

Allaster N., Siperstein E.—Endocrinology, 1959, 64, 175.

153.

Gonadotrophins. Ed. A. Albert, 1961, 300.

32, 202, 3, 395.

e, 1969, 9, 19.

Endocrinology, 1969, 85, 121.

Надійшла до редакції
26.XII 1973 р.HYPOTHALAMUS SUPRAOPTICAL NUCLEUS
HYPOTHALAMIC GONADOTROPIC FUNCTION

Vorobyova

Medical Institute, Kharkov

Summary

was studied against a background of the known
proliferation, induced by saline solution administra-
tion or an association of all of them. It
may exert an additional or auxiliary influence
on the gonadotropic function but its partici-

СТРУКТУРНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИН ГІПОКАМПА В КУЛЬТУРАХ ТКАНИН

Л. І. Барченко, Л. Ф. Попович

Лабораторія морфології нервової системи та відділ експериментальної терапії
Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ

УДК 612.825:578.085.23

Відомо, що в постнатальному онтогенезі диференційовані клітинні елементи мозку втрачають здатність до проліферації та росту в умовах цілісного організму. Але в умовах культивування *in vitro* можуть виявитись такі функціональні можливості нервової тканини, які в цілісному організмі з віком втрачаються. Метод культур тканин дозволяє спостерігати живі нервові клітини та вивчати їх реакцію на різноманітні впливи. Тому метод культивування нервової тканини дістає все більше застосування не тільки в морфологічних, але і в фізіологічних дослідженнях [2, 5, 12].

Особливий інтерес становить вивчення диференційованих нервових клітин, хоча культивування нервової тканини дорослих тварин пов'язано з певними методичними труднощами. Мюррей і Стоу [14] першими показали міграцію нейронів у культурах тканин симпатичного ганглію дорослої людини. Вони ж спостерігали мітози в нервових клітинах культури. Костеро і Помрат [7], Хог [13], Помрат і Костеро [16] успішно вирощували культуру тканини головного мозку та кори мозочка різних дорослих тварин і показали, що нейрони так само як і клітини глії, мігрують з експлантатів у зону росту. Гейгер [8, 9, 10] вирощувала культури та субкультури кори головного мозку та мозочка дорослих людей, мавп та кроликів.

У всіх випадках вона спостерігала міграцію нейронів та гліальних клітин з експлантатів мозку та мозочка. Гейгер [11] спостерігала також поодинокі мітози в диференційованих нейронах у зонах росту експлантатів кори мозку дорослих людей і мавп.

Ми вивчали можливості вирощування в культурах тканин клітин гіпокампа дорослих кроликів, досліджували морфологічний склад зони росту експлантатів гіпокампа та структурні і функціональні особливості культивованих клітин.

Методика досліджень

Досліди проведені на експлантатах гіпокампа статевозрілих кроликів вагою близько 2 кг. Тварин вмиряли повітряною емболією, швидко вилучали мозок і в стерильних умовах виділяли гіпокампи. З поперечних зрізів верхнього відділу гіпокампа виготовляли експлантати розміром 2×2 мм, в які входили шари амонічного рога та зубчасті фасції. Культивування експлантатів проводилось у флаконах Карреля на поживному середовищі, що складалось із розчину Тироде, плазми крові гуса та ембріонального екстракту.

Експлантати досліджували на різних стадіях утворення зони росту. Фіксація експлантатів для виготовлення тотальних гістологічних препаратів провадилась на сьому—десяту добу культивування. Вивчення морфологічного складу зони росту проводили на тотальних препаратах експлантатів. Імпрегнацію сріблом клітин експлантатів проводили за методом Більшовського в модифікації Коротченка [3]. Нуклеїнові кислоти

виявляли за допомогою гістохімічних реакцій за методом Браше і за методом Ніссла [4], а реакцію на виявлення ацетилхолінестерази проводили за методом Карновського — Рутца [15].

