

Е. Ю. Кириченко¹, А. Г. Сухов¹, А. К. Логвинов¹ и П. Е. Повилайтите²

АНАЛИЗ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПОЛОЖЕНИЯ ЩЕЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ ОТНОСИТЕЛЬНО ХИМИЧЕСКИХ СИНАПСОВ НА СЕРИЙНЫХ УЛЬТРАТОНКИХ СРЕЗАХ БАРЕЛЬНОЙ КОРЫ КРЫС

¹ Отдел нейронных сетей (зав. — д-р биол. наук А. Г. Сухов), Научно-исследовательский институт нейрокибернетики им. А. Б. Когана Южного Федерального университета; ² отдел экспериментальной патоморфологии и электронной микроскопии (зав. — канд. биол. наук П. Е. Повилайтите), ГБУ Ростовской области «Патологоанатомическое бюро», г. Ростов-на-Дону, e-mail: kiriche.evgeniya@yandex.ru

Электронно-микроскопическое исследование щелевых соединений (ЩС) на серийных срезах баррельной коры крыс показало, что ЩС контактируют с одним или обоими отростками, формирующими химический синапс, причем на одиночных срезах такие связи проследить невозможно. На серийных срезах в одном поле зрения можно наблюдать два ЩС в непосредственной близости друг от друга, при этом, каждое ЩС прослеживалось на 2–3 срезах из серии. Учитывая описанные варианты расположения ЩС в коре, предполагается, что ЩС могут являться структурной основой локальной синхронизации биоэлектрической активности не только на пост-, но и на пресинаптическом уровне, а формирование ЩС происходит как до, так и после развития химических синапсов.

Ключевые слова: головной мозг, баррельная кора, щелевые соединения, серийные срезы, химические синапсы, крыса

Развитие нервной системы сопровождается формированием нейронных ансамблей, объединенных не только химическими синапсами, но и щелевыми соединениями (ЩС). Исследования ЩС и их роли в различных структурах нервной ткани позволяют предположить, что они имеют важное значение в процессах дифференцировки нейронов [4], радиальной миграции нейробластов [6], апоптоза [9]. Кроме того, наличие ЩС в коре мозга может способствовать нормальному формированию химических синапсов [12].

В проведенных нами ранее электронно-микроскопических исследованиях соматической коры крыс было показано, что обнаружить отдельно расположенные ЩС без многочисленного микроокружения из преимущественно асимметричных химических синапсов не представляется возможным [2, 3]. Близкое расположение обоих типов контактов предполагает возможность их совместного участия в процессе локальной синхронизации, которая обеспечивает ритмогенез коры.

Цель настоящего исследования — изучение расположения ЩС относительно химических синапсов и пространственных взаимоотношений этих типов контактов с близлежащими структурами в баррельной коре мозга крыс (баррели — citoархитектонические группировки нейронов в форме бочонков, или баррелей, являющиеся зоной проекции вибрисс).

Материал и методы. Работа выполнена на 3 беспородных лабораторных крысах (самцах) в возрасте от 6 мес до

1 года. Содержание животных и эксперименты осуществляли согласно «Правилам проведения работ с использованием лабораторных животных» (приказ №755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Под глубоким эфирным наркозом животным вводили нембутал в дозе 60 мг/кг и проводили транскардиальную перфузию изотоническим и фиксирующим растворами по методу, описанному ранее [2]. После окончания перфузии головной мозг извлекали, на вибраторе VT 1000E (Leica, Германия) изготавливали тангенциальные срезы толщиной 100 мкм баррельного поля сенсомоторной коры. Срезы обрабатывали общепринятыми методами для электронно-микроскопического исследования [5]. Ультратонкие срезы толщиной 70 нм изготавливали на ультрамикротоме Ultracut-E (Leica, Германия), получали серии из 6–12 срезов, которые снимали на бленды с формваровой подложкой и стабилизирующим углеродным напылением. Срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе EM-208 (Philips, Нидерланды) со встроенной CCD TV-камерой (Gatan, США) и Jem 1011 (Jeol, Япония) со встроенной цифровой камерой Erlangshen ES500W (Gatan, США, Канада). Для измерения расстояний между отдельными синапсами использовали прикладную лицензионную программу анализа изображений DigitalMicrograph (Gatan, США).

