

ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ХОЛИНАЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗ В ЯДРАХ ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА КРЫС

© А. Е. Коцюба, В. М. Черток¹

Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток;

¹ *электронный адрес: chertokv@mail.ru*

Гистохимическим и иммуногистохимическим методами у крыс линии Вистар исследовали нейроны, содержащие холинацетилтрансферазу (ХАТ), в ядрах продолговатого мозга. Установлено, что топография и численность холинергических нейронов, находящихся в проекции изученных ядер, в значительной степени зависят от метода выявления этих нейронов. Гистохимическим методом всегда выявляется больше нейронов, чем иммуногистохимическим. Эта особенность выявления ХАТ-позитивных нейронов отчетливо прослеживается среди большинства ядер медиальной и некоторых ядер латеральной области продолговатого мозга. Количество иммунореактивных клеток в ядрах колеблется от 17 до 26 %, тогда как при гистохимической реакции в тех же самых ядрах определяется в 1.5—3 раза больше нейронов. В ядрах задней группы шва ХАТ-позитивные клетки выявляются преимущественно гистохимическим методом.

Ключевые слова: холинергические нейроны, ядра продолговатого мозга.

Принятые сокращения: АХЭ — ацетилхолинэстераза, ХАТ — холинацетилтрансфераза.

Участие ацетилхолина в важнейших механизмах функционирования нервной системы до сих пор обеспечивает устойчивое внимание исследователей к структурам, участвующим в обмене этого нейромедиатора (Karczmar, 2007; Мотавкин, Черток, 2008; Calka et al., 2008; Moeller, Meredith, 2010; Мотавкин, Дюйзен, 2011). В продолговатом мозге обнаружена высокая концентрация ацетилхолина и большое количество клеток с холинергическим типом медиации. В обмен ацетилхолина вовлечены многие ядра ретикулярной формации, моторного соматического и общего висцерального столбов, небольшое количество клеток чувствительных и ассоциативных ядер (Мотавкин, Охотин, 1983; Levey et al., 1983; Satoh et al., 1983; Mizukawa et al., 1986; Motts et al., 2008; Черток, Коцюба, 2013).

В последние годы в литературе активно обсуждается вопрос о значении ацетилхолина в трансмиссии нового класса сигнальных молекул, так называемых газообразных посредников, к которым относят оксид азота (NO), сероводород и монооксид углерода. В центральной нервной системе NO не является самостоятельным нейротрансмиттером, а вырабатывается под влиянием других медиаторов. В стволе мозга он синтезируется в нейронах, аккумулирующих ацетилхолин (Karczmar, 2007; Giraldez-Perez et al., 2009), в коре конечного мозга — в некоторых ГАМК-ергических нейронах (Valtschanoff et al., 1993). Механизм влияния этих веществ на синтез NO во многом сходен: выделяясь при прохождении нервного импульса, нейромедиаторы оказывают воздействие на ионы кальция, которые, поступая в клетку, связываются в цитозоле в единый комплекс с кальмодулином. Комплекс Ca^{2+} —кальмодулин выступает как кофактор, активирую-

щий нитроксидсинтазу — фермент, регулирующий синтез NO.

В настоящее время распределение нейронов, участвующих в обмене газообразных посредников в структурах продолговатого мозга, изучено довольно подробно (Бабич и др., 2009; Коцюба, Черток, 2010, 2012; Черток и др., 2011, 2012). Однако для выяснения роли холинореактивных структур в этом процессе необходимо иметь детальную информацию о топографии и количестве холинергических нейронов в соответствующих центрах мозга. Идентификация холинергических нейронов в структурах мозга одно время проводилась с помощью гистохимического метода выявления ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Но фермент, расщепляющий ацетилхолин, наряду с холинергическими нейронами присутствует в других заведомо нехолинергических клетках, например, в норадренергических нейронах, находящихся в симпатических ганглиях, а иногда и вне нервных структур (Smith, Cucllo, 1984; Mizukawa et al., 1986). Более точная информация о холинергических нейронах получена с помощью гистохимического метода выявления холинацетилтрансферазы (ХАТ), которая в отличие от АХЭ локализована в одних структурах с медиатором — в синаптических пузырьках, где она связана с мембранами (Sha et al., 2004). В начале 60-х годов прошлого века предложен гистохимический метод выявления ХАТ (Burt, 1970). После основательного усовершенствования он стал широко использоваться для подтверждения холинергической функции нейронов.

