

СТРУКТУРНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ НЕЙРОНОВ МОЗГА РЕЦИПИЕНТА ПРИ УСТАНОВЛЕНИИ СИНАПТИЧЕСКИХ КОНТАКТОВ С НЕЙРОТРАНСПЛАНТАТОМ

Журавлева З.Н.¹, Журавлев Г.И.², Шубина Л.В.¹

¹ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», Пушкино, e-mail: zinzhur@mail.ru;

²ФГБУН «Институт биофизики клетки РАН», Пушкино, e-mail: zhuravleva@iteb.ru

Ткань зубчатой фасции мозга 20-дневных плодов крыс гетеротопически трансплантировали в соматосенсорную область неокортекса взрослых крыс. С помощью электронной микроскопии через 5 месяцев после операции изучали гигантские синаптические окончания мшистых волокон гранулярных нейронов трансплантата, сформированные в неокортексе реципиента. Такие синапсы являются химерами, пресинаптические отделы которых принадлежат нейронам трансплантатов, а постсинаптические – нейронам мозга реципиента. Сравнение ультраструктурных характеристик эктопических синаптических окончаний мшистых волокон с таковыми в гиппокампе *in situ* показало, что под влиянием сигналов, идущих из трансплантата, в нейрональных мишенях мозга реципиента происходит значительная структурная реорганизация. От дендритов неокортекса реципиента, вовлеченных в организацию aberrантных функциональных связей, отрастали дендритные шипики разветвленной формы, которые инвагинировали аксональные бутоны для установления интратерминальных синапсов. В цитоплазме самих неокортикальных дендритов наблюдались скопления адгезивного материала наподобие тех, которые присутствуют в *puncta adherentia* гигантских синапсов гиппокампа *in situ*. Количественный анализ показал двукратное увеличение протяженности адгезивных соединений в химерных гигантских синапсах. Морфологические изменения в дендритах и шипиках неокортекса реципиента сопровождались появлением дополнительных органелл (полисом, цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума, митохондрий), имеющих отношение к клеточному синтезу. Полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях нейротрансплантации нейроны мозга реципиента не только перестраивают свою микроструктуру, но и адаптируют метаболический аппарат для установления функциональных контактов с чужеродными аксонами, прорастающими из нейротрансплантатов.

Ключевые слова: нейротрансплантация, зубчатая фасция, неокортекс, гигантские синаптические окончания.

STRUCTURAL REORGANIZATION OF NEURONS FROM THE BRAIN OF A RECIPIENT AFTER THE ESTABLISHMENT OF SYNAPTIC CONTACTS WITH THE NEUROTASPLANT

Zhuravleva Z.N.¹, Zhuravlev G.I.², Shubina L.V.¹

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Science, Pushchino, e-mail: zinzhur@mail.ru;

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Science, Pushchino, e-mail: zhuravleva@iteb.ru

The dentate fascia tissue of the brain of 20-day-old rat fetuses was heterotopically grafted into the somatosensory neocortex of an adult rat. Five months after grafting, the giant synaptic endings of mossy fibers of granule neurons of the transplant, formed in the recipient neocortex, were studied by electron microscopy. These synapses are chimeras whose presynaptic elements belong to neurons of the transplant, and postsynaptic elements are neurons of the recipient brain. A comparison of the ultrastructural characteristics of these ectopic synaptic endings of mossy fibers with those of normal endings in the hippocampus *in situ* showed that a significant structural reorganization occurs in neuronal targets of the recipient under the influence of some signals from the transplants. From the neocortex dendrites involved in the organization of aberrant functional connections, branched dendritic spines grew, which invaginated into axonal terminals to establish intraterminal synapses. Accumulations of adhesive material similar to those present in *puncta adherentia* of giant synapses *in situ* were observed in the cytoplasm of parent dendrites. Quantitative analysis showed a twofold increase in the length of adhesive junctions in the chimeric giant synapses. Morphological changes in the dendrites and spines of the host neocortex were accompanied by the appearance of additional organelles (polyribosomes, cisterns of granular endoplasmic reticulum, mitochondria) involved in cell synthesis. The data obtained indicate that, under conditions of neurotransplantation, neurons of the recipient brain not only reorganize their microstructure but also adapt the metabolic apparatus to establish functional contacts with alien axons, penetrating from the neurotransplants.

Keywords: neurotransplantation, fascia dentate, neocortex, giant synaptic endings.

