

УДК 612.89

РЕАКЦІЯ НЕЙРОНІВ ВЕРХНЬОГО ШИЙНОГО СИМПАТИЧНОГО ВУЗЛА НА УМОВИ КУЛЬТУРИ IN VITRO

Л. М. Коваль

*Лабораторія морфології нервової системи Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця
АН УРСР, Київ*

В останні роки опубліковані дані, одержані з допомогою світлової [5] та електронної мікроскопії [6], присвячені вивченню гліо-гліальних та гліо-невральних відношень в умовах культури in vitro верхнього шийного симпатичного вузла.

Ми вивчали можливі реакції диференційованих симпатичних нейронів при повній ізоляції від нервових та гуморальних впливів організму. При цьому цікаво було з'ясувати, чи відбувається ріст нервових клітин в умовах in vitro та за рахунок яких елементів.

Культивування верхніх шийних симпатичних вузлів (ВШСВ) статевозрілих кішок проводили на целофані у флаконах Карреля. Шматочки ВШСВ (0,5 см) приклеювали гусячою плазмою з додаванням ембріонального екстракту (ЕЕ). Після згортання плазми вводили рідке поживне середовище, яке складалось: з рідини Тироде (50%), бичачої сироватки (40%) і ЕЕ (15%). Флакони вміщували в термостат при 37° С. Середовище поновлювали кожні п'ять днів залежно від зміни рН. Культури для обслідування реакції нейронів фіксували на четверту, восьму, дев'яту доби. Фарбували тотальні препарати та зрізи експлантатів: гематоксиліном за Вейгертом, тіоніном за Нісслем, імпрегнували сріблом за Більшовським в модифікації Коротченка [3] та протарголом за Бодіаном.

Як ми й передбачали, в умовах культивування симпатичного вузла відзначалася реакція симпатичних нейронів не тільки на ізоляцію від впливу організму, а й на ушкодження відростків при виділенні вузла. На восьму-дев'яту добу культивування в усіх експлантатах спостерігалась активна проліферація сателітарної глії, глії нейропіля і провідних шляхів. Частина гліальних елементів мігрувала за ходом нервових волокон в зону росту. Водночас посилено проліферують ендотеліальні та адвентиціальні клітини (рис. 1, а).

Нервові клітини неоднаково змінювались у різних ділянках експлантата. Найбільш зміненими виявились клітини, що знаходились у центрі експлантата. Відбувалось зморщення, збезводнювання з гомогенізацією цитоплазми і ядра та перичелюлярним набряком або периферична вакуолізація і лізис з розплавленням речовини Ніссля. Частина клітин перебувала в стані необоротної деструкції — кришковидного розпаду, чи перетворювалась на клітини «тіні» (Ніссль, Вейгерт). Імпрегнація виявляє фрагментарний розпад відростків нервових клітин. Навкруги гинучих клітин виявляється фагоцитарна реакція глії.

Явища дегенерації нейронів трапляються і на периферії експлантата поблизу зони росту, але деструктивні зміни клітин тут розвиваються інакше. Відбувається округлення, набрякання та вакуольне пе-

