

УДК 591.8 + 576.311.347

ГИСТОЛОГИЯ

А. Л. ШАБАДАШ, С. А. ШАБАДАШ

ГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛИКОГЕНА В СЕТЧАТКЕ ГЛАЗА ЛЯГУШКИ

(Представлено академиком В. В. Парыным 1 VI 1971)

Исследование содержания и распределения гликогена в сетчатке глаза — крайне актуальная и увлекательная задача. Наличие и относительное количество полисахарида в любом типе нервных клеток свидетельствует не только о конденсате потенциальной энергии, но и о физиологической готовности к деятельности, о надежности обеспечения длительного и относительно автономного функционирования. В то же время гистохимическое изучение технически достаточно трудно. Литература вопроса очень невелика, рассеяна по разнообразным журналам, и даже лучшие из работ страдают тремя основными дефектами: 1) вопреки очевидной лабильности ретинального гликогена, подтвержденной разнообразными экспериментами, гистохимические исследования были осуществлены на основе обычных, неспецифических фиксирующих ткани смесей, тогда как следовало применять специальные, инактивирующие ферментолитические вещества (¹⁻³); 2) известен чрезвычайный для нормальных тканей размах гликогенолиза и гликолиза в сетчатке изолированного глаза при энуклеации; следовательно, необходимо технически фиксировать глаз *in vivo* путем быстрой инъекции фиксирующей смеси по кровеносной системе, что является единственно приемлемой техникой гистохимического анализа любого раздела нервной системы; между тем даже компетентные авторы, признавая крайне важную роль быстрой и адекватной фиксации сетчатки, применяли в своих работах погружение (иногда — вскрытого глазного яблока), т. е. прием, непригодный даже для надежного гистологического (не гистохимического!) изучения, о чем десятки лет предупреждал еще Б. Ромейс (⁴); 3) наконец, в опубликованных по гликогену сетчатки исследованиях удивительным образом не учитываются в достаточной мере реактивные изменения распределения и количественного уровня полисахарида, обусловленные адаптацией к различным условиям освещенности. Понятно, что устранение перечисленных недостатков, необходимость которого давно назрела, позволило обнаружить наиболее полную картину динамических состояний полисахаридного обеспечения сетчатки.

Объектом нашего изучения были сетчатки глаз лягушек *Rana ridibunda* и, в меньшей мере, *R. temporaria*, отловленных осенью и содержавшихся в холодильнике при +4°. Они были фиксированы *in situ* внутрисосудистой инъекцией специальной, предотвращающей расщепление гликогена в ткани медно-спиртовой смесью Шабаша (³) в четырех функциональных состояниях: а) 48-часовой темновой адаптации при +4°; б) кратковременного (10—15 мин.) воздействия естественного рассеянного света (после адаптации к темноте); в) после 30 и 60 мин. воздействия постоянного интенсивного света (100 лк); г) при раздражении мелькающим светом (100 лк; 2 гц) в течение 15, 30, 60 и 90 мин. Успешно фиксированный глаз вскрывался и после осторожного удаления хрусталика и стекловидного тела дополнительно дофиксировался 6 час. и более

в той же смеси. Технику дальнейшего приготовления срезов и осуществление цветной реакции на гликоген см. (³) стр. 102—105). Важно подчеркнуть, что окисление 1—2-спиртовых групп глюкозы в макромолекуле гликогена достигается, как это неоднократно нами описывалось, раствором натриевой (или калиевой) соли иодной кислоты (т. е. периодатами, но не кислотой), что исключает гидролиз гликогена в тонком (5 μ) срезе и тем самым устраняет источники вторичных потерь в препаратах.

В результате точного соблюдения всех требований лучшего из современных методов гистохимического обнаружения гликогена установлено: а) наличие гликогена во всех — фоторецепторных, нервных и нейроглиальных — образованиях сетчатки, с присущими им специфическими структурными и функциональными особенностями; б) несомненные динамические изменения распределения и уровня содержания полисахарида, обусловленные реакцией глаза на фактические условия освещенности; в) своеобразный баланс отношения синтез/расход в конкретных структурах, регулируемый и управляемый физиологическим функциональным состоянием.