Несмотря на большое количество работ, опубликованных по распределению холинергических нейронов в различных отделах мозга, количественные исследования этих клеток единичны и крайне противоречивы. Так, под-

счеты, проведенные Бурт и Силвер (Burt, Silver, 1973), показали, что подавляющее число ядер ствола мозга содержит от 18 до 30 % ХАТ-позитивных нейронов. Вместе с тем Мотавкин и Охотин (1983), используя тот же самый метод выявления фермента, нашли в них в 2—3 раза больше холинергических клеток. Большие надежды в этом плане связывали с изучением ХАТ иммуногистохимическим методом. Однако и в этом случае, несмотря на одинаковые методы выявления и подсчета холинергических нейронов, использованные авторами в своих работах, результаты количественных исследований этих клеток в одних и тех же ядрах мозга существенно различались (Vincent, Reiner, 1987; Holmes et al., 1994; Черток, Коцюба, 2013).

В настоящей работе представлены результаты сравнительного анализа гистохимического и иммуногистохимического изучения локализации и количественного распределения ХАТ-позитивных нейронов в одноименных ядрах.

Материал и методика

Работа выполнена на материале 12 крыс линии Вистар массой 200—250 г, содержащихся в условиях лабораторного вивария на стандартном рационе. Образцы продолговатого мозга фиксировали в течение 4 ч в 4%-ном растворе параформальдегида, приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4), при 4 °С. Далее препараты промывали в 0.1 М фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7.4) в течение 24 ч. Фиксированный материал пропитывали в холодном 30%-ном растворе сахарозы на 0.1 М фосфатном буфере и готовили криостатные срезы толщиной 30 мкм. Из продолговатого мозга делали срезы с двух уровней, позволяющих наиболее полно изучать холинергические нейроны в исследуемых ядрах. Изучали ядро солитарного тракта, дорсальное ядро блуждающего нерва, двойное ядро, а также ретикулярные ядра — латеральное, гигантоклеточное, парагигантоклеточное, мелкоклеточное и парацентрального, а также ядра шва задней группы — крупное, бледное и темное.

Для гистохимического исследования ХАТ срезы обрабатывали по описанному методу (Burt, 1970). Для ингибирования неспецифической реакции в инкубационную среду добавляли диизопропилфторофосфат ($1 \cdot 10^{-3}$ М), подавляющего, за исключением ХАТ, активность остальных ферментов, гидролизующих ацетил-КоА (Burt, Silver, 1973). Инкубацию проводили в термостате при 37 °С в течение 2 ч, после чего срезы промывали дистиллированной водой и обрабатывали 5%-ным сульфидом аммония.

Имуногистохимическое выявление ХАТ проводили в соответствии с известным протоколом (Vincent, Reiner, 1987). Для этого срезы последовательно инкубировали с поликлональными антителами кролика против ХАТ (Cayman, США), разведенными в соотношении 1 : 1000, в фосфатном буфере, содержащем 0.03—0.1 % детергента Тритона X-100 и 3 %-ную нормальную сыворотку козы. После промывки свободно плавающие срезы инкубировали в течение 1 ч в растворе биотинилированных вторых козьих антител против иммуноглобулина кролика при разведении 1 : 100 (Vector Labs, США), а затем в растворе авидин-пероксидазного комплекса (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Labs, США). Обработку заканчивали выявлением пероксидазы с помощью 0.03%-ного раствора диа-

минобензидина (DAB Substrate Kit for Peroxidase Vector Labs, США) и 0.01 % перекиси водорода в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4), после чего срезы отмывали в фосфатном буфере и монтировали на предметные стекла. Для оценки специфичности иммуногистохимической реакции использовали метод негативного контроля. Для этого срезы мозга инкубировали с 1 %-ной неиммунной сывороткой вместо первых антител. Во всех контрольных образцах иммунопозитивная реакция отсутствовала.

После тщательного отмывания в фосфатном буфере срезы обезжизняли в спиртах и заключали в полистирол. Нейроны каждого ядра исследовали в серии из 10—12 последовательных срезов, один из которых окрашивали 0.5%-ным раствором метиленового синего, следующие два обрабатывали для гистохимического и иммуногистохимического выявления ХАТ-позитивных нейронов. Каждое ядро ориентировали по характерным признакам в сагиттальной и фронтальной плоскостях, после чего его контуры воспроизводили на экране монитора в соответствии с положением ядер относительно координат сетки.

При гисто- и иммуногистохимических исследованиях в проекции среза каждого ядра определяли среднее количество ХАТ-позитивных нейронов в проекции среза и долю, которые они составляют от общего числа нейронов, выявленных в соответствующих ядрах метиленовым синим. Кроме того, в проекции каждого ядра высчитывали среднюю площадь профильного поля клеток (мкм²) и относительную плотность (концентрацию) энзим-позитивных клеток из расчета на 0.01 мм³. Все нейроны делили на три размерные группы: малые (50—250 мкм²), средние (251—680 мкм²) и крупные (свыше 681 мкм²). Количественную обработку результатов проводили с использованием компьютерных программ автоматизированной системы анализа изображений Allegro MC (Афанасьев и др., 2002). Количественные данные представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего, полученных при обработке не менее 12 срезов каждого отдела мозга. Для оценки значимости цифровых данных применяли *t*-критерий Стьюдента. Значения считали статистически достоверными при $P < 0.05$.

