



МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.15:591.481.1

ОСОБЕННОСТИ МЕТОДА ЦИТОХИМИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ
АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ МОЗГА

РОСТОМЯН М. А., АБРАМЯН К. С.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Исследовано влияние различных факторов, связанных с процедурой цитохимического выявления аденилатциклазы (АЦ) с целью оптимизации условий проведения соответствующей реакции в мозгу и определения локализации фермента на уровне световой и электронной микроскопии. АЦ мозга очень чувствительна к ионам свинца в инкубационной смеси и к условиям фиксации. Основное внимание уделено уменьшению влияния этих факторов, благодаря чему предлагаются методы цитохимического выявления АЦ мозга на уровне световой и электронной микроскопии.

Контроль специфичности реакции проведен инкубацией в среде без субстрата после тепловой денатурации, с применением специфических и неспецифических ингибиторов фосфатвысвобождающих ферментов, а также с заменой субстратов и действием медиаторов. Полученные данные свидетельствуют о возможности выявления в световом и электронном микроскопе продукта реакции, обусловленного активностью АЦ.

Впервые о возможности электронноцитохимического выявления АЦ сообщили Reik и соавт. [1]. Модифицировав инкубационную среду, предложенную для обнаружения АТРаза, они приспособили ее для цитохимической реакции на АЦ и электронномикроскопически показали локализацию этого фермента на мембранах гепатоцитов. Принцип метода основан на осаждении солями свинца пирофосфата, выделяющегося из АТР при проявлении активности АЦ. Howell, Whitefield [2], заменив АТР на синтетический субстрат—аденилалимидодифосфат (АИДФ), не гидролизруемый АТРазами, показали, что так же, как и в печени, активность АЦ клеток островков Лангерганса проявляется на мембране.

Большинство последующих работ по ультраструктурному выявлению АЦ в различных органах выполнено именно этими методами или их модификациями [3—7]. Однако эти методы не позволяют обнаружить АЦ в мозгу, несмотря на то, что активность фермента в нем выше, чем в любом другом органе [8]. Это отмечали и авторы метода выявления АЦ с использованием кобальта в качестве агента, осаждающего пирофосфат [9]. Отсутствие цитохимической реакции в синапсах при свинцовом методе объясняют инактивирующим влиянием фиксатора [6]. Положительные результаты, полученные кобальтовым методом, свидетельствуют о

том, что причиной неудачи является не фиксация, а скорее влияние осаждающего агента.

Целью настоящей работы является усовершенствование и систематизация ранее предложенных методических разработок по цитохимическому выявлению АЦ в мозгу на световом [10] и электронномикроскопическом уровнях [11, 12]. Приведены данные по изучению влияния различных факторов, начиная с фиксации, и каждого компонента инкубационной среды для оптимизации условий сохранения активности АЦ и ее последующего цитохимического обнаружения, а также анализ результатов контрольных экспериментов.

Способы фиксации и состав фиксаторов

Для воспроизводимого выявления АЦ большое значение имеют способы фиксации, различающиеся в зависимости от целей исследования и подробно рассматриваемые в разделе «Методика обнаружения АЦ».

Из фиксаторов нами испробованы забуференные растворы 1,25 и 2,5%-ного глутаральдегида, 1%-ного параформальдегида и их смесь в соотношении 1:1. Концентрации глутаральдегида не имели существенного значения, но реакция в нервных структурах развивалась только при использовании дистиллированного глутаральдегида. Фиксация 1%-ным забуференным параформальдегидом целесообразнее для выявления АЦ в капиллярах. Забуференная смесь параформальдегида и глутаральдегида была апробирована при выявлении АЦ в синапсосамах коры [11].

Определенное значение имеют буферные смеси в составе фиксаторов, применение какодилового и трис-буфера не обнаружило принципиальной разницы между ними. Использование фосфатных буферов нежелательно.

