



## ВЫЯВЛЕНИЕ ДИМОРФИЗМА ХРОМАФФИННЫХ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ ГИСТОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИЕЙ НА АДЕНИЛАТЦИКЛАЗУ

РОСТОМЯН М. А., АБРАМЯН К. С.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Представлены результаты гистохимического выявления аденилатциклазы (АЦ) в мозговом слое надпочечников крыс. Показаны особенности локализации АЦ в интрамуральном нервном ганглии. Выявлены различия в иннервации адреналин- и норадреналинпродуцирующих клеток, свидетельствующие об их диморфизме.

Вопрос о гетерогенности популяции хромаффинных клеток надпочечника был поставлен вскоре после открытия норадреналина. И, несмотря на относительно длительную историю, дискуссия о мономорфизме и диморфизме хромаффинных клеток мозгового слоя актуальна и в настоящее время. Исследователи, признающие зависимость морфологических различий клеток от их функционального состояния, и авторы, отстаивающие представления о наличии различных типов клеток, продуцирующих различные моноамины, продолжают публиковать данные, подтверждающие ту или иную точку зрения, описывать и анализировать адекватность методов дифференцированного выявления этих типов клеток [1—3]. Среди успешных попыток выявления этих различий на светомикроскопическом уровне, следует отметить формалинндуцируемую флуоресценцию, йодатную и аргентаффинную реакции и некоторые другие гистохимические и гистологические методы [3—6].

Решение вопроса, связанного с гетерогенностью хромаффинных клеток, осложнено тем обстоятельством, что биоактивные вещества, продуцируемые клетками мозгового слоя надпочечников, очень близки по химической природе и, более того, являются предшественниками друг друга.

В связи с этим, обнаружение в клетках мозгового слоя того или иного амина позволяет с достоверностью судить об их содержании в клетках в момент исследования, а не о способности к продукции различных аминов. Более убедительными представляются данные по сопоставлению серийных срезов надпочечников, окрашенных на адре-

налин и порадреналин, у животных с четко выраженными различиями в локализации адреналин- и порадреналинпродуцирующих клеток с одновременным учетом их морфологических особенностей.

В настоящей работе гистохимическим методом исследована локализация АЦ в различных структурных образованиях мозгового вещества—хромаффинных гранулах и нитрамуральном нервном ганглии. Показаны особенности иннервации адреналин- и порадреналинпродуцирующих клеток и предпринята попытка рассмотрения результатов гистохимического выявления АЦ в мозговом слое надпочечников в свете представлений о гетерогенности популяции хромаффинных клеток.

### Материалы и методы

Гистохимическое выявление АЦ проводили по методу, предложенному ранее [7], с некоторыми модификациями состава инкубационной среды.

Для инкубации использовали замороженные срезы надпочечников крыс (толщиной 30 мкм), фиксированные перфузией 2,5%-ным глутаральдегидом на 0,1 М трис-малеатом или какодильном буфере рН 7,4. Срезы готовили через 18—20 ч после дополнительного фиксирования материала в фиксаторе такого же состава. Инкубацию проводили при температуре 32—34°. При использовании в качестве субстрата АТР материал инкубировали 30—60 мин, а с синтетическим субстратом аденилилимидодифосфатом—4 ч и более.

Состав инкубационной среды (5 мл): 0,1 М трис-малеатный или какодильный буфер рН 7,4—8,9 (в зависимости от целей исследования и использованных субстратов) с 8% сахарозы или глюкозы; в качестве субстрата использовали 0,5 ммоль АТР с примесью ванадия («Sigma», США) для ингибирования АТРаз или 0,5 ммоль аденилилимидодифосфата («Serva», ФРГ), 4 ммоль  $MgSO_4$ , 2 ммоль теофиллина («Sigma», США), и 1,5—2,4 ммоль  $Pb(NO_3)_2$ , добавляемого в инкубационную среду непосредственно перед употреблением. После инкубации срезы последовательно промывали в дистиллированной воде, 1%-ной уксусной кислоте (1 мин), в воде и 5 мин в 0,5%-ном сульфиде натрия для визуализации пирофосфата свинца, маркирующего места проявления ферментативной активности. Срезы после промывки монтировали на предметные стекла, высушивали при комнатной температуре в течение суток и заключали в глицерин-желатину.

Продукт ферментативной активности в виде темного осадка маркировал места проявления активности АЦ.

