

УДК 616.089.843:611.8

ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СИНАПСОВ МШИСТЫХ ВОЛОКОН ГИППОКАМПОВОЙ ФОРМАЦИИ В НОРМЕ И ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ С ПОМОЩЬЮ ЦИНК-ЙОД-ОСМИЕВОЙ ИМПРЕГНАЦИИ

¹Журавлева З.Н., ¹Ермаков А.А., ²Журавлев Г.И.

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

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

Проводили ультраструктурное изучение гигантских синаптических окончаний аксонов гранулярных клеток гиппокамповой формации (мшистых волокон) в норме и в гетеротопических трансплантатах зубчатой фасции после цинк-йод-осмиевой (ЦИО) импрегнации. Для аллотрансплантации в соматосенсорную область неокортекса взрослых крыс использовали закладку зубчатой фасции из 20-дневных плодов; трансплантаты развивались в течение 5 месяцев. Показано, что в обеих экспериментальных группах гигантские бутоны содержали гетерогенную популяцию синаптических везикул: часть (более 40%) малых светлых пузырьков реагировала с ЦИО-смесью, остальные малые пузырьки, а также большие везикулы с электроноплотной сердцевинкой, митохондрии и постсинаптические области были ЦИО-негативны. На основании обнаруженных особенностей окрашивания синаптических органелл в гигантских синапсах и анализа соответствующей литературы можно предположить, что ЦИО-позитивные органеллы имеют физиологическое значение. Кроме того, сравнительная оценка показала, что по общему числу везикул и количеству ЦИО-позитивных органелл синаптические окончания трансплантатов значительно отстают от синапсов интактного гиппокампа. Полученные данные свидетельствуют о сниженной функциональной активности гигантских синапсов в нейротрансплантатах.

Ключевые слова: гетеротопический трансплантат, гиппокамповая формация, мшистые волокна, гигантские синаптические окончания, синаптические везикулы, ЦИО-импрегнация

CYTOCHEMICAL STUDY OF MOSSY FIBER SYNAPSES IN INTACT HIPPOCAMPAL FORMATION AND AFTER TRANSPLANTATION BY THE ZINC- IODIDE-OSMIUM IMPREGNATION

¹Zhuravleva Z.N., ¹Ermakov A.A., ²Zhuravlev G.I.

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 electron microscopy and zinc-iodide-osmium (ZIO) impregnation, we studied giant synaptic endings of the granule cell axons (mossy fibers) in the intact hippocampal formation and heterotopic fascia dentate transplants. The dentate tissue anlage dissected from the brain of 20-day-old rat fetuses was used for allotransplantation into somatosensory neocortex of the adult Wistar rats. The grafts were survived during 5 months. Ultrastructural and citochemical investigations revealed heterogeneous population of the synaptic vesicles within the giant boutons in both experimental and norm cases. The reaction product was recognized in a part (over 40%) of the small clear synaptic vesicles; the remaining small vesicles and all large dense core ones were ZIO-negative. The synaptic mitochondria and postsynaptic densities were also not stained with the ZIO mixture. On the basis of above staining features of synaptic organelles in the mossy giant synapses and an analysis of the available literature reports, can be proposed that ZIO-positive organelles have a physiological significance. In addition, the comparative estimation showed that both the total number of vesicles and number of ZIO-positive organelles per unit area (1 μm²) of synaptic bouton were significantly lower in the grafts than in normal hippocampal formation. The data obtained demonstrate an impaired functional activity of the graft's mossy fiber synapses.

Keywords: heterotopic transplant, hippocampal formation, mossy fibers, giant synaptic endings, synaptic vesicles, ZIO-impregnation

Гиппокамповая формация мозга, имеющая большое значение для процессов обучения и памяти, состоит из собственно гиппокампа и зубчатой фасции. Гранулярные нейроны зубчатой фасции получают информацию из неокортекса и передают ее в гиппокамп через свои аксоны, так называемые мшистые волокна. Пучки тонких немиелинизированных аксонов следуют вдоль слоя апикальных дендритов пирамидных нейронов поля СА3 и образуют на них гигантские синаптические комплексы. Нервные

