

GRAŻYNA SZUMAŃSKA, ROMAN GADAMSKI,
MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI

AKTYWNOŚĆ CYKLAZY ADENYLOWEJ W ZAKOŃCZENIACH SYNAPTYCZNYCH ODCINKA CA₁ ROGU AMONA U CHOMIKA MONGOLSKIEGO

Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Opracowanie technik cytochemicznych ujawniających aktywność hormonalnie zależnej cyklazy adenylowej (AC) w tkankach zwierzęcych (Reik i wsp. 1970) dało początek licznym badaniom, dotyczącym jej swoistości (Howell, Whitfield 1972; Lemay, Jarett 1975; Cutler, Cristian 1980), lokalizacji komórkowej (Schultze i wsp. 1977; Vorbrodtt i wsp. 1977, 1984; Recharadt, Härkönen 1977; Panula, Recharadt 1979; Szumańska i wsp. 1984; Recharadt, Hervonen 1986) oraz hormonalnej stymulacji (Kebabian i wsp. 1972; Recharadt, Härkönen 1977; Panula 1980; Recharadt, Hervonen 1986; Madison, Nicoll 1988). Związana z błonami komórkowymi AC, pełniąc funkcję receptora katalizuje przemianę adenylozotriójfosforanu (ATP) do cyklicznego 3', 5'-monofosforanu (cAMP), odgrywającego rolę wewnątrzkomórkowego mediatora (second messenger). Wyznacza to kluczową rolę tego enzymu w receptorowo zależnej regulacji czynności komórek (Sutherland, Rall 1960). Jego aktywność stymulowana jest przez szereg czynników, między innymi przez noradrenalinę (Huang i wsp. 1971), dopaminę (Kebabian i wsp. 1972) oraz przez forskolinę (Seamon i wsp. 1981).

Ośrodkowy układ nerwowy należy do najbogatszych w AC narządów ustroju zwierzęcego (von Hungen i wsp. 1974). Jednakże ujawnienie jej aktywności w strukturach mózgu napotyka na szereg trudności metodycznych, związanych przede wszystkim z hamującym oddziaływaniem utrwalaczy i jonów metali ciężkich stosowanych w technice mikroskopowo-elektronowej. Z tym też zapewne związane są kontrowersje w interpretacji uzyskiwanych wyników.

W ostatnich latach opracowano metody ultrahistochemiczne pozwalające na ujawnianie aktywności AC w strukturach ośrodkowego układu nerwowego. Jej obecność wykazano zarówno w synapsach i błonach włókien nerwowych (Greengard i wsp. 1972; Recharadt, Härkönen 1977), jak i w elementach sieci naczyniowej mózgu (Szumańska i wsp. 1984; Vorbrodtt i wsp. 1984). Stwier-

dzono ponadto głębokie nieprawidłowości w aktywności enzymu w ścianach naczyń krwionośnych mózgu w doświadczalnych stanach patologicznych przebiegających z zaburzeniami mechanizmów bariery krew – mózg (Szumańska, Mossakowski 1985; Szumańska i wsp. 1988).

Wybiórcze uszkodzenie neuronów piramidowych sektora CA₁ rogu Amona w warunkach niedokrwienia przodomózgowia u chomików mongolskich i szczurów (Kirino 1982; Kirino i wsp. 1984) i jego prawdopodobny związek z ekscytotoksycznym działaniem neuroprzebieżników aminokwasowych (Pulsinelli 1985; Suzuki i wsp. 1985) zwróciły uwagę na ewentualne zmiany w stanie synaps w tej części zakrętu hipokampa. Obecność nieprawidłowości w ich obrazie ultrastrukturalnym w warunkach niedokrwienia mózgu sugerują badania Mossakowskiego i wsp. (1989), poświęcone analizie dynamiki mikroskopowo-elektronowych uszkodzeń sektora CA₁ u chomików mongolskich. Skłoniło to do systematycznej oceny obrazu mikroskopowo-elektronowego synaps sektora CA₁ rogu Amona, pochodzących z różnych komórek położonych w różnych warstwach tego odcinka zakrętu hipokampa. Badania dotyczyły zarówno zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym, jak i tych, u których wywoływano przemijające niedokrwienie przodomózgowia (Gajkowska i wsp. 1988, 1989). Wydawało się celowe ich uzupełnienie histochemiczną analizą aktywności synaptycznej AC tego obszaru zakrętu hipokampa. Z prac de Robertisa i wsp. (1967) wiadomo, iż AC związana jest swoiście z frakcją zakończeń nerwowych. W niniejszej pracy podjęto cytochemiczną analizę aktywności enzymu u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na dorosłych chomikach mongolskich, samcach. Reakcję cytochemiczną ujawniającą aktywność AC przeprowadzono według metody opisanej przez Recharadt i Härkönen (1977) udoskonalonej przez Recharadt i Hervonen (1985), stosując własną modyfikację medium inkubacyjnego (Szumańska i wsp. 1984).

Użyte do badań zwierzęta podzielono na dwie grupy. W grupie pierwszej chomiki mongolskie uśmiercano przez dekapitację. Mózgowia wyjmowane natychmiast z jamy czaszki, oziębiano na lodzie, zanurzano w roztworze Krebsa – Ringera z dodatkiem glukozy (K – R – G) i krojono w płaszczyźnie czołowej na bloki grubości około 2 mm. Następnie z odcinka CA₁ grzbietowej części zakrętu hipokampa pobierano pod kontrolą lupy prostopadłościanny obejmujące jego poszczególne warstwy. Zwierzęta grupy drugiej uśmiercano przez zastosowanie krótkotrwałej przezsercowej perfuzji roztworem K – R – G, pH 8,3. Wykonanie perfuzji miało na celu wypłukanie krwi z łożyska naczyniowego. Z mózgow zwierząt tej grupy pobierano identyczne bloki tkankowe jak w przypadku zwierząt dekapitowanych.