Результаты

ХАТ-позитивные нейроны определяются во всех изученных ядрах. Клетки различаются между собой формой, размерами и интенсивностью реакции (рис. 1, *a—z*). Большая часть нейронов имеет треугольную или трапециевидную форму и площадь 400—700 мкм². Реже наблюдаются клетки овальной и веретеновидной формы, площадь которых колеблется от 60 до 500 мкм². В отдельных ядрах (гигантоклеточное и парагигантоклеточное) или между ними встречается небольшое количество (около 1 % от общего числа холинергических нейронов) гигантских пирамидных нейронов площадью до 2—2.5 тыс. мкм².

При сопоставлении количественных данных, полученных при измерении клеток, окрашенных метиленовым синим, и ХАТ-позитивных нейронов, отчетливо прослеживается избирательное выявление холинергических нейронов определенных размерных групп (рис. 2). Подсчеты показывают, что при обработке препаратов метиленовым синим самую многочисленную группу во всех ядрах составляют мелкие клетки, на долю которых прихо-

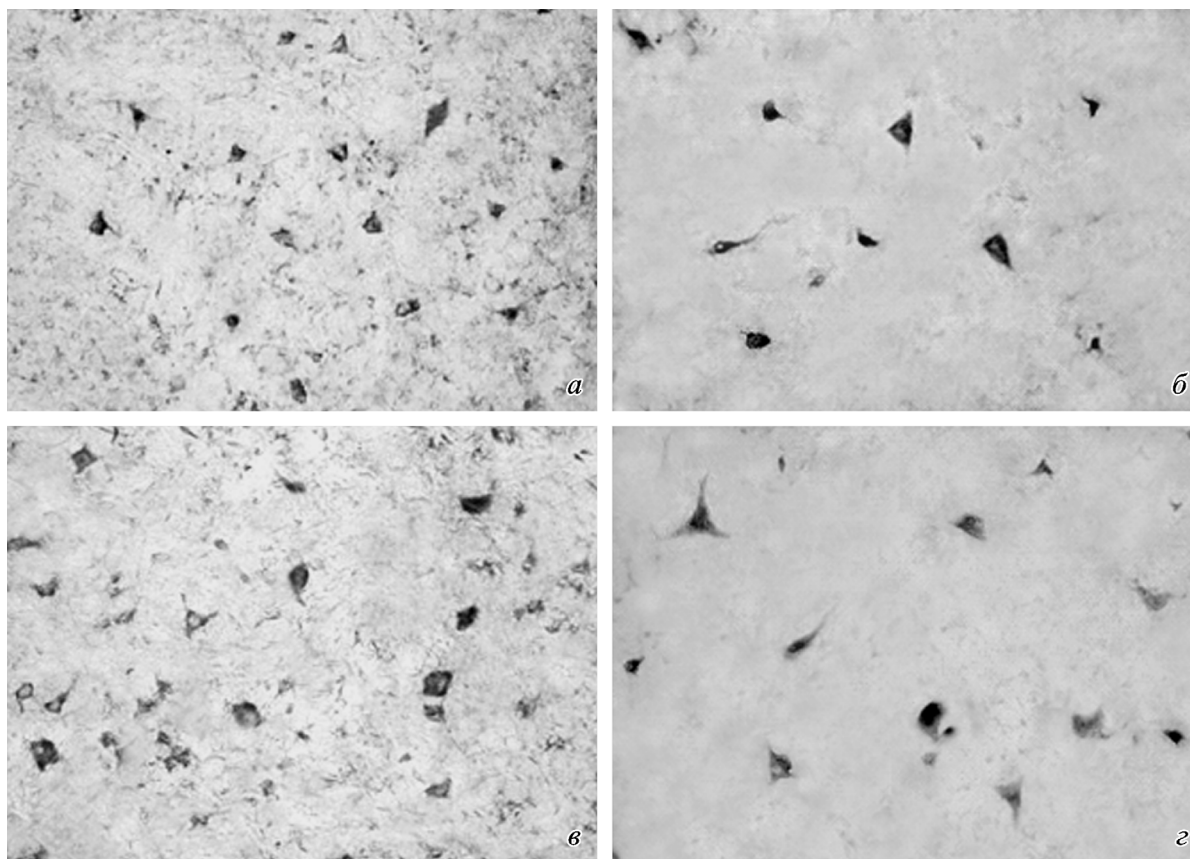


Рис. 1. Холинергические нейроны, различающиеся формой, размерами, плотностью расположения, интенсивностью реакции в ядре одиночного тракта (а, б) и гигантоклеточном ретикулярном ядре (в, г).

