

ЛОКАЛІЗАЦІЯ АЦЕТИЛХОЛІНЕСТЕРАЗИ В ЯДРАХ РЕТИКУЛЯРНОЇ ФОРМАЦІЇ РОМБОВИДНОГО МОЗКУ КІШКИ

Л. Ф. Бурчинська, Л. М. Коваль

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

Оскільки досі нема гістохімічного методу для визначення локалізації самого ацетилхоліну, про його присутність прийнято судити за наявністю ферментів його синтезу та розщеплення. Побічним показником присутності ацетилхоліну в нейронах може бути виявлення в них ферменту, який розщеплює ацетилхолін — ацетилхолінестерази (АХЕ, КФ 3.1.1.7), оскільки біохімічними методами в усіх структурах мозку (за винятком мозочка) була встановлена кореляція між вмістом ацетилхоліну та активністю ацетилхолінестерази [3, 8, 9].

Правомочність використання ідентифікації АХЕ для визначення холінергічних структур підкріплюється даними Букле та ін. [7]. Ці автори мікрохімічним методом виявили в симпатичних нейронах з високою активністю АХЕ також фермент, який синтезує ацетилхолін. Нейрони зі слабкою активністю АХЕ не можна з певністю віднести до холінергічних, оскільки слабка активність ферменту може траплятися і в нехолінергічних нейронах [11]. Тому прийнято [7, 16] до холінергічних нейронів відносити нервові клітини з помірною та високою активністю АХЕ у цитоплазмі перикаріона та відростків.

У літературі серед багатьох досліджень, метою яких було вивчення локалізації ацетилхолінестерази (АХЕ) в стовбурі мозку, тільки кілька праць [12, 13, 14] присвячені ретикулярній формації, тому це питання було предметом нашого спеціального дослідження.

Методика досліджень

Для виявлення АХЕ в ядрах ретикулярної формації стовбура мозку дорослих інтактних кішок (23 тварини) ми користувалися гістохімічним методом Карновського—Рутса [10]. Вивчали найбільші ядра: оральне та каудальне ретикулярні ядра моста, ретикулярне ядро покривки моста; гігантоклітинне, вентральне, дрібноклітинне, латеральне та парамедіанне ядра довгастого мозку.

Реакцію проводили на фіксованих та нефіксованих заморожених зрізах товщиною 25 мк. Робили серійні фронтальні, сагітальні та горизонтальні зрізи. Субстратом для АХЕ був ацетилтіохолінідид, для холінестерази (ХЕ, КФ 3.1.1.8.) — бутирилтіохолінідид. Холінестеразу вибірно гальмували фосфаколом. Специфічність реакції перевіряли слідуочими контролями: обробкою зрізів розчином прозерину в концентрації, яка гальмувала активність обох холінестераз (10⁻⁴ М); інкубацією зрізів у середовищі без субстрату; зруйнуванням ферменту тепловою обробкою з наступною інкубацією зрізів у повноцінному середовищі. Оптимальний час інкубації — 1–2 год.

Для виявлення загального клітинного складу ядер паралельні зрізи фарбували за Нісслем, нейропіль вивчали у препаратах, імпрегнованих сріблом за методом Більшовського в модифікації Коротченка [1].

Результати досліджень та їх обговорення

Обслідування препаратів показало, що структури з вмістом АХЕ є в усіх досліджуваних ядрах ретикулярної формації.

Локалізація ацетилхолінестерази

У нейронах АХЕ в терміналях.

Продукт гістохімії дрібніших гранул корі плазмі перикаріона та

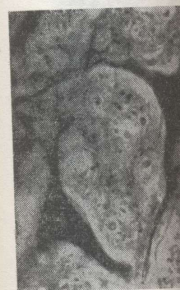


Рис. 1. Локалізація АХЕ в перикаріоні та відростках лярних нейронів. Мікроскоп 36. 25×6.



Рис. 3. Густота сполучення АХЕ в ядрах гігантоклітин.

часта форма нейронів, які нагадують деяких клітинних телітину, зв'язаних з ядром. Максимальна кількість АХЕ в частині нейронів різниці завдяки ядрі плітають тіла та ві

У нейронах АХЕ виявляється у перикаріоні, дендритах, аксонах та терміналях.

Продукт гістохімічної реакції у вигляді пиловидних часток та найдрібніших гранул коричневого кольору дифузно розподіляється у цитоплазмі перикаріона та відростків, завдяки чому добре видна відрост-



Рис. 1. Локалізація АХЕ у перикаріоні та відростках ретикулярних нейронів. Мікрофото. Зб. 25×6.



