

УДК 616.089.843:611.8

## СИНАПТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТРАНСПЛАНТАТОВ НЕРВНОЙ ТКАНИ С МОЗГОМ ЖИВОТНОГО-РЕЦИПИЕНТА

<sup>1</sup>Журавлева З.Н., <sup>2</sup>Журавлев Г.И., <sup>1</sup>Муганцева Е.А.

<sup>1</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуццино;

<sup>2</sup>Институт биофизики клетки РАН, Пуццино, e-mail: zhuravleva@iteb.ru

Проведено электронно-микроскопическое исследование структурно-химических механизмов формирования синаптических связей между трансплантатом зубчатой извилины гиппокампа и неокортексом реципиента. Показано, что функциональная интеграция сопровождается пластической реорганизацией не только аксональных терминалей трансплантированных нейронов, но и нейрональных элементов мозга-реципиента, являющихся постсинаптическими мишенями. В этот процесс активно вовлекаются эндогенные нейропептиды и молекулы клеточной адгезии.

**Ключевые слова:** нейротрансплантация, ультраструктура, зубчатая извилина, нейропептидные ко-трансммиттеры, молекулы адгезии

## SYNAPTIC INTERACTIONS OF THE NEURAL TISSUE TRANSPLANTS WITH RECIPIENT BRAIN

<sup>1</sup>Zhuravleva Z.N., <sup>2</sup>Zhuravlev G.I., <sup>1</sup>Mugantseva E.A.

<sup>1</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino;

<sup>2</sup>Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino e-mail: zhuravleva@iteb.ru

Electron-microscopic investigation of structural and functional mechanisms of synaptic interactions between the hippocampal dentate fascia transplant and recipient neocortex was carried out. The functional integration was shown to be accompanied by a plastic reorganization both axon terminals of the transplanted neurons and postsynaptic neural elements of recipient brain. The endogenous neuropeptides and cell adhesion molecules are involved in the process.

**Keywords:** neurotransplantation, ultrastructure, dentate fascia, neuropeptide co-transmitters, adhesion molecules

В настоящее время трансплантация фетальной и эмбриональной нервной ткани используется для восстановления нарушенных функций мозга в результате нейродегенеративных заболеваний, инсультов и ишемии мозга [2, 3]. Незрелая трансплантированная ткань оказывает положительное влияние на поврежденный мозг благодаря содержанию биологически активных веществ и ростовых факторов. Однако для функциональной интеграции трансплантатов с мозгом реципиента необходимо формирование между ними реципрокных аксональных связей. Работы, выполненные в последние годы, показывают, что трансплантированные нейроны формируют в мозге реципиента как адекватные, так и эктопические проекции [1, 7]. Однако молекулярные и клеточные механизмы, которые контролируют процесс формирования синаптических функциональных контактов между трансплантированной незрелой нервной тканью и зрелыми нейронами мозга реципиента, не изучены. Наибольшую загадку представляет процесс взаимной адаптации пре- и постсинаптических нейронов при гетеротопической трансплантации. В настоящей работе были изучены адаптивные изменения в ультраструктуре и везикулярном составе гигантских синапсов зубчатой извилины гиппокампа при ее трансплантации в область неокортекса, с которым она в норме не взаимодействует.

Нейромедиаторный состав гигантских синапсов хорошо известен. Основным трансммиттером в них является глутамат, содержащийся в малых светлых везикулах. Большие электронно-плотные пузырьки в этих синапсах хранят нейропептидные ко-трансммиттеры, главным образом динорфин и энкефалин [9]. Кроме мультимедиаторной системы нейроредации гигантские синаптические окончания обладают специфическим набором молекул клеточной адгезии, которые формируют выраженные адгезионные соединения с поверхностью дендритов [5, 8].

Целью работы было выяснение структурных и нейрохимических механизмов, вовлекающихся в процесс функциональной интеграции гетеротопических трансплантатов зубчатой извилины гиппокампа с соматосенсорной областью неокортекса мозга реципиента.

