

© Коллектив авторов, 2013  
УДК 611.018.86:612.822.2:597

*И. Б. Михеева, Е. Е. Григорьева, Г. З. Михайлова, Р. Ш. Штанчаев, Л. Л. Павлик  
и Д. А. Мошков*

## СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКИЕ СИНАПСЫ НА ВЕНТРАЛЬНОМ ДЕНДРИТЕ МАУТНЕРОВСКОГО НЕЙРОНА (УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОЗОЛОТОЙ МЕТКИ)

Лаборатория ультраструктуры нейрона (зав. — проф. Д. А. Мошков), Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино

С помощью иммунозолотой метки на вентральном дендрите (ВД) маутнеровского нейрона (МН) золотой рыбки выявлены серотонинергические синапсы как химического, так и смешанного типа. Они характеризуются тем, что содержат несколько митохондрий в бутоне и, помимо активной зоны (АЗ), имеют обязательный десмосомоподобный контакт (ДПК). Своими АЗ они, как правило, контактируют с немечеными химическими гребешковыми синапсами, которые, в свою очередь, уже непосредственно взаимодействуют с ВД. Эти синапсы практически лишены митохондрий и не имеют ДПК, что позволяет идентифицировать их как тормозные. Такая «двухуровневая» организация возбуждающих серотонинергических и тормозных синапсов, по-видимому, имеет прямое отношение к реципрокному механизму регуляции функциональной активности МН со стороны зрительного аппарата.

**Ключевые слова:** маутнеровский нейрон, вентральный дендрит, иммунозолотая метка, серотонин, синапсы, ультраструктура

В результате морфофункциональных исследований обнаружено, что вентральный дендрит (ВД), на котором оканчиваются нервные волокна, идущие из ипсилатерального тектума, в свою очередь, иннервируемого зрительным нервом от контралатерального глаза [15], реципрокно влияет на интегральную функциональную активность маутнеровского нейрона (МН), выражающуюся в свободном поведении моторной асимметрией золотой рыбки [9]. На это указывает то, что односторонняя дисфункция сопровождается повышением функциональной активности контралатерального МН, уменьшением размеров его ВД и дегенерацией большого количества афферентных синапсов на этом дендрите [2, 9]. Хотя механизм реципрокной регуляции функции МН на уровне ВД остается невыясненным, имеются основания предположить, что он связан с возбуждающей серотонинергической передачей. Во-первых, потому что она выступает в роли главного участника влияния на ВД [6], во-вторых, потому что на уровне латерального дендрита и аксонного холмика именно благодаря ее опосредованному воздействию через глицинергические тормозные терминалы реципрокно модулируется возбуди-

мость МН [8]. Цель настоящей работы — идентифицировать серотонинергические синапсы и выяснить их ультраструктурную организацию на уровне ВД, не исследованном ранее с указанных позиций.

**Материал и методы.** Для послезаливочной иммунозолотой электронной микроскопии использовали разработанную нами методику [1]. Головной мозг рыбок (молодь золотых рыбок *Carassius auratus*, Оранда, 3–5 см, 12 особей) в течение 12 ч фиксировали смесью 0,5% глутаральдегида и 4% формалина на 0,1 моль какодилатном буфере с добавлением диметилсульфоксида, отмывали буфером, дофиксировали 2% четырехокисью осмия на том же буфере, обезжировали в этаноле и заливали в эпон-812. Ультратонкие срезы для электронной микроскопии изготавливали на микротоме EM UC6 (Leica, ФРГ). Иммуноцитохимическую реакцию проводили на ультратонких срезах, уложенных на электронно-микроскопические палладированные сеточки без подложки, протравленных 2% натрийпериодатом и 1% периодной кислотой и отмывтых 3 раза по 3 мин в фосфатном буфере (ФБ, 16,7 ммоль  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3,3 ммоль  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 150 ммоль  $\text{NaCl}$ , pH 7,4) с 0,1% тритоном X-100. Сеточки последовательно обрабатывали во влажной атмосфере соответствующими реактивами, приготовленными на ФБ и раскатываемыми на пленку из парафила на дне чашки Петри: сначала — 30 мин в суперблоке (Superblock-TBS, Pierce, Rockford, США), после отмывки — 30 мин 5% фетальной сывороткой, а затем, не отмывая, — 12 ч при 4 °C специфическими кроли-