Preparatyka histochemiczna pobranego materiału tkankowego obejmowa-

ła trzy kolejno po sobie następujące etapy: stymulacji (preinkubacja), utrwalania i właściwej inkubacji. Preinkubację przeprowadzono (20 min w temp. pokojowej) w roztworze K-R-G, zbuforowanym do pH 8,3 z dodatkiem aktywatorów: chlorowodoru dopaminy (3 mM) bądź chlorowodoru noradrenaliny (0,1 mM) lub też forskoliny w stężeniu końcowym 10^{-4} . Części bloków tkankowych nie poddawano w ogóle stymulacji przy użyciu żadnego z wyżej wymienionych aktywatorów, w celu wykazania tzw. aktywności podstawowej (basal activity). Utrwalanie przeprowadzono przez immersję bloczków tkankowych w świeżo przygotowanym roztworze 1% paraformaldehydu w K-R-G zbuforowanym do pH 8,3. Po utrwalaniu (5 min w temp. pokojowej) były one przemywane przez 30 min w trzech zmianach roztworu K-R-G, a następnie poddawane inkubacji w dwóch różnych roztworach inkubacyjnych. Precypitatem pierwszego był kobalt, a drugiego stront. W pierwszym przypadku płyn inkubacyjny zawierał: bufor Trisma, pH 8,3 - 50 mmol/l, $MgCl_2$ - 3 mmol/l, $CaCl_2$ - 8 mmol/l, sól sodową 5'-adenylyl-imido-dwufosforanu (AMP-PNP) - 0,5 mmol/l, teofilinę 10 mmol/l i $Co(NO_3)_2$ - 3 mmol/l. Roztwór inkubacyjny był przezroczysty i zabarwiony lekko różowo. W przypadku drugim płyn inkubacyjny zawierał te same składniki, poza azotanem kobaltu, który zastąpiono chlorkiem strontu ($SrCl_2 \cdot 6 H_2O$) - 10 mmol/l. Był on następnie przekształcany pod wpływem octanu ołowiu w widoczny w obrazie mikroskopowo-elektronowym fosforan ołowiu. Końcowe pH obu płynów inkubacyjnych doprowadzono do 8,5-8,8, a inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej przez 60 do 120 min. Kontrole swoistości odczynu histochemicznego wykonywano inkubując materiał bez substratu i bez aktywatorów oraz stosując β -glicerofosforan sodu zamiast właściwego substratu (AMP-PNP). Po inkubacji, bloczki tkankowe płukano, utrwalano w 1% czterotlenku osmu, odwadniano w roztworach etanolu o wzrastającym stężeniu i tlenku propylenu oraz zatapiano w Eponie. Z bloczków tkankowych zatopionych w Eponie skrawano skrawki półcienkie i barwiono je błękitem toluidyny. Przy użyciu mikroskopu świetlnego określano w nich poszczególne warstwy zakrętu hipokampa i według nich odpowiednio trymowano bloczki tkankowe. Uzyskano w ten sposób skrawki ultracienkie pochodzące z 5 kolejnych warstw hipokampa, tj.: *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum radiale*, *stratum lacunosum-moleculare* i *stratum moleculare*. Skrawki nakładano na siatki, kontrastowano w roztworze octanu uranylu lub nie podbarwiano w ogóle. Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym Joel 100 C.

WYNIKI

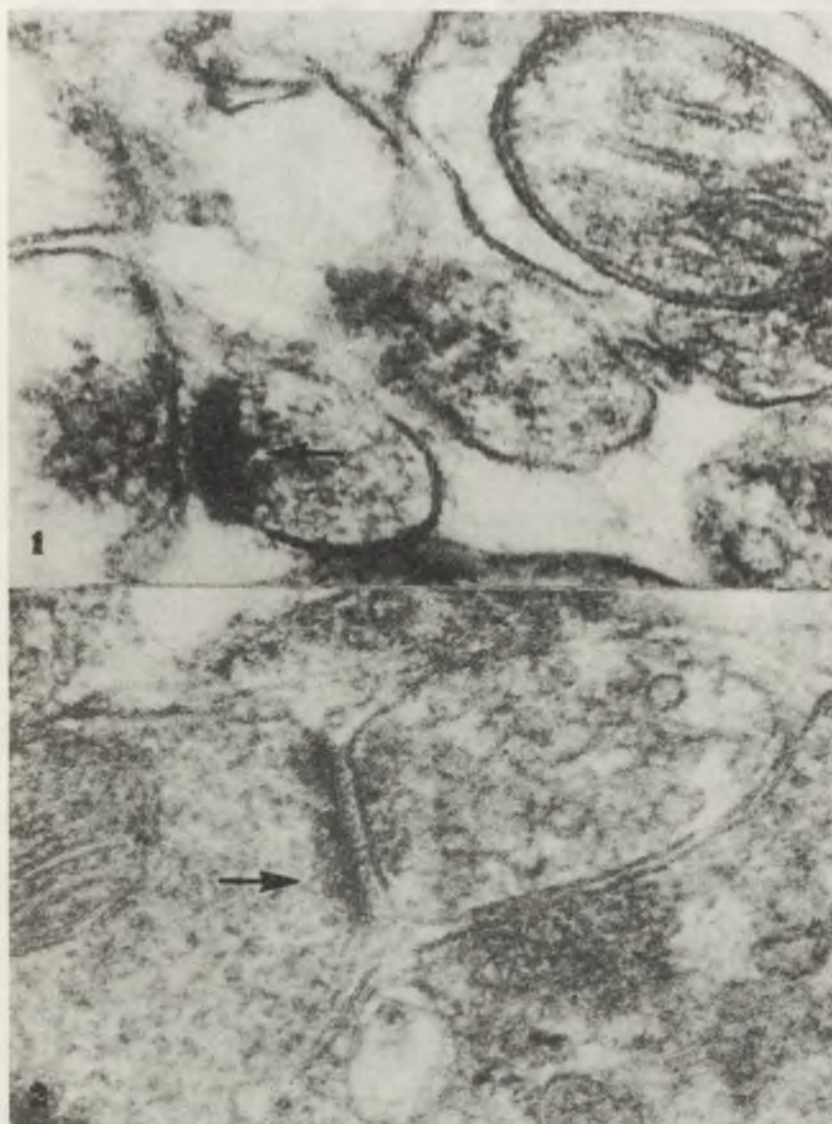
Obserwacje bogatego materiału wykorzystanego do badań wskazują, że aktywność AC ograniczona jest do struktur neuropilu, przede wszystkim do błon dendrytów i zakończeń aksonalnych tworzących kolbki synaptyczne. Synaptyczna lokalizacja AC nie wykazuje różnic w poszczególnych warstwach

sektora CA₁ rogu Amona. Nagromadzenie produktu końcowego reakcji enzymatycznej i jego rozmieszczenie nie wiąże się również z morfologiczną strukturą synaps. Jest ono identyczne w synapsach symetrycznych i asymetrycznych. Intensywność odczynu oraz jego cytologiczna lokalizacja w złączu synaptycznym wykazuje natomiast wyraźną zależność od zastosowanego aktywatora reakcji histochemicznej, a także w pewnym stopniu od rodzaju metalu (stront *versus* kobalt) użytego w adaptacji techniki histochemicznej do celów mikroskopii elektronowej.

