

И. В. ГАЛУЩЕНКО, В. Л. БОРОВЯГИН, М. А. ОСТРОВСКИЙ

АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В СЕТЧАТКАХ ЛЯГУШКИ И КАРПА, ВЫЯВЛЯЕМАЯ МЕТОДАМИ СВЕТОВОЙ И ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

(Представлено академиком Г. М. Франком 30 XII 1972)

Выяснение механизма зрительного процесса неразрывно связано с вопросом о том, как индуцированный светом сигнал фоторецепторной клетки передается в сетчатке нейронам второго порядка — горизонтальным и биполярным клеткам. Ультраструктурная организация пресинаптических окончаний палочек и колбочек и локализация синаптических пузырьков свидетельствуют о том, что передача зрительного сигнала от рецепторов осуществляется химическим путем. Критерии для установления холинэргической природы передачи нервного влияния в настоящее время являются общепринятыми ⁽¹⁾. Существенным аргументом в пользу холинэргической передачи может служить также локализация ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в синаптической области.

Локализация холинэстеразной активности в сетчатке позвоночных на уровне световой микроскопии исследована рядом авторов ⁽²⁻⁵⁾. В сетчатках различных позвоночных АХЭ была обнаружена этим методом в обоих синаптических слоях (у холоднокровных) или в одном из них (у теплокровных) ^(2, 4, 5). Противоречивость полученных данных может объясняться либо видовыми различиями животных, либо различными условиями проведения реакции. Сведения о тонкой локализации АХЭазной активности в структурах сетчатки в литературе отсутствуют.

Целью настоящей работы было выявить локализацию ацетилхолинэстеразной активности в структурах наружного синаптического слоя сетчаток лягушки и карпа методами световой и электронной гистохимии.

Выявление холинэстеразной активности на световом и электронном уровнях проводили по методу Карновского ⁽⁶⁾. Световая гистохимическая реакция на АХЭазу проводилась на фиксированных и нефиксированных препаратах поперечных срезов сетчатки лягушки и карпа (*Rana temporaria*, *Perca fluviatilis* L.). Для электронной гистохимии целую сетчатку лягушки и карпа предварительно фиксировали 1—3% забуференным раствором глутаральдегида, формальдегида или в их смеси (рН 7,2; 4—20°; 30 мин.), затем инкубировали 1,5—2 часа по Карновскому или модифицированным по Барнетт методом Карновского ⁽⁷⁾, промывали, обезвоживали в спиртах и заливали в ЭПОН-812. Неокрашенные и контрастированные насыщенным водным раствором уранилацетата (37°, 75 мин.) ультратонкие срезы исследовали в электронном микроскопе (80 кВ). В качестве контроля специфичности продукта реакции (преципитата) были использованы инкубационные среды: а) не содержащие субстратов; б) содержащие сульфат эзерина ($1 \cdot 10^{-5}$ мол/л) для подавления общей холинэстеразной активности; в) содержащие специфический ингибитор АХЭазной активности ГД-42 ($1 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-6}$ мол/л).

Световая гистохимия. В наших экспериментах АХЭаза в случае инкубирования срезов сетчатки лягушки и карпа отчетливо обнаруживается как в наружном, так и во внутреннем синаптических слоях (рис. 1а, 1б). В наружном слое, как и было показано ранее ^(2, 5) осадок выявляется в виде одной, достаточно плотной полосы. В каких именно структурах этого синаптического слоя локализована АХЭаза, при использовании световой микроскопии сказать невозможно. Распреде-

ние ферментативной активности в довольно широком внутреннем синаптическом слое лягушки имеет весьма сложный характер: осадок располагается в виде 3—4 полос (рис. 1а). Подобную картину наблюдали также в сетчатках теплокровных (⁴). Это указывает на синаптическую неоднородность данного слоя и предполагает возможность нахождения здесь синапсов с нехолинэргическими медиаторами. Так, например, во внутреннем синаптическом слое обнаружены катехоламины (⁸).

