

П.М. БАЛАБАН, И.С. ЗАХАРОВ, В.Н. МАЦ

ПРИЖИЗНЕННОЕ ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ОКРАШИВАНИЕ
СЕРТОНИНЭРГИЧЕСКИХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК
5,7-ДИОКСИТРИПТАМИНОМ

(Представлено академиком П.Г. Костюком 10 X 1984)

Одной из нерешенных до сих пор проблем экспериментальной нейрофизиологии является прижизненное определение типа медиатора, который продуцирует исследуемый нейрон или группа нейронов. Частично эта проблема решена для идентифицируемых нервных клеток путем гистохимического анализа [2] после электрофизиологического эксперимента, однако метода прижизненной идентификации всех нейронов, продуцирующих определенный медиатор, до настоящего времени предложено не было.

В данной работе описан способ избирательной прижизненной окраски нервных клеток (предположительно серотонинэргических) виноградной улитки. Принцип, на котором основан предлагаемый метод, может быть использован для идентификации клеток, продуцирующих и другие медиаторы.

Эксперименты проводились на взрослых виноградных улитках *Helix lucorum* L. Опытным животным в полость тела (в гемоцель) вводился нейротоксин 5,7-диокситриптамиин ("Serva"), растворенный в растворе следующего состава (мМ): NaCl 80, KCl 4, MgCl₂ 5, CaCl₂ 7, НЕРЕС 5, аскорбиновая кислота 0,1%. Контрольным животным в те же сроки вводили такие же объемы солевого раствора. Введение 5,7-диокситриптамина (5,7-ДОТ) проводили либо дважды с интервалом в 7 дней в дозе 10 мг/кг, либо один раз в дозе 20 мг/кг массы животного. Результаты не различались. Всего исследовано 11 опытных и 10 контрольных животных.

При извлечении подглоточного комплекса ганглиев через 25–30 дней после первого введения 5,7-ДОТ у всех опытных улиток обнаружены несколько групп интенсивно окрашенных в красно-коричневый цвет мелких и крупных нейронов. Расположение окрашенных нейронов было полностью идентичным у всех исследованных животных, что позволило предположить наличие избирательного окрашивания. Среди окрашенных нервных клеток оказалась и хорошо изученная гигантская метациеребральная клетка, продуцирующая серотонин [2]. Карта расположения окрашенных нейронов в pedalных ганглиях приведена на рис. 1.

5,7-Диокситриптамиин отличается от серотонина (5-окситриптамина) только на одну гидроксильную группу и применяется для избирательного разрушения синаптических терминалей серотонинэргических нейронов. При введении 5,7-ДОТ в омывающий нервную систему раствор, происходит избирательный захват этого вещества из-за сходства с серотонином в основном только серотонинэргическими нейронами [3, 4]. Эти данные и тот факт, что интенсивно окрашивался идентифицированный серотонинэргический нейрон, привели к мысли о том, что все окрашенные нейроны являются серотонинэргическими. Это предположение было проверено путем сравнения расположения окрашенных 5,7-ДОТ нейронов и расположения описанных в литературе серотонинсодержащих нейронов, выявленных у виноградной улитки методом формальдегидной конденсации [2].

К сожалению, в настоящее время в литературе отсутствует детальная карта серотонинэргических нейронов виноградной улитки, но качественная картина рас-

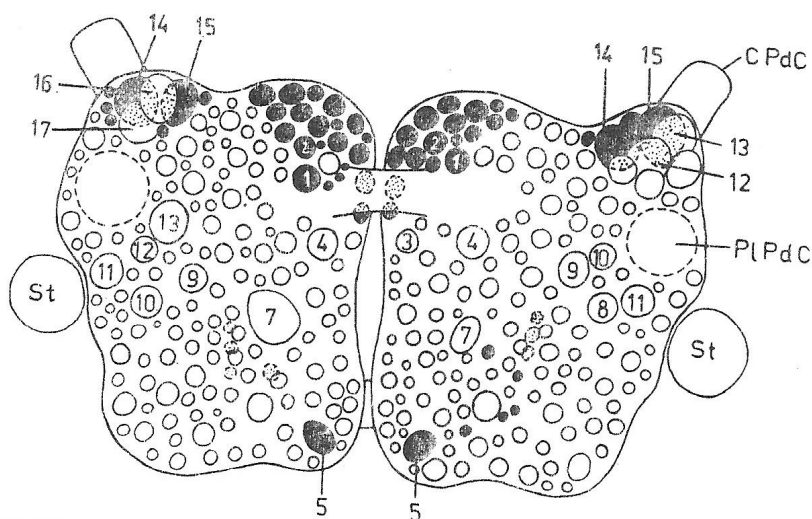


Рис. 1. Карта-схема расположения нейронов на дорсальной поверхности педалных ганглиев. 1–17 – номера морфологически идентифицируемых нервных клеток. Тела нейронов, приобретающих после воздействия 5,7-ДОТ красно-коричневую окраску и лежащие на поверхности ганглиев, обозначены черным, а лежащие в нижних слоях клеточной коры помечены точками. Возможны незначительные индивидуальные отклонения. *St* –статоцист; *CPdC* – церебро-педалный коннектив; *PlPdC* – плевро-педалный коннектив