Нейротрансплантация рассматривается как перспективный подход для восстановления поврежденной нервной системы. Мозг является иммунопривилегированной областью организма, поэтому трансплантированная в него нервная ткань, состоящая из прогениторных и фетальных клеток, не отторгается и продолжает дифференцировку. В условиях нейротрансплантации создаются особые условия для развития аксональных путей в мозге: незрелые клеточные предшественники развиваются в микроокружении зрелого мозга и встраиваются в уже существующие нейрональные системы. Возможность формирования синаптических связей между нейронами трансплантированной ткани и мозгом реципиента определяется способностью нервной ткани разного возраста к морфофункциональным пластическим преобразованиям и к взаимной адаптации. Известно, что при трансплантации могут устанавливаться как типичные, так и атипичные, не свойственные контактирующим отделам мозга синаптические связи [1; 2].

При многих неврологических заболеваниях значительные нарушения происходят в гиппокампальной формации. Эпилепсия, например, приводит к значительной гибели нейронов, аберрантному спрутированию аксонов гранулярных нейронов зубчатой фассии (мшистых волокон гиппокампа) и дальнейшему распространению патологической активности в мозге. Мшистые волокна заканчиваются уникальными гигантскими синаптическими окончаниями на апикальных дендритах пирамидных нейронов поля СА3 гиппокампа. Ранее мы показали, что между трансплантатами зубчатой фассии гиппокампа и неокортексом реципиента формируются функциональные синаптические контакты, хотя в норме эти два отдела мозга не взаимодействуют. При этом в пресинаптических терминалях таких синапсов серьезно изменяется везикулярно-химический состав: уменьшается количество везикул, содержащих глутаматергический трансмиттер, и увеличивается число нейропептидных гранул [1; 3]. В то же время ничего не известно о структурной перестройке в нейронах мозга реципиента, которые взаимодействуют с чужеродными аксонами, проникающими из трансплантата. Целью настоящей работы являлось изучение структурно-химической реорганизации в постсинаптических компартментах таких неспецифических контактов. Для этого проводили сравнение ультраструктуры гигантских синапсов мшистых волокон гиппокампальной формации крыс, образованных в неокортексе после трансплантации зубчатой фассии, и таковых в здоровом мозге.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на крысах породы Вистар с соблюдением рекомендаций к работе с животными (ГОСТ Р ИСО10993-2-2009). Все процедуры проводили под

нембуталовым наркозом (40 мг/кг) и местной анестезией. Донорским материалом для аллотрансплантации в соматосенсорную область неокортекса служили закладки зубчатой фасции 20-дн. плодов; в качестве реципиентов использовали пять половозрелых крыс-самцов той же породы. Через 5 месяцев после операции мозг фиксировали 2.5% раствором глутарового альдегида, выделяли область неокортекса с трансплантатом и нативный гиппокамп из другого полушария мозга для контроля. Далее материал дофиксировали четырехокисью осмия и обрабатывали для электронной микроскопии по стандартной методике. Синаптические окончания мшистых волокон идентифицировали по большим размерам терминалей (не менее 3-4 мкм в диаметре) и другим детерминантным признакам, известным из литературы и собственных наблюдений [1; 3; 4]. Для количественного анализа использовали по 50 случайно выбранных микроизображений гигантских синапсов ($n = 50$) из экспериментальных и контрольных образцов с хорошо выраженными активными зонами на дендритных шипиках и адгезивными соединениями на стволах дендритов. Электронно-микроскопические фотоизображения сканировали, сохраняли в виде компьютерных файлов и производили морфометрический анализ с помощью программы UTHSCSA Image Tool. Сравнительный анализ проводили по следующим показателям: число адгезивных контактов между аксональной терминалью и дендритом и их суммарная длина (в мкм) в среднем на синапс, а также отношение суммарной длины адгезивных соединений к полной протяженности зоны прилегания терминали к поверхности дендрита, в процентах. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Origin 6.0. Вычисляли средние значения для групп показателей (M) и стандартные ошибки (m). Для определения уровней значимости различий (P) каждого показателя использовали параметрический t -критерий Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

При электронно-микроскопическом изучении контрольного материала (прозрачного слоя поля СА3 нативного гиппокампа) легко идентифицировались гигантские синаптические окончания аксонов гранулярных нейронов зубчатой фасции. Они компактно располагались между крупными профилями апикальных дендритов пирамидных нейронов и соответствовали известным морфологическим критериям [4]. Кроме гигантских размеров аксональных терминалей (до 5-6 мкм в диаметре), от обычных синапсов их отличало наличие двух типов функциональных контактов: синаптические активные зоны с дендритными шипиками и симметричные адгезионные соединения с поверхностью самих дендритов. При удачном плане среза можно было наблюдать места отрастания разветвленных шипиков от дендритных стволов (рисунок 1).