элементы этой афферентной системы гиппокампа являются чрезвычайно пластичными и подвергаются структурной и функциональной перестройке в ответ на разные внутренние и внешние воздействия [11]. Способность нейронов зубчатой фасции к пластической реорганизации проявляется также в том, что они могут генерироваться в течение всей жизни и функционально встраиваться в уже существующие нейронные сети [15]. В условиях гетеротопической нейротрансплантации они формируют

синаптические взаимодействия с нейронами, с которыми в норме не контактируют [3, 4]. По-видимому, столь высокая функциональная пластичность гранулярных нейронов зубчатой фасции обусловлена их сложным и гетерогенным нейрохимическим составом. Основным нейромедиатором синаптических окончаний гранулярных нейронов является глутамат. Во время постнатального развития и при повышенной активности дополнительно к глутамату в них экспрессируется гамма-аминомасляная кислота [9]. Гранулярные клетки, их аксоны и синаптические терминалы имеют самое большое в мозге количество ионов цинка. Кроме того, они содержат нейропептидные ко-трансммиттеры и богаты ростовыми факторами [10]. Ранее мы показали, что при формировании синапсов мшистых волокон с несвойственными им в норме нейрональными мишенями роль нейропептидных котрансммиттеров значительно возрастает [3, 4]. **Целью настоящей работы** было изучение нейрохимических особенностей синапсов мшистых волокон в норме и после нейротрансплантации с помощью цинк-йод-осмиевой импрегнации.

Материал и методы исследования

Исследование проведено на крысах породы Вистар в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009. Объектами для изучения были гиппокамповая формация интактного мозга и гетеротопические трансплантаты зубчатой фасции. Донорским материалом для трансплантации служили закладки фасции 20-дневных плодов, которые выделяли в растворе Игла под стереомикроскопом. В качестве реципиентов использовали крыс-самцов ($n = 5$) возрастом 3 мес. Трансплантацию производили в полость в соматосенсорной области неокортекса, где эмбриональная ткань развивалась в течение 5 месяцев. Более детально процедура нейротрансплантации описана ранее [1, 2]. Образцы ткани, взятые из нормального мозга (зона окончания мшистых волокон – *str. lucidum*) и из нейротрансплантатов, фиксировали 4% раствором формальдегида на фосфатном буфере, разрезали его на кусочки объемом 1 мм³ и дофиксировали 6,25% раствором глутарового альдегида. После промывки в трис-НСI буфере образцы импрегнировали в течение 16 час. при 4°C в цинк-йод-осмиевой смеси, которую готовили следующим образом. Раствор А – 6 г цинка в порошке и 2 г перекристаллизованного йода растворяли в 40 мл дистиллированной воды. Раствор Б – 4 мл фильтрованного раствора А доводили 4 мл трис-НСI до pH 7,4. Перед употреблением к 8 мл полученной смеси добавляли 2 мл 2% раствора четырехокси осмия. Затем материал обезживали в спиртах восходящей крепости и абсолютном ацетоне и заливали в эпон 812. Ультратонкие срезы контрастировали цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе. Гигантские синапсы мшистых волокон идентифицировали благодаря большим размерам синаптической терминали (до 4–6 мкм) и другим структурным признакам,

известным из литературы и собственных наблюдений [1, 14]. Сравнительный количественный анализ общего числа синаптических везикул и ЦИО-положительных органелл в гигантских синапсах гиппокамповой формации *in situ* и нейротрансплантатов проводили с помощью компьютерной программы UTHSCSA Image Tool. Для этого использовали отцифрованные электронно-микроскопические изображения гигантских синаптических бутонов и производили подсчет на площади 1 мкм² (по 25 квадратов в 4 разных вариантах эксперимента); достоверность различий определяли по критерию Стьюдента.