Значение состава инкубационной смеси

Концентрация ионов свинца в инкубационной смеси является лимитирующим фактором при выявлении АЦ в нервной ткани. При использовании рекомендуемого в литературе состава инкубационной смеси [1] специфическая реакция в нервных волокнах и синапсосамах не развивается. Учитывая возможность ингибирующего влияния ионов свинца на АЦ [2, 3, 13, 14], их концентрация была уменьшена вдвое—до 2,4 мМ. Благодаря этому удалось показать АЦ в срезах мозговой ткани [10] и в изолированных нервных окончаниях, выделенных из мозга крыс [11]. В последующем использовали 1,5 мМ раствор азотнокислого свинца [12]. Снижением его концентрации предотвращается значительное ингибирование фермента, уменьшается возможность гидролиза субстрата и обеспечивается выявление АЦ в мозгу.

Субстраты. Природным субстратом АЦ является АТР. Апробирование ряда образцов АТР, полученных из различных источников (дрожжевая, мышечная), содержащих различные металлы (натрий, барий, магний) и изготовленных разными фирмами («Calbiochem», Швеция; «Reanal», Венгрия; «Serva», ФРГ; «Sigma» США), показало их неоди-

наковую пригодность для обнаружения АЦ мозга. Предпочтительнее АТР с примесью ванадия («Sigma», США), ингибирующего АТРаза, потенциально мешающего выявлению АЦ и оказывающего стимулирующее действие на активность АЦ.

Аденилилимидодифосфат (АИДФ) применяли только в контрольных экспериментах для установления специфичности реакции на АЦ.

Буферы. рН инкубационной среды. Использование трис-малеатного, трис-НСI и какодилового буферов способствует проявлению примерно одинаковой картины. Применяя трис-винный или какодилово-винный буферы, удается показать АЦ в нервных волокнах и синаптических окончаниях мозга даже при относительно высокой концентрации ионов свинца (2,4 мМ) в инкубационном растворе [11], однако указанные буферные смеси сильно активируют АЦ, что затрудняет исследование ее чувствительности к различным факторам. Поэтому эти методы выявления АЦ имели ограниченное применение лишь для констатации характера локализации АЦ в тех или иных структурах.

В присутствии АТР активность АЦ мозга проявляется в довольно широком ряду значений рН—6,4—8,4, оптимум находится в пределах величин рН 7,2—7,6. При использовании АИДФ рН среды должен быть не ниже 8,3. АЦ в эндотелии капилляров мозга может быть выявлена и при более низких значениях рН.

Значение ионов магния. Истинным субстратом АЦ является Mg^{2+} -АТР, поэтому магний в инкубационной среде необходим для образования комплекса с АТР. Магний обычно добавляют в виде сернокислых или солянокислых солей в концентрации 1—10 мМ, то есть не в эквимольных соотношениях с АТР, а в значительном избытке. Исследования с варьированием концентрации солей магния в инкубационной среде показали, что наилучшее выявление АЦ в нервных структурах отмечается в присутствии 4—10 мМ сернокислого магния.

Влияние теофиллина заключается в ингибировании фосфодиэстеразы, которая переводит сАМР, образовавшийся под влиянием АЦ, в АМР. Казалось бы, что этот компонент среды необходим только при биохимических исследованиях, при которых активность АЦ измеряется по нарастающему уровню сАМР, но не имеет значения при гистохимическом исследовании, когда активность определяется по пирофосфату. Однако исключение теофиллина из инкубационной среды способствует развиту фоновой окраски в ряде органов.

Методика обнаружения АЦ

Светомикроскопическое выявление АЦ. Обязательным условием цитохимического выявления АЦ является фиксация перфузией. Наркотизированных крыс перфузировали через аорту физиологическим раствором (200—300 мл), затем таким же объемом фиксатора—со скоростью 35—45 мл/мин. Замедление перфузии приводит к резкому ухудшению реакции на АЦ в нервных элементах. Для выявления фермента в капиллярах мозга скорость перфузии не так важна. После перфузии мозг при необ-

ходимости дополнительно фиксировали в смеси того же состава (2—20 ч). Возрастание продолжительности постфиксации отражается на интенсивности реакции, особенно капилляров мозга. Допустима перфузия большим объемом фиксатора без последующей дофиксации.