а, в — гистохимический метод (Burt, 1970); б, г — иммуногистохимический метод выявления ХАТ. Об. 20х.

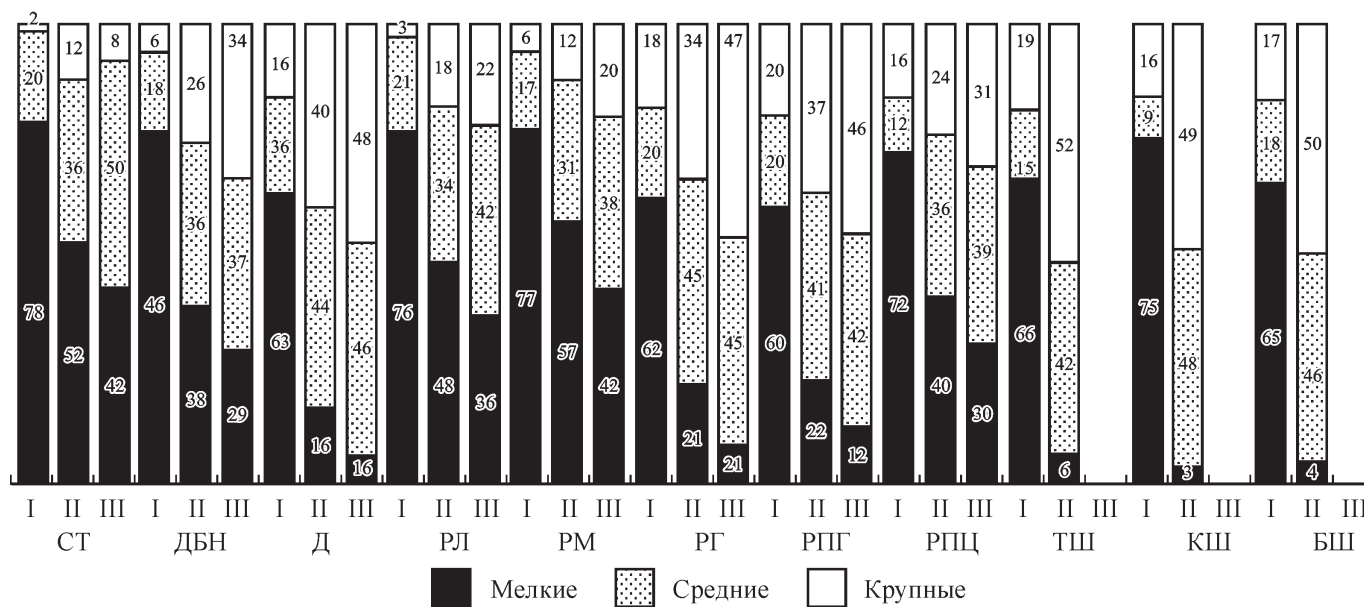


Рис. 2. Количественное соотношение (%) мелких, средних и крупных нейронов в ядрах продолговатого мозга при окрашивании клеток метиленовым синим (I), а также при гистохимическом (II) и иммуногистохимическом (III) выявлении ХАТ-позитивных нейронов.

Ядра: СТ — солитарного тракта, ДБН — дорсальное блуждающего нерва, Д — двойное, РЛ — ретикулярное латеральное, РМ — ретикулярное мелко-клеточное, РГ — ретикулярное гигантоклеточное, РПГ — ретикулярное парагигантоклеточное, РПЦ — ретикулярное парацентральное, ТШ — темное шва задней группы, КШ — крупное шва задней группы, БШ — бледное шва задней группы.

