

УДК 616.089.843:611.8

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СИНАПТИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ НЕЙРОНАМИ ТРАНСПЛАНТАТА И МОЗГОМ РЕЦИПИЕНТА

Журавлева З.Н.^{1,3}, Журавлев Г.И.², Ермаков А.А.¹

¹Учреждение РАН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН; ²Учреждение РАН Институт биофизики клетки РАН; ³Пушкинский государственный университет; Пушкино

Закладку зубчатой фасции гиппокампа 20-дневных плодов крыс гетеротопически трансплантировали в соматосенсорную область неокортекса взрослых животных. Аксоны гранулярных нейронов трансплантата проникали в мозг реципиента и устанавливали синаптические контакты с несвойственными им в норме клеточными элементами неокортекса. В экспериментальном материале они воспроизводили свои основные ультраструктурные признаки, позволяющие их идентифицировать в неокортикальной ткани. Вместе с тем при сравнении с контрольным гиппокампом мы обнаружили ряд особенностей в структуре гигантских синаптических окончаний. Морфометрический анализ показал, что в процесс формирования синаптических связей при трансплантации активно вовлекаются эндогенные нейропептиды и молекулы клеточной адгезии.

Ключевые слова: нейротрансплантация, зубчатая фасция, синапсы, нейропептиды, адгезионные контакты

Мозг является иммунопривилегированной областью организма, поэтому трансплантированная в него нервная ткань не отторгается и продолжает дифференцировку. Нервные клетки достигают зрелого состояния, их аксонные и дендритные отростки проникают в ткань мозга реципиента и формируют функциональные синаптические связи. Благодаря этому, метод нейротрансплантации используется не только в экспериментальных исследованиях для изучения фундаментальных проблем биологии и медицины, но и в клинической практике для компенсации нарушенных функций центральной нервной системы. Вместе с тем существуют противоречивые мнения о структурной специфичности таких взаимодействий. Ранее мы показали, что при отсутствии адекватных мишеней трансплантированные нейроны могут формировать функциональные взаимодействия с несвойственными им в норме отделами мозга [2, 16]. Однако молекулярные и субклеточные механизмы, способствующие регенеративным процессам и сопровождающиеся установлением

эктопических синаптических связей, неизвестны. В настоящем исследовании изучались особенности ультраструктурной организации синаптических контактов, сформированных между гетеротопическими трансплантатами зубчатой фасции гиппокамповой формации и нейронами соматосенсорной области неокортекса.

Материалы и методы: Опыты проведены на крысах породы Вистар с соблюдением правил работы с лабораторными животными (приказ МЗ РФ № 755). В качестве донорского материала использовали закладку зубчатой фасции 20-дневных плодов. Аллотрансплантацию в соматосенсорную область неокортекса производили взрослым самцам (n = 5). Следует отметить, что указанные структуры в нативном мозге ни анатомически, ни функционально не контактируют. Все процедуры проводили под нембуталовым наркозом. Для электронно-микроскопического изучения использовали трансплантаты через 5 месяцев после операции. Фиксацию производили с помощью перфузии 2.5% раствора глутарового альдеги-

да через восходящую аорту сердца. Затем из оперированного полушария выделяли область неокортекса с трансплантатом зубчатой фасции и из интактного полушария гиппокамповую формацию для контроля. Срезы мозга толщиной 500 мкм, содержащие необходимый материал, дофиксировали погружением в 1% раствор четырехоксида осмия. Более подробно методика проведения операции и последующей обработки материала описана нами ранее [1, 16]. Прилежащий к трансплантату неокортекс был исследован электронно-микроскопически на глубину до 500 мкм. Синаптические окончания идентифицировали по известным ультраструктурным признакам [6]. Для количественного анализа использовали по 100 случайно выбранных микрофото гигантских синапсов, полученных из экспериментальных и контрольных образцов. Достоверность результатов по подсчету числа синаптических везикул и протяженности адгезионных соединений определяли по критерию Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение: Трансплантаты были обнаружены у всех оперированных животных. Признаков отторжения ткани или дегенерации клеточных элементов не было выявлено. Нейроны, большинство которых располагалось в виде плотно упакованного слоя, имели микроскопические и ультраструктурные характеристики типичных клеток-зерен зубчатой фасции. Хорошо дифференцированные аксонные и дендритные отростки внутри трансплантатов формировали многочисленные синаптические контакты. Между трансплантатом и мозгом реципиента прослеживались реципрокные функциональные связи в виде мощных пучков нервных и глиальных отростков. В прилежащем к трансплантату неокортексе были обнаружены тонкие немиелинизированные аксоны, заканчивающиеся крупными (до 4 – 5 мкм в сечении) синаптическими окончаниями. Такие размеры терминалей не типичны для неокортекса, но соизмеримы с гигантскими синапсами мшистых волокон гиппокамповой формации. Как и в нормальном гиппокампе, они формировали асимметричные активные зоны с дендритными шипиками и