Dopaminozależna AC ujawniana przy zastosowaniu azotanu kobaltu, wykazuje linijne rozmieszczenie aktywności w obszarze postsynaptycznym licznych, różnej wielkości styków synaptycznych, występujących we wszystkich pięciu warstwach zakrętu hipokampa (ryc. 1). Dendryty z zaznaczoną błonową aktywnością enzymu związane są ściśle z zakończeniami aksonalnymi. Na charakter aktywności nie wpływa różnorodność morfologiczna pęcherzyków synaptycznych zawartych w zakończeniach aksonalnych, ani zróżnicowanie ich ilości i rozmieszczenia (pęcherzyki okrągłe i spłaszczone, rozproszone lub groniasto zagęszczone w pobliżu błony presynaptycznej). Morfologicznie różnorodne synapsy charakteryzują się wspólnym wzorcem obrazu histochemicznego, wyrażającym się silną aktywnością enzymatyczną w błonach postsynaptycznych i w ich otoczeniu. Zwraca uwagę fakt, że znaczny odsetek synaps nie wykazuje w ogóle reakcji histochemicznej lub jedynie śladową. Mitochondria nie zawierają produktów odczynu histochemicznego, co stanowi zresztą jedno z kryteriów jego swoistości (ryc. 1, 2).

W materiale, w którym dla ujawnienia AC zamiast kobaltu stosowano chlorek strontu, stwierdzano, że stymulowana dopaminą aktywność enzymu występuje nie tylko w obszarze postsynaptycznym lecz również w błonie presynaptycznej oraz w szczelinie synaptycznej. W tym przypadku obok błonowej lokalizacji enzymu spotyka się jego aktywność wewnątrzkomórkową. Wypustki komórek nerwowych, przede wszystkim dendryty, zawierają różnej wielkości ziarnistości produktu reakcji enzymatycznej, nie związane z żadnymi upostaciowanymi strukturami cytoplazmatycznymi (ryc. 3). Przy zastosowaniu tej techniki histochemicznej obserwuje się niekiedy aktywność AC w błonach podstawnych i w mięśniówce drobnych naczyń krwionośnych.

W przypadku AC, stymulowanej przez noradrenalinę i ujawnianej przy użyciu zarówno jonów kobaltu, jak i strontu, produkt reakcji enzymatycznej gromadzi się wyłącznie w postsynaptycznych błonach synaps. Nie spotyka się go nigdy w błonach presynaptycznych. Jednakże stwierdza się tu często obrazy, w których końcowy produkt odczynu widoczny jest w postaci elektro-nowo-gęstych ziarnistości związanych z błonami dużych wypustek nerwowych poza miejscami styków synaptycznych (ryc. 4). Ogólnie można stwierdzić, że noradrenalina bardziej niż dopamina stymuluje aktywność AC zlokalizowaną w błonach wypustek komórek nerwowych poza obszarami synaptycznymi, w neuropilu wszystkich warstw kory amonalnej. Zastosowanie związków strontu dla ujawnienia w obrazach mikroskopowo-elektronowych aktywności

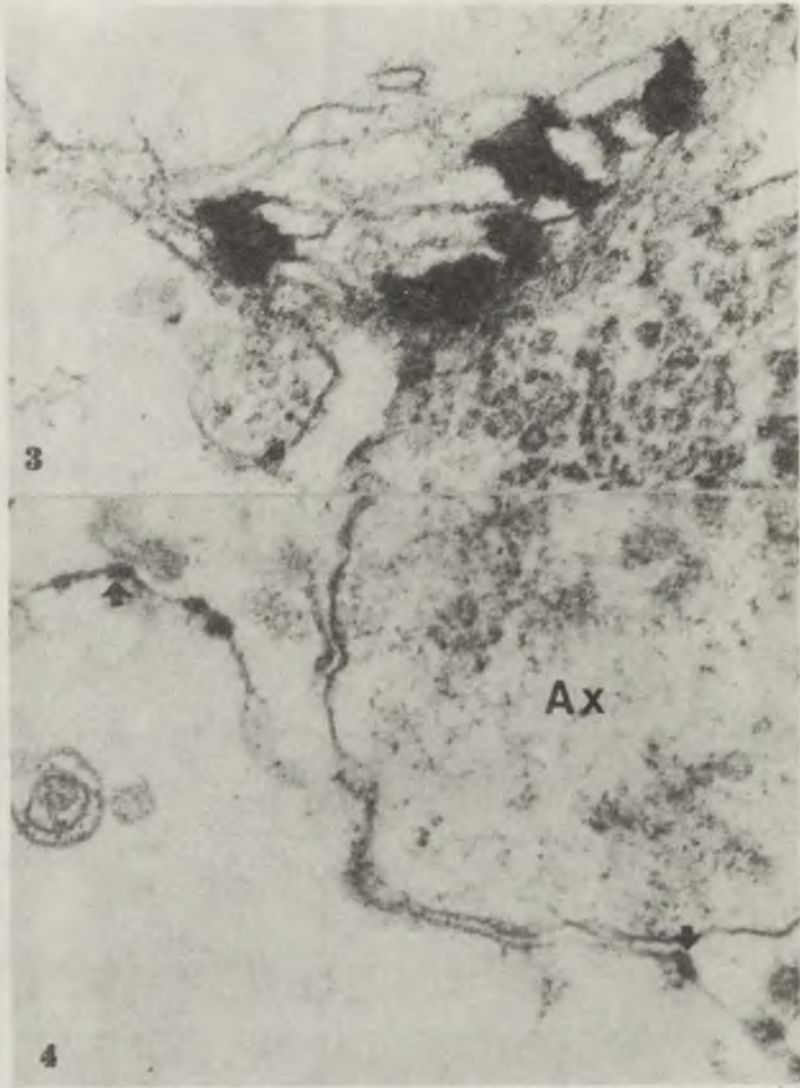


Ryc. 1. *Stratum oriens*. Aktywność cyklazy adenylowej (AC) widoczna w błonie postsynaptycznej (strzałka). Mitochondria bez odczynu. Stymulacja dopaminą. Płyn inkubacyjny I (kobalt). Pow. 60000 ×