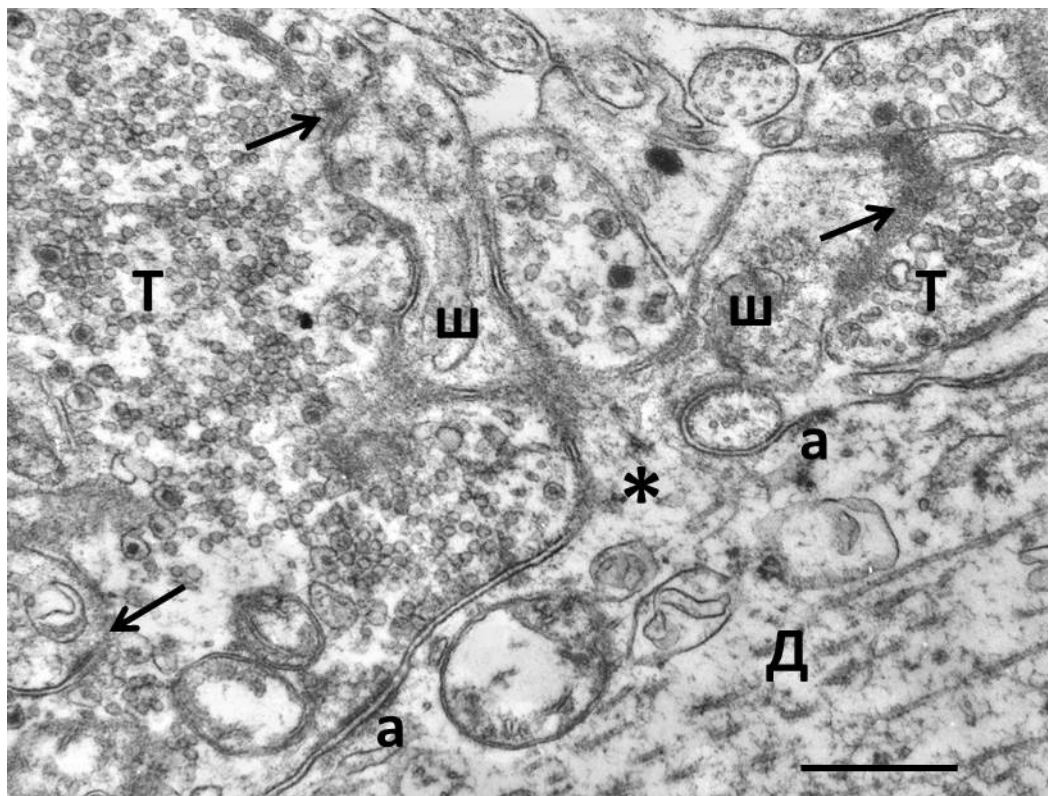


Рис. 1. Гигантское синаптическое окончание мышного волокна в гиппокампе крысы.

Д – дендрит; Т – синаптическая терминаль; а – адгезивное соединение; ш – головка разветвленного шипика; стрелка – синаптический контакт; звездочка – место ответвления шипика от дендрита. Масштаб: 0.5 мкм

Их синаптические терминали были плотно заполнены малыми светлыми и большими гранулярными синаптическими пузырьками, среди которых наблюдались также митохондрии и профили перерезанных дендритных шипиков с активными зонами, имеющими хорошо выраженные постсинаптические уплотнения. В цитоплазме головок разветвленных дендритных шипиков среди типичного для них филаментозного материала наблюдались вакуоли и цистерны эндоплазматического ретикулума, некоторые из которых были упорядочены в виде типичного шипикового аппарата. Кроме того, в дендритных шипиках иногда присутствовали свободные или сгруппированные рибосомы. Каждая гигантская синаптическая терминаль широко распластывалась по поверхности дендрита. Между смежными аксональной и дендритной мембранами наблюдались адгезивные соединения, около которых со стороны аксональной терминали никогда не было синаптических везикул. Из-за симметрично расположенного осмиофильного адгезивного материала с обеих сторон противостоящих мембран такие соединения называли десмосомоподобными, или *puncta adherentia*, контактами и рассматривали как места механического удержания сложного синаптического комплекса [4]. С помощью

современных методов молекулярной биологии определен нейрохимический состав адгезивных соединений, который свидетельствует об их более значительной роли в координации морфофункциональных процессов в гигантских синапсах гиппокампа [5-7].

