

В. Ф. МАЙОРОВА, И. В. ЧЕРНОВА

**ВЫЯВЛЕНИЕ ^3H -АЦЕТИЛХОЛИНА В ЦИТОПЛАЗМЕ
ЦЕНТРАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS*
МЕТОДОМ ГИСТОАВТОРАДИОГРАФИИ**

(Представлено академиком Е. М. Кренсом 20 II 1976)

Представления П. К. Анохина о том, что любое пресинаптическое возбуждение трансформируется в специфические цитоплазматические химические превращения дендрита и сомы нейрона, т. е. подвергается внутринейрональному преобразованию, послужило предпосылкой настоящей работы (¹). Исходя из этих представлений, мы предполагали изучить особенности распределения экзогенного ^3H -ацетилхолина в нервной ткани моллюска. Для решения поставленной задачи применен гистоавторадиографический метод, сочетающий морфологические и биохимические приемы исследования, который позволяет изучить характер распределения меченного по тритию ацетилхолина в нервных клетках моллюска.

В исследовании были использованы крупные нейроны моллюска *L. stagnalis*, у которого ранее были изучены нейрохимические особенности и физиологические реакции на периферические стимулы (^{2, 5}). Предварительно проведенное электронно-микроскопическое исследование нейронов моллюсков *L. stagnalis* (^{3, 4}) позволило нам не только изучить ультраструктурную организацию тел и отростков нейронов, но и обнаружить на телах этих нейронов аксональные терминалы, образующие аксосоматические синапсы.

Свежевыделенное окологлоточное кольцо моллюска *L. stagnalis*, представляющее собой центральную нервную систему прудовика, инкубировали в растворе ацетилхолин-(N-метил- ^3H)-хлорида (молекулярный вес 182, концентрация $8 \cdot 10^{-6}$ M), со специфической активностью 120 мкС/ммоль в течение 1, 5, 15, 30 мин., а затем переносили нервное кольцо в специальный для моллюсков физиологический раствор, обладающий свойствами переживающей среды, на сроки от 1 мин. до 3 час. После окончания инкубации окологлоточное нервное кольцо фиксировали в жидкости Карнуа в течение 5 мин. при комнатной температуре, затем быстро проводили по спиртам и заливали в парафин. Приготовленные блоки резали на микротоме на полные серии срезов толщиной 7 мкм. Затем срезы депарафинировали и покрывали желатиной и фотоэмульсией типа «М» и «Р». После 10-дневной экспозиции препараты проявляли и окрашивали метиленовой синью. Изучение гистоавтографов производили с помощью световой микроскопии. Всего представлено 6 серий опытов на 50 животных. Для работы брали только летних животных, собранных в июне под Москвой.

При инкубации изолированного окологлоточного кольца с меченым ацетилхолином найдено, что это меченое вещество проникает через ганглионарную оболочку в нервную ткань и распространяется в кортикальной зоне различных ганглиев. Кортикальная зона представляет собой зону клеточных тел нейронов и вставочных сегментов их отростков. Автографы обнаруживаются между телами нейронов, часто повторяя их контуры, вокруг ядер глиальных клеток.

При изучении абдоминального, большого и малого париетальных ганглиев висцерального кольца обнаружено, что меченое вещество избирательно накапливается в телах отдельных нейронов, образующих локальные

группы. Меченые нейроны, содержащие изотопную метку внутри цитоплазмы, по своим размерам обычно относятся к средним клеткам, с наибольшим диаметром сомы порядка 80 мкм. Чаще они образуют довольно тесную группу, расположенную в непосредственной близости от оболочки ганглия.

В большом париетальном ганглии обнаружена группа нервных клеток, содержащих изотопную метку, которые лежат в кортикальном слое, в зоне, обращенной внутрь окологлоточного кольца. Нейроны этой группы, диаметром около 60—80 мкм, имеют округлую форму, апикальная часть их сомы прилежит к оболочке правого париетального ганглия. Нервные отростки, отходящие от тел нервных клеток, направляются в нейропиль. Эти нейроны имеют крупное светлое ядро с большим количеством хроматинового вещества и несколькими ядрышками. Ядро окружено довольно узким слоем цитоплазмы, содержащей тигроид, различной структуры. Вещество Ниссля может быть в виде крупных оформленных глыбок, расположенных обычно по периферии тела нейрона, а также в виде мелкодисперсных глыбок рибонуклеопротеидов, заполняющих всю толщу цитоплазмы.

При изучении меченых нейронов большого париетального ганглия оказалось, что радиоактивная метка распределяется не равномерно по цитоплазме нервной клетки, а отдельными разграниченными участками, между которыми имеются зоны цитоплазмы, лишенные радиоактивной метки. В определенных нервных клетках таких ограниченных участков цитоплазмы, в которых накапливается изотопная метка, может быть несколько (рис. 1).

