in the 60–80s of methods for detecting monoaminergic neurons (histo-fluorescence, immunocytochemistry), numerous studies were carried out to map monoaminergic neurons and assess their phenotype. Fundamentally new opportunities for studying monoaminergic neurons appeared in the last decade following the synthesis of a fluorescent ligand of membrane transporters of monoamines – 4-[4-(dimethylamino) styryl]-N-methylpyridinium iodide (ASP⁺), which allows staining of living monoaminergic neurons. Our work was aimed to expand the spectrum of ASP⁺ use in the study of central and peripheral monoaminergic neurons. When doing this, we: (1) developed a method for ASP⁺ staining of living dopaminergic neurons in a primary culture of the mouse embryonic mesencephalon, which can be used for testing antiparkinsonian drugs in cell models of Parkinson's disease; (2) developed using ASP⁺ a method for assessing the permeability of the cerebrospinal fluid-brain barrier for monoamines and for mapping of monoaminergic neurons involved in the exchange of monoamines between the cerebrospinal fluid and the brain; (3) showed that the systemic administration of ASP⁺ allows to map in vivo peripheral monoaminergic neurons and cells of peripheral organs expressing monoamine transporters; (4) showed that ASP⁺ cannot be used to assess the formation of the blood-brain barrier during ontogenesis.

Keywords: brain, cell culture, CSF-brain barrier, ASP⁺