При темновой адаптации общее содержание гликогена в сетчатке лягушки значительно (рис. 1а). В слое фоторецепторов наибольшие накопления обнаруживаются в миоидах колбочек (которые окрашены поэтому в темно-вишневый цвет); поскольку колбочки в темноте вытянуты в длину, их миоиды отчетливо отличимы и чаще всего имеют форму рюмки на узкой ножке; в некоторых случаях (особенно, если срез проходит под некоторым углом к длинной оси фоторецепторов) гликоген располагается в виде толстых «шнуров». Миоиды палочек содержат меньше количества гликогена, границы распределения которого менее четки. В обеих структурах видны гранулы гликогена в эллипсоиде, очевидно — в митохондриях. Ядросодержащие отделы палочек и, особенно, колбочек характеризуются двоякой локализацией наличия гликогена: а) своеобразными «перипеллюлярными сеточками», содержащими гранулы, по величине и окраске аналогичные «бутонам» наружного и внутреннего синаптических слоев; б) плотными зернистыми «колпачками» в зоне контактов с разветвлениями мюллеровских клеток. Наружный синаптический слой (мы считаем обозначение «синаптический» (De Robertis (⁵)), наиболее адекватным) содержит гликоген в претерминальных нервных волокнах и синаптических «бутонах». Тела горизонтальных клеток охвачены сплошными «кольцами» гликогенсодержащих гранул, соответствующих перипеллюлярным терминалям при окраске метиленовой синью или импрегнации серебром; кроме того, гликоген содержится в их коротких и массивных дендритах. Биполяры очерчены гликогеновыми «ободками», охватывающими их тела, с вкрапленными гранулами, неотличимыми (особенно — на биполярах внешней зоны) по форме и размерам от «бутонов» синаптических слоев; природа этих образований требует уточнения (в том числе — электронномикроскопического); однако данные (⁶, ⁷) о реципрокных связях горизонтальных, биполярных и амакриновых клеток дают основания аналогизировать их со структурами синаптического характера и по морфологии, и по содержанию гликогена. Цепочки точечных зерен гликогена контурируют отростки биполяров. Сходно распределение полисахарида в амакриновых клетках, где, сверх того, различно содержание гликогена в тигроиде цитоплазмы и дендритическом отростке. Очень обильны накопления гликогена во внутреннем синаптическом слое; обилие гликогена в нервных волокнах нейрофила и синаптических «бутонах» дополняется его содержанием в тяжах нейроглиальных отростков, что подчеркивает характерную продольную исчерченность слоя. Сложность описанных Dowling, Michael и др. трансверсальных взаимосвязей нейронов сетчатки полностью воспроизводится препаратами, в которых выявлен гликоген. Ганглиозные клетки содержат немного мелкозернистых включений в цитоплазме и окружены четким перипеллюлярным «ободком»

с пуговчатыми «вздутиями». Нейроглиальные мюллеровские клетки умеренно богаты гликогеном (преимущественно — в базальных отделах) в форме точно-округлых гранул.

Кратковременное освещение темноадаптированной сетчатки умеренным рассеянным естественным светом обуславливает характерные и существенные изменения в локализации и общем уровне содержания гликогена в сетчатке (рис. 16). Любое световое воздействие на сетчатку сопровождается относительным снижением валового запаса гликогена, которое фотометрически вообще сложно учитываемо из-за структурных (и, соответственно, функциональных) различий слоев сетчатки. Однако принципиально важны не суммарные количественные изменения, но перераспределение гликогена в конкретных образованиях: именно локальная убыль или увеличение полисахарида дают ключ к функциональной интерпретации гистохимических результатов. Критический рубеж темнота/свет сопровождается наиболее острыми признаками различий; гликоген в миоиде колбочек несколько уменьшен, а в палочках, наоборот, количество его увеличено; укрупняются, а в слое биполяров и, отчасти, амакринов — резко гиперплазируются гликогенонакопления в пре- и постсинаптических структурах. Особенно отчетлива гиперплазия гликогеновых гранул в синаптоидных «бутонах» наружных биполяров в сочетании с избыточным содержанием полисахарида в контактирующих с ними «ножках» боковых ветвей мюллеровских клеток (рис. 18); в ряде мест формирование крупных гликогеновых «бляшек» по периферии биполярных нейронов объединяет, по-видимому, невральные и нейроглиальные отложения. В синаптических слоях гиперплазия «бутонов» сопровождается относительным снижением общего содержания гликогена, причем исчерченность внутреннего синаптического слоя становится расплывчатой (рис. 18). В перипеллюлярных «ободках» горизонтальных и ганглиозных клеток синаптические «бутоны» увеличены. Наряду с видоизменением накоплений гликогена в нервных клетках и нейрорпиле значительно возрастает содержание полисахарида в нейроглиальных мюллеровских клетках, где, в отличие от темновой адаптации, он оформлен в виде удлиненных палочковидных, ориентированных параллельно длинной оси клетки, структур. Следовательно, конкретные данные динамических изменений распределения гликогена коррелируют с современными физиологическими характеристиками контрастной чувствительности глаза, которая «резко снижается при переходе от одной освещенности к другой» (9).

Лимит статьи не позволяет описать реактивные процессы при раздражении интенсивным постоянным или мелькающим светом. В частности, при воздействии мелькающим светом вначале утрачивается гликоген из наиболее лабильных синаптических структур и мюллеровской глии, затем ресинтез обеспечивает избыточное накопление и — если длительность воздействия превышает 60—90 мин. — содержание гликогена вновь резко снижается во всех слоях сетчатки. Таким образом, динамика расхода и синтетического восстановления гликогена является ценным индикатором биологических состояний сетчатки.

Лаборатория проблем управления функциями
в организме человека и животных
Академии наук СССР
Москва

Поступило
1 VI 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Л. Шабаташ, Бюлл. эксп. биол. и мед., 7, 268 (1939). ² А. Л. Шабаташ, Изв. АН СССР, сер. биол., № 6, 745 (1947). ³ А. Л. Шабаташ, Гистохимия гликогена нормальной нервной системы, М., 1949. ⁴ Б. Ромейс, Микроскопическая техника, ИЛ, 1953. ⁵ E. De Robertis, Histophysiology of Synapses and Neurosecretion, 1964. ⁶ J. Dowling, B. Boycott, Proc. Roy. Soc. B, 166, 80 (1966). ⁷ J. Dowling, Proc. Roy. Soc., B, 170, 205 (1968). ⁸ C. R. Michael, Sci. Am., 220, 105 (1969). ⁹ А. Л. Бызов, Вестн. АН СССР, 7, 56 (1969).