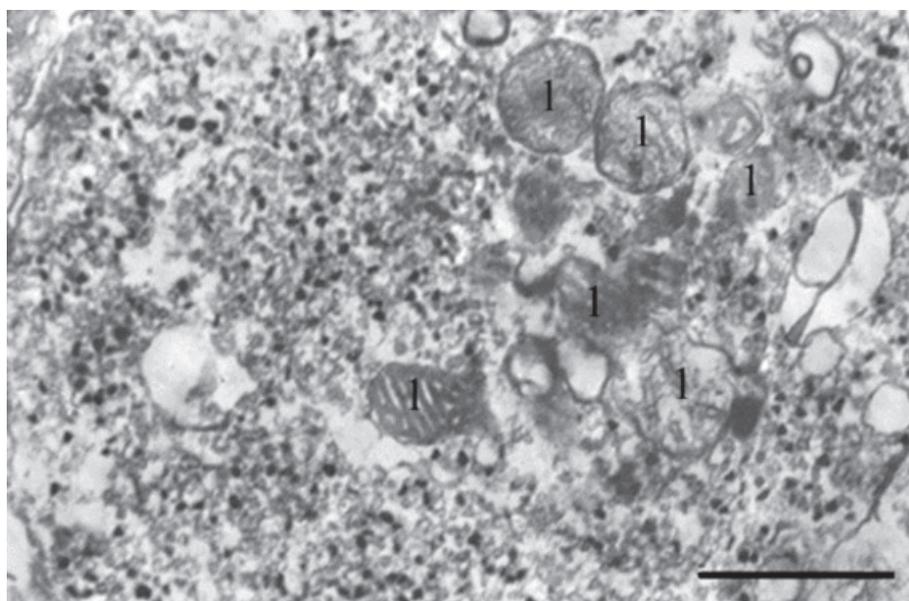
Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании полутонких срезов под световым микроскопом было обнаружено, что цинк-йод-осмиевый реагент проник в кусочки ткани не на всю глубину. Поэтому для электронной микроскопии использовали только поверхностные участки образцов. Сохранность ткани была хорошей и гигантские синаптические окончания мшистых волокон легко распознавались среди других нервных элементов как в контрольном, так и в экспериментальном материале. Огромные аксонные расширения диаметром около 5–6 мкм, густо заполненные синаптическими пузырьками, широко распластывались по апикальным дендритам пирамидных нейронов гиппокампа, образуя с ними преимущественно симметричные адгезивные соединения. Вместе с тем мшистые волокна формировали синаптические контакты с асимметричными активными зонами на инвагинированных в терминали дендритных шипиках. Хотя в трансплантированной ткани зубчатой фасции наблюдались некоторые нетипичные для нормального гиппокампа функциональные взаимодействия, их изучение не входило в задачу настоящей работы. Основные особенности ультраструктуры гетеротопических нейротрансплантатов были нами описаны ранее [1]. Электронно-микроскопическое изучение обоих типов образцов после проведения ЦИО-импрегнации показало, что продукт реакции выявлялся не только в гигантских аксональных бутонах, но и в более мелких синаптических профилях. К сожалению, достоверно определить происхождение синаптических бутонов малого размера не представлялось возможным, и они для настоящего анализа не использовались, хотя и могли быть перерезанными фрагментами крупных терминалей мшистых волокон.

Характер распределения продукта импрегнации в гигантских синаптических окончаниях нормальной гиппокамповой формации и в нейротрансплантатах зубчатой фасции был аналогичен. При этом была выявлена определенная специфичность

проведенной реакции, выражающаяся в том, что реакционный продукт четко ассоциировался с малыми (около 40 нм в диаметре) светлыми синаптическими пузырьками, в то время как митохондрии и постсинаптические плотности были всегда негативны (рисунок). Большие везикулы диаметром 80–120 нм с осмиофильной сердцевиной, которые в гигантских синапсах мшистых волокон являются вместилищем нейропептидных ко-трансммиттеров, также никогда не реагировали с ЦИО-реагентом. Гранулы ЦИО-преципитата по размеру варьировались от 20 до 60 нм в диаметре и распределялись по аксоплазме не равномерно, а формировали не очень выраженные скопления. Редкие везикулы с положительной реакцией наблюдались также в непосредственном контакте с плазматической мембраной. В некоторых синаптических окончаниях, как правило, имеющих более осмиофильный матрикс, окрашенные везикулы концентрировались в области активных зон. В большинстве синаптических везикул продукт реакции плотно заполнял внутренний объем, а особенно крупные, грубые конгломераты неправильной формы даже выходили за границу пузырьков. В то же время некоторые пузырьки были заполнены продуктом реакции только частично, а иногда ЦИО-окрашенные зерна точечного размера