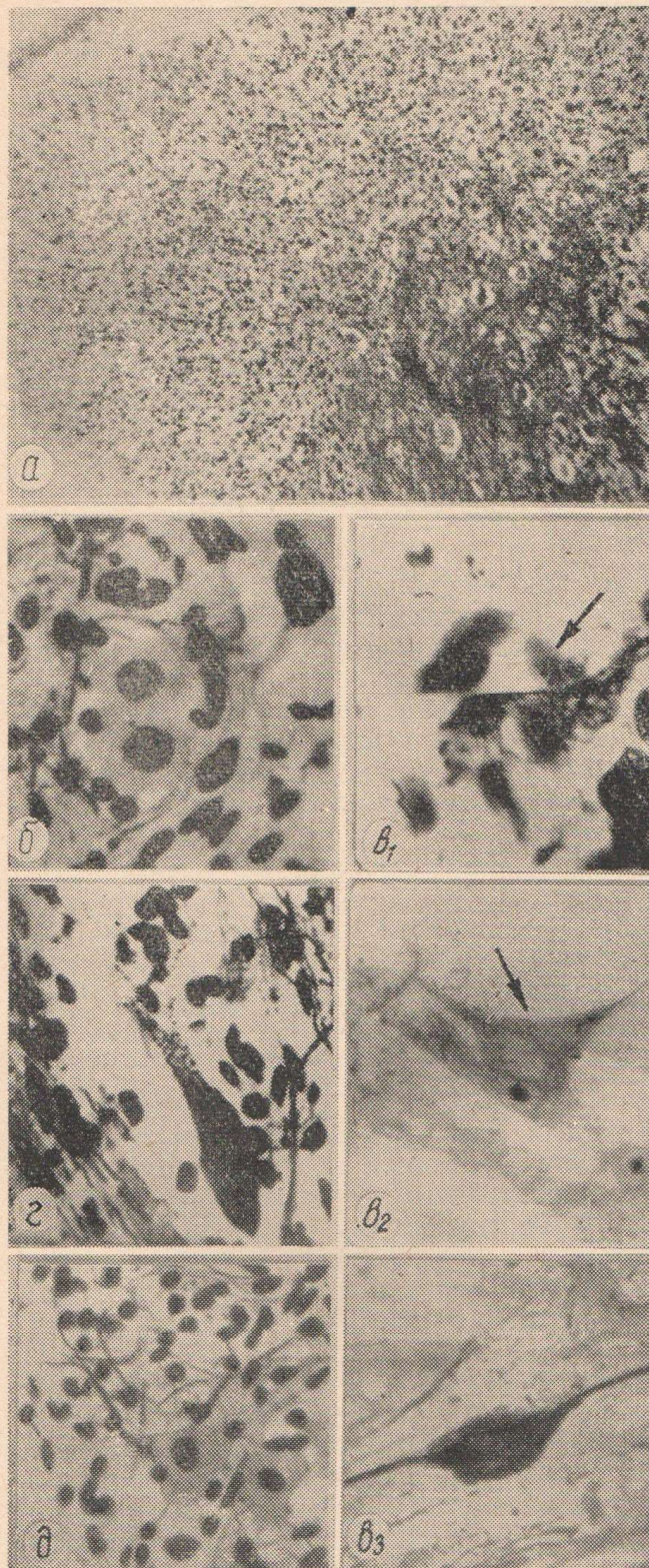


Рис. 1. Нейрони в культурі *in vitro* ВНСВ дорослої кішки.

a — загальний вигляд експлантата восьмидобової культури; видно периферичну зону міграції клітин. 36. 10×7; *b* — амітоз заокруглених дедиференційованих нейронів на периферії експлантата. 36. 90×6; *b*_{1, 2, 3} — виселені в зону росту малодиференційовані уні- та біполярні нейрони: *b*₁ — метод імпрегнації за Більшовським в модифікації Коротченка. 36. 90×6; *b*₂ — метод Ніссля. 36. 40×6; *b*₃ — метод Бодіана. 36. 40×6; *г* — хромафіні зерна в тілі та відростках нейронів. 36. 40×6; *д* — переживаючий мультиполярний нейрон. 36. 40×6. Імпрегнація за Більшовським в модифікації Коротченка (*a*, *b*, *г*, *д*).

реродження клітин. Округлення нейронів на межі зони росту може відбуватися внаслідок того, що в цих ділянках клітини розташовані не так щільно і не відчувають взаємного механічного впливу одне на одне, який зберігається в центрі експлантата. При цьому дані клітини перебувають у кращих умовах живлення і впливу неспецифічного середовища. Поеднання цих факторів зумовлює округлення клітин і наступні їх зміни. В округлених нейронах імпрегнація не виявляє відростків; тіла таких нервових клітин заповнюють оточуючу їх капсулу. Ядра великі, набряклі, округлі з чітко контурованим ядрцем (рис. 1, *b*).