пределения в ЦНС виноградной улитки описанных в литературе серотонинэргических нейронов и нейронов, окрашенных в результате воздействия 5,7-ДОТ, полностью совпадает. В тех областях, где по литературным данным, полученным с помощью гистохимического изучения [2], нет серотонинсодержащих нейронов (буккальные и плевральные ганглии) не обнаружено и окрашенных нейронов. Крупные дофаминсодержащие нейроны церебральных ганглиев, опознаваемые по форме и месторасположению, не изменили своей окраски после воздействия 5,7-ДОТ. Эти данные подтверждают предположение об избирательной окраске серотонинсодержащих нейронов при воздействии 5,7-ДОТ.

Наблюдаемая окраска нейронов сохраняется после фиксации 10% формалином и стандартной проводки для парафиновых срезов. На срезах толщиной 7 мкм окрашенные 5,7-ДОТ нейроны отчетливо видны. Окраску нейронам придают коричневые гранулы, находящиеся в цитоплазме клеток.

При внутриклеточном отведении (18 нейронов) активности нервных клеток, окрашенных 5,7-ДОТ, обнаружено, что амплитуда потенциала покоя и потенциалов действия у идентифицированных нейронов педалного и церебрального ганглиев не отличаются от таковых у контрольных животных. Характер спонтанной активности гигантской серотонинэргической метациеребральной клетки также не изменен (рис. 2). Раздражение нервов на окрашенных 5,7-ДОТ препаратах изолированной ЦНС вызывало обычные реакции. Нанесение капли морковного сока на хеморецептивную поверхность кожи на препарате "ЦНС–хеморецептор" [1] вызывало такую же активацию серотонинэргического метациеребрального нейрона, что и в контрольных препаратах. Эти результаты говорят о сохранности синаптических входов серотонинэргических нейронов.

В то же время одним из основных проявлений влияния 5,7-ДОТ на нервную систему являются дегенеративные изменения в синаптических терминалях серотонинсодержащих нейронов у позвоночных и беспозвоночных животных [3–6], которые наблюдаются уже через несколько часов после введения. Имеющиеся литера-

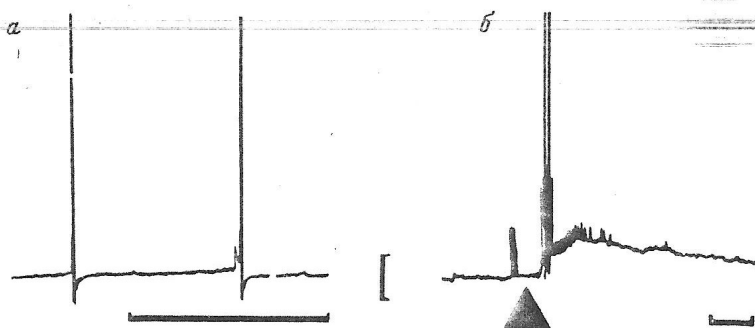


Рис. 2. Фоновая и вызванная активность гигантских серотонинсодержащих нейронов церебральных ганглиев: *а* — фоновая активность ярко окрашенного нейрона левого метациеребрального ганглия на 32 день после введения 5,7-ДОТ, *б* — ответ правой метациеребральной клетки (окрашенной, 32 день после введения 5,7-ДОТ) на нанесение капли сока (треугольник) на околоротовую поверхность кожи улитки. Калибровка 10 мВ, 10 с

турные данные указывают на длительное от 1 до 2 мес понижение синтеза серотонина в нервной системе после воздействия 5,7-ДОТ [4, 6]. Максимальный срок для восстановления функций составляет около 2 мес. Обнаруженная нами окраска нейронов появляется у улитки только через месяц и сохраняется более 2,5 мес, что позволяет предположить восстановление функций окрашенных нейронов. Следует отметить, что поведение улиток через 1,5 мес после введения 5,7-ДОТ не отличалось от поведения контрольных животных.

Таким образом, предложенный в настоящей работе метод позволяет избирательно прижизненно окрашивать серотонинэргические нейроны в нервной системе моллюсков. Учитывая, что действие 5,7-ДОТ изучено в основном на позвоночных [4, 5] и что основой избирательного попадания вещества только в определенные клетки является специфичный механизм обратного захвата выделяемого данным нейроном медиатора, можно предположить, что окрашивание серотонинэргических нейронов будет наблюдаться и у позвоночных животных в ту фазу онтогенеза, когда обратный захват медиатора эффективен не только в терминалах, но и в теле клетки.