После фиксации мозг отмывали 1—24 ч в 0,1 М какодиловом или трис-буфере, рН 7,4 с 8% сахарозы. Замороженные срезы (40 мкм), отмытые в буфере (30—60 мин), инкубировали при 32—34° 1,5—3 ч в среде следующего состава: 0,1 М какодиловый или трис-буфер, рН 7,4 0,5 мМ АТР, 8% сахарозы, 4 мМ сернокислого магния, 2 мМ теофиллина, 1,5 мМ азотнокислого свинца. Последний добавляли перед упогреблением, и после его растворения смесь фильтровали. В случае использования АИДФ его концентрация должна быть 1 мМ, рН буфера—не ниже 8,3, время инкубации—6 ч и более.

После инкубации срезы промывали в дистиллированной воде, в 1%-ной уксусной кислоте (1 мин), снова в воде и «окрашивали» в 0,5%-ном растворе сульфида натрия для визуализации пирофосфата свинца. Препараты заключали в глицерин-желатину и исследовали в световом микроскопе: Продукт ферментативной реакции в виде темных осадков маркирует места проявления активности АЦ (рис. 1).

Электронномикроскопическое выявление АЦ в срезах. Срезы фиксированного перфузией мозга, приготовленные на вибротоме, обрабатывали так же, как для световой микроскопии. После инкубации и промывки в буфере их дофиксировали в 1%-ной забуференной четырехокиси осмия (30—40 мин), обезвоживали в спиртах и смесях с пропиленоксидом и заключали в форме плоскопараллельной заливки.

На лавсановую пленку или фольгу, размерами больше предметного стекла, наносили капли заливочной среды, помещали в них срезы из смеси пропиленоксида со смолой и покрывали предметным стеклом, изготовленным из аралдита. Полученный «сэндвич» полимеризовали 16—18 ч при 56°. После полимеризации лавсан или фольга легко отделяются и срезы остаются на предметном стекле из аралдита. Этот препарат просматривали в световом микроскопе, нужные участки вырезали и наклеивали на аралдитовые блоки для ультрамикротомирования и последующего целенаправленного исследования.

Электронномикроскопическое выявление АЦ в синапсах. АЦ синапсом является реактивным показателем изменения их функционального состояния [12], поэтому обязательно быстрое препарирование, особенно на начальных этапах. Время между декапитацией животного и гомогенизацией мозга не должно превышать 3—5 мин. 50—80 мкл синапсом, выделенных по Найос [15], преинкубировали 20 мин в 4 мл солевой среды [16] комнатной температуры и фиксировали в суспензии равным объемом фиксатора. Через 15—20 мин синапсомы осаждали центрифугированием при 15000 об/мин в течение 15 мин. Фиксатор сливали, а осадок промывали 0,1 М какодиловым буфером, рН 7,4 в течение 18—20 ч. Кусочки размером не более 0,5 мм³ инкубировали при 32—34° 30—90 мин. После инкубации материал промывали 30 мин в трех сменах