симметричные адгезионные десмосомоподобные соединения со стволами дендритов (рис.). Некоторые дендритные шипики, хотя и принадлежали нейронам неокортекса, имели разветвленные головки. Повидимому, вырастающие из трансплантата в неокортекс реципиента мшистые волокна индуцировали характерные для их постсинаптических мишеней в норме дополнительные ветвления шипиков. Пресинаптические отделы гигантских синапсов были заполнены массой малых (около 40 нм в диаметре) синаптических пузырьков и относительно небольшим количеством больших электронно-плотных везикул, размер которых варьировал от 60 до 120 нм (рис.). Известно, что в малых везикулах содержится основной нейромедиатор синапсов мшистых волокон – глутамат, оказывающий возбуждающее действие на нейроны [7]. Большие гранулярные везикулы являются вместилищем нейропептидных котрансмиттеров, которые обычно выделяются экстрасинаптически в межклеточное пространство и модулируют нейротрансдукцию [4, 5].

При сравнении морфологии гигантских синапсов, сформированных на несвойственных им нейронных мишенях в неокортексе, с таковыми в контрольном гиппокампе выявились значительные различия в количестве и распределении больших гранулярных везикул. Если в гиппокампе *in situ* наличие пептидсодержащих гранул относительно общего числа пузырьков составляло $3.3 \pm 0.6\%$, то в синапсах на атипичных мишенях в неокортексе оно достигало $5.8 \pm 0.6\%$ (различия достоверны при $p < 0.01$). В норме гранулярные везикулы, как правило, были распределены равномерно по синаптоплазме или располагались вдали от синаптических активных зон. В экспериментальных условиях нейропептидные гранулы имели тенденцию скапливаться в области синаптических контактов. Около некоторых активных зон обнаруживалось до 10-15 гранул. Иногда наблюдалось непосредственное слияние гранулярных везикул с пресинаптической мембраной. Подсчет синаптических активных зон, в состав которых входили большие гранулярные везикулы с электронно-плотным

центром, показал, что в экспериментальном материале они встречались в 7.9 раз чаще, чем в норме (соответственно $62.3 \pm 3.4\%$ и $7.9 \pm 1.6\%$; $p < 0.001$). Некоторые везикулы с внешней стороны имели дополнительное окружение игольчатыми частицами. Известно, что такие опущенные электронно-плотным материалом гранулярные везикулы транспортируют из перикарионов макромолекулярные комплексы, предназначенные для строительства активных зон [12]. Значительное увеличение количества активных зон, имеющих в своем составе большие гранулярные пу-

зырьки, свидетельствует об активном воздействии последних на постсинаптический нейрон через синаптические контакты. В литературе описано увеличение количества нейропептидных гранул, усиление их подвижности и секреции в межклеточное пространство при долговременной посттетанической потенциации и развитии эпилептических разрядов [3, 11, 14]. В условиях трансплантации нейропептиды, по видимому, участвуют в адаптации синаптического аппарата к новому, не типичному для них тканевому микроокружению.