Рис. 2. АХЕ-вмісна сателітарна глія та холінергічні терміналі навколо гігантського ретикулярного нейрона. Н — нейрон. Мікрофото. Імерс. зб. 100×4. Розтягнуто при друкуванні.

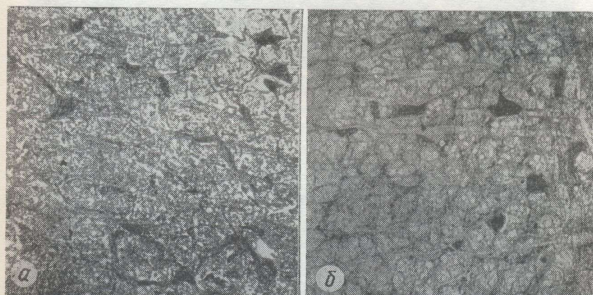


Рис. 3. Густота сплетення нейропіля та кількість нейронів в імпрегнованому препараті (а) та при реакції на АХЕ (б). Гігантоклітинне ядро довгастого мозку. Мікрофото. Зб. 10×4.

часта форма нейронів (рис. 1). Іноді продукти реакції утворюють структури, які нагадують речовину Ніссля. Ядра нейронів прозорі, тільки у деяких клітинах темно-коричневі гранули виявляються на нитках хроматину, зв'язаних з ядром.

Максимальна активність ферменту визначається в терміналях. В частині нейронів реакція може бути відсутньою, і тоді їх можна розрізнити завдяки яскраво-пофарбованим варикозним волокнам, які обплітають тіла та відростки, або АХЕ-вмісній сателітарній глії (рис. 2).

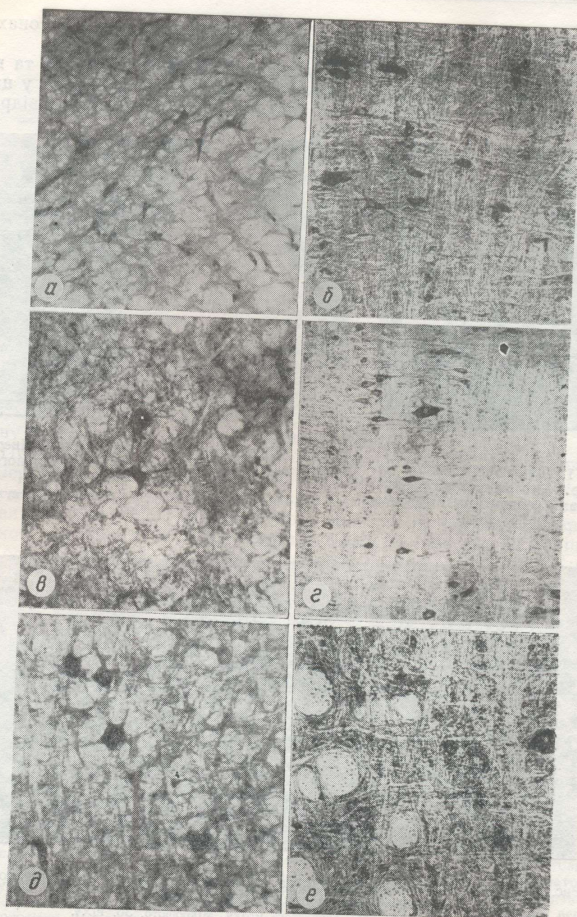
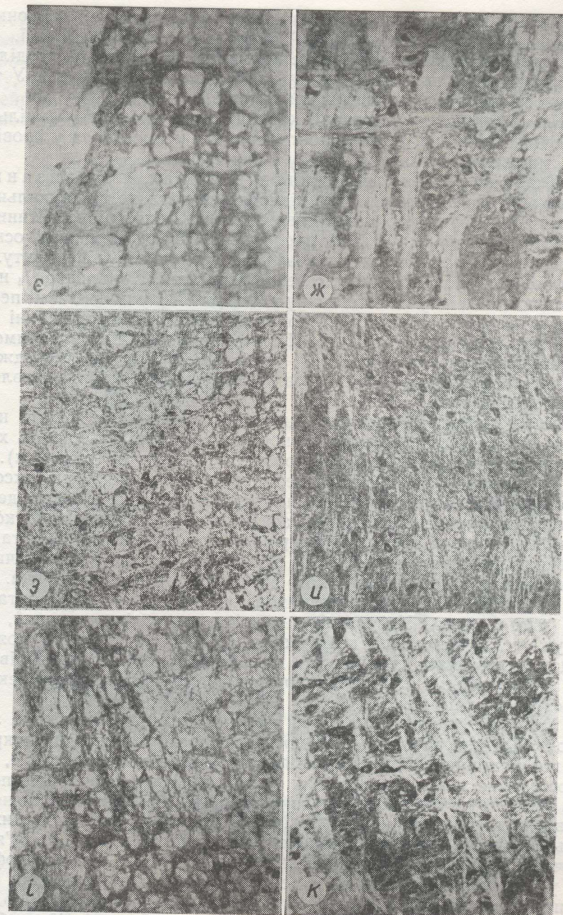