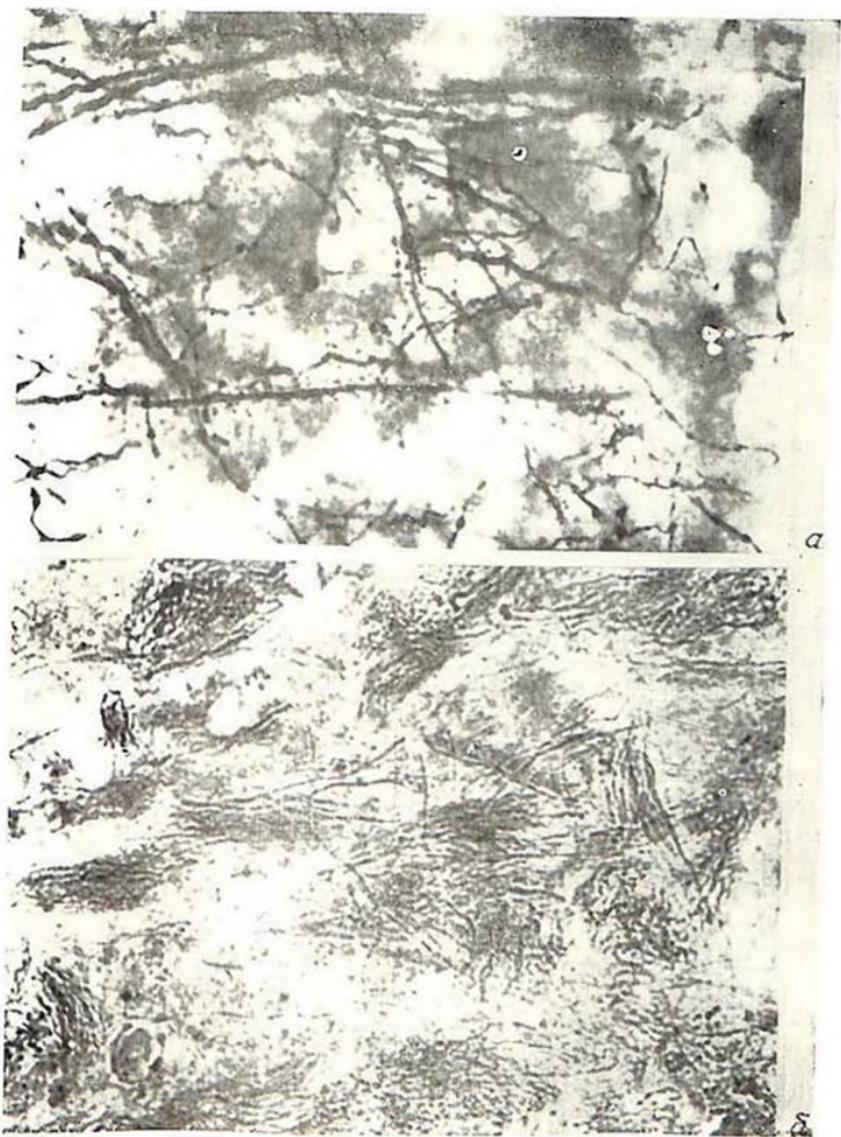


Рис. 1. Фрагменты среза мозга крысы, инкубированного в среде, предназначенной для выявления АЦ; отложения продукта гистохимической реакции на АЦ видны в нервных окончаниях и по ходу нервных волокон; Объектив 63, окуляр 12,5; а—кора мозга, инкубация с АТР; б—область полосатого тела, инкубация с аденилимилодифосфатом