Результати досліджень

В перші дні зона росту складається, в основному, з астрогліальних і епендимних елементів, які в процесі росту формують пласт клітин (рис. 1, А). Слід зазначити, що навіть в одному і тому ж досліді

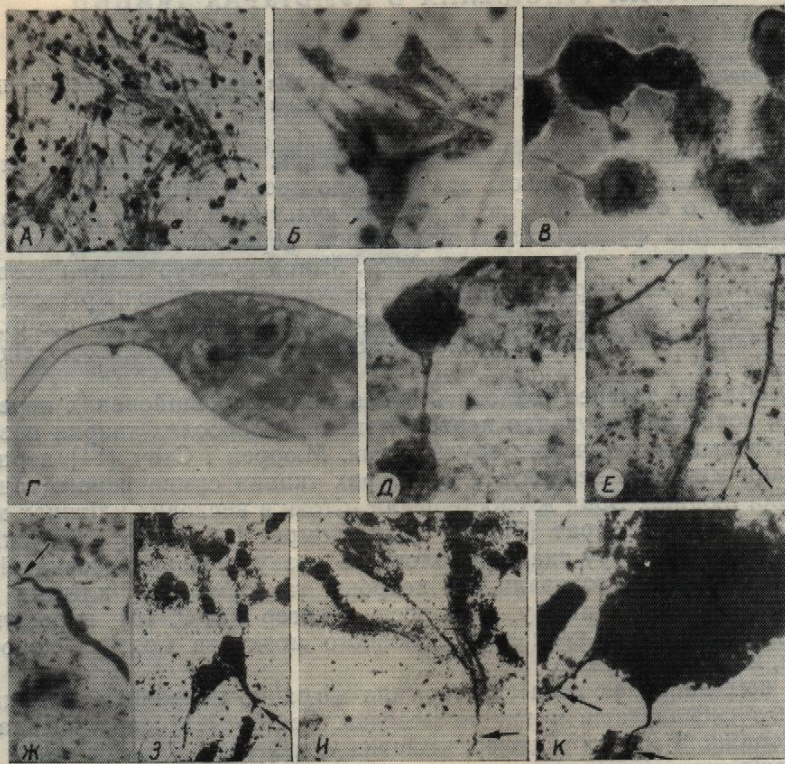


Рис. 1. Культура гіпокампа дорослих кроликів.

А — загальний вигляд зони росту, ок. 3, об. 8; Б — група гліальних клітин, ок. 6, об. 8; В — група олігодендрогліальних клітин з молодими відростками, ок. 6, об. 100; Г — диференційований дендритний нейрон з відростком, ок. 6, об. 100 (збільшено при друкуванні); Д — гранулярний нейрон з новоутвореними від старої культури відростками, ок. 6, об. 100 (А, Б, В, Г, Д — фарбування за Браше); Е, Ж — відростки пірамідних нейронів, які ростуть і розгалужуються, ок. 6, об. 100; З — гранулярні нейрони в зоні росту (на кінцях відсічених старих відростків видно новоутворені протоплазматичні вирости) ок. 3, об. 100; И — розростання апікальних дендритів пірамідних нейронів, ок. 3, об. 100; К — новоутворення коротких відростків поліморфними нейронами, ок. 6, об. 100 (збільшено при друкуванні). Стрілками позначені потовщення на кінцях новоутворених відростків (Е, Ж, З, И, К — імпрегнація сріблом).

спостерігаються деякі індивідуальні особливості росту експлантатів гіпокампа, які відрізняються один від одного розмірами зони росту і співвідношенням у ній клітинних елементів.

За нашими спостереженнями, першими мігрують з експлантатів гіпокампа клітини астроцитарної глії. В процесі росту тіла клітин щільно прилягають одне до одного і утворюють єдиний пласт. Астроцитарна глія здатна мігрувати від експлантата на більш далеку відстань, ніж всі інші клітини зони росту. Ці гліальні клітини мають веретеновидну

форму і довгі прямі потоншені цих клітин великі, овальні. В якій і яскраво забарвлені глибки не спостерігати фігури мітозу. Цитоплазма фарбується піроніном і не фарбується Нісслом.

Слідом за астрогліальними клітинами мігрують інші клітинні елементи — нейрони. Клітини олігодендроглії, заповнені інтенсивно Нісслом. Від шаровидного перикаріона клітини сполучаються між собою довгими багатоядерними. Іноді між ядрами, що свідчить про наявність гліальних клітин можна спостерігати культури вони так активно переважають над іншими клітинними елементами.