### Сведения об авторах:

Михеева Ирина Борисовна (e-mail: mikheirina@yandex.ru), Григорьева Екатерина Евгеньевна, Михайлова Гульнара Зульфатовна, Штанчаев Рашид Шамильевич, Павлик Любовь Леоновна, Мошков Дмитрий Алексеевич (d\_moshkov@mail.ru), лаборатория ультраструктуры нейрона, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН 142290, Пущино, ул. Институтская, 3

чьими антителами к серотонину (Sigma, США) в разведении 1:4000 с добавлением 0,1% тритона X-100. В качестве контроля специфические антитела заменяли ФБ. Вслед за этим после отмывки в ФБ с 1 моль NaCl, 0,1% тритоном X-100 и 0,1 моль глицином обрабатывали 1 ч при комнатной температуре вторичными антителами (козьи антикроличьи антитела, Sigma, США), меченными коллоидным 10 нм золотом. После этого срезы последовательно отмывали ФБ, дистиллированной водой, контрастировали 4% уранилацетатом и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе BS-500 (Tesla, Чехословакия). Съемку вели на фотопленку, негативы обрабатывали и анализировали после их оцифровки с помощью сканера Epson V700 (Seiko, Япония).

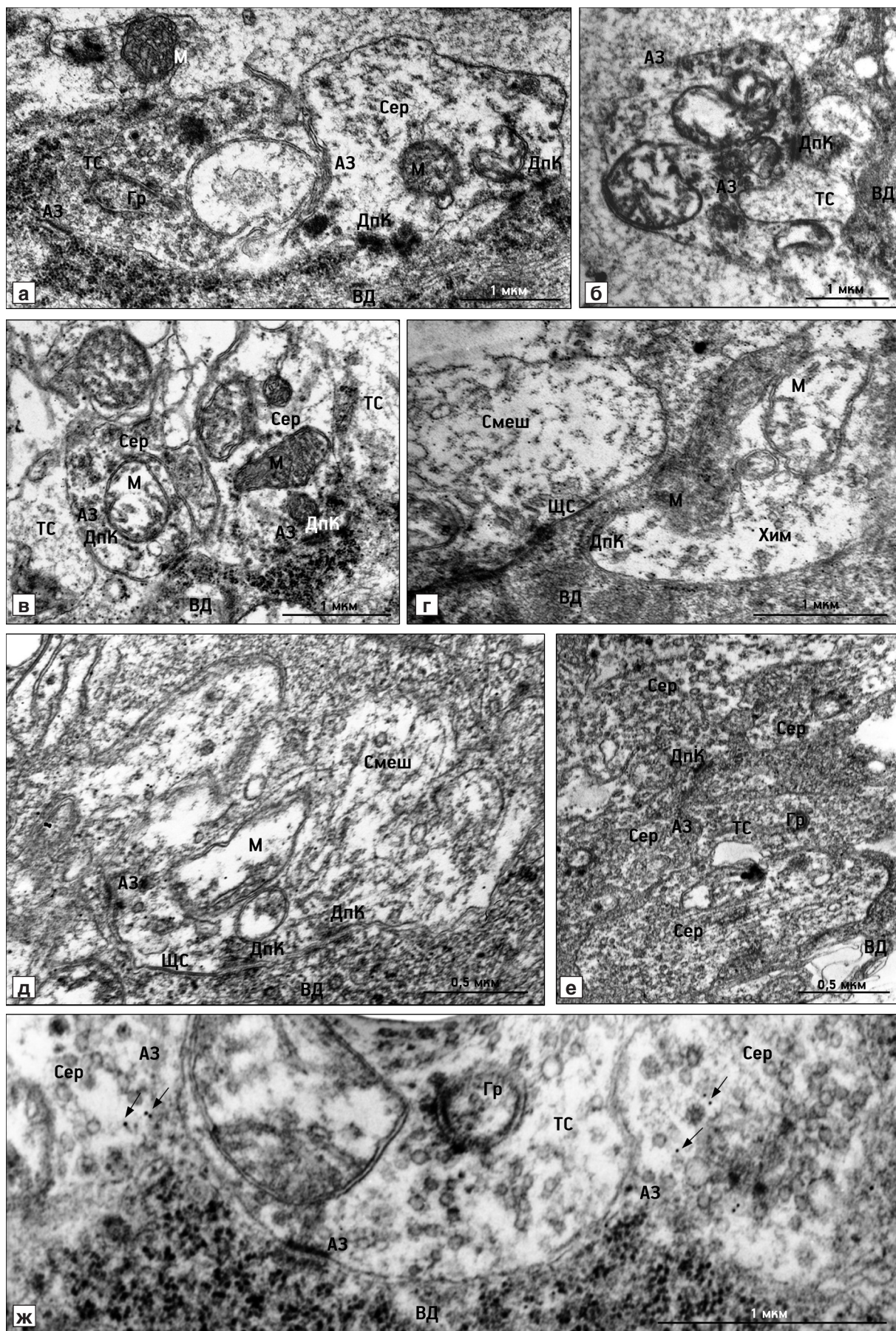
**Результаты исследования.** Исследования ВД МН показывают, что в контрольных ультратонких срезах при замене специфических антител буфером неспецифического связывания меченных золотом антител со структурами нервной ткани практически не происходит (рисунков, а), что является свидетельством высокой специфичности иммуноцитохимической реакции.