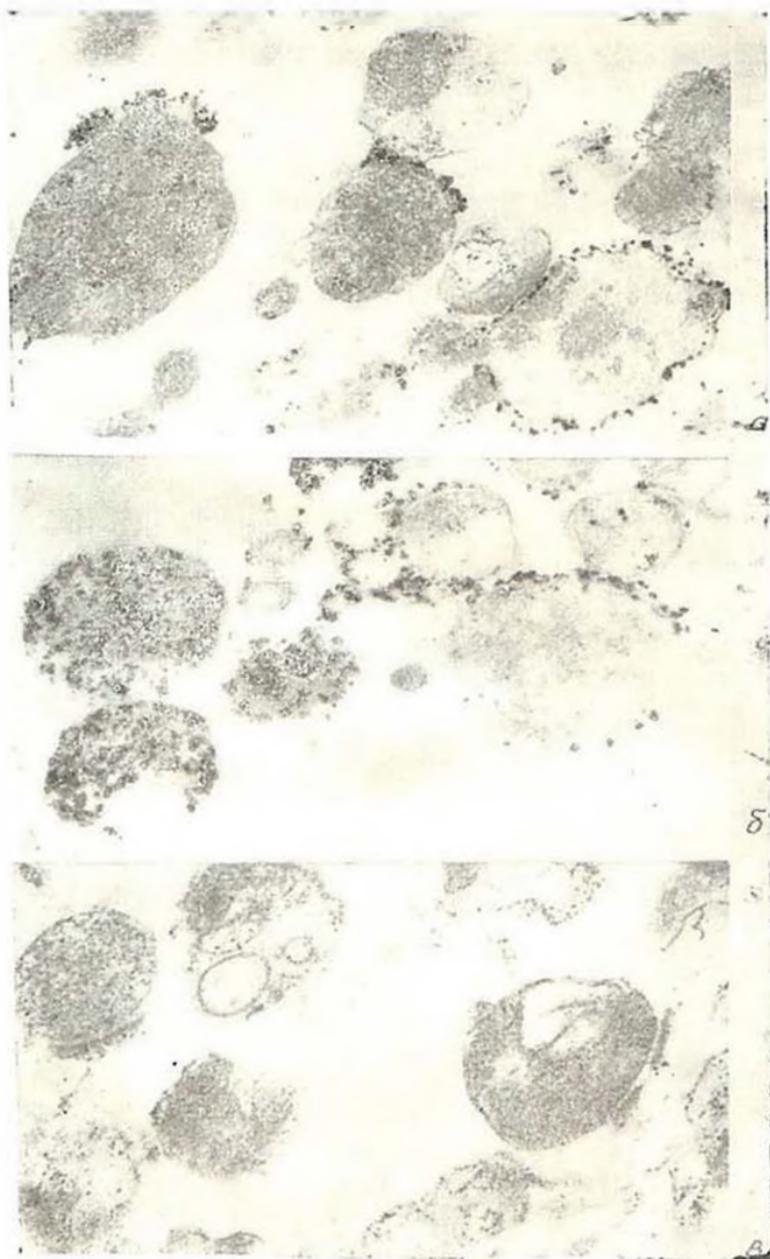


Рис. 2. Синаптомия коры мозга крысы с различной локализацией АЦ (увеличили 50000x): а—продукт цитохимической реакции отлагается в постсинаптической области и у синаптической мембраны; в части синапсомом реакция на АЦ отсутствует; б—продукт цитохимической реакции проявляется в внутри синапсомом и вокруг них; в—препарат, инкубированный в среде без субстрата, реакция на АЦ отсутствует

0,1 М какодилового буфера, рН 7,4 и постфиксировали 30—40 мин в 1%-ной забуференной четырехокиси осмия. Обезвоживание и заливку в араалит проводили через смеси с пропиленоксидом.

Ультратонкие срезы исследовали без контрастирования. Продукт ферментативной реакции в виде электронноплотного осадка отлагался в различных участках синапсом (рис. 2).

Полученные данные свидетельствуют о возможности обнаружения АЦ мозга в случае соблюдения совокупности условий, которые предполагают: 1) быструю стабилизацию фермента фиксаторами, иммобилизующими активность АЦ; 2) уменьшение ингибирующего действия фиксаторов сокращением времени их воздействия; 3) ослабление ингибирующего действия свинца снижением его концентрации; 4) применение соответствующих субстратов.

Однако в ряде работ высказаны сомнения относительно данных, полученных методами с применением свинца в качестве фактора, осаждающего пирофосфат [13, 14]. Основанием для этих опасений является, с одной стороны, повышенная чувствительность АЦ к ионам свинца, а с другой—доступность используемых субстратов АТР и АИДФ для действия других фосфатвысвобождающих ферментов и их способность к неэнзиматическому гидролизу. С целью установления специфичности предложенных методов проведены контрольные опыты.

Контроль специфичности цитохимической реакции на АЦ

Ферментативная природа реакции установлена опытами с инкубацией материала в среде без субстрата, а также с тепловой денатурацией, предшествующей инкубации. В отсутствие субстрата реакция не развивается даже после многочасовой инкубации. Отсутствие реакции после прогревания срезов (10 мин при 70°) свидетельствует о ферментативном характере реакции и об отсутствии осадков, обусловленных неэнзиматическим гидролизом АТР ионами свинца.

Влияние фторидов на цитохимически выявляемую АЦ. Фтористый натрий является неспецифическим ингибитором многих ферментов, в том числе нуклеозидтрифосфатаз и фосфомоноэстераз. Однако на АЦ он оказывает активирующее действие, поэтому влиянию фторидов придается большое значение. Этот эффект используется в цитохимических исследованиях для подавления активности нуклеозидтрифосфатаз и активации АЦ, то есть в качестве фактора, дифференцирующего эти ферментные системы и способствующего специфическому выявлению АЦ.