Рис. 4. Розподіл холінергічних нейронів та структура холінергічного
Зліва — фронтальні, справа — горизонтальні зрізи (на рис. *а* — сагітальний
зріз); *а, б* — дрібноклітинне ядро довгастого мозку, *в, г* — оральне, *д, е* —
каудальне ядра моста;

Інтенсивна та помірна реакція може виявлятися в нейронах різного розміру: в дрібних, середніх, крупних та гігантських. Холінергічні нейрони частіше дифузно розсіяні в ядрах, але можуть об'єднуватися в групи, які складаються з 3—10 дрібних та середніх клітин. Відростки таких холінергічних нейронів утворюють власний нейропіль, що виділяється інтенсивною реакцією в нейропілі ядер.



нейропілю в ядрах ретикулярної формації.
 а, б — парамедіанне ядро; в, г — ретикулярне ядро покритишки моста; д, е —
 латеральне ядро. Мікрофото. 36. 10×4.

Той факт, що серед загальної маси клітин існують відокремлені групи, де клітини щільно прилягають одна до іншої, а їх відростки сплітаються у власний нейропілю, дозволяє припустити, що ми виявляємо функціональні комплекси холінергічних нейронів. Такі групи холінергічних нейронів виявлені у вентральному, дрібноклітинному та латеральному ядрах (в останньому їх більше).

До складу груп можуть входити окремі нехолінергічні нейрони, які виділяються завдяки оточуючій їх АХЕ-вмісній сателітарній глії.

За характером зв'язків ядра ретикулярної формації підрозділяють на дві групи: ядра, зв'язані та не зв'язані з мозочком [6, 15]. У такій послідовності ми й будемо розглядати матеріал.

Оскільки інтенсивність реакції кожного ядра залежить від кількості холінергічних нейронів, інтенсивності реакції у нейропілі та у провідних шляхах, ми звертали увагу на кожен з цих структур.

1. Холінергічні елементи в ядрах, не зв'язаних з мозочком. До цієї групи ядер відносяться оральне та каудальне ретикулярні ядра мосту, гігантоклітинне, вентральне та дрібноклітинне ядра довгастого мозку (рис. 3, а, б; рис. 4, а—е). В усіх цих ядрах основна маса нейронів має слабку активність АХЕ або не вміщує ферменту. Такі клітини повинні бути віднесені до нехолінергічних. Приблизно $1/4$ нейронів виявляють помірну та інтенсивну реакцію АХЕ у цитоплазмі перикаріону та відростків, тобто вони є холінергічними. При порівнянні паралельних зрізів, пофарбованих за Нісслем та на АХЕ, ми бачимо, що в останніх препаратах клітинний склад ядер мов би розріджений. Це пояснюється тим, що з усієї маси ретикулярних нейронів виявляються тільки холінергічні.

В імпрегнованих препаратах цих ядер виявляється густий нейропіль, що складається з волокон різного калібру, які утворюють характерну для ретикулярної формації гратчасту структуру (рис. 3, а). Нейропіль представлений широкими дендритними галуженнями, аксонами та колатеральними аксонів самих ретикулярних нейронів, а також дендритами вторинних чутливих нейронів, аферентними аксонами та їх колатеральними. Порівнюючи структуру нейропіля при реакції на АХЕ та в імпрегнованих препаратах (рис. 3, а, б), ми бачимо, що холінергічна частина нейропіля в порівнянні з його загальним об'ємом невелика. Цікаво, що структура нейропіля неоднакова у поздовжних та фронтальних зрізах (рис. 4, а—к). У фронтальних зрізах нейропіль густіший, більш розгалужений і яскравіше пофарбований. Цей факт можна пояснити тим, що основна маса дендритного дерева ретикулярних нейронів галузиться у фронтальній площині, утворюючи мов би фронтальні «скрани» для поступаючих аферентів.