У зоні росту, з допомогою специфічних нейрогістологічних методів Ніссля, Більшовського в модифікації Коротченка та Бодіана, вдається виявити поодинокі нейрони, які мігрували з експлантата. При фарбуванні за Нісслем, вони, найчастіше, мали уні- та біполярну форму. Цитоплазма їх заповнена дрібними зернами речовини Ніссля (рис. 1, *b*₂), яка в цих клітинах концентрується навколо мембрани ядра та на периферії клітини. В деяких клітинах речовину Ніссля видно також в одному з відростків. У окремих виселених біполярів можна бачити вп'ячування ядерної оболонки

Рис

Імп

у е
кл
два
тіл
фі
пофі
ніс
а
ви
же
ній
умпа
на
по
різ

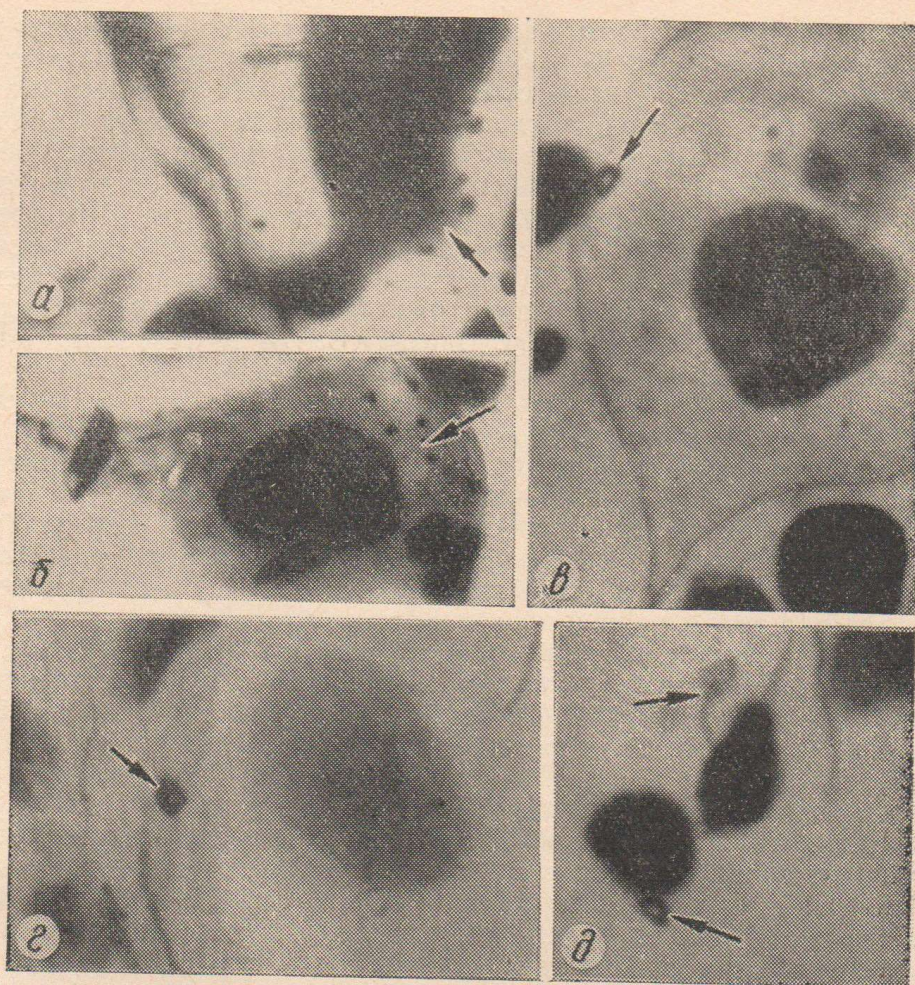


Рис. 2. Дегенеруючі (а, б) і незмінені синаптичні бляшки (в, г, д) на поверхні переживаючих нейронів.