Активирующее действие фторида на АЦ описано в эндоплазматическом ретикулуме, в аппарате Гольджи и в мембранах нервных клеток [6], в нейронах улиток [17] и других объектах [18]. Есть данные и об отсутствии активирующего влияния фторида на АЦ [19, 20]. Показано также, что действие фторида проявляется не везде одинаково [1]. По мнению Cutler [18], фториды могут предотвращать ингибцию АЦ, обусловленную ионами свинца.

Наши эксперименты показали неоднозначность действия фторида

на АЦ. Так, реакция в капиллярах мозга несколько усиливалась, но на АЦ нервных структур фторид не оказывал стимулирующего влияния.

Биохимическими исследованиями установлено, что активирующее действие фторидов не проявляется в присутствии свинца [20]. Однако при биохимическом анализе всего объема ткани, как правило гетерогенной, сдвиги, происходящие в отдельных структурах, могут маскироваться и не выявляться. Интереснее в этом отношении результаты, полученные на гомогенном материале—синапсосамах [21]. Этими исследованиями показано, что потеря чувствительности АЦ синапсом к фторидам наблюдается уже при фиксации альдегидами. Следовательно, обработка материала, связанная с цитохимическим выявлением АЦ, не всегда является подходящей для проявления активирующего эффекта фторида.

Применение аллоксана при цитохимическом выявлении АЦ вошло в практику исследования после сообщения о его ингибирующем эффекте на АЦ печени [22]. Впоследствии ингибирующий эффект аллоксана на цитохимически выявляемую АЦ был описан и многими другими исследователями [6, 9, 19, 23]. Однако в некоторых случаях ингибирование аллоксаном проявлялось слабо [24] или имело ограничения и было эффективным только в присутствии 20 мМ раствора фтористого натрия [23].

Наблюдаемое после добавления аллоксана помутнение раствора объясняют [4] возможностью его взаимодействия со свинцом. Это может приводить к резкому снижению концентрации ионов свинца в инкубационной смеси и предотвращению возможности протекания цитохимической реакции. Именно с этих позиций Kvinnslund [4] объясняет данные по ослаблению аллоксаном неэнзиматического гидролиза субстрата, приведенные в работе Lemay, Jarrell [13]. Нестабильность в щелочной среде и способность аллоксана образовывать комплексы с металлами дают основание предположить, что его ингибирующее влияние на АЦ является непрямым и связано с уменьшением концентрации ионов свинца в инкубационной смеси.

Наши попытки ингибировать АЦ с помощью аллоксана не дали ожидаемых результатов [11], хотя следует отметить, что при уменьшении концентрации свинца в инкубационной смеси добавление аллоксана приводит к некоторому ослаблению реакции.

Цинк в качестве ингибитора АЦ был апробирован на ряде органов [8]. Наиболее выраженное ингибирующее действие цинка проявлялось в мозгу. Наши исследования по действию цинка (1 мМ) на АЦ изолированных нервных окончаний показали почти полное подавление цитохимической реакции на АЦ.

Контроль на фосфомоноэстеразы. Известны случаи, когда субстратом для фосфатаз может служить АТФ. Поэтому был проведен контроль на щелочные и кислые фосфатазы в разных вариантах: с заменой субстрата, с применением ингибиторов и изменением рН среды.

При инкубации срезов с β -глицерофосфатом вместо АТФ не обнаружилось ничего сходного с реакцией на АЦ ни в кислой, ни в щелочной среде (рН 6,4 и 8,4). Кислые и щелочные фосфатазы имеют различную

локализацию в клетке. Между тем, при инкубации с АТР реакция обнаруживалась в одних и тех же структурах, независимо от рН. Эти данные указывали на то, что реакция обусловлена ферментом, проявляющим активность в довольно широком спектре величин рН, свойственном АЦ.

Инкубация срезов с ингибиторами щелочной фосфатазы—цистеином, фенилаланином, ЭДТА (1 мМ)—не подавляла реакцию. В качестве ингибиторов фосфатаз использовали также тартраты. На реакцию, предложенную для выявления АЦ, они не оказывают ингибирующего действия. Приведенные результаты позволяют исключить возможность выявления кислых и щелочных фосфатаз методами, предложенными для обнаружения АЦ.