У ті ж строки культивування мігрували диференційовані нейрони, як правило, мігрують по напрямку міграції нейронів усіх популяцій морфних. При цьому диференційовані нейрони проявляють певну полярність. У них можна спостерігати ходять від перикаріона. В зоні росту з набряклим, іноді зміщеним перикаріоном.

Серед нейронів, які мігрують, пірамідні клітини з двома ядрами. В ядрах спостерігаються блідо-рожеві піронінофільні ядра, що свідчить про активний метаболізм. Ці клітини за Браше і Нісслом виявляють активність.

Довгі відростки нейронів, які формуються при культивуванні експлантатів для клітинних культур ми спостерігаємо, так і регенеруючі клітини (рис. 1, Д). Крім того, можна спостерігати як від перикаріона, так і у вигляді відростка. Вони мають вигляд тонких і розгалужених за ходом руху відростки направляються до клітин або їх відростків і стикаються з ними. Відростки утворюються щось по-іншому, добре видно при імпрегнації сріблом. Це не явище спостерігала Гейгер-Рудольф та мавп. Такі зв'язки між клітинами експлантатів, а також між нейронами.

Оскільки відомо, що в гіпокампі поліморфних нейронів є холінергічні, є дані, що нейрони мозочка містять ацетилхолінестеразну активність.

Реакція на виявлення ацетилхолінестерази в гіпокампі дорослих кроликів проводили за методом Карновського — Рутца [15]. Позитивну реакцію спостерігали в окремих нейронах, їх в олігодендрогліальних клітинах.

реакцій за методом Браше і за методом Ніссля. Ацетилхолінестерази провадили за методом Карновського.

Матеріал досліджень

Забарвлення складається, в основному, з астрогліальних клітин, які в процесі росту формують пласт клітин, що навіть в одному і тому ж дослідженні

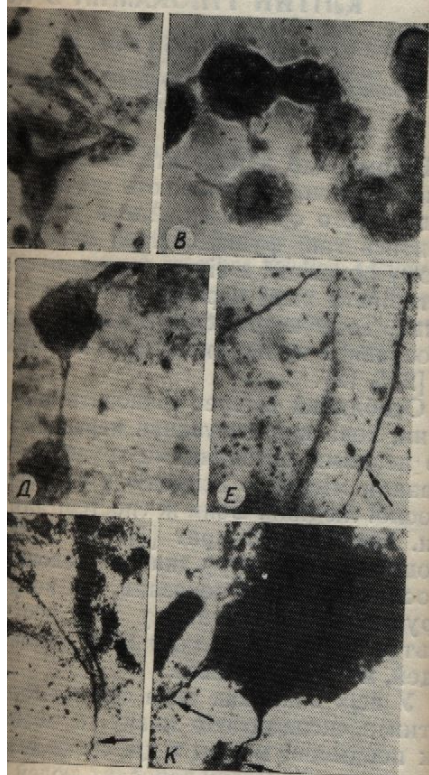


Рис. 1. Зображення клітин мозку дорослих кроликів.

А — група гліальних клітин, ок. 6, об. 8; В — група клітин, ок. 6, об. 100; Г — диференційований дозрілий нейрон, ок. 6, об. 100; Д — гранулярні нейрони, ок. 6, об. 100; Е, В, Г, Д — фарбування за Браше; Е, В, Г, Д — розгалуження, ок. 6, об. 100; З — гранулярні клітини, ок. 6, об. 100; І — диференційований дозрілий нейрон, ок. 6, об. 100; К — нейрони, ок. 6, об. 100 (збільшено при друкуванні за методом Ніссля). Е, З, І, К — фарбування за Карновським.

особливості росту експлантів гліальних клітин одного розмірами зони росту і співвідношенням.

Першими мігрують з експлантів гліальні клітини. В процесі росту тіла клітин щільно зливаються в єдиний пласт. Астроцитарна тканина на більш далекій відстані, ніж гліальні клітини мають веретеновидну

форму і довгі прямі потоншені на кінцях відростки (рис. 1, Б). Ядра цих клітин великі, овальні. В ядрі добре розрізняються кілька ядерців і яскраво забарвлені глибокі гетерохроматину. У цих клітинах можна спостерігати фігури мітозу. Цитоплазма гліальних клітин слабо фарбується піроніном і не фарбується за Нісслем.