2. Холінергічні елементи у ядрах, зв'язаних з мозочком. До цієї групи ядер відносяться: ретикулярне ядро покривки моста, парамедіанне та латеральне ядра довгастого мозку (рис. 4, е—к).

Порівняння нейрогістологічних та гістохімічних препаратів показало, що у цій групі ядер холінергічних нейронів більше: приблизно $1/3$ — $1/2$ нервових клітин ядер — холінергічні. Відповідно і нейропіль цих ядер містить більше холінергічних волокон, ніж нейропіль ядер, не зв'язаних з мозочком. Холінергічний нейропіль густіший і більш яскраво пофарбований у латеральному ядрі та в ретикулярному ядрі покривки моста, ніж у парамедіанному.

Розподіл холінергічних нейронів нерівномірний на різній глибині та протязі ядер. Так, наприклад, у латеральному ядрі, крім ділянок, де холінергічні та нехолінергічні нейрони чергуються один з іншим, є ділянки, де переважають ті чи інші нейрони.

3. Холінергічні терміналі. Холінергічні терміналі, які контактують з нейронами ретикулярної формації, бувають двох типів: транзиторні варикозні волокна та кінцеві синаптичні бляшки (рис. 5). Продукти реакції можуть повністю заповнювати бляшки та варикозити або тільки окреслювати їх. Претермінальні волокна пофарбовані слабкіше. Транзиторні варикозні волокна утворюють на поверхні тіл та

відростків густі сітковидні сплетення. Можна прослідкувати холінергічні волокна, які підіймаються по відростку на тіло клітини та обплітають її. Кінцеві холінергічні синаптичні бляшки мають різну форму (кільцевидну, овальну, неправильну) та розміри (від 1 до 5 мк). В 25-мк зрізі на нейроні середнього розміру можна налічити до 30—40 бляшок. Іноді вся поверхня тіла клітини та відростків вкрита бляшками.

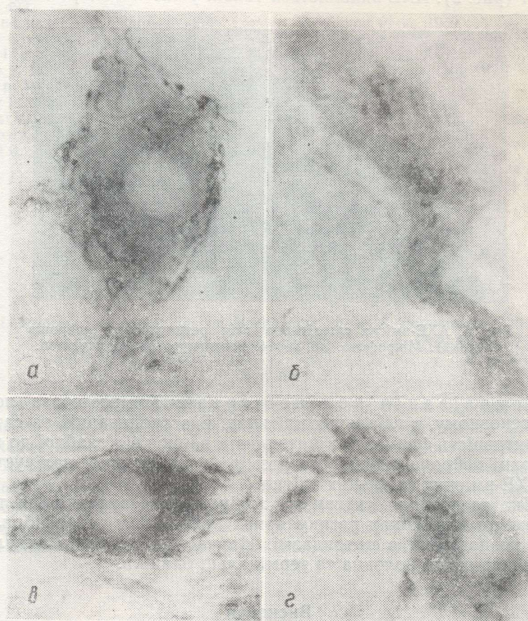


Рис. 5 Холінергічні терміналі на ретикулярних нейронах різних ядер ретикулярної формації.
а — гігантклітинного, б — вентрального, в — латерального ядер довгастого мозку, г — каудального ядра моста. Мікрофото. Імерс. 36. 100X4. Розтягнуто при друкуванні.

Холінергічні терміналі виявляються на поверхні більшості нейронів холінергічної та нехолінергічної природи. Звідси витікає, що холіноцептивні властивості притаманні більшості нейронів ретикулярної формації ромбовидного мозку, тоді як холінергічних нейронів в ній мало.

Електрофізіологічними методами доведена можливість конвергенції терміналей різного походження на одному ретикулярному нейроні [2].

Наші дані, одержані на гіпокампі [4, 5] та в цьому дослідженні (значно більша кількість терміналей на нейронах в імпрегнованих препаратах, ніж при реакції на АХЕ), дозволяють припустити, що конвергують терміналі різної медіаторної природи. Ми за допомогою обраної гістохімічної реакції виявляємо тільки холінергічні аференти.

4. Локалізація АХЕ у глії. Активність АХЕ виявляється тільки в частині сателітарної глії. Позитивна реакція у вигляді дрібних гранул та пиловидних часток виявляється у цитоплазмі клітин (рис. 6). Реакція інтенсивніша в ділянках, які ближче до нейрона. Ядра глії прозорі. АХЕ-вмісна глія виявляється навколо холінергічних та нехолінергічних нейронів. На тілах сателітарної глії можна бачити холінергічні терміналі (рис. 2). АХЕ виявляється також у частині астроцитарної глії.