Контроль на нуклеотидпирофосфатазу. Этот фермент действует только при высоких значениях рН—9,5—10, а магний оказывает на него ингибирующий эффект. Условия проведения цитохимической реакции на АЦ, то есть в присутствии магния и при рН 7,4—8,9, исключают возможность проявления активности нуклеотидпирофосфатазы.

Контроль на АТРазы. Известно, что АТР гидролизует АТРазами, зависящими от Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Эти ферменты представлены в организме в большей концентрации, чем АЦ. В связи с этим использование АТР при цитохимической реакции на АЦ не исключает возможности неспецифического окрашивания, обусловленного активностью АТРАЗ.

а) *Контроль на Na^+ , K^+ -активируемую АТРазу.* Удаление ионов натрия и калия из инкубационной среды не влияло на интенсивность реакции. Опыты с добавлением в среду различных концентраций этих ионов не выявили существенного влияния на реакцию.

Инкубация с ингибитором Na^+ , K^+ -активируемой АТРАЗы уабанном не только не ослабляла реакцию, но даже усиливала ее, что согласуется с данными литературы об активирующем влиянии уабанна на АЦ [25]. Эти результаты показывают, что развивающаяся цитохимическая реакция не связана с Na^+ , K^+ -активируемой АТРАЗой, а обнаруженное стимулирующее действие уабанна свидетельствует в пользу специфичности выявления АЦ.

б) *Контроль на Ca^{2+} -активируемую АТРазу.* Удаление Ca^{2+} из срезов ткани хелаторами ЭДТА и ЭГТА в концентрации 1 мМ не снижало реакцию. Это позволяет исключить действие Ca^{2+} -активируемой АТРАЗы на проявление реакции для выявления АЦ.

в) *Контроль на Mg^{2+} -активируемую АТРазу.* Этот фермент трудно исключить при цитохимическом выявлении АЦ. Для работы обоих ферментов в качестве субстрата необходим Mg^{2+} -АТР. Оба фермента содержат сульфгидрильные группы, поэтому их невозможно вычлениить и идами тисловых ферментов. Для проявления Mg^{2+} -зависимой АТРАЗы, как и для АЦ, подходит широкий спектр рН. Но активность Mg^{2+} -АТРАЗы на несколько порядков выше, чем АЦ, что затрудняет идентификацию указанных ферментов. Отличительные особенности этих ферментов проявляются в локализации и в отношении к гормональной регуляции. Для Mg^{2+} -АТРАЗы характерна связь со структурами, кото-

рым присуща двигательная активность, тогда как АЦ—мембранный фермент плазмалеммы и ее производных.

Влияние гормонов и медиаторов. Как было показано ранее [1], после фиксации сохраняется чувствительность АЦ к действию биологических активных веществ. Так, адреналин активирует АЦ капилляров мозга и других органов; активирующее действие медиаторов проявляется преимущественно в нервных элементах мозга. Выявление активирующего эффекта указанных веществ является убедительным доказательством обнаружения фермента, регулируемого первыми посредниками, то есть активности АЦ.

Контроль специфичности аденилилимидодифосфатом. Применение АТР имеет недостатки, связанные с атакуемостью этого субстрата фосфатвысвобождающими ферментами (АТРазы и др.), потенциально способными искажать картину выявления АЦ. При использовании АИДФ снимается вопрос о возможном проявлении неспецифической реакции, обусловленной АТРазами. Применение АИДФ показало, что в большинстве случаев локализация реакции совпадает с получаемой при использовании АТР. Однако с синтетическим субстратом необходима многочасовая инкубация.

Локализация АЦ в нервной ткани при использовании различных осаждающих агентов—кобальта [9], свинца [10—12] и стронция [24], а также различных субстратов—АТР [9—12] и АИДФ [24] почти одинакова, что свидетельствует о достоверности полученных результатов.

Анализ вышеприведенных результатов и данных литературы свидетельствует о специфичности предложенных методов выявления АЦ на световом и электронномикроскопическом уровнях с применением свинца и АТР. Несмотря на многочисленность контрольных экспериментов, эти методы имеют очевидное преимущество, выражающееся в способности визуализировать продукт ферментативной реакции, что невозможно при использовании кобальта, бария [14] и стронция в качестве осадителей пирофосфата. На целесообразность применения предложенных методов выявления АЦ указывает четкая реактивность к специфическим биоактивным веществам в соответствующих органах-мишенях и возможность изучения локализации и свойств фермента при различных функциональных состояниях клеток.