О специфичности реакции судили по результатам контрольных экспериментов (рис., а) с инкубацией срезов в среде без субстрата, с тепловой денатурацией, с ингибиторами специфических и неспецифических фосфоэстераз, а также с гормональной стимуляцией.

Для дифференцированного выявления хромаффинных клеток использовали метод окраски толуидиновым синим [8].

Электронномикроскопическое исследование проводили на надпочечниках крыс, перфузированных 2,5%-ным забуференным глутаральдегидом, обезживание—по стандартной схеме, заливку и последующее ориентированное ультрамикротомирование различных видов клеток—методом перезаливки, предложенным ранее [9].

### Результаты и обсуждение

При гистохимическом выявлении АЦ в мозговом веществе надпочечников крыс обнаруживается четко выраженная реакция, проявляющаяся во внутринадпочечниковом нервном аппарате. Характер локализации реакции напоминает картину, получаемую при имперганции

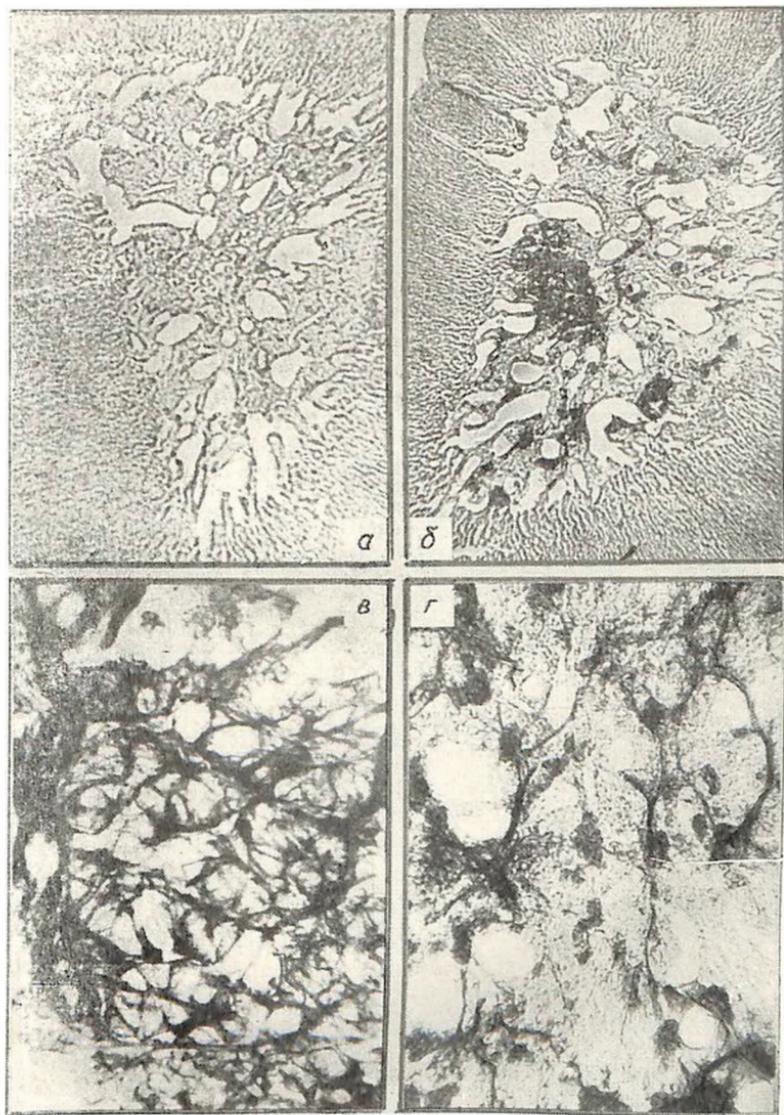


Рис. Гистохимическая реакция на ацетилхолинэстеразу в мозговом слое надпочечников: *а*—контрольный препарат. В срезе надпочечника виден корковый и мозговой слой без признаков реакции на АЦ. Об. 4, ок. 8; *б*—реакция на АЦ локализована в интрамуральном ганглии, нервных волокнах и островках парадrenalлипродуцирующих клеток. Об. 4, ок. 8; *в*—фрагмент рис. б. Интрамуральный нервный ганглий при большем увеличении. Реакция проявляется в нервных волокнах и в мембранах нервных клеток. Об.25, ок.8. *г*—нервные волокна подходят к островкам парадrenalлипродуцирующих клеток. Об.12.5, ок. 8.

температуры, относятся соответственно к адреналин- и норадреналинпродуцирующим клеткам [4—6, 14].

