НЕЙРОХИМИЯ
т. 5, № 2, 1986

УДК 577.15.591.48:88

ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В МОЗЖЕЧКЕ КРЫСЫ

РОСТОМЯН М. А.
Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Гистохимическим методом исследована локализация аденилатциклазы (АЦ) в мозжечке и ее чувствительность к различным медиаторам. Наибольшая активность АЦ выявлена в коре мозжечка, в многочисленных нервных окончаниях и вдоль нервных волокон. Внутримозжечковые ядра также обладают АЦ активностью.

Норадреналин активирует АЦ в нервных структурах коры, тогда как активирующий эффект дофамина выражен в нервных волокнах белого вещества междольковых пластинок мозжечка.

Вопрос о роли системы аденилатциклаза—циклический аденозинмонофосфат (АЦ-сАМР) в нейротрансмиссии мозжечка детально изучали Bloom и соавт. [1—4], которые на основании экспериментальных данных, полученных биохимическими, электрофизиологическими, иммуноцитохимическими и фармакологическими методами показали, что сАМР является вторым посредником в медиации ингибиторного эффекта норадреналина (НА) на клетки Пуркинье мозжечка.

В исследованиях, проведенных на синаптосомных мембранах, выделенных из мозжечка собаки под влиянием катехоламинов наблюдали активацию АЦ, приводящую к повышению уровня сАМР [5]. Наибольший эффект оказывали изопротеренол, адреналин и НА, тогда как действие дофамина (ДА) было весьма слабо выражено и проявлялось при довольно высоких концентрациях (1 мМ). Активирующий эффект ДА не отмечался в препаратах неочищенных мембран мозжечка крупного рогатого скота [6]. Отсутствие сдвигов в уровне сАМР под влиянием галоперидола (антагонист ДА) позволило допустить, что дофамин не играет существенной роли в функциях мозжечка [7]. Однако биохимические методы из-за гетерогенности ткани не всегда позволяют уловить изменения в локальных областях органов. Разнонаправленные сдвиги, возникающие в различных клеточных структурах органа, могут нивелироваться при биохимическом анализе всего объема ткани.

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения локализации гистохимически выявляемой АЦ в мозжечке и исследование ее чувствительности к адреналину, НА и ДА.

Материалы и методы

Выявление АЦ проводили по методу, предложенному ранее [8, 9], с некоторыми модификациями состава инкубационной среды, приведенными ниже. Предпосылкой для разработки метода послужили данные электронноцитохимических исследований АЦ [10] и приемы визуализации солей фосфата, применяемых при исследовании фосфатаз.

Исследования проведены на продольных и поперечных серийных срезах мозжечка крыс, фиксированных перфузией через аорту. Наркотизированных животных перфузировали физиологическим раствором (около 200 мл), а затем фиксатором (2,5%-ный глютаральдегид, забуференный 0,1 М какодилатным или трис-малеатным буфером pH 7,4) с 4,5%-ной сахарозой со скоростью 35—45 мл/мин в течение 5—6 мин. Зафиксированный таким образом мозг осторожно извлекали и дополнительно фиксировали погружением в фиксатор такого же состава.

Инкубацию замороженных срезов толщиной 30—40 мкм проводили при температуре 32—34° в течение 2—3 ч. Инкубационную среду готовили на 0,1 М какодиловом или трис-малеатном буфере pH 7,4, содержащем 8% глюкозы. В ее состав входили также (в мМ) сернокислый магний—4, теофиллин—2, АТР—0,5 с примесью ванадия («Sigma», США) для ингибиции АТРаз, азотнокислый свинец—1—2. Последний добавляли перед употреблением и после тщательного перемешивания смесь фильтровали.

После инкубации срезы промывали несколько секунд в дистиллированной воде, 1 мин—в 1%-ной уксусной кислоте для удаления остатков несвязавшегося свинца и 3—5 мин в 0,5%-ном растворе сульфида натрия для визуализации реакции на АЦ. В пробы, предназначенные для исследования локализации АЦ, добавляли тартраты (конечная концентрация 1%), усиливающие специфическую окраску на АЦ. Чувствительность к медиаторам исследовали в среде, не содержащей этой соли.

Контрольные инкубации проводили с использованием той же инкубационной среды и времени, но без субстрата или одного из компонентов среды. Гистохимическое выявление АЦ основано на обнаружении не cAMP—специфического продукта ферментативной реакции, а солей фосфата, поэтому для определения специфичности реакции и возможного участия других ферментативных систем в образовании осадка вместо АТР были использованы и другие фосфатсодержащие субстраты (AMP, ADP), а также ингибиторы для кислой, щелочной фосфатаз и нуклеозидтрифосфатаз (уабаин, ЭДТА, тартрат). Для тестирования гормональной стимуляции и действия медиаторов в инкубационную среду добавляли адреналин, НА (10^{-5}М) и ДА (3 мМ).