Імпрегнація за Більшовським в модифікації Коротченка. Мікрофото. Зб. 90×6. Розтягнуто при друкуванні.

у вигляді борозни поділу. Імпрегнація сріблом також виявляє поодинокі клітини, що виселяються в зону росту, у яких імпрегнується один або два відростки (рис. 1, в₁, з), таким чином виявляються уні- та біполярні тіла яких витягнуті в напрямку зони росту. Але всі застосовані специфічні методи фарбування показують, що в зону росту мігрують тільки поодинокі, недиференційовані нейрони.

Частина симпатичних нейронів експлантата не виявляє дистрофічних та деструктивних змін. Правильні контури цих клітин, присутність яскравих брилок речовини Ніссля, що заповнюють цитоплазму, а також ясне пухирцевидне ядро — характерні для здорових нервових клітин. Імпрегнація виявляє їх мультиполярну форму. Розгалужені відростки цих клітин не фрагментовані і спостерігаються на значній відстані. Отже, ці нейрони симпатичного вузла переживають в умовах культури *in vitro* (рис. 1, д).

Незміненими виявляються і хромафінні клітини, розташовані групами чи поодинокі, серед нейронів та нервових волокон всередині та на периферії експлантата. Округлі тіла та короткі відростки їх заповнені хромафінними зернами. Тонус та розміри цих клітин не відрізняються від нормальних.

Цікаво, що в цитоплазмі частини переживаючих нейронів, які зберегли нормальний тонус та прозоре пухирцевидне ядро, з'являються аргентофільні зерна. Зерна мають такі ж розміри і так само імпрегнуються, як зерна в поряд розташованих хромафінних клітинах. В глибині експлантата можна бачити нейрони, різною мірою заповнені хромафінними зернами, які можуть скупчуватись навколо великого ядра і прямувати до полюса клітини, а також поширюватись у відростки мультиполярних нейронів, внаслідок чого відростки спостерігаються на великій відстані (рис. 1, з). Інтенсивність імпрегнації — реакція гранул на срібло, як у хромафінних, так і в нервових клітинах, варіює від коричневого до чорного тону. Вигляд гранул та їх розмір у хромафінних і нервових клітинах не відрізняються. Отже, порівняння зернистості хромафінних клітин та зернистості, яка з'являється в нервових клітинах експлантата, свідчить про їх цілковиту подібність.

В імпрегнованих сріблом препаратах на тілах і відростках переживаючих та гинучих нейронів виявляються синаптичні бляшки. Синаптичні бляшки мають кільцевидну та булавовидну форму. Трапляються транзиторні контакти, утворені варикозитетами терміналей. Найчастіше синаптичні бляшки виявляються поблизу одного з полюсів нейронів, а також на всій поверхні клітин (рис. 2).

Більшість синаптичних бляшок перебувала в стані деструкції, набрякання, гомогенізації, посиленої аргентофілії та кришковидного розпаду. На деяких клітинах помітні були як гинучі, так і незмінені синаптичні бляшки, тобто термінали, які походять від гинучих та переживаючих клітин.

Крім описаних змін (появи хромафінної зернистості, округлення і збільшення об'єму) частина симпатичних нейронів виявляла ознаки аміотичного поділу; каріотомію, двоядерність і цитотомію.

Амітоз відбувався нерівномірно. Розміри дочірніх клітин в чотирі-п'ять разів менші за розмір материнських клітин. Цитоплазма новоутворених клітин заповнена брилками речовини Ніссля, ядра пухирцевидні, займають більшу частину тіла клітини. Можна було прослідкувати, що дрібні дочірні клітини стають округлими і групами мігрують, зміщуючись за ходом волокон до периферії експлантата.