Для изучения структурной реорганизации синаптических окончаний мшистых волокон при контакте с чужеродными нейрональными мишенями был исследован прилежащий к трансплантату неокортекс мозга реципиента на глубину от 200 до 500 мкм. Гигантские синаптические терминалы в неокортексе не располагались плотным слоем, как это типично для их места расположения в гиппокампе, а были распределены среди элементов соматосенсорной области достаточно рассеянно. В то же время вокруг некоторых дендритов наблюдались их скопления, которые, по-видимому, представляли собой последовательные синаптические бутоны одного и того же аксона. Такие синапсы являются химерами, пресинаптические отделы которых принадлежат нейронам трансплантатов, а постсинаптические – нейронам мозга реципиента. Принцип организации химерных синапсов мшистыми волокнами во многом совпадал с таковым в мозге *in situ*, т.е. интратерминальные химические синапсы устанавливались с инвагинированными дендритными шипиками, а адгезивные несинаптические соединения - с поверхностью дендритов. Примечательно, что дендритные шипики неокортекса, в норме имеющие классическую грибовидную форму, при контакте с мшистыми волокнами, проникающими из трансплантатов, часто приобретали разветвленные головки неопределенной конфигурации (рисунок 2).

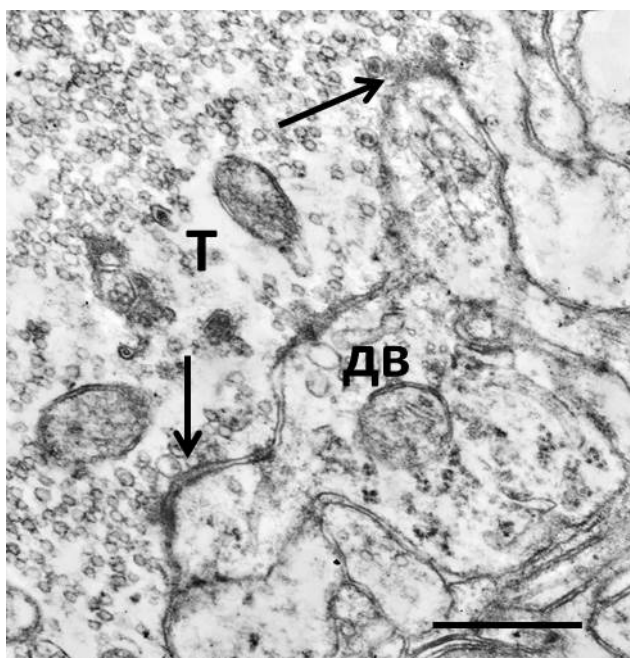
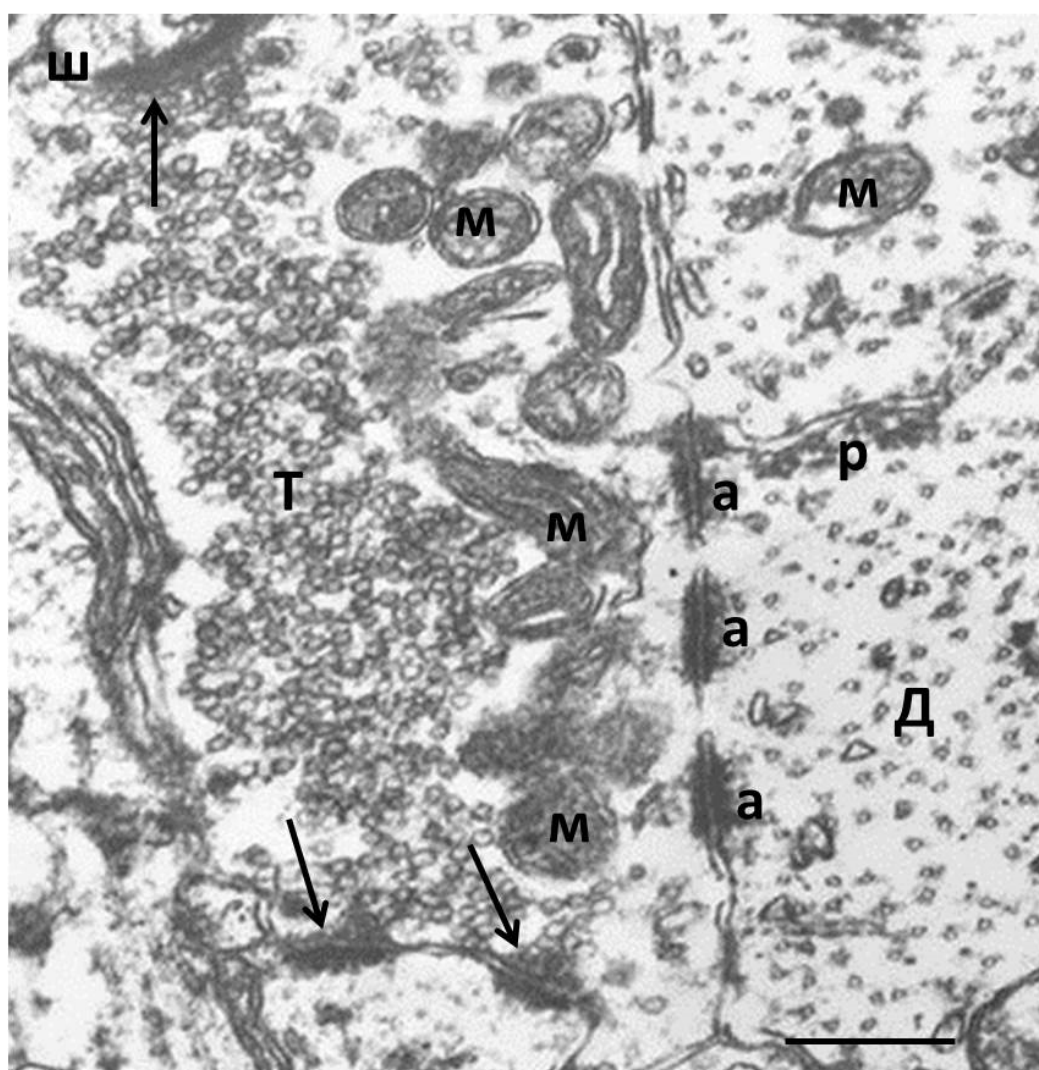