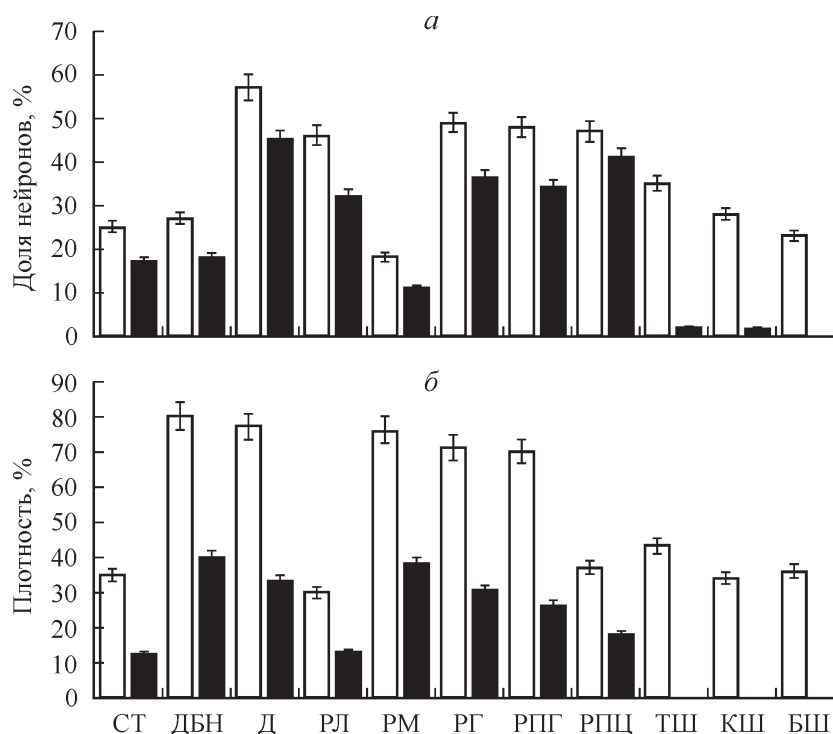


Рис. 3. Сравнительная характеристика ХАТ-положительных нейронов, выявленных гистохимическим (светлые столбцы) и иммуногистохимическим (черные столбцы) методами, в ядрах продолговатого мозга.

а — доля холинергических нейронов; б — относительная плотность нейронов. За 100 % принята величина показателя в одноименных ядрах при окрашке препаратов метиленовым синим. Обозначения ядер те же, что и на рис. 2.

дится 65—78 % общего количества нейронов. Средних по величине клеток в 2.5—3 раза меньше. Наиболее вариabельную группу составляют крупные нейроны: их число в исследованных ядрах колеблется от 2—3 % (ретикулярные мелкоклеточное и латеральное ядра) до 16—20 % (двойное ядро, ретикулярные гигантоклеточное, парацентральное и парагигантоклеточное ядра). Выраженные различия между содержанием ХАТ-положительных нейронов и окрашенных метиленовым синим определяется в тех ядрах, в которых при выявлении клеток метиленовым синим особенно велика доля мелких клеток. В ядрах, располагающих большим количеством средних и крупных нейронов (двойное ядро, гигантоклеточное и парагигантоклеточное ядра), указанные различия не столь велики. Однако это правило соблюдается не всегда. Некоторые ядра (ядро одиночного пути, дорсальное ядро блуждающего нерва и мелкоклеточное ядро), в которых при окрашке препаратов метиленовым синим определяется достаточно обширная группа небольших по размеру клеток, включают в себя и мелкие ХАТ-положительные нейроны. В то же время в ядрах шва подавляющая часть нейронов, в том числе средних и крупных, демонстрирует или чрезвычайно низкую интенсивность реакции на ХАТ, или полное отсутствие таковой.

При сопоставлении данных, полученных при гистохимическом и иммуногистохимическом исследовании одноименных ядер, установлены существенные различия в процентном соотношении мелких, средних и крупных клеток (рис. 2). Иммуногистохимический метод позволяет выявить преимущественно средние и крупные нейроны, при гистохимической обработке препаратов, кроме того, определяется более или менее многочисленная группа мелких ХАТ-положительных клеток. Однако в обоих

случаях преобладают холинергические нейроны средних и крупных размеров. Доля крупных нейронов всегда выше в ядрах медиального поля (гигантоклеточное, парагигантоклеточное и парацентральное). Но больше всего таких клеток в двойном ядре. В ядрах, известных своими сенсорными или ассоциативными функциями (ядро одиночного пути, ретикулярные латеральное и мелкоклеточное ядра), крупные холинергические нейроны встречаются в 3—4 раза реже.

Количество холинергических клеток напрямую не связано с численностью нейронов, маркированных метиленовым синим. Например, из 684 нейронов, которые выявляются этим красителем в проекции ядра одиночного пути, лишь 116 (17 %) являются иммунопозитивными. В ретикулярном мелкоклеточном ядре из 695 определяется 76 (11 %) таких клеток. В ретикулярном гигантоклеточном ядре на их долю приходится около 36 % (из 325 клеток, окрашенных метиленовым синим, наличие ХАТ иммуногистохимическим методом подтверждено в 118). Но во всех случаях наибольшее количество ХАТ-положительных нейронов установлено в ядрах медиальной зоны (рис. 3, а). В латеральной зоне продолговатого мозга таких клеток в 2.5—3 раза меньше.