Электронная гистохимия. Электронномикроскопическое выявление локализации ферментов не допускает применения осмиевых фиксаторов из-за полной инактивации ферментативной активности и вымывания продукта реакции (⁹). Префиксация альдегидами частично ингибирует ферментативную активность белков (^{10, 11}). Ингибирующее действие альдегидов зависит от их концентрации и степени очистки от глютаровой кислоты и посторонних примесей. Известно, что максимальная сохранность АХЭазной активности в нервной ткани может быть получена при использовании предварительной фиксации в смеси формальдегид — глютаральдегид при температурах, близких к комнатной (⁷). В наших опытах максимальная сохранность структур наружного синаптического слоя и удовлетворительная сохранность АХЭазной активности были достигнуты при использовании 1% глютаральдегида при 20°.

На рис. 1в, г представлены радиальные срезы сетчатки лягушки в области наружного синаптического слоя. Как и в случае световой гистохимии, осадок конечного продукта реакции обнаруживается в наружном синаптическом слое. Он отчетливо виден (рис. 1в) в области расположения тяжелой мюллеровских волокон в сравнительно узкой зоне на уровне пресинаптических окончаний фоторецепторных клеток. На рис. 1г показан инвагинирующий лентовидный синапс (типа «ribbon») в окончании рецептора. Как видно на рис. 1г, к терминали фоторецепторной клетки слева от синаптической ленты и одного из дендритов горизонтальной клетки прилегает отросток глиальной мюллеровской клетки. В нейроглиальной щели между этим отростком и окончанием фоторецептора четко виден темный лентовидный осадок конечного продукта реакции на АХЭазу. В некоторых случаях преципитат реакции выявляется в межклеточном пространстве между плазмомембранами синаптических окончаний смежных фоторецепторных клеток. Однако в собственно синаптической щели между пресинаптическим окончанием рецептора и постсинаптической мембраной следующей нервной клетки осадка обнаружить не удалось. Осадок обнаруживается также между дисками в цитоплазме наружных сегментов палочек и колбочек (рис. 1д, е). Обычно осадок интенсивный и заполняет междисковое пространство в виде продолговатых крупных гранул от дистального до апикального участков фоторецептора. Следовательно, можно говорить о внутриклеточной локализации АХЭ в цитоплазме наружного сегмента фоторецептора.

В контрольных опытах при инкубации сетчаток в средах без субстратов, а также в присутствии специфических и неспецифических ингибиторов АХЭазной активности ни в области тяжелой мюллеровских клеток, ни в междисковом пространстве наружных сегментов фоторецепторных клеток осадок не выявляется.

Электронномикроскопические исследования подтверждают данные световой гистохимии о локализации АХЭазы в структурах наружного синаптического слоя лягушки и карпа. Преципитат обнаруживается в области плотного прилегания окончаний фоторецепторов и отростков глиальных клеток друг к другу, а также между плазмомембранами синаптических окончаний смежных фоторецепторов. Отсутствие осадка в пресинаптических мембранах фоторецепторов и постсинаптических структурах следующих нервных клеток еще не есть окончательное свидетельство отсутствия здесь АХЭазы. Оно может быть обусловлено, например, тем, что предварительная фиксация альдегидами ингибирует