### Материал и методы исследования

Работа выполнена на крысах породы Вистар с соблюдением рекомендаций работы с животными, изложенными в Директивах Европейского Сообщества. Зубчатая извилина гиппокампа была выбрана в качестве донорской структуры для трансплантации, т.к. аксоны гранулярных нейронов, входящие в состав этой структуры, заканчиваются гигантскими синаптическими окончаниями, которые можно легко идентифицировать на ультраструктурном уровне. Они характеризуются большими размерами терминаль-

ных бутонов (до 5 мкм), интратерминальным способом формирования активных зон с дендритными шипиками и выраженными адгезивными соединениями с поверхностью дендритных стволов [1, 4, 11]. Эмбриональную закладку зубчатой фасции выделяли из плодов 19–20 дней гестации; реципиентами служили девять половозрелых самцов. Для трансплантации производили трепанацию черепа над соматосенсорной областью неокортекса (координаты:  $AP = + 2,0$ ;  $L = 5,5$ ) и отсасывали небольшой объем ткани мозга, куда помещали кусочек эмбриональной закладки зубчатой извилины. Через 5 месяцев мозг животных фиксировали с помощью перфузии 2,5%-м раствором глутарового альдегида. Затем из оперированного полушария выделяли трансплантат с прилежащей к нему областью неокортекса, а из противоположного – гиппокамповую формацию для контрольных исследований. Все процедуры с животными проводили под нембуталовым наркозом (40 мг/кг, внутривенно) и местной анестезией (2,0%-й новокаин, подкожно). Далее кусочки мозга разрезали на тонкие пластины, дофиксировали осмиевой кислотой и обрабатывали для электронной микроскопии по стандартной методике. Ультратонкие срезы исследовали в электронном микроскопе JEM-100B (Япония). Фотопластины с микроизображениями гигантских синапсов, полученные в микроскопе, сканировали, сохраняли в виде компьютерных файлов и производили количественный и морфометрический анализ с помощью программы UTHSCSA Image Tool. Для этого использовали не менее 50 микроизображений синаптических окончаний из контрольной и экспериментальной групп. Проводили сравнительный количественный анализ везикулярного состава и степени выраженности адгезивных соединений в гигантских синапсах в норме и после трансплантации. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента.

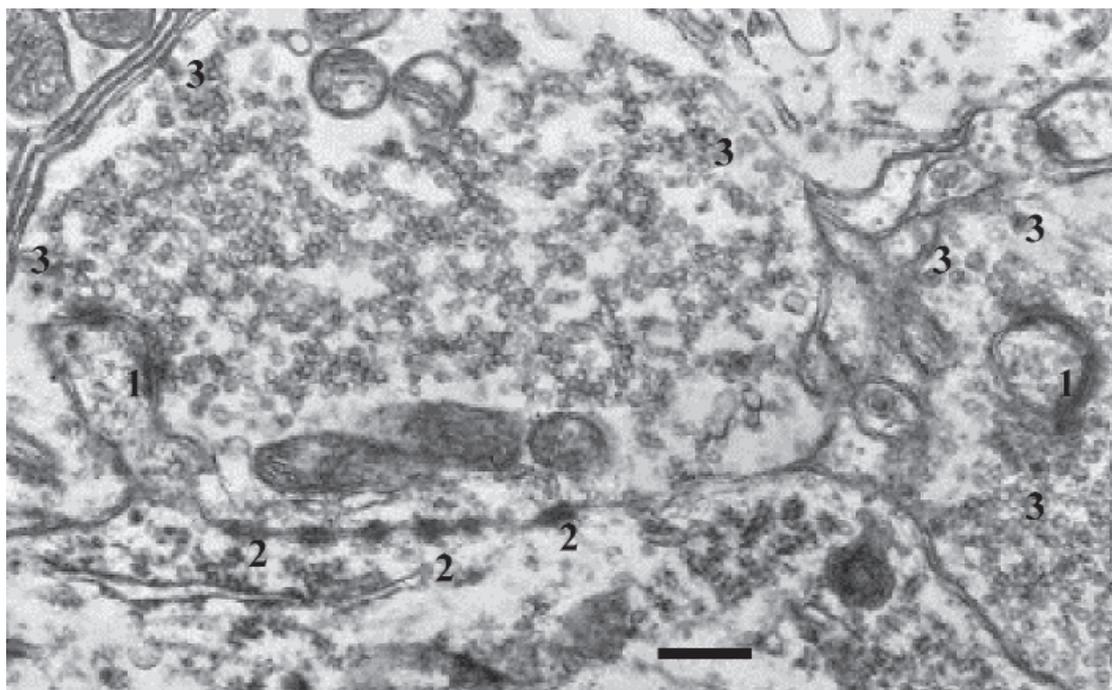
#### Результаты исследования и их обсуждение