Слідом за астрогліальними клітинами по поверхні утвореного ними пласта мігрують інші клітинні елементи — клітини олігодендроцитів і нейрони. Клітини олігодендроцитів мають округлу форму, з шаровидним ядром, заповненим інтенсивно забарвленими глибокими гетерохроматину. Від шаровидного перикаріона відходять короткі паростки, якими клітини сполучаються між собою (рис. 1, В). Серед клітин олігодендроцитів багато двоядерних. Іноді можна спостерігати перетяжку цитоплазми між ядрами, що свідчить про аміотичний поділ. Групи олігодендроцитів можна спостерігати по всій зоні росту. В деяких посадках культур вони так активно проліферують, що мають кількісну перевагу над іншими клітинними елементами зони росту.

У ті ж строки культивування, крім гліальних елементів, в зону росту мігрували диференційовані нейрони із залишками відростків. Нейрони, як правило, мігрують по пласту гліальних клітин. Ми спостерігали міграцію нейронів усіх популяцій: пірамідних, гранулярних та поліморфних. При цьому диференційовані клітини зберігають свою структурну полярність. У них можна розрізнити аксон та дендрити, що відходять від перикаріона. В зоні росту трапляються окремі змінені клітини з набряклим, іноді зміщеним до периферії клітини ядром.

Серед нейронів, які мігрували в зону росту, ми спостерігали великі пірамідні клітини з двома ядрами (рис. 1, Г). При фарбуванні за Браше в ядрах спостерігаються блакитні глибокі хроматину і великі інтенсивно піронінофільні ядерця, що свідчить про інтенсивний ядерний синтез і є показником активного метаболізму. В цитоплазмі при фарбуванні за Браше і Нісслем виявляються глибокі РНК.

Довгі відростки нейронів звичайно пошкоджуються в процесі виготовлення експлантів для культивування. В зоні росту семи — десяти добових культур ми спостерігали клітини як з дегенерованими відростками, так і регенеруючі культивуючі апікальних дендритів та аксонів (рис. 1, Д). Крім того, можна спостерігати утворення нових відростків як від перикаріона, так і у вигляді колатералей, що ростуть від культивуючого відростка. Вони мають вигляд протоплазматичних виростів з потовщеннями і розгалуженнями за ходом і на кінцях (рис. 1, Е, Ж). Новоутворені відростки направляються, як правило, до ближчезростаючих клітин або їх відростків і стикаються з ними. На місці стикання в кінцях відростків утворюється щось подібне до термінального потовщення, яке добре видно при імпрегнації сріблом (рис. 1, Е, Ж, З, І, К). Аналогічне явище спостерігала Гейгер [11] в експлантатах кори мозку дорослих людей та мавп. Такі зв'язки утворюються між нейронами в зоні росту експлантів, а також між нейронами і клітинами глії.

Оскільки відомо, що в гіпокампі дорослих кроликів більша частина поліморфних нейронів є холінергічними, цікаво було простежити чи зберігають ці нейрони холінергічну природу в умовах культури тканини. Є дані, що нейрони мозочка в культурі тканин зберігають високий рівень ацетилхолінестеразної активності [1].

Реакція на виявлення ацетилхолінестерази в клітинах експлантів гіпокампа дорослих кроликів була проведена за методом Карновського — Рутца [15]. Позитивну реакцію на ацетилхолінестеразу спостерігали в окремих нейронах, їх відростках, нервових терміналях, а також в олігодендроцитів клітинах. У деяких великих поліморфних нейронів

(рис. 2, А) цитоплазма була заповнена темно-коричневими гранулами ацетилхолінестерази; ядра залишалися ясними, в них реакція відсутня. На поверхні холінергічних поліморфних та нехолінергічних гранулярних і пірамідних нейронах виявлені терміналі, заповнені гранулами ацетилхолінестерази. В тілах гранулярних нейронів зубчастої фасції реакція на холінестеразу відсутня, навколо них розташовані залишки сплетень варикозних волокон, темних від інтенсивної реакції на ацетил-



Рис. 2. Холінергічні елементи в культурі тканин.