Как видно из приведенных данных, описанные типы клеток отличаются типичными свойствами, иннервацией и, как следствие этого, должны отличаться характером метаболизма, а также регуляцией синтеза и секреции различных катехоламинов. Отражением метаболических различий в этих типах клеток мозгового вещества может служить также выявленный гистохимическим методом неоднородный характер окрашивания на гликоген [15].

Приведенные ультраструктурные и гистохимические особенности «окраски» мозгового вещества свидетельствуют о наличии, по крайней мере, двух типов хромоаффинных клеток. Примечательно, что эти различия выявляются и в отношении системы циклических нуклеотидов, которые имеют определенную роль в осуществлении экзоцитоза [16] и других процессов, связанных с проявлением функций надпочечников.

Как показано выше, реакция на АЦ проявляется не только в хромоаффинных гранулах, в мембранах которых она сосредоточена вместе с дофамин-β-гидроксилазой [11], но и в нервных элементах надпочечника. Нервные волокна интрамурального ганглия, проявляющие четко выраженную реакцию на АЦ, связаны преимущественно с островками норадреналинпродуцирующих клеток. Очевидно, это свидетельствует о том, что их регуляция в большей мере, чем регуляция адреналинпродуцирующих клеток, зависит от нервных влияний, медируемых посредством системы АЦ-сАМР.

Тесная анатомическая связь между интрамуральным нервным сплетением и островками норадреналинпродуцирующих клеток, объединяющая их как бы в единое целое, позволяет высказать предположение, что вопреки сложившимся представлениям [17], именно эту систему клеток, а не все мозговое вещество, можно считать аналогом постганглионарного сплетения.

## HISTOCHEMICAL REACTION FOR ADENYLATE CYCLASE REVEALS CHROMAFFIN CELLS DIMORPHISM

ROSTOMIAN M. A., ABRAMIAN K. S.

Institute of Biochemistry of Armenian Academy of Science, Yerevan

The localization of adenylyate cyclase (AC) was determined histochemically in rat adrenal medulla. AC was detected in chromaffin granules and in intramural ganglion. Due to AC reaction the difference between the innervation of adrenalin- and noradrenalin-producing cells was discovered.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Семашко М. И. Арх. анат., т. 73, № 7, с. 37—41, 1977.
2. Menchimol S., Cantin M. Histochemistry, v. 51, № 1, p. 9—26, 1977.
3. Кацнельсон З. С., Стабровский Е. М. Гистология и биохимия хромаффинной ткани надпочечников, «Медицина», Л., 1975.
4. Coupland R. E. The natural history of the chromaffin cell, Longmans, p. 1—279, London, 1965.
5. Eränkö O.—In: Aforenergic mechanisms (ed. J. R. Vane), p. 103—108, Boston, 1960.
6. Horwood D. Progr. Histochem. Cytochem., v. 3, p. 1—66, 1971.
7. Ростомян М. А., Абрамян К. С. Арх. анат., т. 76, № 1, с. 56—59, 1979.
8. Honoré L. H. J. Histochem. and Cytochem., v. 19, № 8, p. 483—486, 1971.
9. Рейнгольд В. Н., Шестопалова Н. М., Борисов В. М., Абрамян К. С. Тезисы V Всесоюзн. конф. по электронной микроскопии, с. 22, Сумы, 1965.
10. Grynspan-Winograd O. C. r. Acad. sci., v. 268, № 10, p. 1420—1422, 1969.
11. Zinder O., Menard R., Lovenberg W., Pollard H. B. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 79, № 3, p. 707—712, 1977.
12. Zinder O., Nicodijevic O., Hoffman Ph. G., Pollard H. B. J. Biol. Chem., v. 251, № 7, p. 2179—2181, 1976.
13. Winkler H., Carmichael S. W.—In: The secretory granule. (Polsner A. M., Trifaro J. M. eds), p. 3—79, Elsevier Biochemical Press, 1982.
14. Coupland R. E. J. Anat., v. 99, № 2, p. 231—254, 1965.
15. Ростомян М. А., Абрамян К. С. Тезисы XII конф. морфологов Чехословакии, с. 125, 1977.
16. Pollard H. B., Pazoles Ch. J., Creutz C. E., Zinder O. Int. Rev. of Cytology, v. 58, p. 195—197, 1979.
17. Тонких А. В.—В кн.: Адреналин и норадреналин, с. 38—45, М., Наука, 1964.

Поступила 4. XI. 1984