Изучение препаратов, обработанных антителами к серотонину и вторичными антителами, меченными коллоидным золотом, показало, что метка связывается не всеми синапсами, расположенными на ВД и вблизи от него (см. рисунок, б–ж). Такое дифференцированное связывание метки в пределах одного среза относительно небольшого участка дендрита с определенными синапсами и отсутствие ее в соседних синапсах другого строения также свидетельствует об избирательности и специфичности примененной нами иммуноцитохимической методики. На практике такая абсолютная специфичность взаимодействия метки с мишенью наблюдается не всегда. Чаще она имеет количественный характер: больше метки видно на одних типах синапсов, меньше — на других. В последнем случае она встречается и в дендроплазме, что свидетельствует о фоновой неспецифичности. Тем не менее, анализ большого количества электронно-микроскопических снимков позволил дифференцировать различия и получить однозначные результаты, пригодные для последующих обобщений. Видно, что метка, как правило, обнаруживается в синаптических пузырьках. Сами меченые аксонные окончания

относятся к синапсам определенного типа, отличающимся от других ультраструктурными признаками. Первый из них — это обязательное наличие в синаптическом контакте рядом с активной зоной (АЗ) десмосомоподобного соединения (см. рисунок, б) — атрибута возбуждающего синапса с регулируемой проводимостью. Среди других признаков следует указать на присутствие в бутоне нескольких митохондрий, небольшое количество округлых синаптических пузырьков, относительно малый размер АЗ, которая располагается в месте прилегания синапса к своей мишени, а также довольно часто встречающиеся пузырьки с электронно-плотной сердцевиной (см. рисунок, б, в). Некоторые меченые синаптические окончания располагаются на небольшом расстоянии от поверхности дендрита, напрямую контактируют с немечеными синаптическими бутонами, которые, в свою очередь, взаимодействуют через АЗ уже прямо с дендритом (см. рисунок, б), т. е. можно говорить о «первом уровне» немеченых синапсов и «втором уровне» серотонинергических синапсов. Другие располагаются непосредственно на стволе ВД, но свои АЗ формируют на рядом расположенных немеченых синаптических окончаниях, имеющих иное строение и контактирующих напрямую со стволом ВД (см. рисунок, в). При этом среди таких иммунопозитивных серотонинергических синапсов обнаруживаются как чисто химические серотонинергические синапсы, так и синапсы, относящиеся к смешанному типу, среднего (см. рисунок, г) и крупного размера (см. рисунок, д). Кроме химического сигнала через АЗ, они осуществляют электротоническую передачу через щелевое соединение. Похожая организация взаимосвязи меченых и немеченых аксонных окончаний выявлена также на теле МН. Имея подобную топографию, серотонинергические ствольные синапсы химического типа формируют с ВД десмосомоподобные синаптические соединения, но их АЗ располагаются на ствольных, немеченых синаптических окончаниях, находящихся рядом, т. е. описанные ствольные серотонинергические синапсы, формирующие АЗ со смежными бутонами другого типа, тоже можно

Серотонинергические синапсы на вентральном дендрите (ВД) маутнеровского нейрона золотой рыбки.