PECULIARITIES OF CYTOCHEMICAL DETECTION OF ADENYLATE CYCLASE IN BRAIN

ROSTOMIAN M. A., ABRAMIAN K.S.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Academy of Sciences, Yerevan

The influence of different steps of cytochemical procedure for adenylyl cyclase (AC) identification in rat brain has been examined to work out optimal conditions for enzyme visualization in the brain. AC is very sensitive to lead ions and to fixation conditions. Its high reactivity and unstability is another reason of inability to detect enzy-

me activity in brain. Minimization of the influence of the factors mentioned makes it possible to detect AC activity in brain at light and electron microscopic level.

Control experiments were performed to check the specificity of the method. A possible role of other enzymes utilizing ATP has been evaluated.

ЛИТЕРАТУРА

1. Reik L., Petzold G. L., Higgins J. A., Greengard P., Barnett R. J. *Science*, v. 168, № 3929, p. 392—384, 1970.
2. Howell S. L., Whitefield M. J. *Histochem. Cytochem.*, v. 20, № 11, p. 873—879, 1972.
3. Cutler L. S. J. *Histochem. Cytochem.*, v. 23, № 10, p. 786—787, 1975.
4. Kvinnsland S. *Histochem. J.*, v. 11, № 6, p. 659—684, 1979.
5. Масрепонуло А. П. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 88, № 7, с. 110—111, 1979.
6. Востриков В. М. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 92, № 9, с. 361—363, 1981.
7. Schulze W., Wollenberger A., Slezak J. *Acta Histochemica*, suppl. v. 33, p. 165—173, 1986.
8. Sutherland E. W., Rall T. W., Menon T. J. *J. Biol. Chem.*, v. 237, № 4, p. 1220—1227, 1962.
9. Rechart L., Harkonen M. *Histochemistry*, v. 51, p. 113—119, 1977.
10. Ростомян М. А. *Вопр. биохимии мозга*, т. 14, с. 116—120, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1980.
11. Rostomian M. A., Abramian K. S., Hajos F. *Histochemistry*, v. 70, p. 167—171, 1981.
12. Rostomian M. A., Abramian K. S., Kalman M., Hajos F. *Histochemistry*, v. 78, p. 531—538, 1983.
13. Lemay A., Jarrett L. J. *Cell. Biol.*, v. 65, p. 39—50, 1975.
14. Kempen H. J. M., De Pont J. J. H. N. M., Bonting S. L., Stadhouders A. M. J. *Histochem. Cytochem.*, v. 26, № 4, p. 298—312, 1978.
15. Hajos F. *Brain Res.*, v. 93, p. 485—489, 1975.
16. Hajos F., Csillag A. *Brain Res.*, v. 112, p. 207—213, 1976.
17. Коваль А. М., Кононско Н. И., Скибо Г. Г. *Нейрофизиология*, т. 14, № 4, с. 435—437, 1982.
18. Cutler L. S. J. *Histochem. Cytochem.*, v. 31, p. 85—93, 1983.
19. Abro A., Kvinnsland S. *Histochemistry*, v. 42, № 4, p. 333—334, 1974.
20. Cheng H., Farquhar M. G. J. *Cell Biol.*, v. 70, № 3, p. 671—680, 1976.
21. Monneron A., D'Alayer J. *FEBS Lett.*, v. 109, № 1, p. 75—90, 1980.
22. Cohen K. L., Bitensky M. W. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, v. 169, № 1, p. 80—86, 1969.
23. Slezak J., Geller S. A. J. *Histochem. Cytochem.*, v. 32, № 1, p. 105—113, 1984.
24. Poeggel G., Lupp H., Bernstein H.—G., Weiss J. *Int. Rev. Cytol.*, v. 89, p. 35—64, 1984.
25. Shimizu H., Creuling C., Dvly J. *Mol. Pharmacol.*, v. 6, № 2, p. 184—188, 1970.

Поступила 16. VI 1987