В висцеральном ганглии группа меченых нейронов состоит из трех крупных нейронов, расположенных во внутренней области ганглия, вблизи оболочки. Это униполярные нейроны, шаровидной формы с крупным светлоокрашенным отростком, направленным в центр ганглия. Большое пузырьковидное ядро заполнено хроматином и ядрышками различной величины. Слой цитоплазмы, окружающий ядро, содержит нислевское вещество разнообразной морфологической характеристики.

Внутри нейрона ограниченные меченые участки цитоплазмы могут иметь различную топографию относительно положения тела и отростка клетки в пространстве. Так, в нейронах висцерального ганглия меченые зоны цитоплазмы пространственно ориентированы внутрь ганглия и располагаются выше места отхождения первого отростка от тела нейрона. Зоны, заполненные изотопной меткой, окружены цитоплазмой, лишенной автографа.

Таким образом, меченый ацетилхолин проникает через оболочку ганглия и избирательно накапливается в определенных нейронах висцерального кольца, причем накапливается в цитоплазме неравномерно, определенными локальными участками.

При детальном изучении внутринейрональной топографии радиоактивной метки нами была прослежена определенная динамика распространения автографа ацетилхолина внутри цитоплазмы нейрона, в зависимости от времени пребывания первого кольца в инкубационной среде. При малых сроках инкубации (5 мин.) основная масса меченого вещества располагается в районе оболочки и наружных слоев цитоплазмы нейрона. С увеличением времени инкубации окологлоточного кольца в меченом ацетилхолине (15 мин.) обнаруживается тенденция меченых молекул к агрегации в толще цитоплазмы и в районе перинуклеарного пространства, которая заканчивается образованием довольно компактного скопления изотопной метки, прилегающего к мембране ядра нервной клетки (30 мин.). Суммируя изложенные факты, следует отметить, что ацетилхолин проникает через нейрональную оболочку, распределяется в толще цитоплазмы и через 30 мин. инкубации концентрируется вокруг ядра нервной клетки.

В последние годы отмечается определенный интерес к исследованиям, направленным на изучение распределения в нервной ткани биологически