Рис. 2. Поперечный срез разветвленного дендритного выроста (ДВ), устанавливающего синаптические контакты с синаптической терминалью мшистого волокна трансплантированного нейрона в неокортексе реципиента

Обозначения те же, что на рис. 1.

Присутствие аномально разветвленных типов дендритных шипиков на дендритах неокортикальных нейронов свидетельствуют о том, что аксоны, врастающие из трансплантатов, индуцируют в мозге реципиента формирование соответствующих им сложных постсинаптических микровыростов. При этом шиповидные выросты в эктопических гигантских синапсах отличались от таковых в норме более богатым и разнообразным содержанием. Во многих из них встречались митохондрии, а рибосомы были собраны в полисомы или ассоциированы с цистернами гранулярного эндоплазматического ретикулума. Известно, что появление в дендритных шипиках органелл, ответственных за синтез белка, характерно для периодов пластической перестройки синаптического аппарата во время развития или функциональной активации нейронов [8]. Многообразие органелл внутри дендритных микровыростов в нашем экспериментальном материале, когда мшистые волокна формируют aberrantные функциональные связи, по-видимому, отражает процесс нейрохимической реорганизации в связи с адаптацией постсинаптических локусов нейронов неокортекса к проникающим из нейротрансплантата аксонам.



*Рис. 3. Адгезивные соединения между дендритом и аксональной терминалью в
эктопическом гигантском синаптическом окончании, сформированном в неокортексе
реципиента после трансплантации*

Обозначения: **м** – митохондрии; **р** – цистерны эндоплазматического ретикулума; другие обозначения те же, что на рис. 1.