Результаты и обсуждение

Исследование локализации гистохимически выявляемой АЦ в серийных срезах мозга показало, что наиболее интенсивные отложения продукта ферментативной реакции проявляются по всему молекулярному слою коры мозжечка (рис. 1). Реакция обнаруживается и в других отделах мозжечка, но ее интенсивность ниже, чем в коре. Выявляемый продукт реакции следует отнести к проявлению специфической активности АЦ на следующем основании: а) контрольные эксперименты без субстрата показали, что осадки образуются не за счет неспецифического отложения свинца; б) другие фосфатсодержащие субстраты—AMP, ADP не являются источниками фосфата для преципитации в использованных условиях; в) добавление специфических и неспецифических ингибиторов для фосфатаз, нуклеотидпирофосфатаз и нуклеозидтрифосфатаз подтвердило, что эти ферменты не участвуют в образовании осадка.

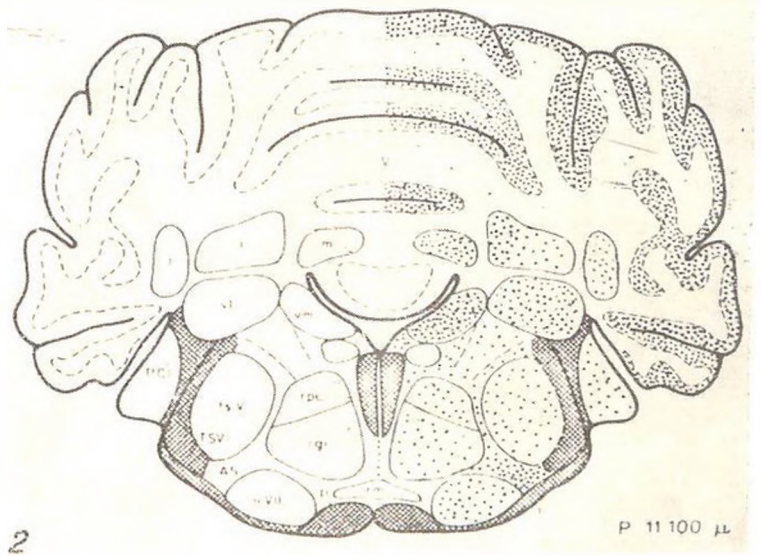

Рис. 1. Продольный срез мозжечка с реакцией на АЦ. Ув.: 15×
Рис. 2. Схематическое изображение поперечного среза мозжечка на уровне Р 11100 мкм. Точками обозначены области, проявляющие положительную реакцию на АЦ. Плотность расположения точек соответствует интенсивности реакции. Условные обозначения: i—nucleus interpositus cerebelli, l—nucleus lateralis cerebelli, m—nucleus medialis cerebelli, nVII—nucleus motorius nervifacialis, P—tractus corticospinalis (tractus pyramidalis), PCI—pedunculus cerebellaris inferior, rgl—nucleus reticularis gigantocellularis, rm—nucleus raphe magnus, rpc—nucleus reticularis parvicellularis, tsV—nucleus tractus spinalis nervi trigemini, V—vermis cerebelli, vl—nucleus vestibularis lateralis, vm—nucleus vestibularis medialis