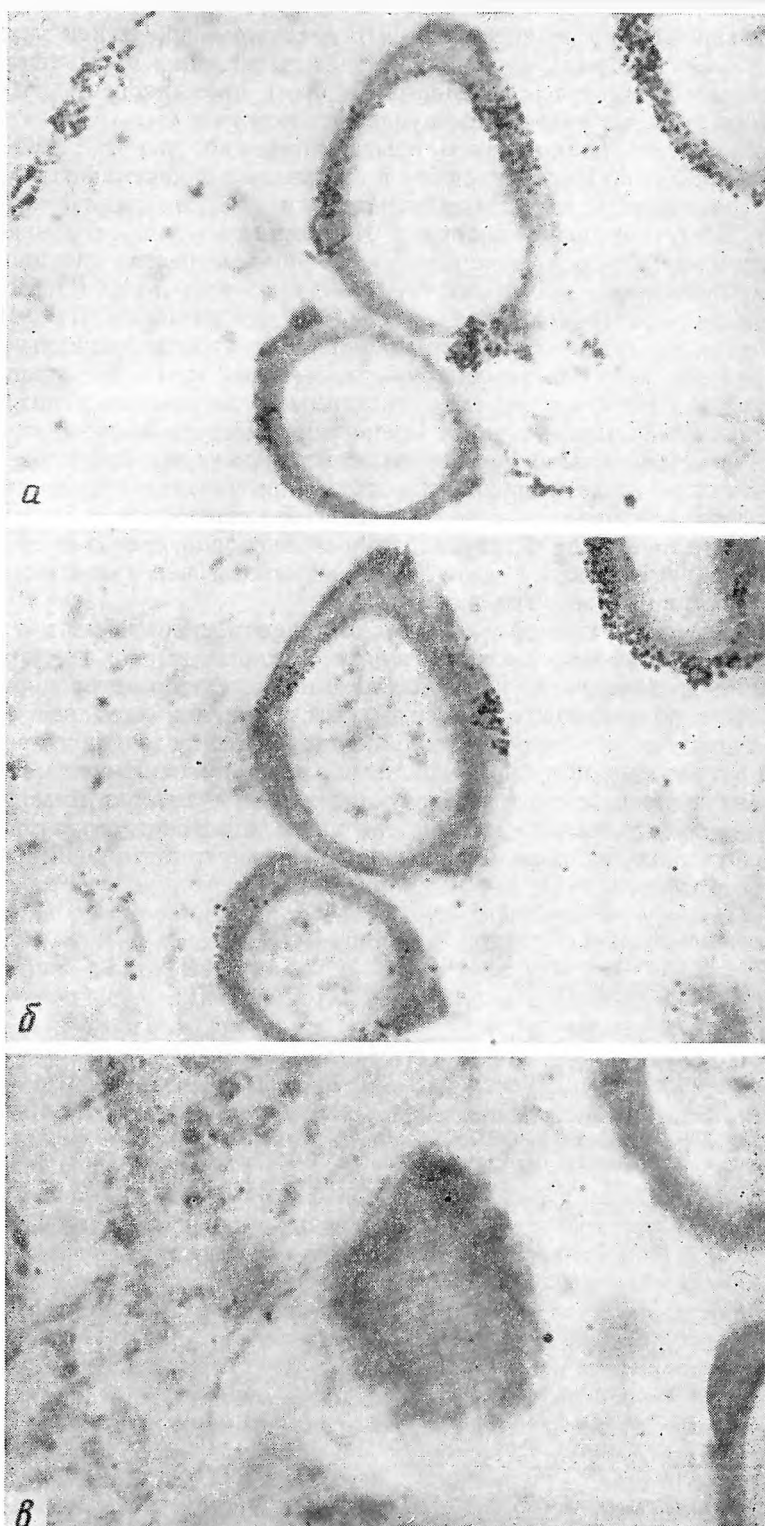


Рис. 1. Автографы ^3H -ацетилхолина в цитоплазме нейронов большого париетального ганглия прудовика *L. stagnalis*. а, б, в — последовательные срезы группы нервных клеток, в цитоплазме которых выявлены автографы ^3H -ацетилхолина (а, б). В последнем срезе (в) автографы ^3H -ацетилхолина в этих нейронах отсутствуют. Толщина срезов 7 мкм, докраска гистоавтографов по Нисслю. Увел. 10×40

активных веществ, интерпретируемых в настоящее время как медиаторы (ГАМК, глицин, лейцин). В ряде работ, выполненных с применением световой гистоавторадиографии, обнаружен факт проникновения ^3H -ГАМК внутрь сомы нервных клеток симпатических ганглиев (⁷).

В эксперименте на кошках и крысах показано, что ^3H -ГАМК и ^3H -глицин избирательно накапливаются в звездчатых и корзинчатых клетках мозжечка, а также в телах клеток Гольджи (⁸). Авторадиографическое изучение ^3H -глутаминовой кислоты и ^3H -глицина в культуре нервной ткани спинного мозга крысят выявило, что меченые вещества активно поглощаются нейронами и глиальными клетками культуры ткани (⁶). Из приведенных выше литературных данных следует, что меченый ^3H -ГАМК, ^3H -глутаминовая кислота и ^3H -глицин проникают внутрь цитоплазмы различных нейронов и могут быть обнаружены методом гистоавторадиографии.

Полученные нами тем же методом данные о включении в цитоплазму определенных нейронов моллюска *L. stagnalis* ^3H -ацетилхолина согласуются с изложенными выше исследованиями, в которых были применены другие биологически активные вещества. В результате проведенного на кортикальных нейронах моллюска гистоавторадиографического изучения распределения меченого ^3H -ацетилхолина установлено, что ^3H -ацетилхолин проникает из окружающей инкубационной среды через ганглионарную оболочку внутрь нервного ганглия.

Меченный по тритию ацетилхолин выявлен в цитоплазме крупных и средних нейронов, составляющих группы, которые имеют определенную локализацию во внутренней зоне большого париетального и висцерального ганглиев. Однако особенно интересным мы считаем тот факт, что меченый ^3H -ацетилхолин обнаружен внутри цитоплазмы определенных нейронов уже при кратковременном взаимодействии с экзогенным ^3H -ацетилхолином.

Результаты проведенного нами исследования и литературные данные позволяют полагать, что, кроме мембран и синаптических структур, в реализации функции нейрона играют роль и внутрицитоплазматические структуры нервной клетки.

Научно-исследовательский институт
нормальной физиологии им. П. К. Анохина
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
12 II 1976

* ЛИТЕРАТУРА

- ¹ П. К. Анохин, Усп. физиол. наук, т. 2, 5 (1974). ² П. К. Анохин, И. В. Орлов, С. А. Осиповский, Нейрофизиология, т. 5, 5 (1973). ³ В. Ф. Майорова, Л. П. Троицкая, ДАН, т. 206, № 6, 1471 (1972). ⁴ В. Ф. Майорова, Л. П. Троицкая, Матер. XXIII совещ. по проблемам ВНД, т. 2, Горький, 1972, стр. 226. ⁵ С. А. Осиповский, Микроионофоретическое исследование нейрхимических механизмов в реакциях нейронов прудовика, Автореф. канд. дисс., 1973. ⁶ Z. Hösl, E. Hösl, P. F. Andres, Brain Res., v. 62, 2 (1973). ⁷ I. A. C. Young, D. A. Brawn et al., Brain Res., v. 63 (1973). ⁸ A. Zjungdahl, T. Hökfelt, Brain Res., v. 62, 2 (1973).