При этом гистохимическим методом всегда выявляется больше холинергических нейронов, чем иммуногистохимическим. Эта зависимость прослеживается среди большинства медиальных и в меньшей степени латеральных ядер продолговатого мозга, но особенно отчетливо среди ядер шва. В двойном ядре, гигантоклеточном, парацентральном и парагигантоклеточном ядрах различия величины этого показателя достигают 12—14 %, в других ядрах (ядро солитарного тракта, мелкоклеточное и латеральное) не превышают 8 %. В ядрах шва гистохимиче-

ским методом выявляется 23—35 % холинергических нейронов, иммуногистохимическим — от 0 до 2 % (рис. 3, а).

Результаты сравнительного изучения относительной плотности нейронов в исследованных ядрах представлены на рис. 3, б. В некоторых ядрах, в которых нами установлены высокие цифры абсолютной численности ХАТ-позитивных нейронов, выше и значения их относительной плотности (рис. 3, а, б). В одноименных ядрах концентрация клеток при иммуногистохимическом исследовании в 1.5—3 раза ниже, чем при использовании гистохимического метода. Однако это наблюдается не всегда, ввиду того что величина относительной плотности зависит не только от количества нейронов, но и их размеров. Ядра, включающие в себя примерно равное абсолютное количество клеток, но в которых тем или другим методом чаще выявляются более крупные нейроны (двойное ядро, гигантоклеточное, парацентрально-парагигантоклеточное ядро), имеют значения относительной плотности ниже, чем структуры с более многочисленной группой мелких клеток (дорсальное ядро блуждающего нерва, ретикулярное мелкоклеточное ядро). Тем не менее в ретикулярном латеральном ядре небольшие размеры большинства нейронов не компенсируют их ограниченного количества: концентрация клеток в нем наименьшая. Между остальными ядрами различия величины показателя не столь существенны и в большинстве случаев не превышают стандартной ошибки средней.

Обсуждение

В настоящее время накоплен большой объем информации по ХАТ-позитивным нейронам мозга, полученный гистохимическим методом. Однако в связи с тем, что в последние годы для изучения ХАТ все чаще используется иммуногистохимический метод, появилась необходимость сопоставить данные по локализации и количественному распределению нейронов, выявленных каждым из указанных методов, в одноименных ядрах мозга. Представленные выше материалы, а также данные, полученные из литературных источников (Мотавкин, Охотин, 1983; Vincent, Reiner, 1987; Holmes et al., 1994; Мотавкин, Дюйзен, 2011), свидетельствуют о том, что холинергические нейроны в ядрах ствола мозга распределены крайне неравномерно. Но во всех случаях гистохимическим методом выявляется в 1.5—3 раза больше нейронов, чем иммуногистохимическим. При этом основное количество иммунопозитивных нейронов представлено средними и крупными клетками, тогда как гистохимическим методом в ядрах продолговатого мозга выявляется достаточно многочисленная группа мелких нейронов. Аналогичные результаты получены и другими авторами (Calka et al., 2008) при изучении холинергических нейронов спинного мозга морской свинки на параллельных срезах, обработанных отдельно для гистохимического и иммуногистохимического исследования ХАТ: многие нейроны небольшого размера, которые постоянно выявлялись гистохимическим методом, оказались иммунонегативными. Как показали наши исследования, указанная особенность выявления ХАТ-позитивных нейронов прослеживается и среди ядер продолговатого мозга крысы.

Высказывается предположение о том, что число клеток, содержащих ХАТ, находится в прямой зависимости от общего количества крупных нейронов, которые выяв-

ляются в ядрах метиленовым синим (Мотавкин, Охотин, 1983; Holmes et al., 1994). Полученные нами данные также показывают, что в ядрах медиальной зоны, где велика доля крупных клеток, ХАТ-позитивные нейроны встречаются чаще, чем в ядрах с низким содержанием таких клеток. Согласно данным из литературы (Holmes et al., 1994), из 9080 иммунопозитивных клеток ретикулярной формации продолговатого мозга более 90 % сосредоточено в ее крупноклеточной части. В то же время по расчетам Райгородской (1971), в гигантоклеточном ядре только треть нейронов большого размера является холинергическими (из 67 клеток 23). В ретикулярном вентральном ядре эти цифры еще ниже: из 125 крупных нейронов лишь 11 обладают ферментативной активностью. Около 380 таких нейронов находится в крупноклеточной части парамедианной области (Holmes et al., 1994).