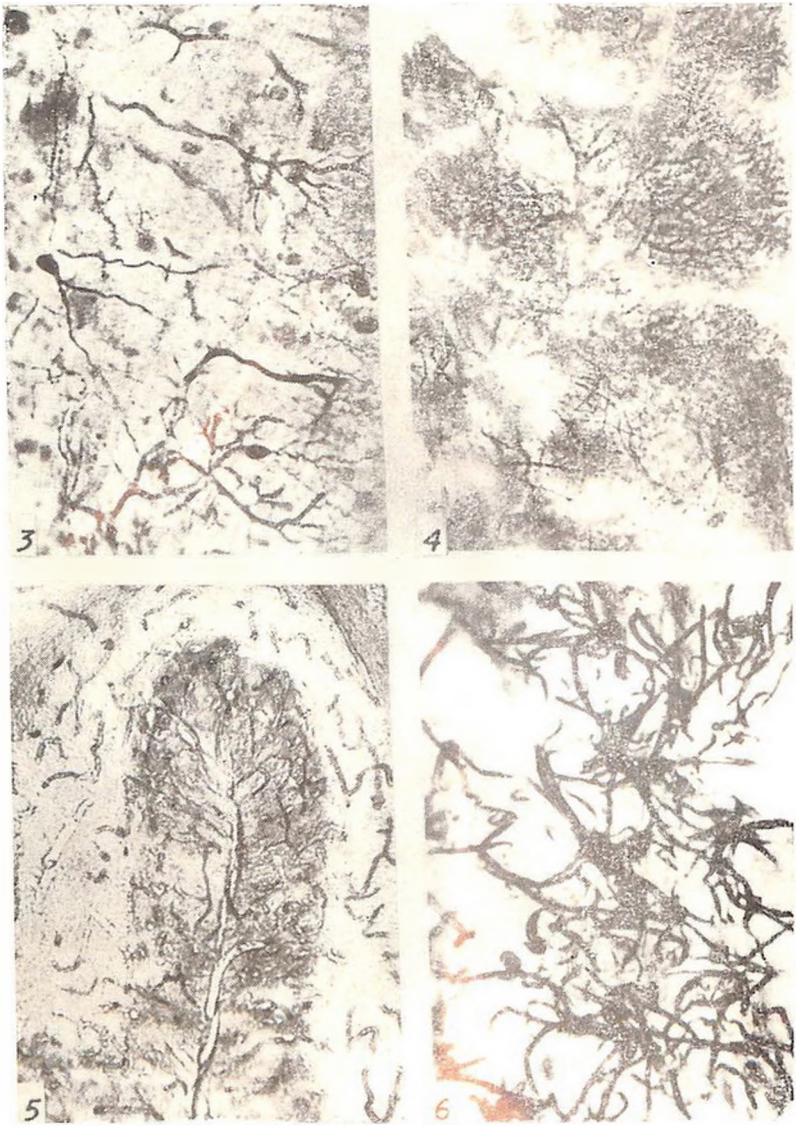

Рис. 3. Нервные контакты клеток разлитого типа в коре мозжечка. Ув.: об. 63, ок. 8

Рис. 4. Активация норадреналином АЦ нервных волокнах молекулярного слоя. Ув.: об. 63, ок. 8

Рис. 5. Активация адреналином АЦ микрососудистого русла. Ув.: об. 12,5, ок. 8

Рис. 6. Активация дофамином АЦ нервных волокон в междольковой пластинке белого вещества. Ув.: об. 63, ок. 8

На рис. 2 приведено схематическое изображение поперечного среза мозжечка крысы на уровне Р 11100 мкм (номенклатура и схема— по атласу Palkovits [11]). Как видно из рис. 1, довольно интенсивная реакция проявляется в медиальном вестибулярном ядре (vm), несколько слабее в латеральном вестибулярном ядре (vl) и далее в медиальном (m), промежуточном (i) и латеральном (l) ядрах. Хорошо выражена реакция в области 5 поля катехоламинергических клеток (А5), в области ретикулярной формации—она весьма умеренная.

При больших увеличениях можно видеть, что реакция преимущественно выражена по ходу нервных волокон и в нервных окончаниях. Нередко можно видеть контактирующие нервные окончания, принадлежащие клеткам различных типов (рис. 3). Особенно четко реакция проявляется в дендритах различных нейронов и несколько напоминает препараты, импрегнированные серебром. Локализация реакции, проявляющейся в дендритах, настолько специфична, что позволяет изучать особенности морфологии дендритного отдела нервных клеток различного типа и при необходимости вести учет числа, толщины, длины дендритов различного порядка, а также количества шипиков и других измеряемых параметров.

Наличие АЦ в дендритах и их шипиках свидетельствует о постсинаптической локализации этого фермента. Интересно отметить, что аналогичные результаты на светомикроскопическом уровне были получены не только с помощью гистохимической реакции на АЦ [9], но и иммуноцитохимическими методами, выявившими массовый характер локализации β-адренергических рецепторов в молекулярном слое мозжечка и, в частности в дендритах клеток Пуркинье [12]. Как известно, АЦ сопряжена с β-адренергическими рецепторами и сходство картин, получаемых различными методами, свидетельствует о хорошей корреляции данных и убедительности полученных результатов. Хорошо согласуются с ними и результаты электронномикроскопических исследований, выполненных с помощью кобальтового метода на коре мозга, хвостатом ядре [13] и в культивируемых нейронах симпатического ганглия [14], а также в изолированных синаптосомных фракциях, выделенных из коры [15] и гипоталамуса крыс [16]. В этих исследованиях было выявлено, что АЦ имеет также пресинаптическую локализацию.