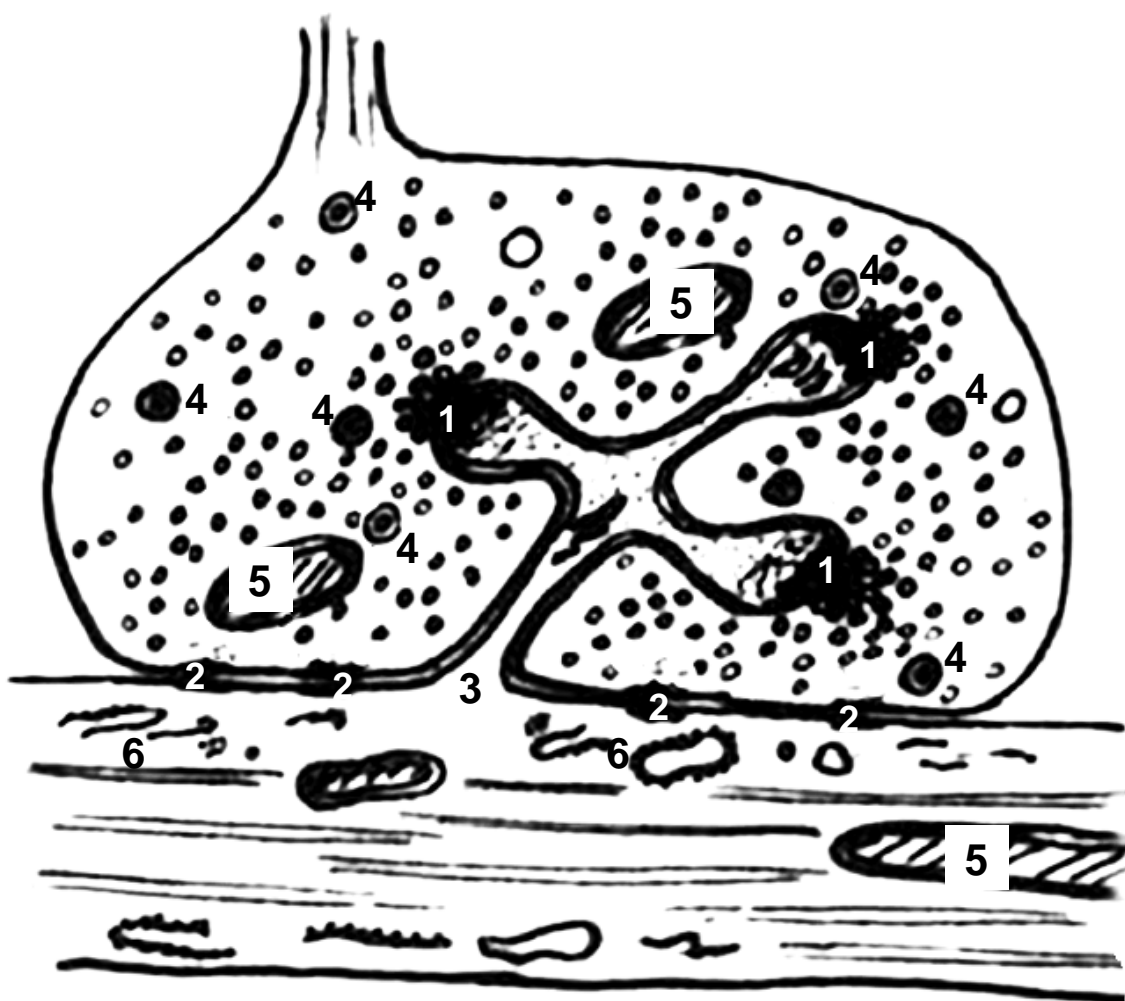


Схема строения гигантского синаптического окончания аксона гранулярной клетки, формирующего два типа функциональных контактов:

- 1 - синаптические активные зоны с головками разветвленного дендритного шипика,
- 2 - адгезионные соединения с поверхностью дендрита. 3 - место отщепления дендритного шипика от родительского дендрита, 4 - большие пузырьки с электронно-плотным центром, содержащие нейропептидный котрансмиттер, 5 - митохондрии, 6 - цистерны эндоплазматического ретикулума в постсинаптической части синапса

Сравнение ультраструктуры и морфометрических характеристик гигантских синаптических окончаний в норме и эктопических синапсов в неокортексе, показало, что в процесс установления и сохранения функциональных связей при трансплантации вовлекаются также адгезионные десмосомоподобные соединения, формирующиеся между гигантской терминалью и стволом дендрита. По сравнению с нормальным гиппокампом в условиях гетеротопической трансплантации адгезионные соединения синаптической терминали с дендритом были более многочисленны и интенсивны. В среднем в неокортексе реципиента зоны адгезии занимали 20-30% общей области прилегания гигантских бутонов к поверхности постсинаптических дендритов, в то время как в контроле они составляли только 7-8%. В области таких соединений со стороны терминали отсутствовали синаптические везикулы, но почти всегда обнаруживались митохондрии, а с противоположной, дендритной стороны часто располагались цистерны гранулярного и агранулярного эндоплазматического ретикулула. Кроме того, в экспериментальном материале мы иногда наблюдали транслокацию адгезионных соединений на ножки дендритных шипиков и даже их пространственное слияние с синаптическими активными зонами.