А — реакція на АХЕ в цитоплазмі поліморфного нейрона, Б — гранулярний нейрон, на якому розташовані холінергічні гліальні клітини.

холінестеразу. На тілах холінергічних та нехолінергічних нейронів розташовані скупчення сателітної глії, в якій спостерігається реакція на ацетилхолінестеразу (рис. 2, Б).

Таким чином, дані проведених досліджень показали, що в культурах тканин гіпокампа дорослих тварин зберігають життєздатність знаходяться в активному стані не тільки гліальні елементи — клітини астроцитарної глії і олігодендроцити, але і всі популяції нейронів гіпокампа: пірамідні, гранулярні, та поліморфні. Про це свідчить їх активна міграція з експлантатів, інтенсивний синтез нуклеїнових кислот та ацетилхолінестерази, а також регенерація і ріст пошкоджених відростків та новоутворення міжклітинних контактів. Електрофізіологічні дослідження Штарка та ін. [6] показали, що нейрони гіпокампа в культурах тканин зберігають імпульсну активність.

Всі ці дані свідчать про те, що нейрони гіпокампа дорослих тварин в умовах культивування *in vitro* зберігають певні морфологічні і функціональні особливості, властиві їм у цілісному організмі.

Висновки

1. В умовах культури тканин всі популяції нейронів гіпокампа (пірамідні, гранулярні та поліморфні) зберігають життєздатність, можуть мігрувати в зону росту, диференціювати відростки та утворювати контакти на різних структурах.

2. Частина холінергічних нейронів і олігодендроцитів на даних структурах культивування (7—10 діб) зберігають здатність до синтезу ацетилхолінестерази.

Література

1. Ененко С. О. — Функц. и структ. организация взрослых нервных клеток в условиях культуры ткани. Автореф. дисс., М., 1971.
2. Жуковская Н. М. — Исслед. электрофизиол. характеристик различн. типов клеток в культуре нервной ткани. Автореф. дисс., М., 1970.
3. Коротченко В. В. — Фізіол. журн. АН УРСР, 1969, 15, 4.
4. Пирс Э. — Гистохимия, М., 1962.

5. Смирнова Н. А., Курелл Докл. АН СССР, 1971, 196, 5, 12.
6. Штарк М. Б., Воскресен Попов И. В. — Доклады АН СССР, 1971, 238, 1, 12.
7. Costero J., Pomerat C. — Amer. J. Med. Sci., 1958, 187, 1.
8. Geiger R. — In: Progr. in Neurobiol., 1958, 187, 1.
9. Geiger R. — Nature, 1958, 187, 1.
10. Geiger R. — In: Intern. Revue Neurobiol., 1963, 5, 1.
11. Hild W., Tasaki J. — J. Neurocytol., 1953, 1, 1.
12. Hogue M. — Anat. Res., 1953, 1, 1.
13. Murray M., Stout A. — Am. J. Pathol., 1953, 1, 1.
14. Karnovsky M., Roots J. — J. Neurocytol., 1953, 1, 1.
15. Pomerat C., Costero J. — Amer. J. Med. Sci., 1958, 187, 1.

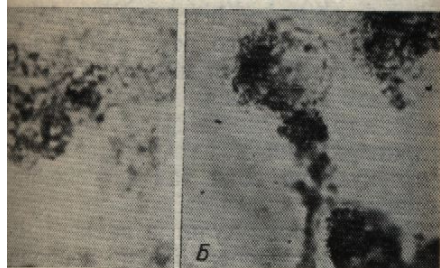
STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PECULIARITIES OF HIPPOCAMPUS

L. I. Bar

Laboratory of Morphology of the Nervous System, the A. A. Bogomolov Institute of Neurology, Moscow

It is shown that the hippocampus in tissue cultures. Morphological and functional peculiarities of the cultured hippocampus neurons and oligodendroglia and neurons of all types migrate from the hippocampus explants preserve their structural polarity; the karyon can be differentiated in the explants regenerate in the tissue culture grow towards either the neighbouring explants or form something like clods and large intensively pyramidal to the intensive nuclear synthesis. Tissue culture preserve their cholinergic properties. It is found that some cholinergic neurons synthesize acetylcholinesterase on the seventh day of culture. This is confirmed for the fact that the hippocampus explants preserve their morphological and functional properties.