Трансплантаты, содержащие зрелые нервные и глиальные клетки, были обнаружены у всех экспериментальных животных. Электронная микроскопия показала, что все нейроны в трансплантатах имели хорошо дифференцированные дендритные и аксональные отростки, активно вступающие в синаптические взаимодействия друг с другом. Кроме того, гранулярные нейроны также проецировали свои аксоны в мозг реципиента. Между трансплантатами и мозгом животных-реципиентов наблюдались пучки аксонов и дендритов, которые в сопровождении астроцитарных отростков проникали в мозг реципиента. Среди них идентифицировались тонкие (около 0,1 мкм в диаметре) немиелинизированные аксоны, принадлежащие трансплантированным гранулярным клеткам зубчатой извилины.

В прилежащем к трансплантату неокортексе, благодаря уникальным ультраструктурным признакам, были идентифицированы гигантские окончания аксонов

гранулярных нейронов. В мозге реципиента они контактировали с дендритами и дендритными шипиками нейронов соматосенсорной области. Такие синаптические окончания представляли собой химеры, в которых пресинаптические элементы принадлежали нейронам трансплантата, а постсинаптические элементы – нейронам животного-реципиента. Как и в норме, аксональные терминальные бутоны достигали 5–6 мкм в поперечнике, хотя некоторые их профили, обнаруженные в неокортексе, были по размерам несколько меньше. Как и в норме, они содержали два типа синаптических везикул: малые светлые везикулы и крупные нейропептидные гранулы. Эктопические гигантские синапсы гранулярных нейронов также воспроизводили два типа функциональных контактов с постсинаптическими нейронами: интратерминальные активные зоны с инвагинированными дендритными шипиками и адгезивные десмосомоподобные соединения с поверхностью дендритов. Около активных зон концентрировались синаптические везикулы, а около адгезивных соединений они всегда отсутствовали. В то же время рядом с адгезивными участками в пресинаптической части синапсов обычно присутствовали митохондрии, а в постсинаптической части – цистерны эндоплазматического ретикулума. Эктопические синаптические окончания имели морфологические признаки функционально зрелых контактов (рисунок).

При сравнении гигантских синапсов, сформированных на несвойственных им нейронных мишенях при трансплантации, с таковыми в контрольном гиппокампе выявились значительные различия в распределении больших гранулярных везикул. В норме они, как правило, были распределены равномерно по синаптоплазме, а в случаях примембранной локализации располагались вдали от синаптических активных зон. В экспериментальных условиях нейропептидные гранулы имели тенденцию скапливаться в области синаптических контактов. В эктопических гигантских синапсах по сравнению с нормой была также выявлена реорганизация адгезивных соединений. Даже визуальный электронномикроскопический анализ показал, что они более многочисленны и осмиофильны. Часто симметричные адгезионные контакты наблюдались на стволах дендритов в местах ответвления дендритных шипиков. Иногда наблюдалась транслокация адгезионных соединений на ножки дендритных шипиков и даже их пространственное слияние с синаптическими активными зонами.