Fig. 1. *Stratum oriens*. Electron microscopic demonstration of dopamine-stimulated adenylylated cyclase (AC) activity in the postsynaptic membrane (arrow). No reaction in mitochondrium. Cobalt method. × 60000

Ryc. 2. *Stratum radiatum*. Aktywność dopaminozależnej AC w obszarze postsynaptycznym (strzałka). Skrawek nie podbarwiany. Płyn inkubacyjny I (kobalt). Pow. 50000 ×

Fig. 2. *Stratum radiatum*. Electron microscopic demonstration of dopamine-stimulated AC in the postsynaptic thickening (arrow). No poststaining. Cobalt method. × 50000

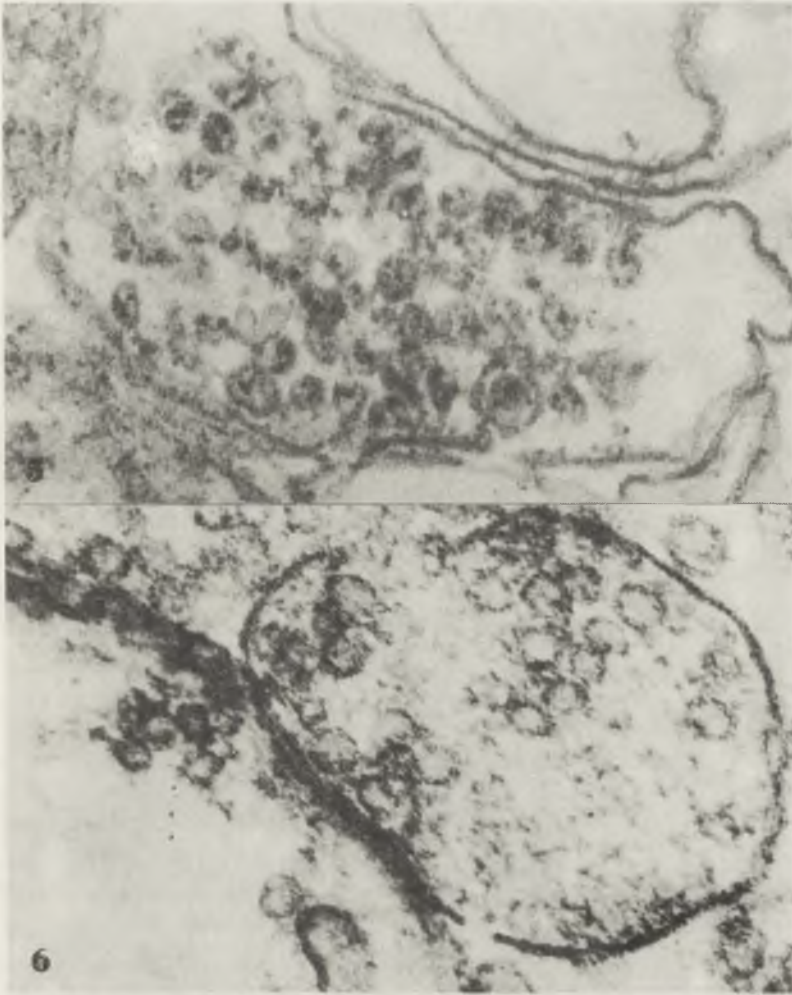


Ryc. 3. *Stratum lacunosum-moleculare*. Nierównomiernie rozłożona, silna aktywność cytoplazmatycznej AC w dendrycie. Stymulacja dopaminą. Płyn inkubacyjny II (stront). Pow. 30000 ×

Fig. 3. *Stratum lacunosum-moleculare*. Electron microscopic demonstration of dopamine stimulated AC. Strong irregularly distributed reaction product in dendrite. Stront method. × 30000

Ryc. 4. *Stratum pyramidale*. Noradrenalinozależna AC. Produkt reakcji w postaci ciemnych zagęszczeń skupionych na błonie włókna nerwowego (strzałki). Widoczne zakończenie aksonu (Ax) z pęcherzykami synaptycznymi pozbawionymi aktywności enzymatycznej. Płyn inkubacyjny II (stront). Pow. 40000 ×

Fig. 4. *Stratum pyramidale*. Electron microscopic demonstration of norepinephrine-stimulated AC. Only scanty stront precipitates (arrow) are seen on the nerve fiber membranes. Axon terminal (Ax) contains synaptic vesicles without enzyme activity. Stront method. × 40000