При иммуногистохимическом исследовании задних ядер шва большая часть нейронов, в том числе и крупных, демонстрирует или чрезвычайно низкую интенсивность реакции, или ее полное отсутствие, хотя гистохимическим методом в тех же ядрах определяется около трети нейронов с положительной реакцией на ХАТ. Не выявили иммунореактивных клеток в ядрах шва и ряд других авторов (Satoh et al., 1983; Holmes et al., 1994; Motts et al., 2008; Черток, Коцюба, 2013), тогда как при гистохимическом исследовании в них постоянно находятся объемные скопления нейронов, обладающих активностью ХАТ и АХЭ (Мотавкин, Охотин, 1983; Satoh et al., 1983; Mizukawa et al., 1986). В дорсальном ядре блуждающего нерва встречается не так много клеток большого размера, но ХАТ-позитивные нейроны встречаются в нем чаще, чем, например, в ретикулярном околоцентральной ядре, в котором крупных клеток в несколько раз больше. Выявленные различия в количестве клеток, связанные с методом их визуализации, прослеживаются и среди некоторых других ядер, включающих в себя относительно много мелких ХАТ-позитивных клеток (ядро солитарного тракта и ретикулярное мелкоклеточное ядро).

Для идентификации холинергических нейронов иммуногистохимический метод имеет несомненное преимущество перед гистохимическим. Его специфичность доказана многочисленными работами и сомнений не вызывает. Вместе с тем число клеток, выявленных гистохимическим методом, зависит от ряда факторов, которые следует учитывать при оценке полученных материалов. К ним относятся: 1) колебания в соотношении между выявляемой связанной формой ХАТ и не выявляемым растворимым ферментом; 2) меняющиеся соотношения между различными изоэнзимами ХАТ, обладающими разной способностью связываться с субстратом нейрона; 3) неодинаковая активность ингибируемых гидролаз и т. д. (Burt, 1970; Burt, Silver, 1973). И хотя при параллельном применении обоих методов часто наблюдается пропорциональность изменений численности клеток в исследованных ядрах, приведенные выше факты заставляют с известной осторожностью относиться к опубликованным ранее результатам количественного изучения ХАТ-позитивных нейронов гистохимическим методом.

Мы затрудняемся объяснить, почему в одних ядрах различия, связанные с методом идентификации холинергических нейронов, выражены в большей степени, чем в других. Вполне вероятно, что это связано с тем, что гистохимическим методом определяются различные типы нейронов (холинергические-холиноцептивные и нехоли-

нергические-холиноцептивные, холинергические-нехолиноцептивные), процентное соотношение которых зависит от конкретного ядра (Мотавкин, Черток, 2008; Мотавкин, Дюйзен, 2011), тогда как иммуногистохимическим методом можно выявить только холинергические-холиноцептивные нейроны.

При сопоставлении материалов, представленных в настоящей работе, с опубликованными ранее данными о локализации и количестве нейронов, обладающих активностью NADPH-диафоразы (Бабиц и др., 2009; Черток и др., 2010; Коцюба, Черток, 2012), нельзя не отметить много общего в распределении клеток, участвующих в обмене двух разных нейротрансмиттеров в одноименных ядрах продолговатого мозга. Тесные структурные отношения, существующие между холин- и нитроксидагическими нейронами в ядрах ствола мозга, являются дополнительным аргументом в пользу предположения о взаимном влиянии двух типов нейронов друг на друга.