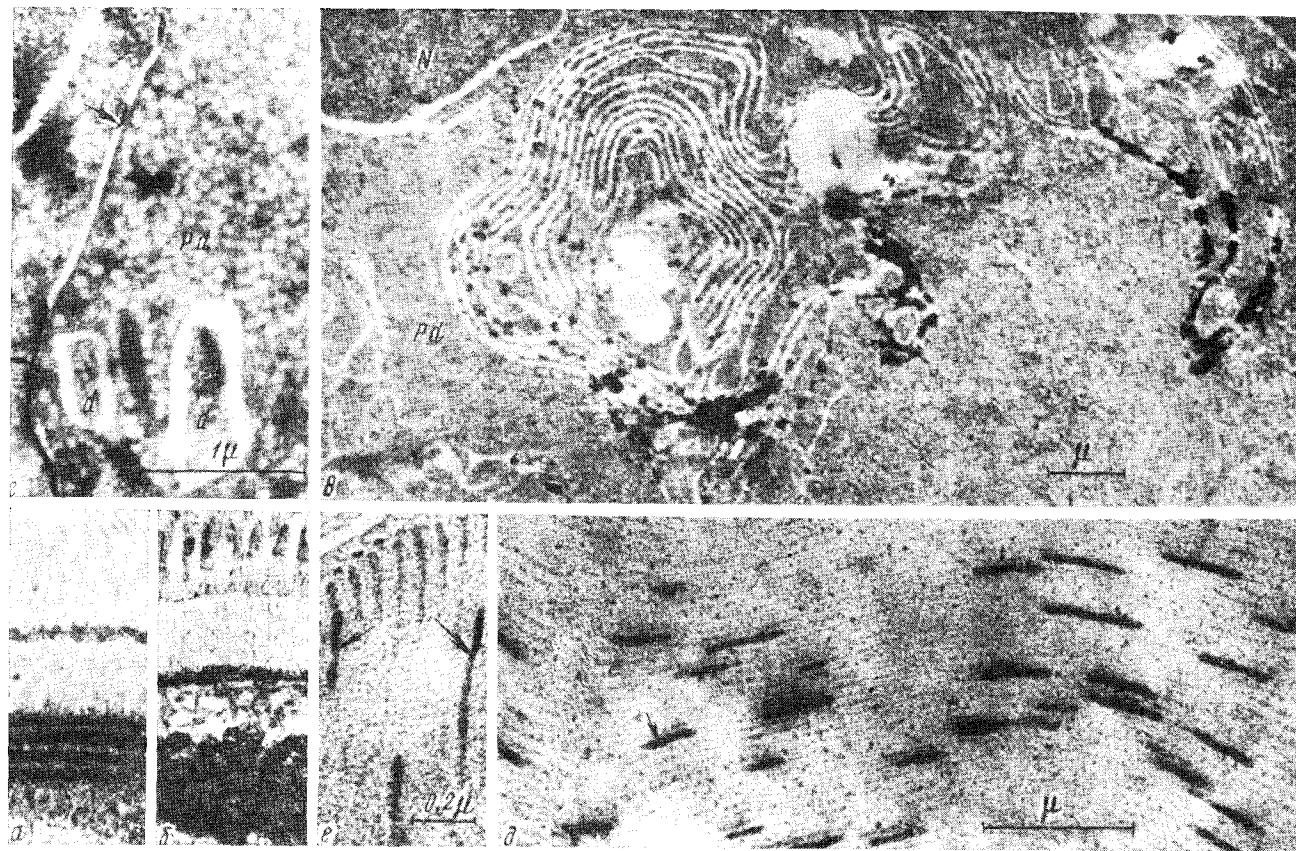


Рис. 1. *а, б* — поперечный срез сетчатки лягушки (*а*) и кариа (*б*). Фиксация Са-формалином 30 мин., 5—7°. Инкубация на АХЭ на срезах по Кариевскому (⁶) 1 час., 40°. *в* — радиальный срез сетчатки лягушки в области наружного синаптического слоя. Инкубация на целой сетчатке по Кариевскому 1 час., 45 мин. при комнатной температуре. Виден темный осадок, локализованный в области многочисленных толстых мюллеровских волокон. *г* — радиальный срез сетчатки лягушки в области пресинаптического окончания фоторецептора. Условия инкубации те же. Осадок (стрелки) расположен между мембранами синаптического окончания рецептора и мюллеровского волокна. Непосредственно в области синаптических контактов между дендритами горизонтальных клеток (*д*) и фоторецептором осадок не обнаруживается. *д* — участок радиального среза наружного сегмента палочки сетчатки лягушки. Условия инкубации те же. Осадок продукта реакции (стрелки) локализован в междисковых пространствах. *е* — то же, что *в*, при большем увеличении. Видна граница наружного сегмента фоторецептора. Осадок локализован в междисковых пространствах

сравнительно слабую активность фермента в самих синаптических контактах, или тем, что анатомические особенности этого синапса (глубокое внедрение дендритов в пресинаптическую область рецепторов) затрудняют проникновение компонентов инкубационной среды. В структурах внутреннего синаптического слоя АХЭаза не была выявлена по причине затрудненной диффузии реагентов инкубационной среды, поскольку в данном случае инкубировалась целая сетчатка.