лишь контурировали везикулярные мембраны. Часть окрашенных пузырьков имела овальную форму, напоминая эллипсоидные синаптические везикулы, которые типичны для тормозных синапсов, хранящих гамма-аминомасляную кислоту. Возможно, окрашенные эллипсоидные везикулы в нашем материале также имеют отношение к хранению тормозного нейромедиатора. В пользу такого предположения говорят данные об обнаружении в системе мшистых волокон помимо основного нейромедиатора глутамата гамма-аминомасляной кислоты, количество которой увеличивается при развитии и функциональной нагрузке [9]. Визуальная оценка наших препаратов указывает на возрастание числа эллипсоидных везикул в гигантских синапсах трансплантированной зубчатой фасции. Взаимодействие ЦИО-реагента с везикулами разной нейромедиаторной природы свидетельствует о том, что он имеет химическое сродство не к самим трансмиттерам, а к неким субстратам, связанным с их метаболизмом или функционированием. Кроме синаптических пузырьков реакционный продукт выявлялся в тубулярных цистернах эндоплазматического ретикулума и лизосомоподобных телах, которые присутствуют в пресинаптических бутонах мшистых волокон и участвуют в рециклировании везикул.



Гигантский синаптический бутон мшистого волокна из гиппокамповой формации in situ. Темные гранулы – ЦИО-положительные синаптические везикулы; 1 – ЦИО-негативные митохондрии. Масштаб – 0,5 мкм

Сравнительная количественная оценка везикулярного состава в расчете на 1 мкм² поперечных сечений гигантских окончаний в нормальном гиппокампе и в транс-

плантатах показала уменьшение числа как ЦИО-положительных, так и ЦИО-отрицательных органелл в трансплантированной ткани. Наиболее заметная разница средних

величин была обнаружена при подсчете числа ЦИО-положительных гранул ($101,1 \pm 5,5$ в норме и $83,0 \pm 3,0$ в нейротрансплантатах; $p < 0,01$). Менее значимые различия двух экспериментальных групп были выявлены при сравнении общего пула синаптических пузырьков ($226,3 \pm 9,0$ в норме и $200,1 \pm 6,1$ в нейротрансплантатах; $p \leq 0,025$). При этом доля ЦИО-положительных пузырьков в общей популяции синаптических везикул также была ниже в категории синапсов из трансплантатов зубчатой фасции. Если в синаптических окончаниях нормального гиппокампа она составляла $0,450 \pm 0,012$ (или 45%), то в синапсах нейротрансплантатов – только $0,414 \pm 0,013$ (или 41,4%); различия достоверны при $p \leq 0,05$. Известно, что число везикул в терминальных бутонах наряду с другими параметрами синаптических окончаний коррелирует с функциональной активностью синапсов [13]. Проведенный нами анализ общего количества везикул свидетельствует о том, что гигантские синапсы, развивающиеся в гетеротопических трансплантатах зубчатой фасции, функционируют менее активно, чем таковые в мозге *in situ*. Кроме того, из полученных данных следует, что метаболиты синаптических везикул, вступающие в реакцию с ЦИО-смесью, также ответственны за интенсивность нейрореперации в этом типе синапсов.

Химическая основа окрашивания ЦИО-реагентом пока окончательно не ясна. Сначала его предлагали применять для обнаружения ацетилхолина в синаптических пузырьках нервно-мышечных синапсов [5]. Затем другие авторы обнаружили, что при определенных условиях в симпатических ганглионарных нервах он выявляет моноаминергические нейромедиаторы [7]. Рентгено-структурный анализ ЦИО-преципитата показал, что осмиевокислый цинк ассоциируется с субклеточными местами, обладающими высокой аффинностью к бивалентным ионам кальция. При этом ЦИО-смесь взаимодействует с этими локусами через сульфгидрильные группы, замещая ионы кальция в белковых макромолекулах [8]. В условиях наших экспериментов основными ЦИО-положительными субклеточными органеллами были синаптические везикулы малого размера. Из литературы известно, что в них присутствует несколько $\text{Ca}(2+)$ -связывающих белков, таких как синаптофизин, синаптотагмин, синаптобревин. Синаптотагмин 1, например, вовлекается в быстрый процесс везикулярного захвата и секвестирования ионов кальция, используя $\text{Ca}(2+)/\text{H}(+)$ антипорт [6]. Этот