Важные изменения ультраструктуры эктопических гигантских синапсов были обнаружены в топографии и выраженности адгезивных соединений, образованных между аксональными терминалями и дендритными стволами (рисунок 3). В первую очередь следует отметить, что симметрично адгезивным участкам в аксональной терминали, принадлежащей трансплантату, со стороны дендритного ствола, принадлежащего нейронам реципиента, также присутствовали аналогичные осмиофильные уплотнения, хотя их наличие не свойственно неокортикальным дендритам в норме. Это придавало внесинаптическим адгезивным зонам в эктопических окончаниях мшистых волокон вид соединений типа *puncta adherentia*, характерных для гиппокамповой формации. Межклеточное пространство в участках внесинаптических адгезионных соединений было заполнено волокнистым материалом, который иногда был организован в виде поперечных мостиков, демонстрирующих бинаправленные межклеточные взаимодействия молекул клеточной адгезии через такие зоны. Иногда участки адгезии занимали основную часть области аппозиции терминали к дендритному стволу или концентрировались в местах ответвления дендритных шипиков. В некоторых синапсах они распространялись на ножки дендритных шипиков и сливались с активными зонами, хотя в норме эти два типа контактов всегда топографически разнесены. Известно, что при дифференцировке гигантских синапсов в онтогенезе нарождающиеся примитивные активные зоны расположены на дендритах и колокализированы с адгезивными контактами [9]. Эти литературные данные позволяют нам предположить, что и в условиях гетеротопической трансплантации зубчатой фассии, когда формируются aberrантные синаптические связи, соединения *puncta adherentia* также принимают участие в генезе новых аксо-шипиковых активных зон.

При микроскопическом анализе аксо- и дендроплазмы вблизи адгезионных соединений в эктопических гигантских синапсах неокортекса были выявлены признаки повышенной функциональной активности по сравнению с идентичными локусами в гигантских синапсах *in situ*. Так, со стороны пресинаптического бутона около них скапливались митохондрии, что свидетельствует о бóльшей энергозависимости процесса aberrантной коммуникации через адгезивные специализации. Со стороны ствола дендрита наблюдалась концентрация органелл, имеющих прямое отношение к синтезу метаболитов.

Среди них были идентифицированы свободные и прикрепленные к цистернам шероховатого эндоплазматического ретикулума рибосомы, митохондрии и другие микроструктуры. Некоторые группы канальцев эндоплазматического ретикулума находились в непосредственном контакте с конгломератами адгезивного материала (рисунок 3).

Проведенный количественный анализ подтвердил наблюдения об усилении адгезии вне активных зон эктопических синапсов (таблица). По сравнению с контролем в них обнаружено достоверное увеличение количества дискретных адгезионных соединений и их суммарной протяженности более чем в 2 раза. В среднем количество дискретных участков в синапсах, сформированных в неокортексе после трансплантации, было 3.7 ± 0.4 , а в контрольных синапсах только 1.7 ± 0.3 . Процент, который занимала суммарная длина отдельных участков зон адгезии от полной длины прилегания аксональной терминали к дендриту в эктопических синаптических окончаниях, в среднем также значительно превышал их значения в контрольных синапсах ($29.0 \pm 7.0\%$ против $8.0 \pm 3.0\%$).

Количественный анализ адгезионных соединений (АС) в гигантских синапсах мшистых волокон в контроле и после трансплантации. Средние значения и стандартные ошибки ($M \pm m$); P – уровень различий показателей для каждого параметра

Параметры	Контроль	Трансплантация	P
Среднее число АС в синапсе	1.7 ± 0.3	3.7 ± 0.4	0.001
Суммарная длина АС в синапсе (мкм)	0.31 ± 0.08	0.71 ± 0.12	0.009
Суммарная длина АС/полная длина аппозиции терминали к дендриту (%)	8.0 ± 3.0	29.0 ± 7.0	0.009

Существенное значение внесинаптических адгезионных соединений в формировании эктопических синапсов в условиях нейротрансплантации подтверждают известные литературные данные об их нейрохимическом составе. В основу молекулярной организации этих контактов входят кадгерин-катениновая и нектин-афудиновая адгезивные системы, а также синаптическая адгезионная молекула S-SCAM [5-7]. Классические кадгерины играют ключевые роли в развитии и физиологии нервной системы. Они участвуют в морфогенезе дендритных шипиков, прикрепляя AMPA рецепторы к активной зоне через белки катенины [6; 10]. Нектины, располагаясь на обеих сторонах *puncta adherentia*, взаимодействуя через афадин с актиновым цитоскелетом, также вовлекаются в моделирование синапсов [11].