Обговорення результатів досліджень

Ми культивували верхній шийний симпатичний вузол дорослих кішок, з тим щоб виявити реакції диференційованих симпатичних нейронів в умовах *in vitro*. Літературних даних про реакції диференційованих нейронів, ізолюваних від нервових та гуморальних впливів організму, ще немає. Форсман і Койдан-Споеррі [5, 6] вивчали глію-гліальні і глію-невральні відношення в гангліях щурів. Отже, як об'єкт нашого дослідження ВШСВ дорослої кішки, так і поставлена задача, дозволяють з нових позицій вивчати диференційовані симпатичні нейрони. Оскільки в умовах культури нейрони повністю ізолювані від нервових та гуморальних впливів організму, природно було припустити, що на восьму-дев'яту доби ізоляції і відсікання відростків відбудеться деструкція нервових клітин. Таке припущення здавалось особливо обґрунтованим, оскільки культивувався вузол дорослих тварин, симпатичні нейрони яких повністю диференційовані. Проте, як видно з фактичного матеріалу, серед маси дегенеруючих нейронів у всіх культурах частина диференційованих нейронів підтримує нормальний метаболізм, тобто переживає в умовах культури. Про це свідчать: наявність яскраво забарвлених брилок Ніссля, збереження розгалужених відростків мультиполярних клітин, незмінені нейрофібрилярні структури

і, нарешті, наявність незмінених синаптичних бляшок. Переживаючими (в умовах восьми-дев'ятидобового культивування) нейронами експлантата можуть бути тільки нейрони, які не зазнали травми при виділенні вузла, тобто нейрони, відростки яких не виходять за межі вузла. Такими нейронами, аксони і дендрити яких не виходять за межі вузла, а утворюють міжнейрональні контакти всередині його, можуть бути тільки вставні нейрони. Саме вони зберігаються між ушкодженими і дегенеруючими нервовими клітинами вузла, саме їх незмінені синапси ми виявляли на тілах дегенеруючих і переживаючих нейронів.

Отже, культивування ізольованого *in vitro* симпатичного ганглію, несподівано для нас, дозволило довести існування проміжних нейронів ВШСВ, що досі було дискусійним питанням в невровегетативній фізіології.

Відповідаючи на питання про можливі реакції диференційованих симпатичних нейронів в умовах *in vitro*, ми повинні відзначити, що більшість нейронів експлантованого вузла гине. Переживаючі нервові клітини, які за всіма ознаками є вставними нейронами, на даних строках культивування змінюються в кількох напрямках.

Перший тип змін виявляється в цитоплазмі деяких переживаючих мультиполярних нейронів, де накопичуються гранули, які формою, розміром, щільністю і характером імпрегнації ідентичні гранулам хромафінних клітин симпатичного вузла. Простежуються різні стадії заповнення цитоплазми нервових клітин такими гранулами і поширення їх по відростках. (Ці гранули не можна прийняти за зерна ліпофусцину, оскільки вони значно крупніші і не утворюють характерних для ліпофусцину скупчень біля полюсів клітин.) Крім того, хромафіноподібні гранули поширюються по відростках нервових клітин, чого ніколи не трапляється з зернами ліпофусцину.

Всі ці спостереження дають нам підставу припустити, що в умовах культури частина переживаючих нейронів депонує катехоламіни в цитоплазмі у вигляді гранул. Відомо, що і в нормальних умовах частина нейронів ВШСВ є адренергічними, тобто нейронами, які виробляють медіатор — норадреналін, що постійно виводиться з перікаріона по відростках під дією нервових імпульсів та гуморальних впливів. Це було доведено Хамбергером [7], який виявив у цитоплазмі симпатичних нейронів люмінесцюючу зернистість катехоламінів. Можливо, що в умовах культивування *in vitro* частина переживаючих нейронів зберігає здатність синтезувати медіатор, але при відсутності нервових і гуморальних впливів не відбувається постійного виведення синтезованого медіатора, і він накопичується в цитоплазмі у вигляді гранул, які ми й виявляємо.