белок также участвует в эндо-экзоцитозе синаптических пузырьков и в синхронизации синаптической передачи [12]. Однако следует отметить, что в нашем материале ЦИО-реакция затрагивает не все интраклеточные хранилища ионов кальция. Во-первых, продукт реакции не выявляется в главном депо кальция, синаптических митохондриях, осуществляющих основной гомеостатический контроль этих ионов в пресинаптических бутонах. Во-вторых, лишены преципитата постсинаптические отделы синаптических комплексов, содержащие кальций-связывающие белки потенциал-зависимых ионотропных каналов. Известно, что в гигантских синапсах гиппокампальной формации важные модулирующие влияния на синаптическую передачу оказывают ионы цинка, которые также локализуются в малых светлых глутаматергических везикулах [10]. Возможно, в условиях нашего эксперимента с реагентами ЦИО-смеси через сульфгидрильные группы могут взаимодействовать также бивалентные ионы цинка.

Заключение

Таким образом, данные ультраструктурного и цитохимического анализа показали, что окончания мшистых волокон гиппокампальной формации как в норме, так и после ее гетеротопической трансплантации в неокортексе, содержат гетерогенную популяцию синаптических пузырьков. При этом более 40% малых светлых синаптических везикул реагировали с ЦИО-реагентом, остальные везикулы малого размера и крупные пузырьки с осмиофильной сердцевиной не содержали ЦИО-преципитата. Митохондрии и постсинаптические плотности также не взаимодействовали с реакционной смесью. Характер распределения ЦИО-позитивных везикул внутри синаптических бутонных был сходным в обеих экспериментальных вариантах. Вместе с тем количественный анализ везикулярного состава обнаружил между ними значительную разницу. В синаптических бутонах трансплантатов по сравнению с нормой было уменьшено не только общее количество пузырьков, но и число ЦИО-положительных органелл. Это свидетельствует о сниженной функциональной активности синапсов в трансплантатах. При сопоставлении полученных и литературных данных сделано заключение, что реагенты ЦИО-смеси взаимодействуют с локусами синаптических везикул, обладающими химическим сродством к бивалентным ионам, таким как кальций и цинк. В связи с этим можно заключить, что ЦИО-импрегнация субсинаптических органелл может быть

одним из маркеров интенсивности функциональных процессов в гигантских синапсах мшистых волокон.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 12-04-00812).

Список литературы

1. Журавлева З.Н. Дифференцировка нейронов и синапсов мшистых волокон в трансплантатах зубчатой фации, развивающейся в неокортексе крыс // *Онтогенез*. – 1998. – Т. 29, № 2. – С. 85–91.
2. Журавлева З.Н., Ермаков А.А., Журавлев Г.И. Вовлечение нейропептидных механизмов в процесс интеграции гетеротопических трансплантатов зубчатой фации с мозгом реципиента // *Журн. высш. нервн. деят.* – 2007. – Т. 57, № 2. – С. 205–209.
3. Журавлева З.Н., Журавлев Г.И., Муганцева Е.А. Синаптические взаимодействия трансплантатов нервной ткани с мозгом животного-реципиента // *Фунд. исслед.* – 2011. – № 10, часть 3. – С. 577–580.
4. Журавлева З.Н., Хуцян С.С. Структурные признаки динамического состояния синаптических контактов между нейротрансплантатом и мозгом // *Бюлл. экспер. биол. мед.* – 2013. – Т. 156, № 10. – С. 433–437.
5. Akert K., Kawana E., Sandri C. ZIO-positive and ZIO-negative vesicles in nerve terminals // *Prog. Brain Res.* – 1971. – Vol. 34. – P. 305–317.
6. Cordeiro J.M., Boda B., Gonçalves P.P., Dunant Y. Synaptotagmin I is required for vesicular Ca²⁺/H⁺ -antiport activity // *J. Neurochem.* – 2013. – Vol. 126, № 1. – P. 37–46.
7. De Iraldi A.P. Localizing-SH groups in monoaminergic synaptic vesicles with the mixture of zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) // *Brain Res.* – 1975. – Vol. 94. – P. 363–367.
8. Gilloteaux J., Naud J. The zinc-iodide osmium tetroxide staining-fixative of Maillet. Nature of the precipitate studied by X-ray microanalysis and detection of Ca⁺⁺-affinity subcellular sites in a tonic smooth muscle // *Histochem.* – 1979. – Vol. 63. – P. 227–243.
9. Gutierrez R. The dual glutamatergic-GABAergic phenotype of hippocampal granule cells // *Trends Neurosci.* – 2005. – Vol. 28. – P. 297–303.
10. Henze D.A., Urban N.N., Barrionuevo G. The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review // *Neurosci.* – 2000. – Vol. 98, № 3. – P. 407–427.
11. Nicoll R.A., Schmitz D. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2005. – Vol. 6. – P. 863–876.
12. Nishiki T., Augustine G.J. Synaptotagmin I synchronizes transmitter release in mouse hippocampal neurons // *J. Neurosci.* – 2004. – Vol. 24, № 27. – P. 6127–6132.
13. Rollenhagen A., Lübke J.H. The morphology of excitatory central synapses: from structure to function // *Cell Tissue Res.* – 2006. – Vol. 326. – P. 221–237.