Выявление АХЭазной активности в определенной зоне мюллеровских тяжей представляет, на наш взгляд, существенный интерес. Согласно существующим представлениям (¹², ¹³), глиальные клетки могут играть определенную роль в функции межнейронных контактов. Предполагается, что медиатор химического синапса действует не только на постсинаптическую мембрану, но и на примыкающую поверхность глиальной клетки, в результате чего возникают вторичные процессы деполяризации и пролонгирования эффекта синаптического проведения. Возможно также, что глиальная часть синаптического аппарата принимает участие в регулировании активности ферментативных процессов, определяющих метаболизм медиатора в области синапса. В пользу такой точки зрения говорит, как нам кажется, обнаруженная АХЭазная активность в гланевральной щели синапса в наружном синаптическом слое сетчатки. Можно себе представить, что выделившийся из пресинаптического окончания рецептора АХ диффундирует в синаптической щели и гидролизует АХЭазой, локализованной в месте нейро-глиального контакта.

Выявление и ингибирование АХЭазной активности между дисками в цитоплазме наружных сегментов палочек и колбочек и в глиальных тяжах было строго параллельно. Кроме того наличие в наружных сегментах фоторецепторов АХЭазной активности подтверждается и биохимически (собственные данные). Как нам кажется, данные о локализации АХЭазы в междисковом пространстве представляют определенный интерес. Во-первых, в нашей лаборатории было показано, что цитоплазма междискового пространства представляет собой не жидкую гиалоплазму, а заполнена структурированными компонентами, вероятно, белковой природы (¹⁴) *. Во-вторых, теоретические предпосылки при моделировании фотовозбудимости на искусственных липидных мембранах в присутствии неорганических ионов (¹⁵) допускают возможность существования в наружных сегментах фоторецепторов медиаторной системы ацетилхолин — АХЭаза.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пущино-на-Оке
Институт химической физики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
28 XII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. Я. Михельсон, Э. В. Зеймаль, В кн. Ацетилхолин, «Наука», 1969.
² М. А. Островский, Тр. общ. биол., **22**, 474 (1961). ³ C. Nichols, G. Koelle, Science, **155**, 477 (1967). ⁴ Nichols, G. Koelle, J. Comp. Neurol., **133**, 1 (1968).
⁵ O. Frönko, M. M. Niemi, E. Merenmies, The Structure of the Eye, N. Y.—London, 1961. ⁶ M. J. Karnovsky, L. Roots, J. Histochem. and Cytochem., **12**, 219 (1964). ⁷ A. Kokko, H. G. Mauthner, R. J. Barnett, *ibid.*, **17**, 625 (1969).
⁸ I. Haggendal, I. Malmfors, Acta physiol. scand., **64**, 58 (1965). ⁹ D. Sabatini David, K. Bensch, J. Cell. Biol., **17**, 19 (1963). ¹⁰ P. Y. Anderson, J. Histochem. and Cytochem., **15**, 652 (1967). ¹¹ U. M. Bris, V. Tennison, P. Duffy, Biochemistry and Pharmacology of the Basal Ganglia, N. Y.—London (1965). ¹² Н. Н. Боголепов, В кн. Длительные электрические потенциалы нервной системы, Тбилиси, 1969. ¹³ А. И. Ройтбак, В кн. Длительные электрические потенциалы нервной системы, 1969. ¹⁴ В. Л. Боровягин, М. А. Островский, И. Б. Федорович, Биофизика, **16**, 350 (1971). ¹⁵ H. C. Pant, B. Rosenberg, Photochem. Photobiol., **14**, 1 (1971).

* Электронномикроскопические картины «пустого» междискового пространства фоторецепторов при осмиевых фиксациях являются артефактом, так как возникают в результате разрушения структуры веществ цитоплазмы наружных сегментов при фиксации, обезвоживании и заливке клеток.