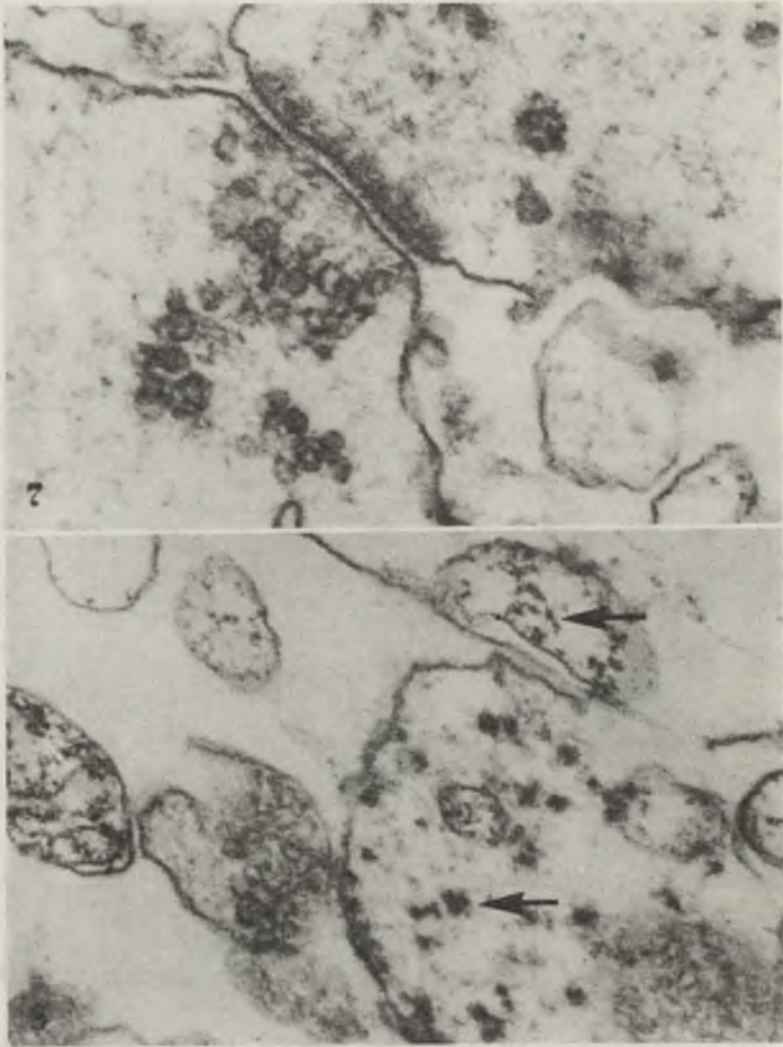


Ryc. 5. *Stratum moleculare*. Aktywność AC w pęcherzykach synaptycznych. Stymulacja noradrenaliną. Płyn inkubacyjny II (stront). Pow. 100000 ×

Fig. 5. *Stratum moleculare*. Norepinephrine-stimulated AC activity in synaptic vesicles. Stront method. ×100000

Ryc. 6. *Stratum oriens*. Związana z błonami synaptycznymi, forskolinozależna AC skupiona głównie w obszarze postsynaptycznym. Płyn inkubacyjny II (stront). Pow. 60000 ×

Fig. 6. *Stratum oriens*. Electron microscopic demonstration of forskolin-stimulated AC activity is present in the postsynaptic region. Stront method. ×60000

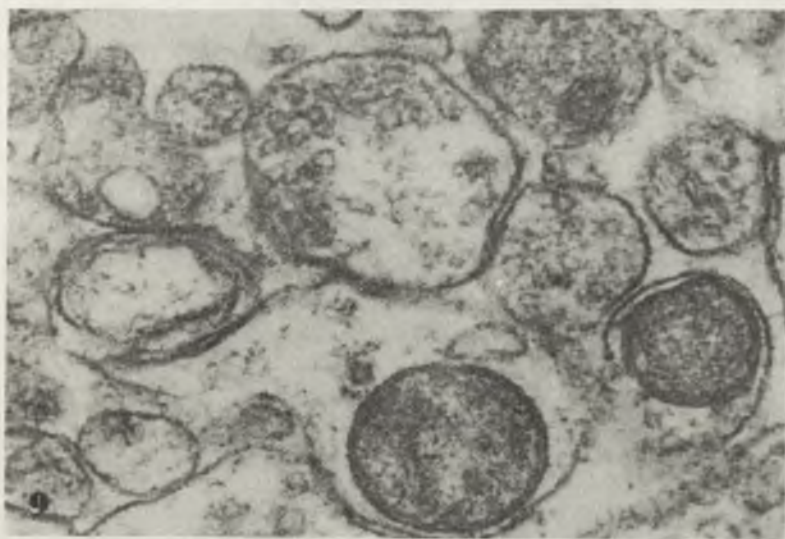


Ryc. 7. *Stratum pyramidale*. Kolbka synaptyczna. Forskolinozależna AC zlokalizowana w błonie synaptycznej oraz w pęcherzykach synaptycznych. Płyn inkubacyjny I (kobalt). Pow. 40000 ×

Fig. 7. *Stratum pyramidale*. Electron microscopic demonstration of synaptic cleft. Forscolin-stimulated AC activity is localized in the postsynaptic membranes and synaptic vesicles. Cobalt method. × 40000

Ryc. 8. *Stratum moleculare*. Inkubacja bez aktywatora (basal activity). Aktywność AC w postaci ziarnistości rozmieszczonych w cytoplazmie dyndrytów (strzałka). W obu błonach synapsy nie stwierdza się aktywności enzymatycznej. Płyn inkubacyjny I (kobalt). Pow. 60000 ×

Fig. 8. *Stratum moleculare*. Electron microscopic demonstration of basal activity of AC in the form of dark precipitations in the dendrite cytoplasm (arrow). Synaptic membranes are non reactive. Cobalt method. × 60000



Ryc. 9. *Stratum pyramidale*. Kontrola odczynu histochemicznego. Inkubacja bez substratu. Brak reakcji histochemicznej w strukturach neuropilu. Płyn inkubacyjny I (kobalt). Pow. 40000 ×

Fig. 9. *Stratum pyramidale*. Control of histochemical reaction. Incubation without substrate. No reaction products in the neuropil. Cobalt method. ×40000

noradrenalinozależnej AC prowadzi niekiedy do nagromadzenia ziarnistych złogów produktu końcowego reakcji w pęcherzykach synaptycznych (ryc. 5), zjawiska nie spotykanego przy aktywacji dopaminą. Nie można jednakże wykluczyć nieswoistości tego procesu, podobnie jak w przypadku odczynu ujawnianego niekiedy w zmienionych mitochondriach i lizosomach. Przy zastosowaniu noradrenaliny jako aktywatora enzymu nie stwierdzano wykładników jego aktywności w elementach strukturalnych ścian naczyń.

Forskolina, trzeci z zastosowanych stymulatorów AC, powoduje słabszą niż dopamina i noradrenalina aktywację odczynu histochemicznego. Przy użyciu soli obu metali ciężkich końcowy produkt reakcji enzymatycznej wiąże się ze strukturami błonowymi synaps (ryc. 6), głównie z błoną postsynaptyczną (ryc. 7), widoczny jest jednak również i w błonach presynaptycznych. Intensywność odczynu cytochemicznego przy zastosowaniu forskoliny w obszarze postsynaptycznym jest ogólnie słabsza niż przy zastosowaniu stymulacji tak dopaminą, jak i noradrenalina. Przy użyciu strontu w reakcji stymulowanej forskoliną, drobne ziarnistości produktu końcowego reakcji gromadzą się również w niektórych mitochondriach dendrytów zawartych w neuropilu. Elementy strukturalne ścian naczyń krwionośnych nie wykazują aktywności enzymatycznej.