14. Rollenhagen A., Sätzler K., Rodríguez E.P., Jonas P., Frotscher M., Lübke J.H. Structural determinants of transmission at large hippocampal mossy fiber synapses // *J. Neurosci.* – 2007. – Vol. 27, № 39. – P. 10434–10444.

15. Toni N., Laplagne D.A., Zhao C., Lombardi G., Ribak C.E., Gage F.H., Schinder A.F. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells // *Nat. Neurosci.* – 2008. – Vol. 11. – P. 901–907.

References

1. Zhuravleva Z.N. *Rus. J. Development. Biol.*, 1998, vol. 29, no. 2, pp. 44–50
2. Zhuravleva Z.N., Ermakov A.A., Zhuravlev G.I. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2008, vol. 38, no. 3, pp. 309–312.
3. Zhuravleva Z.N., Zhuravlev G.I., Mugantseva E.A. *Fundamental. Issledov.*, 2011, no. 10 (3), pp. 577–580.
4. Zhuravleva Z.N., Khutsyan S.S. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2013, vol. 156, no. 10, pp. 433–437.
5. Akert K., Kawana E., Sandri C. *Prog. Brain Res.*, 1971, vol. 34, pp. 305–317.
6. Cordeiro J.M., Boda B., Gonçalves P.P., Dunant Y. *J. Neurochem.*, 2013, vol. 126, no. 1, pp. 37–46.
7. De Iraldi A.P. *Brain Res.*, 1975, vol. 94, pp. 363–367.
8. Gilloteaux J., Naud J. *Histochem.*, 1979, vol. 63, pp. 227–243.
9. Gutierrez R. *Trends Neurosci.*, 2005, vol. 28, pp. 297–303.
10. Henze D.A., Urban N.N., Barrionuevo G. *Neurosci.*, 2000, vol. 98, no. 3, pp. 407–427.
11. Nicoll R.A., Schmitz D. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2005, vol. 6, pp. 863–876.
12. Nishiki T., Augustine G.J. *J. Neurosci.*, 2004, vol. 24, no. 27, pp. 6127–6132.
13. Rollenhagen A., Lübke J.H. *Cell Tissue Res.*, 2006, vol. 326, pp. 221–237.
14. Rollenhagen A., Sätzler K., Rodríguez E.P., Jonas P., Frotscher M., Lübke J.H. *J. Neurosci.*, 2007, vol. 27, no. 39, pp. 10434–10444.
15. Toni N., Laplagne D.A., Zhao C., Lombardi G., Ribak C.E., Gage F.H., Schinder A.F. *Nat. Neurosci.*, 2008, vol. 11, pp. 901–907.

Рецензенты:

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

Работа поступила в редакцию 30.11.2013.