а — участок поверхности ВД с синапсами разного типа, контрольный препарат. Метка отсутствует; б — меченый серотонинергический синапс, расположенный и формирующий активную зону на тормозном окончании, взаимодействующем с ВД; в — два меченых серотонинергических синапса, расположенные на ВД, но формирующие активные зоны на смежных немеченых синапсах тормозного типа; г — два серотонинергических синапса на поверхности ВД, смешанного типа (слева) и химического типа (справа); д — крупный меченый серотонинергический смешанный синапс на стволе ВД; е — тормозный немеченый синапс гребешкового типа на стволе ВД в окружении меченых серотонинергических синапсов, расположенных на «первом и втором уровнях»; ж — гребешковый тормозный синапс, метка на нем отсутствует, контактирующий с мечеными серотонинергическими синапсами (стрелки — золотые зерна). Сер — серотонинергический синапс; ТС — тормозный синапс; Гр — гребешок; М — митохондрия; АЗ — активная зона; ДпК — десмосомоподобный контакт; ШС — щелевое соединение; Смеш — синапс смешанного типа; Хим — синапс химического типа.



рассматривать как аксосоматические, поскольку они управляют пресинаптическими бутонами, а не дендритом.

Следует особо остановиться на описании немеченых синаптических окончаний «первого уровня», на которых оканчиваются описанные выше возбуждающие серотонинергические синапсы. Своими АЗ они обращены к стволу дендрита, не имеют контактов вне этого участка и, главное, не проявляют иммунореактивности (см. рисунок, е, ж). Кроме того, они имеют некоторые ультраструктурные особенности, отличающие их от иммунореактивных синапсов, главной из которых является отсутствие десмосомоподобных соединений. К другим характерным для них структурным чертам относятся большое количество мелких пузырьков, весьма протяженные АЗ, часто распространяющиеся на инвагинации, так называемые гребешки, как правило, обнаруживаемые внутри бутонов в виде двухконтурных вакуолей с синаптическими пузырьками, расположенными по внешней стороне. Следует указать также на наличие протяженных субповерхностных цистерн в районе прилегания синапса к стволу и почти полное отсутствие митохондрий в бутонах. В тех редких случаях, когда они встречаются, число их не превышает 1–2 (см. рисунок, ж). По указанным признакам такие синапсы с полным основанием могут быть отнесены к тормозным (ГАМК-ергическим) афферентным аксонным окончаниям.

Обсуждение полученных данных. При проведении работы нам пришлось встретиться с определенными трудностями в строгой ультраструктурной идентификации синапсов, связанными с частичной деструкцией ткани в срезе после достаточно сильных химических воздействий натрийпериодата и периодной кислоты, усугубляющей и без того весьма редкое одновременное присутствие всех исследуемых признаков в каждом конкретном сечении бутона. Тем не менее, сопоставление многочисленных ультраструктурных данных между собой дает возможность сделать ряд обобщений, указывающих на то, что использованная нами методика вполне приемлема. С ее помощью удалось дифференцировать разные типы синапсов, выявляемые на электронно-микроскопическом уровне после иммуноцитохимического мечения серотонина коллоидными частицами золота. Показано, что синаптические окончания на ВД МН золотой рыбки, по ряду ультраструктурных признаков отличающиеся друг от друга, имеют и разную нейротрансмиттерную природу.

Существование возбуждающих серотонинергических синапсов, являющихся окончаниями

нервных волокон, приходящих из тектума, иннервируемого зрительным нервом, было предположено еще на основании данных по монокулярной хирургической депривации и унилатеральной зрительной стимуляции [2]. Ранее синапсы, содержащие специфические мембранные рецепторы серотонина, были идентифицированы на МН (в том числе и на ВД) цихлидовых рыб *Astatotilapia burtoni* под световым микроскопом с помощью иммуногистохимической окраски [1]. Также иммунореактивность к серотонину была показана на светомикроскопическом уровне в области ВД МН у рыбок *Danio rerio* [7] и золотых рыбок [5]. Высказывались предположения, что это синаптические окончания тормозных интернейронов [5, 11] или возбуждающих спинномозговых нейронов на ВД [4]. Тем не менее, есть основания полагать, что обнаруженные серотонинергические синапсы принадлежат возбуждающим нервным волокнам, приходящим из тектума, иннервируемого зрительным нервом от контралатерального глаза. Такой вывод можно сделать из сопоставления данных ультраструктурной идентификации серотонинергических синапсов с полученными ранее данными, указывающими на то, что после длительной оптокинетической стимуляции или энуклеации глаза именно синапсы с указанными ультраструктурными признаками претерпевают запустевание или дегенерацию [2]. Кроме того, предположение о зрительной природе исследуемых синапсов в полной мере согласуется с электрофизиологическими и иммуногистохимическими данными о существовании возбуждающих синаптических влияний на ВД МН со стороны ипсилатерального и, в меньшей степени, контралатерального тектума [12].