Исследование влияния нейроактивных веществ—адреналина, НА и ДА показало, что изменение активности АЦ характеризуется определенной направленностью и неодинаково проявляется в различных отделах мозжечка. НА оказывает стимулирующее влияние на АЦ нервных волокон молекулярного слоя (рис. 4), активирующее действие адреналина проявляется преимущественно на эндотелии микроциркуляторного русла (рис. 5).

Специфическое и выраженное активирующее влияние оказывает ДА. Его действие проявляется в дендритах клеток Пуркинье, в нервных волокнах корзинчатых и горизонтальных клеток. Наиболее приме-

чательным является активация АЦ нервных волокон в пластинках белого вещества (рис. 6), которые при обычных условиях инкубирования не выявляются. Этот факт свидетельствует о наличии в различных слоях мозжечка структур, чувствительных к ДА, который наряду с НА может иметь определенное значение в функциях мозжечка.

Изменение активности АЦ под воздействием вышеуказанных соединений проявляется далеко не во всех извилинах мозжечка, что, по-видимому, отражает функциональное разнообразие участков коры мозжечка и связанную с этим мозаичность реактивных ответов АЦ на действие тех или иных медиаторов.

Функциональная значимость указанных различий, вероятно, может быть выяснена при изучении влияния определенных физиологических или фармакологических нагрузок, которые можно соотнести к изменению в определенных структурных образованиях мозжечка. И в этом случае исследование серийных срезов мозжечка и картирование сдвигов по критерию изменения активности АЦ в известной мере содействовало бы получению дополнительной информации о внутри- и внемозжечковых связях и механизмах нервной передачи в мозжечке.

HISTOCHEMICAL STUDIES OF ADENYLATE CYCLASE IN RAT CEREBELLUM

ROSTOMIAN M. A.

Institute of Biochemistry of Armenian Academy of Sciences, Yerevan, USSR

Cerebellar adenylate cyclase and its sensitivity to different mediators was studied by histochemical methods. The highest level of adenylate cyclase activity was found in the cerebellar cortex, in numeros nervous endings and along the nervous fibers. Cerebellar nuclei, especially n. vestibularis medialis and A5 catecholaminergic cele group also demonstrated adenylate cyclase activity.

Noradrenaline activated adenylate cyclase in nervous structures of the cortex, while the activating effect of dopamine was pronounced also in the subcortical structures of cerebellum.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bloom F. E.* Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., v. 74, p. 1—103, 1975.
2. *Bloom F. E.* Fed Proc., v. 38, p. 2203—2207, 1979.
3. *Siggins G. R., Battenberg E. P., Hoffer B. J., Bloom F. E, Steiner A.* Science, v. 179, № 4073, p. 585—588, 1973.
4. *Siggins G. R., Henriksen S. J.* Science, v. 189, № 4202, p. 559—561, 1975.
5. *Nishikori K., Maeno H.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 195, № 2, p. 505—507 1979.
6. *Воейков В. Л., Виленская Н. Д.* Тезисы докл. III Всесоюзн. симпозиума «Циклические нуклеотиды», с. 28—29, Киев, 1980.
7. *Palmer G. C., Jones D. J., Medina M. A., Palmer S. J., Stavinova W. B.* Neuropharmacology, v. 17, № 7, p. 491—498, 1978.

8. *Ростомян М. А., Абрамян К. С.* Арх. анат., т. 76, № 1, с. 56—59, 1979.
9. *Ростомян М. А.*, Вопр. биохимии мозга, т. 14, с. 116—120, Ереван, Изд.-во АН АрмССР, 1980.
10. *Reik L., Petzold G. L., Higgins J. A., Greengard P., Barnet R. J.* J. Histochem. Cytochem., v. 20, p. 382—384, 1970.
11. *Palkovits M.* Utmutató és atlasz patkányady sejtcsportjainak izolált kivételére. Academiai Kiado, Budapest, 1980.
12. *Strader C. D., Pickel V. M., Joh T. H., Strohsacker M. W., Shorr R. G. L., Lefkowitz R. J., Caron M. G.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 80, p. 1840—1844, 1983.
13. *Rechardt L., Härkönen M.* Histochemistry, v. 51, p. 113—119, 1977.
14. *Hervonen H., Rechardt L.* Histochemistry, v. 48, p. 43—50, 1976.
15. *Rostomian M. A., Abramian K. S., Hajos F.* Histochemistry, v. 70, p. 167—171, 1980.
16. *Rostomian M. A., Abramian K. S.* Proc. of the 7th European Congress on Electron Microscopie. v. 2, p. 31—32, Hague, The Netherlands, 1980.

Поступила 20. V 1985