Механизм появления окраски состоит, по нашему мнению, в том, что 5,7-ДОТ разлагается в теле клетки со временем с образованием интенсивно окрашенных веществ, которые не выводятся из клетки. Появление интенсивной окраски 5,7-ДОТ наблюдается при хранении его в растворенном виде через несколько десятков минут [4]. Возможно, что окрашивание связано с накоплением продуктов распада 5,7-ДОТ в лизосомах в связи с регенерационными процессами, протекающими в клетке вслед за разрушением терминалей аксонов.

Описанный в настоящей работе метод прижизненной избирательной окраски может быть применен и для нейронов, продуцирующих другие медиаторы. Для этого необходимо синтезировать вещества, разлагающиеся с появлением окрашенных продуктов и в то же время попадающие в нейроны путем обратного захвата из-за сходства с медиатором, продуцируемым данными нейронами.

Когда настоящая работа была подготовлена к печати, нам встретилась работа [7], в которой описано появление сходной окраски у гигантских серотонинэргических нейронов пиявки (клеток Ретциуса). Существенно, что и у этого объекта электрические свойства клеточной мембраны сохранились не измененными несмотря на отсутствие выявляемого гистохимическим методом серотонина в клетках Ретциуса после обработки 5,7-ДОТ [7]. Обнаружение сходного эффекта влияния 5,7-ДОТ

именно на серотонинэргические нейроны у пиявки является существенным подкреплением правильности интерпретации данных, полученных в настоящей работе на легочном моллюске.

Авторы благодарят Н.Б. Салимову и Д.А. Сахарова за предоставленные материалы и за участие в обсуждении результатов.

Институт высшей нервной деятельности
и нейрофизиологии
Академии наук СССР, Москва

Поступило
30 X 1984

ЛИТЕРАТУРА

1. Максимова О.А., Балабан П.М. Нейронные механизмы пластичности поведения. М.: Наука, 1983, с. 126.
2. Сахаров Д.А. Генеалогия нейрона. М.: Наука, 1974, с. 236.
3. Baumgarten H.G., Björklund A., Lachenmayer L. et al. — Acta Physiol. Scand., 1971, Suppl. 373, p. 1–16.
4. Baumgarten H.G., Jenner S., Björklund A. et al. Biology of serotonergic transmission. 1982, p. 249–277.
5. Daly J., Fuxe K., Jonsson G. — Brain Res., 1973, vol. 49, № 2, p. 476–482.
6. Hiripi L., Nemcsok J., Salanki J. — Comp. Biochem. and Physiol., 1981, vol. 69C, № 2, p. 407–410.
7. Lent C.M., Dickinson N.H. — Brain Res., 1984, vol. 300, № 1, p. 167–161.

УДК 612.172+612.819.9

ФИЗИОЛОГИЯ

В.М. ПОКРОВСКИЙ, В.Г. АБУШКЕВИЧ, А.И. ДАШКОВСКИЙ, С.В. ШАПИРО

ВОЗМОЖНОСТЬ УПРАВЛЕНИЯ РИТМОМ СЕРДЦА ПОСРЕДСТВОМ ПРОИЗВОЛЬНОГО ИЗМЕНЕНИЯ ЧАСТОТЫ ДЫХАНИЯ

(Представлено академиком Н.П. Бехтеревой 30 IX 1984)

Связь между частотой дыхания и частотой сокращений сердца является результатом взаимодействия центральных механизмов регуляции дыхательной и сердечно-сосудистой систем [1–4]. Принято считать, что отношения между указанными вегетативными функциями носят лишь корреляционный характер [5–7] и каждое отдельное сокращение сердца не предопределяется центральным механизмом.

У 10 добровольцев — девушек 19–22 лет — регистрировали электрокардиограмму и пневмограмму. Исходная частота сердечных сокращений была $87,2 \pm 2,2$ в 1 мин, а частота дыхания — $14,0 \pm 0,5$. Затем испытуемым предлагали осуществлять дыхание в такт индифферентного раздражителя — вспышек света фотостимулятора. За каждой вспышкой следовал один дыхательный акт. Частота вспышек фотостимулятора задавалась экспериментатором и превышала исходную частоту сердцебиений. Исследования проведены в диапазоне частот, крайние значения которых условно обозначены как минимальная и максимальная частоты и составили соответственно 103,4 и 125,0 в 1 мин. При дыхании в такт вспышкам света в избранном диапазоне у испытуемых развивался феномен управления ритмом сердца. Он состоял в том, что за каждым дыханием через строго определенный промежуток времени следовало одно сокращение сердца. Ступенчатое изменение в этом диапазоне частоты дыхания приводило к синхронному изменению частоты сердечных сокращений (рис. 1). Феномен получен у 100% обследованных, способных воспроизвести заданную частоту дыханий. Следует отметить, что испытуемые практически без переходного периода