До недавнего времени адгезионные соединения гигантских синапсов гиппокампа по аналогии с таковыми в эпителиальных клетках рассматривали как зоны механического скрепления аксонной терминали и постсинаптического дендрита. Однако результаты последних лет свидетельствуют о том, что они имеют и другие, более важные функции. Показано, что в молекулярной архитектуре симметричных адгезионных соединений гигантских терминалей гиппокампа присутствуют белки, которые ранее обнаруживались лишь в составе синаптических контактов. Так, на обеих сторонах таких соединений найдена синаптическая адгезионная молекула, обычно входящая в молекулярный каркас незрелых синаптических контактов [15]. Обнаружены также и другие химические компоненты пресинаптических и постси-

наптических комплексов, которые участвуют в структурном моделировании дендритов и их шипиков [9, 13]. В аналогичных адгезионных соединениях, скрепляющих синаптические гломерулы в мозжечке, обнаружены NMDA-рецепторы [10]. Наши наблюдения также подтверждают синаптогенную роль десмосомоподобных соединений гигантских синаптических окончаний. Возможно, они являются начальными, незрелыми формами эктопических аксо-шипиковых синаптических контактов между мшистыми волокнами и несвойственными им в норме нейронными мишенями в мозге реципиента.

Таким образом, электронномикроскопическое исследование показало, что гетеротопически трансплантированная эмбриональная ткань зубчатой фасции гиппокампа крысы успешно интегрируется с помощью синаптических связей с мозгом взрослого животного-реципиента. Пресинаптическими компонентами таких химерных связей являются аксональные отростки трансплантированных нейронов, а постсинаптическими мишенями – клеточные элементы мозга реципиента. В регенеративные процессы активно вовлекаются нейропептидные котрансмиттеры мшистых волокон зубчатой фасции и молекулы клеточной адгезии, содержащиеся в десмосомоподобных адгезионных соединениях аксонных терминалей с поверхностью дендритов неокортекса.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 09-04-01136) и грантами Министерства образования и науки РФ (№ 2.1.1/2280 и № 2.1.1/3876).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Журавлева З.Н. // Онтогенез. 1998. Т.29. № 2. С.85.
2. Журавлева З.Н. // Онтогенез. 2002. Т.33. № 3. С.230.
3. Мокрушин А.А. // Известия АН. Серия биол. 2002. №1. С.74.
4. Chavkin C. // Prog. Brain Res. 2000. V.125. P.363.
5. Commons K.G., Milner T.A. // Brain Res. 1996. V.758. P.181.
6. Hamlyn L.H. // J. Anat. (Lond). 1962. V.96. P.112.

7. Henze D.A., Urban N.N., Barrionuevo G. // *Neurosci.* 2000. V.98. No.3. P.407.
8. Mazarati A.M. // *Neuropeptides.* 2004. V.38. No.6. P.331.
9. Mizoguchi A., Nakanishi H., Kimura K., et al. // *J. Cell Biol.* 2002. V.156. No.3. P.555.
10. Petralia R., Wang Y-X., Wenthold R. // *Eur. J. Neurosci.* 2002. V. 15. P.583.
11. Shakiryanova D., Tully A., Hewes R., et al. // *Nature Neurosci.* 2005. V.8. No.2. P.173.
12. Shapira M., Zhai R., Dresbach T., et al. // *Neuron.* 2003. V.38. P.237.
13. Togashi H., Abe K., Mizoguchi A., et al. // *Neuron.* 2002. V.35. P.77.
14. Torrealba F., Carrasco M.A. // *Brain Res. Rev.* 2004. V.47. P.5.
15. Yamada A., Irie K., Deguchi-Tawarada M., et al. // *Genes Cells.* 2003. V.8. P.985.
16. Zhuravleva Z.N., Vinogradova O.S. // *J. Neural Transpl. Plasticity.* 1994. V. 5. No.3. P.169.

ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF THE SYNAPTIC CONNECTIONS BETWEEN THE TRANSPLANT NEURONS AND HOST BRAIN

Zhuravleva Z.N.^{1,3}, Zhuravlev G.I.², Ermakov A.A.¹

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS;*

²*Institute of Cell Biophysics RAS;*

³*Pushchino State University*

Pushchino, Russia

The hippocampal dentate fascia anlage of the 20-day rat fetus was heterotopic transplanted into somatosensory neocortex of the adult animals. Axons of the transplanted granular neurons penetrated into recipient's brain and established synaptic contacts with inappropriate for them cellular elements of the neocortex. In the experimental material, they reproduced their main ultrastructural properties that make them easy for identification in the neocortical tissue. However, compared to the control hippocampus, we revealed a number of features in the structure of giant synaptic endings. Morphometric examination indicated that the endogenous neuropeptides and cell adhesion molecules are actively involved in the formation of synaptic connections after transplantation.

Keywords: neurotransplantation, fascia dentate, synapses, neuropeptides, adhesion contacts