Всего на 7 различных сериях срезов просмотрено 10 ЩС. Анализ начинали с центрального среза каждой серии, на нем находили ЩС, которое потом исследовали и на других срезах серии.

Результаты исследования. Изучение серийных срезов показало, что все электрические синапсы или ЩС, включая те, которые на одиночных срезах не имеют связи с химическими синаптическими контактами, при анализе их расположения в объеме, на самом деле, контактируют с одним или с обоими отростками, фор-

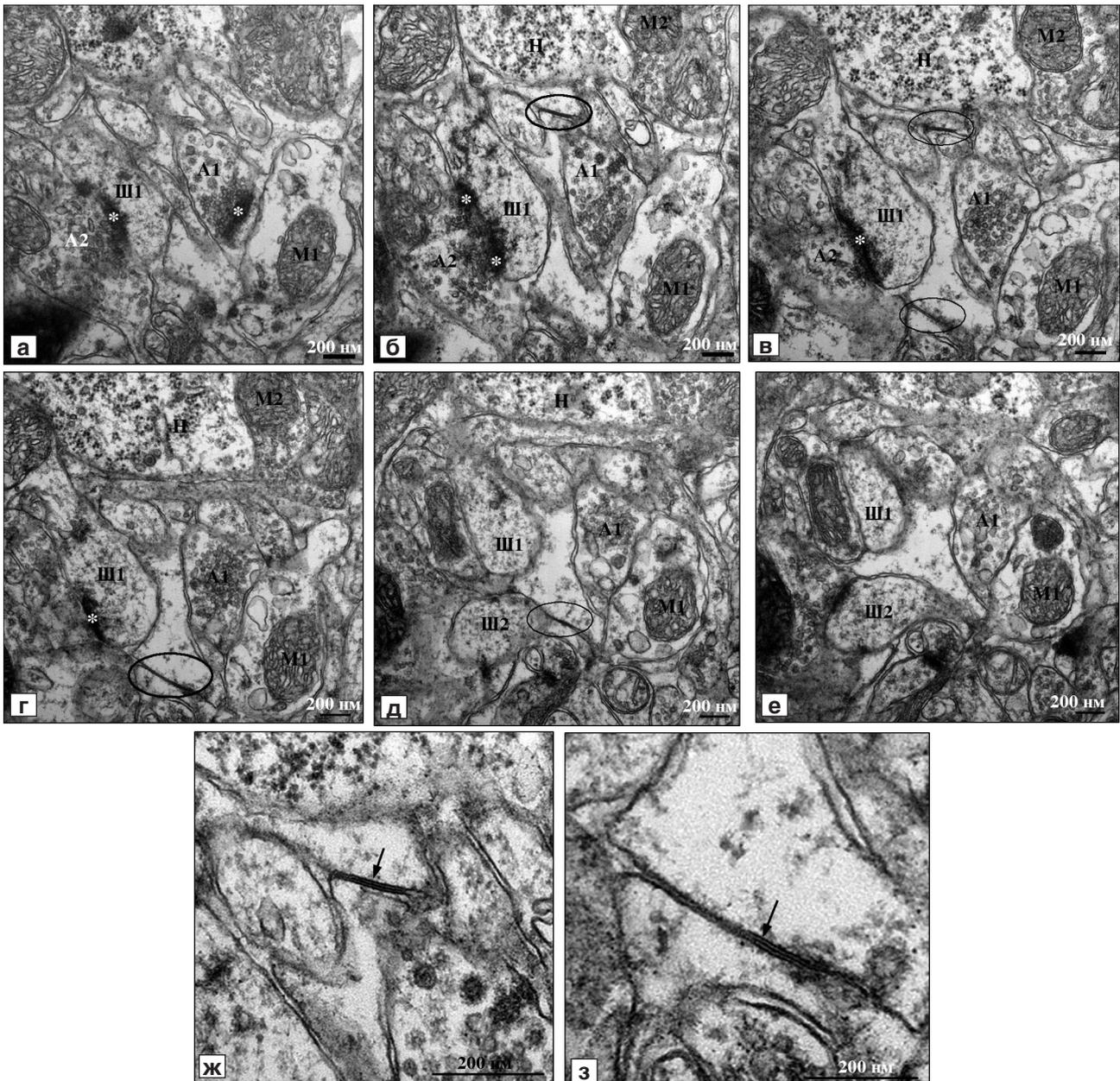


Рис. 1. Расположение щелевых соединений (ЩС) и аксо-шиповых синапсов баррельной коры мозга крысы на серийных срезах.