W materiale tkankowym przygotowanym do badań mikroskopowo-elektronowych bez preinkubacji w którymkolwiek ze stosowanych stymulatorów AC, ukierunkowanym na ujawnienie jej tzw. aktywności podstawowej (basal activity) stwierdza się nagromadzenie elektronowo-gęstych ziarnistości produ-

ktu końcowego reakcji luźno rozsianych w cytoplazmie pojedynczych wypustek nerwowych (ryc. 8). Intensywność odczynu jest jednak znacznie słabsza niż w przypadku dopaminozależnej AC występującej w tej samej lokalizacji komórkowej. Aktywność podstawowa enzymu nie występuje natomiast w obszarze styków synaptycznych.

Swoistość odczynu histochemicznego potwierdzają obrazy wykazujące brak aktywności AC przy przeprowadzaniu reakcji bez swoistego substratu lub przy jego zastąpieniu β -glicerofosforanem (ryc. 9).

OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowana metoda cytochemicznego wykrywania aktywności synaptycznej AC pozwala na stosunkowo precyzyjną jej lokalizację w poszczególnych elementach strukturalnych odcinka CA₁ zakrętu hipokampa, wyróżniającego się szczególnym bogactwem połączeń synaptycznych i ich zróżnicowaniem strukturalnym, a także różnorodnością źródeł komórkowych. Na podkreślenie zasługują również odmienności czynnościowe, wyrażające się bogactwem układów neurotransmiterowych występujących w tym właśnie obszarze ośrodkowego układu nerwowego (Wieraszo, 1983).

Istotne trudności w interpretacji obrazów ultracytochemicznych związane są ze źle zachowaną strukturą tkanki, co stanowi następstwo skomplikowanej, długotrwałej i wieloetapowej obróbki materiału. Szczególnie istotnym etapem procedury histochemicznej jest stymulacja aktywności AC przez tkankowo swoiste hormony lub neurotransmitery (Kebabian i wsp. 1972; Schultze i wsp. 1977; Recharadt, Härkönen 1977; Panula, Recharadt 1979; Recharadt, Hervonen 1986). Jej niezbędność wynika przede wszystkim z faktu bardzo znacznego, nierzadko całkowitego hamowania aktywności enzymu przez substancje utrwalające oraz sole metali ciężkich, stosowane w preparatyce histochemicznej i mikroskopowo-elektronowej. Mechanizm stymulującego działania poszczególnych aktywatorów jest odmienny. Naturalnymi aktywatorami enzymu są zastosowane w naszych badaniach neurotransmitery dopamina i noradrenalina. Z wczesnych prac Sutherlanda i Ralla (1960) oraz Reika i współautorów (1970) wiadomo, iż przekaźniki te uwalniane z kolbki synaptycznej wnikają do szczeliny synaptycznej i wiążą się z receptorem położonym w błonie postsynaptycznej, którym jest właśnie AC, aktywująca proces tworzenia cyklicznego AMP/cAMP z wysokoenergetycznego ATP. Wyizolowany w 1981 r. przez Seamona i wsp. dwuterpen-forskolina oddziałuje bezpośrednio na kompleks enzymatyczny AC, złożony z podjednostki katalizującej i wiążącej nukleotydy guanylowy.

Porównanie obrazów histochemicznych uzyskanych przy zastosowaniu trzech aktywatorów aktywności mózgowej AC pozwoliło na ocenę ich wpływu na intensywność odczynu oraz jego rozmieszczenie w kolbkach synaptycznych, dendrytach, wypustkach osiowych i innych elementach neuropilu. Obrazy

uzyskiwane przy zastosowaniu poszczególnych aktywatorów różnią się między sobą, nie na tyle jednak, aby niemożliwe było określenie ich wspólnego wzorca. Ogólny histochemiczny obraz aktywności enzymu jest jednak wypadkową obrazów uzyskiwanych przy użyciu różnych aktywatorów. Na ich podstawie należy stwierdzić, iż aktywność AC w badanym odcinku zakrętu hipokampa jest ograniczona do wyżej wymienionych elementów strukturalnych neuropilu. Nie wykazano natomiast jej obecności w perykarionach komórek nerwowych, w komórkach glejowych ani też w śródbłonkach naczyń krwionośnych. Jedynie dopaminozależna AC wykazywała nieznaczną aktywność w błonach podstawnych i w mięśniówce stosunkowo nielicznych naczyń.

Nie wykazano różnic w intensywności ani w rozmieszczeniu aktywności AC w synapsach zlokalizowanych w różnych warstwach zakrętu hipokampa. Zasluguje to tym bardziej na uwagę, iż w poszczególnych warstwach sektora CA₁ rozmieszczone są synapsy pochodzące z odmiennych źródeł komórkowych i zawierające różne neuroprzekazniki (Andersen i wsp. 1963, 1966). Podobnie nie znalazły odzwierciedlenia w obrazie aktywności enzymu różnice w strukturze morfologicznej synaps. Jednakowe jego rozmieszczenie i identyczna intensywność dotyczyły synaps symetrycznych i asymetrycznych. Według do dziś akceptowanej koncepcji Graya (1969) synapsy symetryczne, określane mianem synaps typu I, odpowiadają synapsom pobudzającym, podczas gdy asymetryczne, zaliczane do typu II, stanowią synapsy hamujące. W tym kontekście uznać należy, iż czynnościowe zróżnicowanie synaps w sektorze CA₁ rogu Amona nie jest związane z odmiennościami histochemicznymi obrazu aktywności AC. Porównanie obrazów uzyskanych w naszych badaniach przy zastosowaniu wszystkich stymulatorów aktywności enzymu, ze spostrzeżeniami Rechardt i Härkönen (1977) oraz Panula i Rechardt (1979) może wskazywać, iż aktywność AC w mózgu chomika mongolskiego jest ogólnie słabsza niż w ośrodkowym układzie nerwowym szczurów. Podobne różnice międzygatunkowe stwierdzono już uprzednio, wykazując wyższą aktywność enzymu w sieci naczyniowej mózgu szczura niż myszy (Vorbrodt i wsp. 1984). Nie można wykluczyć, że różnice te wskazują na gatunkową swoistość enzymu.