Заключение

Электронно-микроскопическое сравнение гигантских синапсов мшистых волокон, сформированных в неокортексе реципиента после трансплантации зубчатой фасции крыс, с

такowymi в гиппокампе *in situ* показало, что под влиянием аксонов, прорастающих из нейротрансплантатов, в постсинаптических компартментах эктопических синапсов происходила значительная структурная реорганизация. Она касалась основных детерминантных признаков гигантских синапсов. На дендритах неокортекса, контактирующих с аксонами трансплантированных нейронов, были обнаружены несвойственные им в норме разветвленные дендритные шипики, инвагинирующие аксональные терминалы для формирования интратерминальных синаптических активных зон. В местах прилегания крупных дендритных ветвей к гигантским терминалам, в примембранных локусах дендритов неокортекса были идентифицированы скопления осмиофильного материала, наподобие того, который присутствует в гиппокампе *in situ* на местах адгезивных соединений типа *puncta adherentia*. Количественный морфометрический анализ показал увеличение протяженности таких адгезионных соединений в эктопических гигантских синапсах более чем в 2 раза. Важно, что эти морфологические изменения в эктопических синапсах сопровождались появлением в цитоплазме дендритов и дендритных шипиков дополнительных органелл (полисом, цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума, митохондрий), имеющих отношение к процессам клеточного синтеза. Полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях трансплантации нейроны мозга реципиента не только перестраивают свою микроструктуру, но и адаптируют метаболический аппарат к установлению функциональных контактов с чужеродными аксонами, проникающими из нейротрансплантатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-04-00786).

Список литературы

1. Журавлева З.Н., Журавлев Г.И., Муганцева Е.А. Транссинаптическая координация установления морфофункциональных связей между нейротрансплантатом и мозгом (ультраструктурное исследование) // Бюлл. exper. биол. мед. 2015. Т. 160. № 7. С. 104-109.
2. Magavi S.S.P., Lois C. Transplanted neurons form both normal and ectopic projections in the adult brain. Development. Neurobiol. 2008. vol. 68. P. 1527-1537.
3. Журавлева З.Н., Журавлев Г.И., Муганцева Е.А. Синаптические взаимодействия трансплантатов нервной ткани с мозгом животного-реципиента // Фундаментальные исследования. 2011. № 10. С. 577-580.
4. Rollenhagen A., Lübke J.H. The mossy fiber bouton: the "common" or the "unique" synapse? Front. Synaptic. Neurosci. 2010. vol. 2. 2:2. DOI: 10.3389/fnsyn.2010.00002.

5. Hoy J.L., Constable J.R., Vicini S, Fu Z., Washbourne P. SynCAM1 recruits NMDA receptors via protein 4.1B // *Molec. Cell. Neurosci.* 2009. vol. 42. no. 4. P. 466–483.
6. Aiga M., Levinson J.N., Bamji S.X. N-cadherin and neuroligins cooperate to regulate synapse formation in hippocampal cultures. *J. Biol. Chem.* 2011. vol. 286. no. 1. P. 851-858.
7. Toyoshima D., Mandai K., Maruo T., Supriyanto I., Togashi H., Inoue T., Mori M., Takai Y. Afadin regulates puncta adherentia junction formation and presynaptic differentiation in hippocampal neurons. *PLoS ONE*. 2014. vol. 9. no. 2. e89763. DOI:10.1371/journal.pone.0089763.
8. Ostroff L.E., Botsford B., Gindina S., Cowansage K.K., LeDoux J.E., Klann E., Hoeffler C. Accumulation of polyribosomes in dendritic spine heads, but not bases and necks, during memory consolidation depends on cap-dependent translation initiation. *J. Neurosci.* 2017. vol. 37. no. 7. P. 1862-1872.
9. Amaral D.G., Dent J.A. Development of the mossy fibers of the dentate gyrus. I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J. Comp. Neurol.* 1981. vol. 195. P. 51–86.
10. Danielson E., Zhang N., Metallo J., Kaleka K., Shin S.M., Gerges N., Lee S.H. S-SCAM/MAGI-2 is an essential synaptic scaffolding molecule for the GluA2-containing maintenance pool of AMPA receptors. *J. Neurosci.* 2012. vol. 32. no. 20. P. 6967-6980.
11. Rikitake Y., Mandai K., Takai Y. The role of nectins in different types of cell-cell adhesion. *J. Cell Sci.* 2012. vol. 125. P. 3713-3722.