а — первый срез. Видны аксоны и шипик, митохондрия и несколько химических синапсов; б — второй срез. Овалом обозначено ЩС между отростками нейрона, один из которых мембранами контактирует с шипиком и аксоном, а второй — с мембраной нейрона; в — третий срез. Наблюдается такая же картина — ЩС находится в плоскости среза, что видно при большем увеличении (см. рисунок, ж); г — четвертый срез. Первое ЩС исчезает из поля зрения, но на противоположном конце отростка, на котором оно формировалось, появляется второе ЩС с более протяженной плотной зоной контакта (овал); д — пятый срез. Видно, что отростки нейрона, между которыми формируется ЩС, контактируют с двумя шипиками, один из которых на предыдущих четырех срезах формировал аксо-шиповый химический синапс; е — шестой срез. Второе ЩС пропадает, однако второй шипик также формирует аксо-шиповый химический синапс; ж — участок второго среза (очерченный участок рисунка б). Типичная ультраструктура первого ЩС; з — участок четвертого среза (очерченный участок рисунка г), где плотная зона второго ЩС находится в плоскости среза. Звездочка — активная зона химического синапса; овал — область формирования ЩС; А1 и А2 — аксоны; Ш1 и Ш2 — шипики; Н — нейрон; М1 и М2 — митохондрии; стрелки — ЩС.

мирующими химический аксо-шиповый или аксо-дендритный синапс. При этом, как правило, как минимум на одном из срезов серии было видно близкое расположение ЩС и синаптической щели химического синапса. Кроме того, во всех исследованных сериях срезов рядом с первым

ЩС в непосредственной близости появилось другое ЩС. На одном или нескольких срезах серии можно было видеть оба эти контакта в одном поле зрения.

Мы анализировали несколько серий электронно-микроскопических фотографий, на каждой из