повнена темно-коричневими гранулами, в них реакція відсутня. Оліморфних та нехолінергічних гранулярних терміналі, заповнені гранулами гранулярних нейронів зубчастої фасції, навколо них розташовані залишки клітин від інтенсивної реакції на ацетил-



елементи в культурі тканин.

А — типовий нейрон, Б — гранулярний нейрон, на якому помітні гліальні клітини.

чних та нехолінергічних нейронів розрізняються, в якій спостерігається реакція на

Ці дослідження показали, що в культурі тварин зберігають життєздатність не тільки гліальні елементи — клітини полі, але і всі популяції нейронів гіпокампальної. Про це свідчить їх активний синтез нуклеїнових кислот та генерація і ріст пошкоджених відростків контактів. Електрофізіологічні дослідження показали, що нейрони гіпокампа в культурі активні.

Нейрони гіпокампа дорослих тварин зберігають певні морфологічні і функціональні особливості в цілому організмі.

Висновки

Всі популяції нейронів гіпокампа (піри) зберігають життєздатність, можуть утворювати відростки та утворювати кон-

такти з олігодендроцитів на даних структурах зберігають здатність до синтезу ацетил-

Література

1. Организация взрослых нервных клеток в условиях культуры. М., 1971.
2. Трофизм, характеристик различных типов клеток. Дисс., М., 1970.
3. АН УРСР, 1969, 15, 4.

5. Смирнова Н. А., Курелла Г. А., Шунгская В. Е., Ененко С. О. — Докл. АН СССР, 1971, 196, 5, 1245.
6. Штарк М. Б., Воскресенская Л. В., Ратушняк А. С., Оленев С. Н., Попов И. В. — Доклады АН СССР, 1972, 202, 3, 734.
7. Costero J., Pomerat C. — Amer. J. Anat., 1951, 89, 405.
8. Geiger R. — Amer. J. Med. Sci., 1956, 231, 427.
9. Geiger R. — In: Progr. in Neurobiology, London, 1957.
10. Geiger R. — Nature, 1958, 187, 1674.
11. Geiger R. — In: Intern. Review of Neurobiology, Academic Press, N. Y., London, 1963, 5, 1.
12. Hild W., Tasaki J. — J. Neurophysiol., 1962, 25, 2, 277.
13. Hogue M. — Anat. Res., 1953, 115, 395.
14. Murray M., Stout A. — Amer. J. Anat., 1947, 80, 225.
15. Karnovsky M., Roots J. — J. Histochem. a. Cytochem., 1964, 12, 13, 219.
16. Pomerat C., Costero J. — Amer. J. Anat., 1956, 99, 24.

Надійшла до редакції
29.I 1973 р.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PECULIARITIES OF HIPPOCAMPUS CELLS IN THE TISSUE CULTURES

L. I. Barchenko, L. F. Popovich

Laboratory of Morphology of the Nervous System and Department of Experimental Therapy, the A. A. Bogomoletz Institute of Physiology, Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Summary

It is shown that the hippocampus cells of mature rabbits are possible to be cultivated in tissue cultures. Morphological composition of the growth zone as well as structural and functional peculiarities of the cultivated cells were studied. Cells of the astrocyte glia, oligodendroglia and neurons of all the populations: pyramidal, granular and polymorphous — migrate from the hippocampus explants to the growth zone. Differentiated neurons preserve their structural polarity; the axon and dendritic twigs branching off from the perikaryon can be differentiated in them. Most neuron processes injured during preparation of the explants regenerate in the tissue cultures, besides, new processes are formed which grow towards either the neighbouring cells or their processes and at the points of the contact with them form something like terminal bulbs. When staining by Braché chromatin clods and large intensively pyraninophilic nucleoli are observed in the nuclei, that testifies to the intensive nuclear synthesis. To find out whether the hippocampus neurons in the tissue culture preserve their cholinergic nature, their acetylcholinesterase activity was studied. It is found that some cholinergic neurons and oligodendroglia preserve ability to synthesize acetylcholinesterase on the seventh — tenth day of cultivation. The data obtained evidence for the fact that the hippocampus neurons under conditions of tissue culture preserve definite morphological and functional features peculiar to them in the whole (intact) organism.