Wykazana w naszych badaniach dopamino-, noradrenalino- i forskolinozależna AC związana była przede wszystkim z błonami postsynaptycznymi, a w mniejszym stopniu z błonami dendrytycznymi poza obszarami zespołów synaptycznych. Zgodne jest to z wcześniejszymi spostrzeżeniami innych autorów. Rechardt i Hervonen (1986) wykazali, że AC związana z neurotransmisją zlokalizowana jest postsynaptycznie. Greengard i wsp. (1972) stwierdzili, że aktywność AC występuje w synapsach zawierających receptory dopaminowe (w jądrze ogoniastym) i noradrenalinowe (w korze mózgu).

Mniej jednoznaczna, a interpretacyjnie trudniejsza jest sprawa presynaptycznej lokalizacji aktywności AC, spostrzeganej przez nas przy stymulacji enzymu zarówno dopaminą, jak i forskoliną. Analiza własnego materiału wskazuje, że występowała ona głównie wówczas, gdy dla uwidocznienia

końcowego produktu reakcji enzymatycznej stosowano jony strontu. Szereg autorów, w tym Lemay i Jarett (1975) oraz Schultze i wsp. (1977), kwestionowało zasadność używania soli ołowiu oraz strontu w histochemii AC ze względu na ich hamujące oddziaływanie na aktywność enzymu oraz możliwość związanej z tym jej nieswoistej lokalizacji. Większość autorów prowadzących histochemiczne badania nad aktywnością AC w ośrodkowym układzie nerwowym przy zastosowaniu soli strontu (Schultze i wsp. 1977; Vorbrodtt 1977; Cutler 1983), strontu i kobaltu (Recharadt, Härkönen 1977; Szumańska i wsp. 1984; Vorbrodtt i wsp. 1984) lub cezu (Recharadt, Hervonen 1985, 1986) zgadza się, iż nie ma uniwersalnej jednej metody dla ujawnienia bardzo obfitej zawartości enzymu w tkance nerwowej. Niezbędne jest dla celów porównawczych równoległe stosowanie kilku metod. Recharadt i Hervonen (1986) przypuszczają, iż presynaptyczna lokalizacja aktywności AC stwierdzana przez nich przy stymulacji enzymu przez toksynę cholery mogła być uwarunkowana zjawiskiem „feedback” receptorów neurotransmiterowych, bądź też czynnościowo modulowana przez kompleksy synaptyczne, zawierające zespolenia akso-aksonalne. Nie można wykluczyć takiej możliwości i w naszym materiale.

Na odrębną uwagę zasługuje stosunkowo duży odsetek nieaktywnych synaps, spostrzeganych w naszym materiale. Być może jest to zjawisko związane z ich stanem czynnościowym. Nie można jednakże wykluczyć hamującego wpływu soli metali ciężkich stosowanych w preparatyce histochemicznej.

Podstawowa aktywność (basal activity) AC w naszym materiale związana była wyłącznie z wypustkami dendrytycznymi i nie występowała w miejscach styków synaptycznych. Podobnie Panula i Recharadt (1979) wykazali, iż w neostriatum szczurów niestymulowana aktywność AC występowała w dendrytach bez związku z zakończeniami synaptycznymi.

Czynnikiem obniżającym w sposób istotny jakość obrazów morfologicznych w przedstawionym przez nas materiale było stosowanie perfuzji roztworem K – R – G, mającej na celu wypłukanie krwi z łożyska naczyniowego mózgu. Wykonywanie tego zabiegu, zalecanego przez Recharadt (1988) uwarunkowane jest tym, iż wysoka aktywność endogennej peroksydazy zawartej w morfotycznych elementach krwi silnie hamuje aktywność synaptycznej AC. Ograniczenie zastosowania katalazy (wybiórczego inhibitora endogennej peroksydazy) zastąpiono perfuzją układu naczyniowego, traktowaną jako *sui generis* kontrola swoistości odczynu histochemicznego. Porównanie obrazów uzyskiwanych z materiału zwierząt perfundowanych i dekapitowanych, nie wykazywało jednakże uchwytnych różnic w intensywności i rozmieszczeniu reakcji.

Pomimo przedstawionych powyżej ograniczeń metodycznych i interpretacyjnych wydaje się, iż badanie aktywności AC w odcinku CA₁ zakrętu hipokampa w warunkach niedokrwienia, będzie mogło stanowić istotny element w ocenie mechanizmów patogenetycznych wybiórczego uszkodzenia komórek nerwowych w tej strukturze mózgu.

ULTRASTRUCTURAL STUDIES ON ADENYLATE CYCLASE (AC) ACTIVITY
IN THE CA₁ SECTOR OF AMMON'S HORN IN MONGOLIAN GERBIL

Summary

Adenylate cyclase activity, stimulated by dopamine, norepinephrine and forskolin, was demonstrated histochemically in electron microscopy of the CA₁ sector of Ammon's horn in Mongolian gerbil. Cobalt and stront were used as precipitating agents. The reaction product located in the synapses was mostly associated with the postsynaptic membranes. It was also present in the plasma membrane of some nerve fibers. There were no differences in the enzyme activity in particular layers of Ammon's horn as well as between symmetric and asymmetric types of synapses. The intensity of the reaction product depended mostly on the stimulator used.