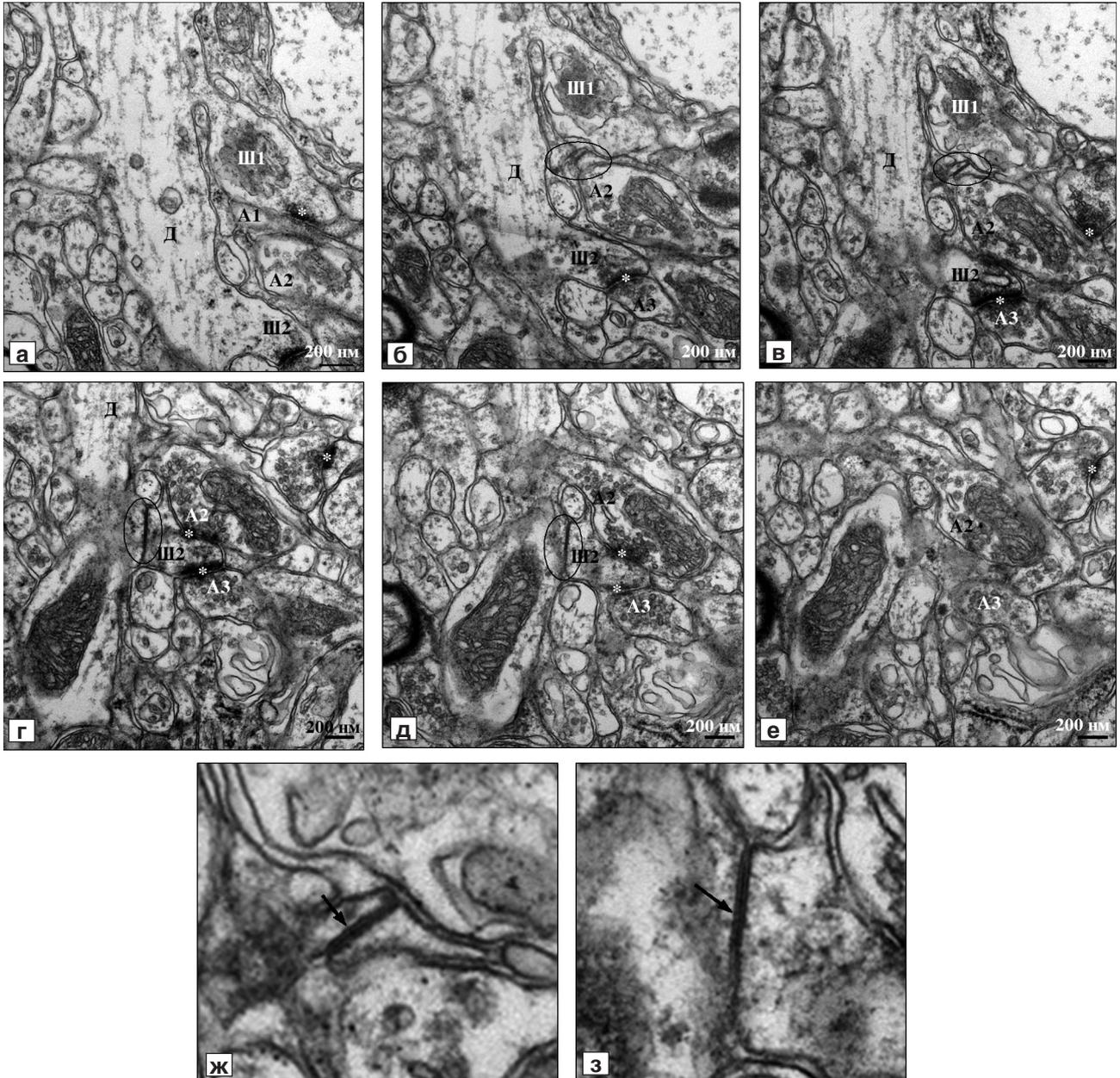


Рис. 2. Щелевые соединения (ЩС) в баррельной коре мозга крысы рядом со стволом дендрита на серийных срезах.

а — первый срез; б — второй срез; появившееся ЩС отмечено овалом; в — структура ЩС находится в плоскости среза; г — первое ЩС исчезло, овалом отмечено второе ЩС; д — второе ЩС в плоскости среза; е — второе ЩС исчезло; ж — первое ЩС при большом увеличении (очерченный участок рисунка в); з — второе ЩС (очерченный участок рисунка д). А3 — аксон; Д — дендрит. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

которых одно и то же ЩС исследовано от момента его появления до исчезновения из поля зрения.

На рис. 1 представлено ЩС на различных срезах одной из серий. На электронномикроскопических фотографиях для ориентировки отмечено несколько митохондрий, которые видны на большинстве срезов этой серии, также показаны синаптические щели химических синапсов и ЩС.

Анализ срезов данной серии показал, что отдельные ЩС выявляются обычно только на 3–4 последовательных срезах, т.е. на протяжении до

210–280 нм, после чего их структура уже не видна (см. рис. 1).

На других сериях срезов наблюдалась сходная картина расположения обоих типов контактов: в серии на двух или трех срезах подряд было видно одно ЩС между двумя нейрональными отростками, один из которых на следующих срезах оказывался аксоном или шипиком, который, в свою очередь, формировал аксо-шиповый химический синапс. Когда первое ЩС на следующих срезах серии пропадало, рядом с аксо-шиповым химическим синапсом в поле зрения появлялось другое ЩС (рис. 2).

Измерение расстояний между синаптическими контактами баррельной коры как на серийных, так и на одиночных срезах показало, что среднее расстояние между ЩС, как и расстояние между химическими синапсами, было в 2–3 раза больше, чем расстояние между ЩС и химическим синапсом.

Исследование баррельной коры на серийных срезах позволяет определить среднюю протяженность ЩС в объеме. На большинстве серий зона ЩС прослеживалась на 2–3 срезах, учитывая толщину каждого среза (70 нм), можно заключить, что в среднем размер одного ЩС не превышает 200–280 нм.

Таким образом, на всех срезах исследованных нами серий обнаруживались близко расположенные химические асимметричные синапсы и ЩС. На серийных срезах прослеживается контакт мембран отростков, образующих ЩС с отростками — аксонами, дендритами, шипиками, формирующими химические аксо-дендритные и аксо-шипиковые синапсы. На отдельных срезах ЩС расположено так, что находится в непосредственной близости от активной зоны химического синапса, на других срезах серии наблюдается только контакт плазмолемм отростков в синапсах различного типа. Во всех проанализированных сериях на отдельных срезах можно видеть 2 различных ЩС, т.е., по-видимому, ЩС расположены парами и относительно близко не только к химическим синапсам, но и друг к другу.

Обсуждение полученных данных. Сведения о более позднем формировании химических синапсов по сравнению с ЩС [8, 11] ставят очень важный вопрос о формах и способах взаимодействия обоих типов контактов не только в онтогенезе, но и в механизмах локальной и дистантной синхронизации активности нейронных ансамблей [1]. Полученные нами результаты при исследовании ЩС на серийных срезах, так же как и ранее полученные данные при изучении одиночных срезов [2, 3], свидетельствуют о том, что практически все ЩС расположены рядом с химическими синапсами, находятся с ними в тесной связи и даже контактируют с ними. В пользу теории их взаимной скооперированной деятельности может свидетельствовать и очень малое расстояние между ЩС и химическими синапсами, в то время как различные ЩС расположены значительно дальше друг от друга.

На проанализированных нами сериях срезов в основном наблюдались контакты плазмолеммы одного из отростков, формирующих ЩС, с плазмолеммой шипика, формирующего химический синапс, т.е. с постсинаптической частью

химического синапса. Кроме того, пресинаптические части — аксоны аксо-дендритных и аксо-шипиковых синапсов формировали и ЩС, и химические синапсы одновременно, что было показано ранее [2]. При этом такие случаи, когда оба типа межклеточных контактов расположены рядом или даже на одном отростке, в соматической коре не являются редкостью, как было отмечено и на одиночных срезах [3]. В немногочисленных работах, проведенных с использованием серийных срезов, было также показано расположение ЩС и химических синапсов рядом и даже на одном структурном элементе [7], была отмечена и возможность существования аксо-аксональных ЩС [10]. Учитывая такие варианты расположения ЩС, можно предположить, что они играют функциональную роль в локальной синхронизации активности нейронов одного ансамбля на пресинаптическом уровне. Поскольку конечные внутрикорковые разветвления одиночных афферентных аксонов имеют дивергентный расходящийся характер, то, скорее всего, тесно прилегающие друг к другу химические синапсы, связанные электрическим контактом, принадлежат разным восходящим аксонам нейронов, участвующих в образовании таламокортикальных связей. При этом, появление потенциала действия в одном из контактирующих синапсов может приводить к электротоническому развитию потенциала действия в соседнем синапсе благодаря электротонической передаче через ЩС с низким сопротивлением и последующим антидромным распространением этого потенциала по внутрикорковым разветвлениям второго аксона таламокортикального пути по типу аксон-рефлекса с синхронной активацией других синаптических контактов второго аксона. Как уже отмечалось, исследования онтогенетических аспектов синаптогенеза показывают, что ЩС формируются раньше, чем химические синапсы [6, 12]. В то же время, близкое расположение и взаимосвязь ЩС и химических синапсов в зрелой специализированной структуре мозга — баррельной коре, а также описанное нами ранее наличие ЩС непосредственно на пре- и постсинаптических мембранах химических синапсов [2, 3], свидетельствуют о вероятности формирования ЩС и позже начала закладки химических синапсов в онтогенезе, в том числе, для обеспечения синхронизации осцилляторной активности контактирующих элементов за счет не только химического, но и электротонического взаимодействия.

Изучая ЩС на серийных срезах, мы пришли к выводу, что существуют трудности в установлении истинного соотношения количества ЩС и химических синапсов в коре. Благодаря окру-

глой форме, отчетливо выраженному постсинаптическому уплотнению и наличию пузырьков в пресинаптической части химические синапсы на электронно-микроскопических фотографиях выявляются лучше, вне зависимости от того, тангенциально, сагиттально или фронтально ориентирован срез.

В нашем исследовании ЩС возможно было выявить только в том случае, когда его плотная протяженная структура оптимально ориентирована вдоль плоскости среза, структуру тангенциально срезаемых ЩС нам идентифицировать не удалось, хотя для химических синапсов это возможно. Кроме того, на всех изученных нами сериях срезов ЩС были видны в основном на трех срезах подряд, что позволяет предположить, что протяженность области плотного прилегания мембран ЩС составляет не менее 200 нм. Таким образом, количество ЩС может значительно превышать то количество в коре, которое мы получили в наших предыдущих морфометрических исследованиях на одиночных срезах. Установление истинного количества ЩС в коре является важным для понимания функций этих контактов, а также для анализа строения нейронных ансамблей, объединенных ЩС.

Итак, взаимное расположение химических синапсов и ЩС свидетельствует в пользу их кооперированной деятельности, в частности, об их участии в осуществлении функции синхронизации ритмической активности нейронов одного ансамбля. ЩС могут синхронизировать подпороговый сигнал, обеспечивая локальную синхронизацию, а многочисленные химические синапсы, в том числе перфорированные, могут осуществлять дистантную синхронизацию ритмической активности, достигшей порогового для импульсного разряда значения. Благодаря такой взаимной кооперированной деятельности обоих типов синаптических контактов осуществляется синхронизация ритмической активности и, как следствие, полноценное формирование веретенообразной активности.

ЛИТЕРАТУРА

- Беркинблит М. Б. и Чайлахян Л. М. Электрические синапсы. В кн.: Руководство по физиологии. Общая физиология нервной системы. Л., Наука, 1979, с. 398–441.
- Кириченко Е. Ю., Повилайтите П. Е. и Сухов А. Г. Роль щелевых контактов в локальном ритмогенезе корковых колонок. Морфология, 2008, т. 133, вып. 1, с. 31–34.
- Логвинов А. К., Кириченко Е. Ю., Повилайтите П. Е. и Сухов А. Г. Структурная организация баррельной коры мозга крыс (иммуногистохимическое исследование). Морфология, 2010, т. 137, вып. 1, с. 10–13.
- Bani-Yaghoob M., Underhill T. M. and Naus C. C. Gap junction blockage interferes with neuronal and astroglial differentiation of mouse P19 embryonal carcinoma cells. *Dev. Genet.*, 1999, v. 24, p. 69–81.
- Bozzola J. J. and Russell L. D. *Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists.* Boston, Jones and Bartlett Publishers, 1992.
- Elias L. A., Wang D. D. and Kriegstein A. R. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature*, 2007, v. 448, p. 901–907.
- Fukuda T. and Kosaka T. Gap junction linking the dendritic network of GABAergic interneurons in the hippocampus. *J. Neurosci.*, 2000, v. 20, № 4, p. 1519–1528.
- Montoro R. J. and Yuste R. Gap junctions in developing neocortex: a review. *Brain Res. Rev.*, 2004, № 47, p. 216–226.
- Rivero Vaccari de J. C., Corriveau R. A. and Belousov A. B. Gap junctions are required for NMDA-receptor dependent cell death in developing neurons. *J. Neurophysiol.*, 2007, v. 98, p. 2878–2886.
- Schmitz D., Schuchmann S., Fisahn A. et al. Axo-axonal coupling: a novel mechanism for ultrafast neuronal communication. *Neuron*, 2001, v. 31, p. 831–840.
- Sutor B. and Hagerty T. Involvement of gap junctions in the development of the neocortex. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, v. 1719, p. 59–68.
- Todd K. L., Kristan W. B. and French K. A. Gap junction expression is required for normal chemical synapse formation. *J. Neurosci.*, 2010, v. 30, № 45, p. 15277–15285.

Поступила в редакцию 15.09.2011
Получена после доработки 27.12.2011

ANALYSIS OF SPATIAL ARRANGEMENT OF GAP JUNCTIONS IN RESPECT TO CHEMICAL SYNAPSES IN THE SERIAL ULTRATHIN SECTIONS OF RAT BARREL CORTEX

Ye. Yu. Kirichenko, A. G. Sukhov, A. K. Logvinov and P. Ye. Povilaitite

Electron microscopic investigation of gap junctions (GJ) on serial sections of rat barrel cortex has shown that GJ were in contact with one or both processes that formed chemical synapses, however, these connections could not be traced in single sections. In the serial sections, it was possible to observe two GJ in the immediate proximity to one another, in a single field of vision, thus, each GJ was traced in two or three successive sections in a series. Considering the described variants of GJ arrangement in the cortex, it is suggested that GJ could be a structural basis for local synchronization of the bioelectrical activity not only at postsynaptic, but also at presynaptic level, and the formation of GJ occurs both before, and after the development of chemical synapses.

Key words: *brain, barrel cortex, gap junctions, chemical synapses, rat*

Department of Neuronal Networks, A. B. Kogan Neurocybernetics Scientific Research Institute, Southern Federal University, Department of Experimental Pathologic Morphology and Electron Microscopy, Rostov Regional Pathological Anatomy Bureau, Rostov-on-Don