*Гигантские синаптические окончания в неокортексе реципиента. Дендрит с отходящим от него дендритным шипиком расположен в нижней части фото:*

*1 – синаптические активные зоны; 2 – адгезивные контакты; 3 – большие пузырьки с электронноплотной гранулой, содержащие нейропептидные ко-трансммиттеры.  
Масштаб – 0,5 мкм*

Количественное и морфометрическое исследование гигантских синапсов в норме и после трансплантации подтвердило ультраструктурные наблюдения о значительной реорганизации их важных структурных и нейрхимических составляющих. Полученные цифровые значения представлены в таблице.

Количественный анализ нейропептид-содержащих гранул (НПГ) и адгезивных контактов (АК) в гигантских окончаниях мшистых волокон в норме и после трансплантации, ( $M \pm m$ )

Параметры	Контроль	Трансплантация
Доля НПГ от общего числа везикул в синаптической терминали, %	$3,3 \pm 0,6$	$5,8 \pm 0,6$ *
Число активных зон с НПГ	$7,9 \pm 1,6$	$62,3 \pm 3,4$ **
Среднее число АК в синапсе	$1,7 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,4$ **
Суммарная длина АК в синапсе, мкм	$0,31 \pm 0,08$	$0,71 \pm 0,42$ *
Отношение суммарной длины АК к длине аппозиции терминали к дендриту, %	$8,0 \pm 3,0$	$29,0 \pm 7,0$ *

**Примечание.** Достоверность различий: \* –  $p \leq 0,01$ , \*\* –  $p \leq 0,001$  по сравнению с контролем для каждого параметра.

Результаты статистической обработки количественных данных показали достоверные различия всех использованных для сравнения параметров. Во-первых, в эктопических гигантских синапсах были выявлены изменения в нейромедиаторном составе синапсов. Обнаружено значительное увеличение (в 1,7 раз) числа нейропептидных гранул относительно общего числа синаптических везикул. При этом число синаптических активных зон, в состав которых входили большие гранулярные пузырьки, содержащие нейропептиды, возросло в 7,9 раз. Это свидетельствует о том, что при формировании aberrантных аксональных связей нейропептидные ко-трансммиттеры воздействуют непосредственно на постсинаптические рецепторы нейронов неокортекса или модифицируют их для контакта с чужеродными аксонами. Известно, что эндогенные нейропептиды синтезируются в телах нейронов, упаковываются в большие электронноплотные пузырьки и транспортируются в аксональные терминали. Они обычно освобождаются вдали от активных зон и ретроградно модулируют выброс основного медиатора глутамата. Как правило, нейропептиды оказывают тормозное воздействие и восстанавливают баланс между возбуждением и торможением. В ряде областей мозга крысы, в том числе, и в системе мшистых волокон гиппокампа, активация

нейронов вызывает усиление секреции нейрорепептидов. Они вовлекаются в развитие долговременной посттетанической потенциации [6]. Модулирующая роль пептидной ко-трансмиссии в реорганизации нейронных связей при регенерации мозга позвоночных животных показана нами впервые.

Во-вторых, по сравнению с мозгом *in situ* в гигантских синапсах после трансплантации было выявлено значительное увеличение количества и протяженности адгезионных контактов. Отношение зон адгезии к полной длине аппозиции терминали и дендрита превосходило в 3,6 раза (см. таблицу). Необходимо подчеркнуть, что концентрация молекул клеточной адгезии в постсинаптических областях не свойственна нейронам неокортекса в норме и, по-видимому, индуцирована пресинаптическими аксональными системами нейротрансплантатов. Полученные нами ранее [11] ультраструктурные свидетельства усиления локального синтеза метаболитов в постсинаптических дендритах и дендритных шипиках эктопических синапсов подтверждают такое предположение. Прежде адгезивным соединениям в гигантских синапсах гиппокампа приписывали исключительно механическую функцию, предназначенную для прикрепления терминали к дендриту [4]. С помощью современных методов молекулярной биологии идентифицирован их сложный нейрохимический состав. В организацию этих контактов входят кадгерин-катениновая и нектин-афудиновая адгезивные системы, а также синаптическая адгезионная молекула S-SCAM. Адгезивные системы играют ключевые роли в развитии и физиологии нервной системы. Они управляют эффективностью синаптической передачи, участвуют в морфогенезе дендритных шипиков, координируют сложные биохимические сигнальные процессы в пре- и постсинапсе [8, 10]. Указанные молекулярные соединения присутствуют и в других аксональных путях мозга, однако только в окончаниях аксонов гранулярных нейронов зубчатой извилины они сконцентрированы в специфические структурные конгломераты. Возможно, эти нейрохимические особенности определяют уникальные пластические свойства гранулярных клеток, позволяющие им встраиваться в уже существующие нейронные сети во время их генеза из клеток-предшественников в зрелом мозге.

#### Заключение

Таким образом, проведенное ультраструктурное исследование показало, что гетеротопически трансплантированная эмбриональная ткань зубчатой извилины гиппокампа крысы успешно интегрируется с

помощью синаптических связей с мозгом взрослого животного-реципиента. При формировании синаптических взаимодействий между нейронами трансплантатов зубчатой извилины и нейронами соматосенсорной области неокортекса реципиента происходит взаимная структурно-химическая адаптивная реорганизация как пре-, так и постсинаптических отделов эктопических гигантских синапсов. В процессе образования и последующей стабилизации функциональных связей участвуют эндогенные нейрорепептиды и молекулы клеточной адгезии. Мы полагаем, что нейрорепептидные котрансмиттеры и адгезивные молекулы являются составной частью сложного молекулярно-клеточного механизма, координирующего установление аберрантных аксональных связей между трансплантатом и мозгом реципиента.

*Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 09-04-01136).*

#### Список литературы

1. Журавлева З.Н. Гиппокамп и нейротрансплантация // Журн. высш. нервн. деят. – 2004. – Т. 54, № 2. – С. 149–162.
2. Badylaka S.F., Nerem R.M. Progress in tissue engineering and regenerative medicine // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – Vol. 107, № 8. – P. 3285–3286.
3. Bjorklund A., Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders // Nature Neurosci. – 2000. – Vol. 3. – P. 537–544.
4. Hamlyn L.H. The fine structure of the mossy fiber endings in the hippocampus of the rabbit // J. Anat. (Lond.). – 1962. – Vol. 96. – P. 112–120.
5. Henze D.A., Urban N.N., Barrionuevo G. The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review // Neuroscience. – 2000. – Vol. 98, № 3. – P. 407–427.
6. Hökfelt T., Broberger C., Xu Z.-Q.D., Sergeev V., Ubink R., Diez M. Neuropeptides – an overview // Neuropharm. – 2000. – Vol. 39. – P. 1337–1356.
7. 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.
8. Mizoguchi A., Nakanishi H., Kimura K., Matsubara K. et al. Nectin: an adhesion molecule involved in formation of synapses // J. Cell Biol. – 2002. Vol. 156, № 3. – P. 555–565.
9. Pierce J.P., Kurucz O.S., Milner T.A. Morphometry of a peptidergic transmitter system: dynorphin B-like immunoreactivity in the rat hippocampal mossy fiber pathway before and after seizures // Hippocampus. – 1999. – Vol. 9. – P. 255–276.
10. Tai C.Y., Kim S.A., Schuman E.M. Cadherins and synaptic plasticity // Curr. Opin. Cell Biol. – 2008. – Vol. 20. – P. 567–575.
11. Zhuravleva Z.N., Vinogradova O.S. Intracortical dentate fascia grafts: mossy fiber synapses in the host neocortex // J. Neural Transpl. Plast. – 1994. – Vol. 5, № 3. – P. 169–182.

#### Рецензенты:

Архипов В.И., д.б.н., ведущий научный сотрудник учреждения Российской академии «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», г. Пущино;

Кичигина В.Ф., д.б.н., зав. лабораторией ИТЭБ РАН учреждения Российской академии «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», г. Пущино.

Работа поступила в редакцию 30.06.2011.