

УДК 616.089.843:611.8

УЧАСТИЕ ПЕПТИДНЫХ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ В ФОРМИРОВАНИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ СИНАПТИЧЕСКИХ КОНТАКТОВ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Журавлева¹ З.Н., Ермаков¹ А.А., Журавлев² Г.И., Зенченко¹ К.И.¹ *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино,*² *Институт биофизики клетки РАН, Пущино*

Эмбриональную ткань зубчатой фасции гиппокампа гетеротопически трансплантировали в соматосенсорную область неокортекса крыс. Аксоны гранулярных нейронов трансплантата проникали в мозг реципиента и формировали синаптические контакты с несвойственными им в норме клеточными мишенями. Мы сравнили ультраструктурные характеристики гигантских окончаний гранулярных клеток, контактирующих с неспецифическими мишенями в неокортексе и имеющих типичные постсинаптические локусы в гиппокампе *in situ*. Кроме того, провели количественный анализ больших везикул с электронно-плотной сердцевиной, хранящих пептидные нейротрансмиттеры. Доля больших пузырьков с электронно-плотным центром в экспериментальном материале была в 1,7 раз выше, чем в контроле. Число синаптических активных зон, в состав которых входили пептидергические пузырьки, было увеличено почти в 7,8 раз. Таким образом, пластическая реорганизация гигантских синаптических окончаний в условиях трансплантации не ограничивается структурным моделированием, а затрагивает нейромедиаторные механизмы, в частности, пептидергическую систему.

Функциональная интеграция трансплантатов с мозгом реципиента осуществляется за счет реципрокных аксональных связей между ними. Существуют противоречивые мнения о степени специфичности таких взаимодействий. Ранее на примере гетеротопической трансплантации зубчатой фасции гиппокампа в соматосенсорную область неокортекса мы показали, что при отсутствии адекватных мишеней трансплантированные нейроны могут формировать синаптические взаимодействия с отделами мозга, с которыми в норме ни анатомически, ни функционально не связаны. Врастающие в неокортекс реципиента аксоны гранулярных нейронов (мшистые волокна) зубчатой фасции не только занимают освободившиеся в результате операции трансплантации нейрональные и дендритные поверхности, но и индуцируют образование дополнительных локусов для контактирования [2, 14]. Важным структурным и функциональным признаком синапсов мшистых волокон является то, что помимо малых синаптических везикул с аминокислотными медиаторами они содержат большие электронно-плотные гранулы с нейропептидами [8, 10]. Целью настоящей работы было изучение ультраструктурных особенностей окончаний мшистых волокон и распределения в них пептидсодержащих гранул при формировании контак-

тов с несвойственными им нейрональными элементами в мозге реципиента.

Методы

Эксперименты проведены на крысах породы Вистар. В качестве донорского материала использовали эмбриональную закладку зубчатой фасции гиппокампа 20-дневных плодов. Для трансплантации взрослым крысам самцам ($n = 5$) той же породы по стереотаксическим координатам производили трепанацию черепа над соматосенсорной зоной неокортекса и отсасывали небольшой объем ткани мозга. В полученную ямку с помощью стеклянного капилляра помещали эмбриональную ткань, прижимали ее кровоостанавливающей губкой и закрывали костью черепа. Все процедуры проводили под нембуталовым наркозом (40 мг/кг, внутривенно) и местной новокаиновой анестезией. Через 5 мес после операции животных перфузировали фиксирующим раствором (2,5%-ный раствор глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере), выделяли область мозга с трансплантатом и дорсальный гиппокамп для контроля. Далее материал дофиксировали 1%-ной осмиевой кислотой и обрабатывали для электронной микроскопии по стандартной методике [1, 2]. Для точной ориентации при электронно-микроскопических исследованиях проводили предварительный гистологический анализ полутонких срезов, содержащих как ткань

трансплантата, так и ткань прилежащего неокортекса реципиента. Для количественного анализа использовали микроизображения гигантских синапсов мшистых волокон, имеющих диаметр профиля не менее 3-4 мкм. Производили подсчет всех синаптических пузырьков и везикул с электронно-плотной сердцевиной, а также активных зон, содержащих пептидергические гранулы. При этом пептид-положительными активными зонами считали те из них, в которых присутствовало не менее двух пептидных гранул. Было обработано по 100 случайно выбранных профилей гигантских синапсов из экспериментального материала и контрольного гиппокампа. Полученные результаты выражали в процентах. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента.

Результаты

Во всех оперированных животных были обнаружены трансплантаты, которые, как правило, занимали весь объем трансплантационной ямки. Трансплантаты содержали типичные для зубчатой фации гранулярные клетки с хорошо дифференцированными дендритными и аксональными отростками, активно участвующими в синаптических взаимодействиях. Большинство гранулярных клеток было сгруппировано в плотно упакованные кластеры, которые иногда напоми-

нали фрагменты клеточного слоя. Между трансплантатом и мозгом происходило свободное проникновение нервных и глиальных отростков в обоих направлениях, среди которых идентифицировались тонкие (0,1 – 0,2 мкм в диаметре) немиелинизированные аксоны (мшистые волокна) гранулярных клеток зубчатой фации.

Анализ соседнего с трансплантатом неокортекса был направлен на идентификацию синаптических окончаний мшистых волокон по известным ультраструктурным признакам [1, 7]. Принцип строения гигантских синапсов и субмикроскопическая организация функциональных контактов сохранялись в условиях трансплантации. Они, как и в мозге *in situ*, одновременно формировали синаптические активные зоны с дендритными шипиками и адгезивные десмосомоподобные соединения с поверхностью дендритов. Их пресинаптические компоненты, достигающие 4 - 5 мкм в диаметре, были заполнены массой малых (20 - 40 нм в диаметре) синаптических пузырьков, которые образовывали плотные скопления около активных зон. Помимо этого, в них присутствовало относительно небольшое количество пептидергических везикул (80 - 100 нм), имеющих электронно-плотную сердцевину разной величины (рис.1).

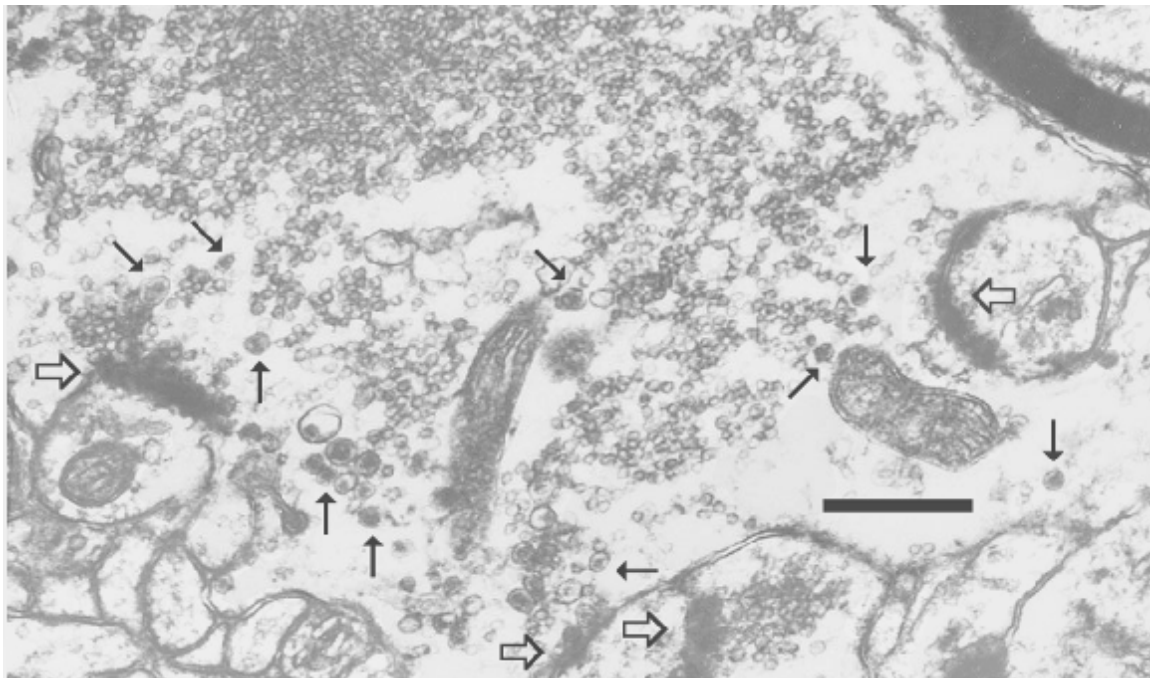


Рисунок 1. Гигантское синаптическое окончание (фрагмент) гранулярной клетки трансплантата зубчатой фации, формирующее синаптические активные зоны с дендритными шипиками соматосенсорной области неокортекса.

Обозначения: толстые контурные стрелки - синаптические активные зоны; обычные стрелки - большие пузырьки с электронно-плотной сердцевиной. Масштаб - 0,5 мкм.

Сравнительный визуальный анализ экспериментального и контрольного материала показал, что содержание и распределение пептидергических гранул по синаптоплазме резко различается. В синапсах контрольного гиппокампа они обычно располагались вне активных зон и, как правило, были приближены к плазматической мембране пресинаптического бутона. При этом только изредка встречались активные зоны, в составе которых помимо малых светлых везикул, присутствовали единичные крупные гранулярные пузырьки. В трансплантационном материале число пептидергических гранул было значительно выше в целом, и, что особенно важно, многие из них располагались в области синаптических контактов. Около некоторых активных зон наблюдалось до 10-15 гранул, и часть из них была встроена в пресинаптическую решетку синапса, что свидетельствует об участии нейропептидов в функциональном акте. Электронно-плотная осмиофильная сердцевина в разных пептидергических везикулах сильно различалась по консистенции и размеру, но никогда не заполняла полностью весь объем. Следует отметить, что возле адгезивных соединений синаптической терминали с дендритом никогда не присутствовали ни малые, содержащие глутамат, везикулы, ни крупные пептидергические гранулы.

Количественный анализ везикулярного состава гигантских синапсов в норме и в условиях трансплантации подтвердил различия, выявленные при визуальных наблюдениях. Доля пептидсодержащих гранул от общего числа пузырьков в синапсах, образованных трансплантированными нейронами с несвойственных им мишенями в неокортексе, была в 1,7 раз выше, чем в гиппокампе *in situ* ($5.8 \pm 0,6\%$ и $3.3 \pm 0,6\%$, соответственно; $p < 0,01$). Еще более значимые различия были обнаружены при подсчете синаптических активных зон, в состав которых входили большие электронно-плотные пузырьки. Если в контроле гигантские синапсы формировали такие активные зоны лишь в $7,9 \pm 1,6\%$ случаев, то в условиях эксперимента число таких функциональных сайтов возрастало до $62,3 \pm 3,4\%$, т.е. почти в 7,8 раз ($p < 0,001$).

Обсуждение

Эмбриональная нервная ткань, развиваясь в условиях трансплантации в зрелом организме, реализует высокий потенциал морфо - функциональных пластических преобразований. Трансплантированные нейроны не только приживаются и дифференцируются, но и формируют афферентные и эфферентные связи с клеточными элементами мозга реципиента. Ультраструктурный анализ позволяет выявить субклеточные механизмы, обеспечивающие адаптацию синапти-

ческого аппарата к новому микроокружению. Гигантские окончания мшистых волокон гранулярных клеток зубчатой фасции являются удобным микрообъектом для этих целей. Они обладают рядом уникальных анатомических и функциональных характеристик: гигантские размеры терминали, формирующие синаптические активные зоны с разветвленными дендритными шипами и десмосомоподобные адгезивные соединения с дендритами, а также сложный везикулярный состав, отражающий нейромедиаторное разнообразие [1, 7, 8]. Благодаря таким ярким особенностям эти синапсы легко идентифицируются в условиях трансплантации при их контакте с неспецифическими нейрональными мишенями неокортекса. Ранее мы показали, что мшистые волокна трансплантированных нейронов, заканчиваясь на атипичных мишенях в соматосенсорной области коры мозга, хотя и воспроизводят основной принцип формирования синапсов, подвергаются некоторой структурной модификации. Они имеют более мощные адгезивные соединения с поверхностью дендритов, с пресинаптической стороны которых наблюдается концентрация митохондрий, а со стороны дендрита располагаются цистерны эндоплазматического ретикула [2, 14]. В данной работе обнаружено, что при контакте с неспецифическими мишенями изменяется и нейромедиаторный статус синаптических окончаний. Известно, что основным медиатором в гигантских синапсах является глутамат, содержащийся в малых светлых везикулах и оказывающий возбуждающее воздействие [8]. С этим же типом везикул связывают и недавно обнаруженный в них тормозный нейротрансмиттер – гамма-аминомасляную кислоту [6]. Кроме того, большие гранулярные пузырьки этих синапсов являются вместилищем нескольких нейропептидов, главным образом, динорфина, энкефалина, холецистокинина [4, 5]. При иммуноцитохимическом исследовании обнаружено, что динорфин-положительные большие гранулярные пузырьки располагаются вдоль внутренней поверхности гигантской терминали и освобождают свое содержимое вне активных зон [10]. Проведенный нами качественный и количественный анализ везикулярного состава показал, что именно нейропептидный пул подвергается наибольшему изменению при формировании неспецифических синаптических контактов в условиях трансплантации. При этом выявлено не только достоверное возрастание числа гранулярных везикул, но и их перераспределение из периферийных областей синаптоплазмы к местам функциональных контактов. Значительное увеличение количества активных зон, имеющих в своем составе большие гранулярные пузырьки, свидетельствует об их

антероградном воздействии на постсинаптический нейрон через синаптические контакты. Существуют литературные данные об участии эндогенных нейропептидов в изменении функциональной активации нейронов. Так, описано увеличение количества нейропептидных гранул, усиление их подвижности и секреции в межклеточное пространство при долговременной посттетанической потенциации и развитии эпилептических разрядов [3, 10, 11, 12]. Считается, что эндогенные нейропептиды, в отличие от классических транмиттеров, оказывают экстрасинаптическое модуляторное влияние на синаптическую передачу и служат для восстановления баланса между возбуждением и торможением [9, 13]. Полученные нами данные показывают, что при организации функциональных связей в условиях трансплантации нейропептиды осуществляют эффективное воздействие на постсинаптический нейрон через синаптические активные зоны. По-видимому, они необходимы для адаптации рецептивных областей мозга к синаптическим контактам с несвойственными им в норме аксональными системами трансплантата.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 03-04-48782).

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 биологическая. 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. Gutiérrez R., Romo-Parra H., Maqueda J., Vivar C., Ramirez M. et al. //J. Neurosci. 2003. V.23. P.5594.
7. Hamlyn L.H. //J. Anat. (Lond). 1962. V.96. P.112.
8. Henze D.A., Urban N.N., Barrionuevo G. //Neurosci. 2000. V.98. No.3. P.407.
9. Mazarati A.M. //Neuropeptides. 2004. V.38. No.6. P.331.
10. Pierce J.P., Kurucz O.S., Milner T.A. //Hippocampus. 1999. V.9. P.225.
11. Shakiryanova D., Tully A., Hewes R., Deitcher D.L., Levitan E.S. //Nature Neurosci. 2005. V.8. No.2. P.173.
12. Torrealba F., Carrasco M.A. //Brain Res. Rev. 2004. V.47. P.5.
13. Wasterlain C.G., Mazarati A.M., Naylor D. et al. //Epilepsia. 2002, No.5. P.20.
14. Zhuravleva Z.N., Vinogradova O.S. //J. Neural Transpl. Plasticity. 1994. V. 5. No.3. P.169.

**THE ROLE OF PEPTIDE NEUROTRANSMITTERS IN THE ESTABLISHMENT OF
NONSPECIFIC SYNAPTIC CONTACTS AFTER TRANSPLANTATION**

Zhuravleva¹ Z.N., Ermakov¹ A.A., Zhuravlev² G.I., Zenchenko¹ K.I.

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino,*

²*Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino*

Embryonic hippocampal fascia dentate tissue was transplanted heterotopically into somatosensory neocortex of adult rats. The axons of grafted neurons grew into the recipient brain and formed synaptic contacts with unusual for them in norm structures. We compared the ultrastructural characteristics of dentate giant endings making the contacts with nonspecific targets in the neocortex and those having the typical postsynaptic sites in the hippocampus *in situ*. The quantitative analysis of the large dense-core vesicles storing the peptide neurotransmitters was carried out also. The share of the large dense-core vesicles was 1.7 times higher in an experimental material, than in the control. In addition, there was almost 7.8-fold increase in number of the synaptic active zones accumulating peptidergic vesicles. Thus, in transplant conditions the plastic reorganization of the giant synaptic endings is not confined oneself to the structural modelling, but also includes neurotransmitter mechanisms, in particular, peptidergic system.