PIŚMIENNICTWO

1. Andersen A., Blachstad B., Lömo T.: Location and identification of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. *Exp Brain Res*, 1966, 1, 236–248.
2. Andersen A., Eccles J. C., Löyning Y.: Recurrent inhibition in the hippocampus with identification of the inhibitory cell and its synapses. *Nature*, 1963, 198, 540–542.
3. Cutler L. S., Cristian C. P.: Cytochemical localization of adenylate cyclase. *J Histochem Cytochem*, 1980, 28, 62–65.
4. Cutler L. S.: Cytochemical methods for the localization of adenylate cyclase. *J Histochem Cytochem*, 1983, 31, 85–93.
5. De Robertis E., Arnair G. R. D. L., Alberici M., Butcher R. W., Sutherland E. W.: Subcellular distribution of adenyl cyclase and cyclic phosphodiesterase in rat brain cortex. *J Biol Chem*, 1967, 242, 3487–3493.
6. Gajkowska B., Gadamski R., Wawrzyniak E.: Wpływ krótkotrwałego niedokrwienia na zmiany w ultrastrukturze zakrętu hipokampa u chomików mongolskich. Część I. Ultrastrukturalna charakterystyka odcinka CA₁ rogu Amona ze szczególnym uwzględnieniem obrazu połączeń synaptycznych. *Neuropat Pol*, 1988, 26, 455–476.
7. Gajkowska B., Gadamski R., Mossakowski M. J.: Wpływ krótkotrwałego niedokrwienia na ultrastrukturę zakrętu hipokampa u chomika mongolskiego. II. Rola synaps w regulacji poniedokrwienionych procesów patologicznych. *Neuropat Pol*, 1989, 27, 339–366.
8. Gray E. G.: Electron microscopy of excitatory and inhibitory synapses. A brief review. W: *Mechanism of synaptic transmission*. Red.: K. Akert, P. G. Wasser. *Progr Brain Res*, Elsevier, Amsterdam, 1969, 31, 141–172.
9. Greengard P., McAfee D. A., Keibian J. W.: On the mechanism of action of cyclic AMP and its role in synaptic transmission. W: *Advances in cyclic nucleotide research*. Red.: P. Greengard, G. A. Robinson Raven Press, New York, 1972, vol. 1, pp 355–373.
10. Huang M., Shimizu J., Daly J.: Regulation of adenosine cyclic 3-, 5-phosphate formation in cerebral cortical slices. *Mol Pharmacol*, 1971, 7, 155–162.
11. Hoowell S. L., Whitfield M.: Cytochemical localization of adenylate cyclase activity in rat islets of Langergans. *J Histochem Cytochem*, 1972, 20, 873–879.
12. Keibian J. W., Petzold G. L., Greengard P.: Dopamine – sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the “dopamine receptor”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69, 2145–2149.
13. Kirino T.: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*, 1982, 239, 57–69.
14. Kirino T., Tamura A., Sano K.: Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1984, 64, 139–147.
15. Lemay A., Jarett L.: Pitfalls in the use of lead nitrate for the histochemical demonstration of adenylate cyclase activity. *J Cell Biol*, 1975, 65, 39–50.

16. Madison D. V., Nicoll R. A.: Norepinephrine decreases synaptic inhibition in the rat hippocampus. *Brain*, 1988, 442, 131–138.
17. Mossakowski M. J., Gajkowska B., Tsitsishvili A.: Ultrastructure of neurons from the CA₁ sector of Ammon's horn in short-term cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Neuropat Pol*, 1989, 27, 39–53.
18. Panula P., Rechart L.: Ultrastructural demonstration of adenylate cyclase activity in the rat neostriatum. *Neurosciences*, 1979, 4, 779–788.
19. Panula P.: Light and electron microscopical and histochemical study on the rat neostriatum *in vivo* and *in vitro*. Academic dissertation, Medical Faculty of the University of Helsinki, 1980.
20. Pulsinelli W. A.: Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res*, 1985, 63, 29–37.
21. Rechart L., Härkönen M.: Electron microscopical demonstration of adenylate cyclase activity in nervous tissue. *Histochemistry*, 1977, 51, 113–119.
22. Rechart L., Hervonen L.: Cytochemical demonstration of adenylate cyclase activity with cesium. *Histochemistry*, 1985, 82, 501–505.
23. Rechart L., Hervonen H.: Histochemical localization of adenylate cyclase in nervous tissue. W: *Neurohistochemistry: Modern methods and applications*, Alan R Liss Inc, 1986, 443–452.
24. Rechart L.: 1988 – konsultacja.
25. Reik L., Petzold G. L., Higgins J. A., Greengard P., Barnett R. J.: Hormone sensitive adenyl cyclase: cytochemical localization in the rat liver. *Science*, 1970, 168, 382–384.
26. Schultze W., Hinterberg W., Krause E. G., Janiszewski S.: Problems of the cytochemical demonstration of adenylate cyclase. *Acta Histochem Cytochem*, 1977, 10, 371–378.
27. Seamon K. B., Padgett W., Daly J. W.: Forskoline: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78, 3363.
28. Sutherland E. W., Rall T. W.: Relation of adenosine-3'-5'-phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. *Pharmacol Rev*, 1960, 12, 265.
29. Suzuki R., Yamaguchi T., Inaba V., Wagner H. G.: Microphysiology of selectively vulnerable neurons. *Prog Brain Res*, 1985, 63, 59–68.
30. Szumańska G., Palkama A., Lehtosalo J. I., Uusitalo H.: Adenylate cyclase in the microvessels of the rat brain. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1984, 62, 219–224.
31. Szumańska G., Mossakowski M. J.: Aktywność cyklazy adenylowej i fosfatazy zasadowej w naczyniach mózgu szczura w doświadczalnym zatruciu chlorkiem manganowym. *Neuropat Pol*, 1985, 23, 297–314.
32. Szumańska G., Mossakowski M. J., Januszewski S.: Zmiany aktywności fosfatazy zasadowej i cyklazy adenylowej w sieci naczyniowej mózgu w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Neuropat Pol*, 1988, 26, 335.
33. Von Hungen K., Roberts S., Hill D. F.: Development and regional variations in neurotransmitter sensitive adenylate cyclase system in cell-free preparations from rat brain. *J Neurochem*, 1974, 22, 811–819.
34. Vorbrodt A., Szumańska G., Dobrogowska D. H.: Cytochemical studies of adenylate cyclase in the choroid plexus and brain vessels of rat and mouse. *J Histochem Cytochem*, 1984, 32, 275–284.
35. Vorbrodt A., Knowiński M., Solter D., Koprowski H.: Ultrastructural cytochemistry of membrane-bound phosphatases in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol*, 1977, 55, 117–134.
36. Wieraszkowski A.: Biochemiczne przejawy plastyczności synaps ze szczególnym uwzględnieniem roli kwasu glutaminowego jako domniemanego neurotransmitera niektórych szlaków hipokampalnych. Praca habilitacyjna. Biblioteka Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, Warszawa 1983, s. 4–12.

Adres autorów: Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa