

УДК 616.089.843:611.8

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГЛИАЛЬНО-СИНАПТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ

¹Журавлева З.Н., ²Журавлев Г.И., ¹Муганцева Е.А.

¹ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН»,
Пуццино, e-mail: zhuravleva@iteb.ru;

²ФГБУН «Институт биофизики клетки РАН», Пуццино, e-mail: genzhur1@rambler.ru

С помощью световой и электронной микроскопии проведено исследование роли астроцитарных глиальных клеток в развитии и функционировании интраокулярных нейротрансплантатов, характеризующихся нормальной или эпилептиформной активностью. Для трансплантации в переднюю камеру глаза использовали эмбриональные закладки септума, выделенные из мозга 17-дневных плодов крыс Вистар; реципиентами служили взрослые самцы той же породы. Электрофизиологическое тестирование типа активности и микроскопическое изучение трансплантатов проводили через 3 месяца после операции. При визуальной микроскопической оценке не обнаружено различий между двумя экспериментальными группами в количестве синаптических контактов и соотношении нейронов и глиальных клеток. Морфометрический анализ показал, что размеры активных зон синапсов также не различаются. Вместе с тем, в трансплантатах с патологической активностью было обнаружено значительное уменьшение степени окружения синаптических окончаний астроцитарными отростками. Таким образом, при развитии трансплантированной нервной ткани в условиях изоляции от мозга происходит нарушение глиально-синаптических взаимодействий, что приводит к генерации эпилептиформной активности.

Ключевые слова: интраокулярная нейротрансплантация, септум, эпилептиформная активность, ультраструктура, трехчастный синапс, перисинаптические астроцитарные отростки

EXPERIMENTAL STUDY OF GLIAL-SYNAPTIC INTERACTIONS IN TRANSPLANTED NERVOUS TISSUE

¹Zhuravleva Z.N., ²Zhuravlev G.I., ¹Mugantseva E.A.

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, e-mail: zhuravleva@iteb.ru;

²Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino

Using light and electron microscopy, we studied the role of astrocytic glial cells in the development and function of intraocular grafts possessing the normal or epileptiform activity. For transplantation into the anterior eye chamber, the septal anlage from the brain of 17-day-old Wistar rat fetuses was used, and recipients were adult rat males of the same strain. The electrophysiological testing of the pattern of activity and a microscopic investigation of the grafts were performed three months after surgery. A visual microscopic examination revealed no differences between two groups of the grafts in the number of synaptic contacts, as well as the ratio of neurons and glial cells. A morphometric analysis showed that the average sizes of synaptic active zones do not differ also. However, a significant decrease in the envelopment of excitatory synaptic endings by perisynaptic astrocytic processes was observed in grafts with the pathological activity. Thus, upon the development of a transplanted nervous tissue in isolation from the brain tissue, glial-synaptic interactions are impaired, which promotes the generation of the epileptiform activity.

Keywords: intraocular transplantation, septum, epileptiform activity, ultrastructure, tripartite synapse, perisynaptic astrocytic processes

Нейротрансплантация фетальной и эмбриональной ткани используется в медицине и экспериментальной нейробиологии для восстановления поврежденных нейронов и нарушенных функций мозга [6]. В трансплантированной ткани дифференцируются типичные для донорской структуры нервные и глиальные клетки, отростки которых формируют сложный нейропиль внутри трансплантата и простираются в мозг реципиента. В организацию синаптических связей между нейронами вовлекаются отростки астроцитарных глиальных клеток. Они окружают синаптические комплексы и участвуют в физиологических процессах. На этом основании предложена концепция трехчастного синапса, в состав которого включают не только

пре- и постсинаптические компоненты, но и окружающие их астроцитарные отростки [5]. Вместе с тем, вокруг трансплантированного материала может формироваться глиомезодермальный рубец, препятствующий реципрокным взаимодействиям между трансплантатом и мозгом. В этих условиях трансплантированные нейроны образуют функциональные синаптические связи друг с другом и представляют собой источник патологической активности. Удобной экспериментальной моделью для изучения особенностей развития и функционирования изолированной нервной ткани являются интраокулярные трансплантаты. Передняя камера глаза (ПКГ), как и мозг, обладает иммунной привилегированностью, а химический состав ее содержимого аналогичен

цереброспинальной жидкости. Питание и иннервацию имплантированная ткань получает из радужной оболочки. Несмотря на дефицит нормальных афферентных источников, в трансплантатах формируется нейропиле, по плотности синаптических контактов не уступающий мозгу *in situ* [1, 2]. Большинство этих синапсов принадлежит собственным нервным элементам, что приводит к формированию в части трансплантатов замкнутых морфофункциональных сетей, в которых группы нейронов отвечают на импульсы синхронно [7]. Целью настоящей работы было сравнительное морфометрическое изучение ультраструктурных параметров синаптических окончаний в комплексе с перисинаптическими астроцитарными отростками в трансплантатах септум, характеризующихся нормальной или эпилептиформной активностью.

Материал и методы исследования

Работа выполнена на крысах породы Вистар с соблюдением рекомендаций по гуманному обращению. Все процедуры с животными проводили под нембуталовым или эфирным наркозом. В качестве донорской структуры для трансплантации использовали септальную область мозга, выделенную из плодов крыс 17 дней гестации. Имплантацию в ПКГ производили крысам-самцам путем введения донорской эмбриональной ткани специальным шприцем через разрез в роговице. Через 3 мес. после операции на основании электрофизиологического тестирования трансплантаты разделили на 2 группы: с нормальной активностью ($n = 3$) и с эпилептиформной активностью ($n = 3$). В контрольной группе на одиночный электрический стимул нейроны отвечали одиночными разрядами, а в экспериментальной группе – множественными популяционными спайками. Затем трансплантаты фиксировали для гистологического и ультраструктурного анализа. Фиксацию производили 2,5%-м раствором глутарового альдегида и дофиксацией 1%-м раствором четырехоксида осмия. Детально процедура трансплантации и подготовки материала описана ранее [1, 2]. Ультраструктурное исследование проводили на электронном микроскопе JEOL JEM-100B. Для морфометрического анализа использовали по 100 микроизображений возбуждающих синаптических окончаний из обеих экспериментальных групп. Изображения отцифровывали, сохраняли в виде компьютерных файлов и анализировали с помощью программы UTHSCSA Image Tool. Сравнение производили по следующим параметрам: размер активной зоны синапсов (по длине постсинаптического уплотнения), периметр пресинаптической терминали (Т), длина астроцитарного отростка, находящегося в контакте с терминалью (А). Степень развития глиального окружения синапса (перисинаптическая глия) вычисляли как отношение параметров А и Т. Схематическое изображение возбуждающего синапса приведено на рис. 1. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p \leq 0,05$.

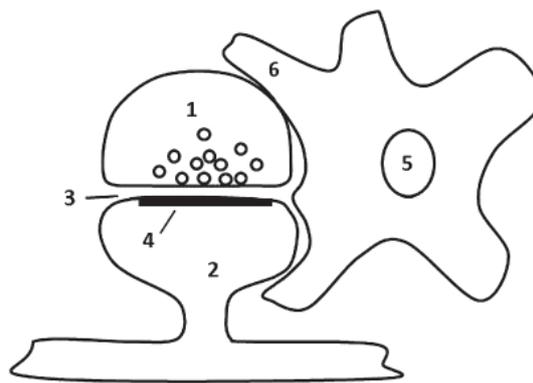


Рис. 1. Схема возбуждающего синаптического окончания в комплексе с перисинаптическим астроцитом (трехчастный синапс):

- 1 – пресинаптическая терминаль с синаптическими везикулами;
- 2 – постсинаптический дендритный шипик;
- 3 – синаптическая щель;
- 4 – постсинаптическое уплотнение;
- 5 – ядро астроцита; 6 – перисинаптический астроцитарный отросток

Результаты исследования и их обсуждение

Трансплантаты септума, развивающиеся в ПКГ в течение 3-х месяцев, представляли собой сферические или овальные образования размером 1–2 мм, располагающиеся между роговицей и радужной оболочкой. Поверхность трансплантатов была покрыта сплошной глиальной оболочкой, которая в некоторых участках была многорядной. В то же время соотношение нервных и глиальных клеток внутри трансплантатов визуально соответствовало нативной citoархитектонике септальной области мозга. Нейроны располагались диффузно, и большинство из них имело типичную для септума мультиполярную форму (рис. 2).

Электронно-микроскопическое изучение трансплантированной ткани показало, что нейроны представляют собой зрелые дифференцированные элементы, а их дендриты и аксоны активно формируют синаптические взаимодействия. Принципиально структурных различий как между самими нейронами, так и их многочисленными синаптическими связями в трансплантатах с нормальным или патологическим типом функциональной активности микроскопически не было обнаружено. Возбуждающие синаптические контакты, имеющие асимметричные активные зоны, преимущественно локализовались на дендритных шипиках, а тормозные контакты – на телах нейронов и стволах дендритов. Нейропилеальные области трансплантатов

представляли собой сложное переплетение нейрональных и глиальных отростков. Астроцитарные отростки, которые располагались вблизи синаптических окончаний, так называемые перисинаптические глиальные отростки, имели нерегулярную форму и окружали синаптические профили по периметру в разной степени. В некоторых синапсах тонкие астроцитарные

отростки находились в непосредственной близости от синаптической щели. Главной функцией астроцитарных отростков, окружающих синаптические окончания, является поддержание метаболического, ионного и трансмиссивного гомеостаза вблизи синаптического контакта. Между синапсами и перисинаптической глией существуют двунаправленные взаимодействия [9, 12].

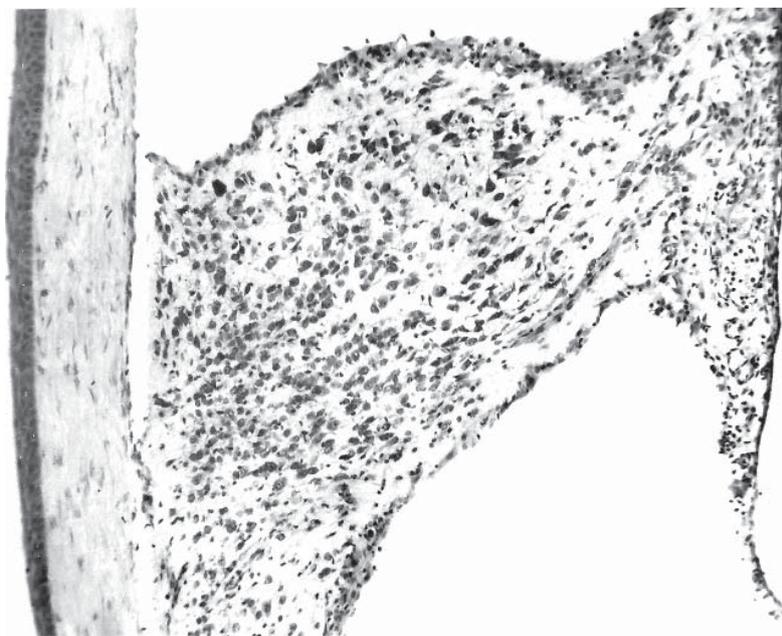


Рис. 2. Общий вид интраокулярного трансплантата септальной области мозга, развивающегося в течение 3-х месяцев:

1 – роговица; 2 – трансплантат; 3 – радужная оболочка. Масштаб – 100 мкм

Для морфометрического исследования были отобраны синаптические контакты, отвечающие структурным характеристикам возбуждающих синапсов и имеющие выраженные постсинаптические уплотнения (ПСУ). Известно, что размер постсинаптической специализации положительно коррелирует с количеством в них рецепторов и отражает силу синаптической связи [11]. В нашем материале в обеих экспериментальных группах размеры ПСУ сильно варьировались (от 0,1 до 1,28 мкм), что свидетельствует о значительной разнице функциональной силы индивидуальных синапсов. При этом в каждом из них длина ПСУ коррелировала с размером (периметр и площадь) пресинаптического boutons, содержащего синаптические везикулы с нейромедиатором. Однако при сравнении средних значений в трансплантатах с эпилептиформной и нормальной активностью эти параметры достоверно не различались. Не наблюдалось разницы также и по средним значениям площади постсинаптических дендритных шипиков (таблица). Это

является показателем того, что каждый синаптический контакт работает в своем индивидуальном режиме и его сила не определяет общую гипервозбудимость нейронов в эпилептическом фокусе. Аналогичные результаты были получены при изучении морфофункциональной корреляции в синапсах неокортекса мышей. Так, в поле бареллов при сенсорной стимуляции вибрисс общая протяженность возбуждающих активных зон не изменялась, хотя происходило значительное увеличение экспрессии транспортеров глутамата [8].

Вместе с тем, наши морфометрические данные показали, что степень астроцитарного окружения пресинаптических boutons в трансплантатах с эпилептиформной активностью в 2 раза ниже, чем в трансплантатах с нормальной активностью (см. таблицу). Известно, что терминальные разветвления отростков астроцитов очень пластичны и быстро реагируют на изменение нейрональной активности. Контролируя ионный баланс, они очищают перисинаптические пространства от ионов калия, кото-

рые в большом количестве освобождаются во время синаптической активности [12]. С помощью мембранных транспортеров они захватывают излишки нейромедиатора из синаптической щели, ограничивая его дальнейшее распространение. Возбуждающий нейромедиатор глутамат в астроцитах деактивируется в глутамин и доставляется обратно в нейроны [9, 12]. Обнаруженное нами ослабление астроцитарного барьера вокруг синапсов в трансплантатах с эпилептиформной активностью позволяет нейромедиаторам более свободно диффундировать из синаптической щели в межклеточные пространства и активировать экстрасинаптические рецепторы и соседние активные зоны. По современным представлениям межклеточные коммуникации

в мозге происходят не только при взаимодействии нервных элементов посредством аксональных волокон и синаптических контактов (wiring transmission, проводная нейропередача), но и в результате передачи нейроактивных метаболитов по экстраклеточным пространствам (volum transmission, объемная нейропередача) [4]. Более того, предполагается, что при организации нейрональных ансамблей в мозге беспозвоночных животных преобладает беспроводной, несинаптический способ трансдукции сигналов [3]. Наши результаты показывают, что в эпилептизированной ткани, развивающейся в передней камере глаза, также возрастает роль объемной передачи нейроактивных веществ, что способствует синхронизации нейрональной активности.

Данные морфометрического анализа возбуждающих синапсов в трансплантатах септума с нормальной и эпилептиформной активностью, ($M \pm m$)

Структурные параметры синапсов	Нормальная активность	Эпилептиформная активность
Длина ПСУ (мкм)	0,40 ± 0,02	0,39 ± 0,01
Площадь пресинаптического бутона (мкм ²)	0,48 ± 0,04	0,39 ± 0,04
Периметр пресинаптического бутона (мкм)	2,09 ± 0,12	1,98 ± 0,1
Степень глиального окружения	0,44 ± 0,04	0,21 ± 0,03 *
Площадь постсинаптического шипика (мкм ²)	0,14 ± 0,2	0,15 ± 0,02

Примечание. * – Достоверность различий ($p \leq 0,05$) между параметрами синапсов в трансплантатах с разной функциональной активностью.

Структурные и функциональные нарушения астроцитов в эпилептическом мозге отмечают и другие исследователи. Обычно гиперактивность и синхронизацию связывают с реактивным астроглиозом, исчезновением доменной организации астроцитов и распространением возбуждающих кальциевых волн по астроцитарным сетям [10; 12]. Однако молекулярные и клеточные основы эпилептизации чаще изучают на образцах ткани, полученных от животных с экспериментально вызванными судорогами или от больных с резистентной формой болезни после нейрохирургических операций. Морфологические изменения в такой ткани являются результатом регулярных судорожных событий и долговременной антиконвульсантной терапии. При этом нарушения в эпилептическом очаге на уровне синаптических контактов практически не исследованы. Существуют единичные данные о том, что в случаях тяжелой формы височной эпилепсии у людей параллельно с исчезновением нейронов, дендритных шипиков и синапсов разрушается и перисинаптическая глия [13]. В отличие от большинства исследований, констатирующих значительные постсудорожные дегенераци-

онные изменения в мозге, экспериментальная модель, предложенная нами, позволяет изучать начальные эпилептогенные нарушения, происходящие на субмикроскопическом уровне.

Заключение

Микроскопическое и ультраструктурное исследование интраокулярных нейротрансплантатов септума с нормальной и эпилептиформной активностью при визуальной оценке не выявило между ними различий по нейронально-глиальному соотношению и количеству синаптических контактов. Данные морфометрического анализа показали, что размеры активных зон, являющиеся показателем функциональной силы синапсов, в двух экспериментальных группах также не различаются. Вместе с тем, в трансплантатах с патологической активностью было обнаружено значительное уменьшение степени окружения синаптических окончаний астроцитарными отростками. В свете современных представлений о синапсе как трехчастном комплексе, включающем в свой состав также и перисинаптические отростки [5], такая аномалия в организации функциональных контактов

в трансплантатах с эпилептиформной активностью приводит к ухудшению обратного захвата возбуждающих нейромедиаторов, их более широкому распространению по экстраклеточным пространствам и гиперсинхронизации нейрональных ответов. Таким образом, нарушение глиально-синаптических взаимодействий, которые возникают при дифференцировке трансплантационной нервной ткани в изоляции от естественных мозговых влияний, является важным эпилептогенным фактором.

Авторы выражают благодарность А.Г. Брагину за выполнение электрофизиологического тестирования нейротрансплантатов. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 12-04-00812).

Список литературы

1. Журавлева З.Н. Гиппокамп и нейротрансплантация // Журн. высш. нервн. деят. – 2004. – Т. 54, № 2. – С. 149–162.
2. Журавлева З.Н., Косицын Н.С. Морфофункциональные взаимодействия периферических нервных волокон радужки с нейронами, развивающимися в передней камере глаза крысы // Морфология. – 2009. – Т. 135, № 3. – С. 41–46.
3. Сахаров Д.А. Множественность нейротрансмиттеров: функциональное значение // Ж. эвол. биохим. физиол. – 1990. – Т. 26, № 5. – С. 733–740.
4. Agnati L.F., Guidolin D., Guescini M., Genedani S., Fuxe K. Understanding wiring and volume transmission // Brain Res. Rev. – 2010. – Vol. 64. – P. 137–159.
5. Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner // Trends Neurosci. – 1999. – Vol. 22. – P. 208–215.
6. Bjorklund A., Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders // Nature Neurosci. – 2000. – Vol. 3. – P. 537–544.
7. Bragin A.G., Vinogradova O.S. Comparison of neuronal activity in septal and hippocampal grafts developing in the anterior eye chamber of the rat // Brain Res. – 1983. – Vol. 312, № 2. – P. 279–286.
8. Genoud C., Quairiaux C., Steiner P., Hirling H., Welker E., Knott G. Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex // Plos Biology. – 2006. – Vol. 4, № 11. – P. 2057–2064.
9. Eulenburg V., Gomez J. Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function // Brain Res Rev. – 2010. – Vol. 63, № 1–2. – P. 103–112.
10. Oberheim N.A., Tian G-F, Han X., Peng W., Takano T., Ransom B., Nedergaard M. Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain // J. Neurosci. – 2008. – Vol. 28, № 13. – P. 3264–3276.

11. Racca C., Stephenson F. A., Streit P., Roberts J.D.B., Somogyi P. NMDA receptor content of synapses in stratum radiatum of the hippocampal CA1 area // J. Neurosci. – 2000. – Vol. 20, № 7. – P. 2512–2522.

12. Seifert G., Carmignoto G., Steinhauser C. Astrocyte dysfunction in epilepsy // Brain Res. Rev. – 2010. – Vol. 63. – P. 212–221.

13. Witcher M.R., Park Y.D., Lee M.R., Sharma S., Harris K.M., Kirov S.A. Three-dimensional relationships between perisynaptic astroglia and human hippocampal synapses // Glia. – 2010. – Vol. 58, № 5. – P. 572–587.

References

1. Zhuravleva Z.N. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2005, vol. 35, no. 4, pp. 343–354.
2. Zhuravleva Z.N., Kositsyn N.S. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2010, vol. 40, no. 6, pp. 615–619.
3. Sakharov D.A. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.*, 1990, vol. 26, no. 5, pp. 733–741;
4. Agnati L.F., Guidolin D., Guescini M., Genedani S., Fuxe K., *Brain Res. Rev.*, 2010, vol. 64, pp. 137–159.
5. Araque A., Parpura V., Sanzgiri R.P., Haydon P.G. *Trends Neurosci.*, 1999, vol. 22, pp. 208–215.
6. Bjorklund A., Lindvall O. *Nature Neurosci.*, 2000, vol. 3, pp. 537–544.
7. Bragin A.G., Vinogradova O.S. *Brain Res.*, 1983, vol. 312, no. 2, pp. 279–286.
8. Genoud C., Quairiaux C., Steiner P., Hirling H., Welker E., Knott G. *Plos Biology*, 2006, vol. 4, no. 11, pp. 2057–2064.
9. Eulenburg V., Gomez J. *Brain Res. Rev.*, 2010, vol. 63, no. 1–2, pp. 103–112.
10. Oberheim N.A., Tian G-F, Han X., Peng W., Takano T., Ransom B., Nedergaard M. *J. Neurosci.*, 2008, vol. 28, no. 13, pp. 3264–3276.
11. Racca C., Stephenson F. A., Streit P., Roberts J.D.B., Somogyi P. *J. Neurosci.*, 2000, vol. 20, no. 7, pp. 2512–2522.
12. Seifert G., Carmignoto G., Steinhauser C. *Brain Res. Rev.*, 2010, vol. 63, pp. 212–221.
13. Witcher M.R., Park Y.D., Lee M.R., Sharma S., Harris K.M., Kirov S.A. *Glia*, 2010, vol. 58, no. 5, pp. 572–587.

Рецензенты:

Куликов А.В., д.б.н., зав. сектором ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН, г. Пущино;

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

Работа поступила в редакцию 10.09.2012.