Другий тип змін переживаючих нейронів, виявлених в культурі ВШСВ, пов'язаний з дедиференціюванням нервових клітин, розташованих поблизу зони росту. При цьому тіла клітин округлюються, відростки відпадають (імпрегнація за Більшовським в модифікації Коротченка), цитоплазма нейронів яснішає, речовина Ніссля в пиловидному стані дифузно заповнює цитоплазму. Можливо, що зміни такого типу викликані впливом неспецифічного поживного середовища, втратою функціональних зв'язків з навколишніми нейронами, відсутністю механічних впливів навколишніх клітин і волокон, характерних для нормальних умов існування ганглію.

Зміну будови нейронів в умовах культури *in vitro* описали японські автори [9]. Явища дедиференціювання, округлення та відпадання відростків нервових клітин експлантата простежені Вінніковим [1] при культивуванні нюхового аналізатора. Наші дані підтверджують всі ці спостереження.

Третій тип змін симпатичних нейронів в умовах культури *in vitro* є наслідком дедиференціювання і проявляється в появі здатності до амітотичного поділу. В результаті амітозу виникають дрібні малодиференційовані клітини, які мігрують у зону росту.

Поділ нейронів в експлантатах мозку курячих ембріонів описують Серебряников та ін. [4], Григор'єв [2], поділ нейронів у зоні росту симпатичних вузлів щурячого зародка спостерігав Максимов [8].

Невелика кількість нейронів, виявлена нами в зоні росту експлантата, є виселеними малодиференційованими елементами, які виникли в результаті амітозу дедиференційованих мультиполярів експлантата.

Висновки

1. В умовах культури *in vitro* ВШСВ дорослих кішок переживають проміжні нейрони. Їх незмінені синапси зберігаються на тілах клітин.

2. Частина переживаючих адренергічних нейронів депонує гранули катехоламінів у цитоплазмі і відростках.

3. Частина нейронів, розташованих у зоні росту, може дедиференціюватись, губити відростки, заокруглюватись, амітотично ділитись.

Література

1. Винников С. А.—ДАН СССР, 1956, 107, 3.
2. Григорьев Л. М.—В кн.: Труды IV Всес. съезда зоол., анат., гистол., К., 1930, 195.
3. Коротченко В. В.—Фізіол. журн. АН УРСР, 1969, XV, 4, 571.
4. Серебряников П. Н., Григорьев Л. М.—В кн.: Труды I гистол. конфер., М., 1935, 264.
5. Coidan-Spoerri R.—Arch. anat., histol., embriol., 1966, 49, 5-8, 441.
6. Forsmann W., Tinquely H., Posternak I.—Z. Zellforsch., 1966, 72, 3, 325.
7. Hamberger B., Norberg K.-A., Sjögqvist F.—II Intern. Pharmacol. Congr., 3.
8. Maximow D.—Publ. 361, Carnegie Inst. of Wash., 1925, 27.
9. Nakai Yunnosuke, Kawasaki Voshiko—Z. Zellforsch., 1959, 51, 1, 108.

Надійшла до редакції
14.V 1969 р.

REACTION OF NEURONS OF THE UPPER NECK SYMPATHETIC GANGLION ON THE CONDITIONS OF CULTURE "IN VITRO"

L. M. Koval

*Laboratory of Morphology of the Nervous System, the A. A. Bogomoletz Institute
of Physiology, Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev*

Summary

Cultivation of UNSG in adult cats showed, that on the 8—9th day some short-process multipolar neurons of the ganglion do not die, surviving under given conditions. Their unchangeable synapses are detected in the neuropile on the bodies and processes of dying neurons. Only those neurons may survive under these conditions the processes of which were not cut off when the ganglion was explanted. Therefore their axones and dendrites do not come out of the ganglion but form intraganglionic interneuronal connections. The internuncial neurons may be such ones. In cytoplasm of some surviving neurons chromaffine granules accumulate, which distribute into the processes. Only slightly differentiated nerve ganglionic elements move into the growth zone.