Список литературы

- Афанасьев А. А., Коцюба А. Е., Черток В. М. 2002. Система для автоматизированного анализа изображений микро- и макроструктур ALLEGRO-МС. Тихоокеанский мед. журн. 10 (3) : 65—68.
- Бабиц Е. В., Черток В. М., Коцюба А. Е. 2009. Нитроксидагические нейроны в ядрах продолговатого мозга у нормо- и гипертензивных крыс Бюл. эксперим. биол. мед. 147 (8) : 157—160.
- Коцюба А. Е., Черток В. М. 2010. Пространственная организация серотонинергических и нитроксидагических нейронов в некоторых ядрах бульбарного отдела сердечнососудистого центра человека. Тихоокеанский мед. журн. 42 (4) : 43—46.
- Коцюба А. Е., Черток В. М. 2012. Иммуногистохимическое исследование H_2S -позитивных нейронов в некоторых структурах мозга человека при артериальной гипертензии. Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 1 : 54—59.
- Мотавкин П. А., Дюйзен И. В. 2011. Ствол головного мозга. В кн.: Руководство по гистологии. СПб.: Специальная лит-ра. 1 : 572—584.
- Мотавкин П. А., Охотин В. Е. 1983. Холинергические нейроны ядерных образований продолговатого мозга человека. Арх. анат. гистол. эмбриол. 84 (1) : 24—31.
- Мотавкин П. А., Черток В. М. 2008. Иннервация мозга. Тихоокеанский мед. журн. 33 (3) : 11—24.
- Райгородская Т. Г. 1970. Активность ацетилхолинэстеразы в каудальных отделах продолговатого мозга. Бюл. эксперим. биол. мед. 153 (6) : 102—106.
- Черток В. М., Коцюба А. Е. 2013. Морфофункциональная организация бульбарного отдела сердечно-сосудистого центра. Владивосток: Медицина ДВ. 164 с.
- Черток В. М., Коцюба А. Е., Коцюба Е. П. 2011. Цистатионин β -синтаза в структурных элементах головного и спинного мозга человека. Цитология. 53 (8) : 664—669.
- Черток В. М., Коцюба А. Е., Коцюба Е. П. 2012. Гемоксигеназа-2 в нейронах головного и спинного мозга человека. Вестн. РАМН. 6 : 36—41.
- Burt A. M. 1970. A histochemical procedure for the localization of choline acetyltransferase activity. J. Histochem. Cytochem. 18 : 408—415.
- Burt A. M., Silver A. 1973. Histochemistry of choline acetyltransferase: a critical analysis. Brain Res. 62 : 509—516.
- Calka J., Zalecki M., Wasowicz K., Arciszewski M. B., Lakomy M. 2008. A comparison of the distribution and morphology of ChAT-, VACHT-immunoreactive and AChE-positive neurons in the thoracolumbar and sacral spinal cord of the pig. Veterinarni Med. 53 : 434—444.
- Giraldez-Perez R. M., Gaytan S. P., Torres B., Pasaro R. 2009. Co-localization of nitric oxide synthase and choline acetyltransferase in the brain of the goldfish (*Carassius auratus*). J. Chem. Neuroanat. 37 : 1—17.
- Holmes C. J., Mainville L. S., Jones B. E. 1994. Distribution of cholinergic, GABAergic and serotonergic neurons in the medial medullary reticular formation and their projections studied by cytotoxic lesions in the cat. Neuroscience. 62 : 1155—1178.
- Karczmar A. G. 2007. Exploring the vertebrate central cholinergic nervous system. New York: Springer. 702 p.
- Levey A. I., Wainer B. H., Mufson E. J., Mesulam M. M. 1983. Co-localization of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the rat cerebrum. Neuroscience. 9 : 9—22.
- Mizukawa K., McGeer P. L., Tago H., Peng J. H., McGeer E. G., Kimura H. 1986. The cholinergic system of the human hindbrain studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. Brain Res. 379 : 39—55.
- Moeller J. F., Meredith M. 2010. Differential co-localization with choline acetyltransferase in nervusterminalis suggests functional differences for GnRH isoforms in bonnethead sharks (*Sphyrnatis*). Brain Res. 1366 : 44—53.
- Motts S. D., Slusarczyk A. S., Sowick C. S., Schofield B. R. 2008. Distribution of cholinergic cells in guinea pig brainstem. Neuroscience. 154 (1) : 186—195.
- Sato K., Armstrong D. M., Fibiger H. C. 1983. A comparison of the distribution of central cholinergic neurons as demonstrated by acetylcholinesterase pharmacohistochemistry and choline acetyltransferase immunohistochemistry. Brain Res. Bull. 11 : 693—720.
- Sha D., Jin H., Kopke R. D., Wu J.-Y. 2004. Choline acetyltransferase: regulation and coupling with protein kinase and vesicular acetylcholine transporter on synaptic vesicles. Neurochem. Res. 29 : 199—207.
- Smith A. D., Cuello A. C. 1984. Alzheimer's disease and acetylcholinesterase-containing neurons. Lancet. 323 : 513.
- Valtschanoff J. G., Weinberg R. J., Rustioni A. 1993. Amino acid immunoreactivity in corticospinal terminals. Exp. Brain Res. 93 : 95—103.
- Vincent S. R., Reiner P. B. 1987. The immunohistochemical localization of choline acetyltransferase in the cat brain. Brain Res. Bull. 18 : 371—415.

Поступила 24 IV 2013

HISTOCHEMICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF CHOLINE
ACETYLTRANSFERASE IN THE NUCLEI OBLONGATA RAT BRAIN

A. E. Kotsyuba, V. M. Chertok¹

Pacific State Medical University, Vladivostok;

¹ e-mail: chertokv@mail.ru

ChAT-positive neurons in the nuclei of the medulla oblongata of Wistar rats have been studied with the use of histochemical and immunohistochemical methods. We have found that the topography and the number of cholinergic neurons at the projection nuclei studied largely depend on the method of detection of these neurons. Histochemical method always revealed more neurons than immunohistochemistry. Such a feature of ChAT-positive neurons detection was clearly seen among the majority of nuclei in the medial region and in some of the nuclei in the lateral region of the medulla oblongata. The number of immunoreactive cells in the nuclei varied from 17 to 26 %, whereas the histochemical reaction determined 1.5—3 times more neurons in the same nuclei. ChAT-positive cells in the nuclei of the back seam were detected mainly by a histochemical method.

Key words: cholinergic neurons, the nucleus of the medulla oblongata.