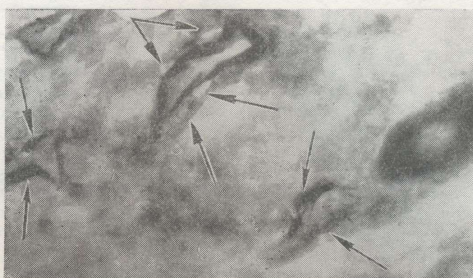


Рис. 6. АХЕ-вмісна сателітарна глія ретикулярних нейронів (стрілки). Мікрофото. 36. 25×4. Розтягнуто при друкуванні.

5. Локалізація холінестерази. Холінестераза локалізується, в основному, в гліальних клітинах. В астроцитарній та сателітарній глії активність ферменту в цитоплазмі варіює від слабкої до високої. На поверхні нейрона середнього розміру у 25 мк зрізі налічується від 10 до 15 ХЕ-вмісних гліальних клітин.

Слабка та помірна активність холінестерази виявляється також у цитоплазмі та відростках ретикулярних нейронів: у нейрофібрилах або дифузно розподілена в цитоплазмі. На частині нейронів виявляються ХЕ-вмісні варикозні волокна та термінальні бляшки.

Висновки

1. У всіх досліджених ядрах ретикулярної формації є холінергічні нейрони. Вони складають невелику частину нейронного складу ретикулярної формації. Отже, основна маса ретикулярних нейронів може використовувати як медіатори інші речовини. Холінергічних нейронів більше у ядрах, зв'язаних з мозочком, ніж у ядрах, не зв'язаних з ним.

2. На ретикулярних нейронах виявлено кілька типів холінергічних терміналей: транзиторні варикозні волокна та кінцеві синаптичні бляшки. Різноманітність форм холінергічних терміналей може пояснюватися їх різним походженням. Наявність цих терміналей свідчить про те, що значна частина ретикулярних нейронів холінергічної та нехолінергічної природи має холіноцептивні якості.

Література

1. Коротченко В. В.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1969, 15, 4, 571.
2. Костюк П. Г.— Фізіол. центр. нервн. сист., К., «Вища школа», 1971.
3. Снісар І. А.— Укр. біохім. журн., 1974, 46, 54.

4. Торская И. В., Бурчинская Л. Ф.—В сб.: Функцио-структ. основы системн. деят. и механизмы пластичн. мозга, М., 1972, 72.
5. Торська І. В., Бурчинська Л. Ф.—Фізіол. журн. АН УРСР, 1973, 19, 4, 454.
6. (Brodal A.) Бродал А.—Ретикул. формация мозгов. ствола, М., 1960.
7. Buckley G., Consolo S., Giacobini E., Sjöqvist F.—Acta physiol. Scand., 1967, 71, 348.
8. Feldberg W.—In: Metabolism of the Nervous System., Ed. G. Richter, N. Y., 1957, 493.
9. Gerebtzoff M. Cholinesterases. London. Pergamon Press, 1959.
10. Karnovsky M., Roots L.—J. Histochem. Cytochem., 1964, 12, 219.
11. Köelle G.—J. Pharmacol. a. Exptl. Therap. 1955, 144, 167.
12. Papp M., Bozik G.—J. Neurochem., 1966, 13, 697.
13. Papp M.—Acta morphol. Hung., 1968, 16, 375.
14. Pavlin R.—J. Neurochem., 1965, 12, 515.
15. (Rossi G., Zanchetti A.) Росси Дж., Цанкетти А.—Ретикул. формация ствола мозга, М., ИЛ, 1960.
16. Waldron H., Gwyn D.—Brain Res., 1969, 13, 146.

Надійшла до редакції
3.XII 1974 р.

LOCALIZATION OF ACETYLCHOLINESTERASE IN CAT RHOMBOID RETICULAR FORMATION NUCLEI

L. F. Burchinskaya, L. M. Koval'

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

Summary

The data on the AchE histochemical identification in the cat rhomboid reticular formation nuclei make it possible to conclude that the cholinergic neurons are present in all the studied nuclei. They constitute a small part of the neuronal composition of the reticular formation. Hence, the bulk of the reticular neurons may use other substances as transmitters. The amount of cholinergic neurons are greater in the nuclei connected with the cerebellum. A considerable part of the cholinergic and noncholinergic reticular neurons possesses cholinceptive properties as far as the cholinergic terminals are found on them in a form of transitory varicose fibers and terminal synaptic buds.