Также важным результатом, на наш взгляд, является четкое доказательство того, что серотонин-иммунопозитивными оказываются синапсы как химического, так и смешанного типа. Первые, более многочисленные, по нашему мнению, ответственны за реципрокные отношения между активностью нервных волокон, приходящих из тектума, управляемого зрительным нервом, и функциональной активностью МН [9]. Их опосредованное взаимоотношение с ВД через тормозные синапсы само по себе предусматривает реципрокность влияния на нейроны. Выявление такой организации было вполне ожидаемым, поскольку аналогичное взаиморасположение и реципрокный на уровне электрофизиологических реакций пресинаптический эффект на МН иммуноцитохимически идентифицированных серотонинергических и тормозных (глицинергических) синапсов уже были известны в области аксонного

холмика и тела МН [8]. Смешанные серотонинергические синапсы, обнаруженные впервые на ВД, вероятно, ответственны за прямую и быструю передачу возбуждающего зрительного сигнала на нейрон. Мы предполагаем, что именно они индуцируют потенциал действия МН, вызванный пугающим зрительным импульсом и инициирующий реакцию страха (startle-reflex) рыбки, ее быстрый отскок с помощью С-изгиба хвоста [3, 10].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о необычной иерархической организации синаптических окончаний нервных волокон, приходящих из тектума, являющегося зрительным анализатором, и их влиянии на МН через ВД. Они показывают также, что в регуляцию зрительной сигнализации, приходящей на ВД, вовлечена серотонинергическая нейротрансмиттерная система. В комплексе они объясняют механизм реципрокного управления интегральной функции МН со стороны зрительного аппарата.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ, гранты № 09-04-00451а и 12-04-00699-а.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Васильева В. С., Лушникова А. Л., Павлик Л. Л. и др. Разработка методов иммуноцитохимического исследования локализации цитокинин-связывающего белка ЦСБ 70 в тканях проростка кукурузы. Физиология растений, 2008, т. 55, № 4, с. 612–619.
2. Михеева И. Б., Цаплина Н. Ю., Григорьева Е. Е. и др. Ультраструктура маутнеровских нейронов при оптокинетикической стимуляции и энуклеации глаза. Морфология, 2011, т. 139, вып. 3, с. 30–35.
3. Canfield J. G. Functional evidence for visuospatial coding in the Mauthner neuron. Brain Behav. Evol., 2006, v. 67, p. 188–202.
4. Chang Y. T., Lin J. W. and Faber D. S. Spinal inputs to the ventral dendrite of the teleost Mauthner cell. Brain Res., 1987, v. 417, p. 205–213.
5. Gotow T., Triller A. and Korn H. Differential distribution of serotonergic inputs on the goldfish Mauthner cell. J. Comp. Neurol., 1990, v. 292, p. 255–268.
6. Korn H. and Faber D. S. The Mauthner cell half a century later: a neurobiological model for decision-making? Neuron, 2005, v. 47, № 1, p. 13–22.
7. McLean D. L. and Fetcho J. R. Relationship of tyrosine hydroxylase and serotonin immunoreactivity to sensorimotor circuitry in larval zebrafish. J. Comp. Neurol., 2004, v. 480, p. 57–71.
8. Mintz I. and Korn H. Serotonergic facilitation of quanta1 release at central inhibitory synapses. J. Neurosci., 1991, v. 11, № 11, p. 3359–3370.
9. Moshkov D. A., Mikhailova G. Z., Grigorieva E. E. and Shtanchaev R. S. Role of different dendrites in the functional activity of the central neuron controlling goldfish behavior. J. Integr. Neurosci., 2009, v. 8, № 4, p. 441–451.
10. Weiss S. A., Zottoli S. J., Do S. C. et al. Correlation of C-start behaviors with neural activity recorded from the hindbrain in free-swimming goldfish (*Carassius auratus*). J. Exp. Biol., 2006, v. 209, p. 4788–4801.
11. Whitaker K. W., Neumeister H., Huffman L. S. et al. Serotonergic modulation of startle-escape plasticity in an African cichlid fish: a single-cell molecular and physiological analysis of a vital neural circuit. J. Neurophysiol., 2011, v. 106, p. 127–137.
12. Zottoli S. J., Hordes A. R. and Faber D. S. Localization of optic tectal input to the ventral dendrite of the goldfish Mauthner cell. Brain Res., 1987, v. 401, № 1, p. 113–121.

Поступила в редакцию 19.06.2012

#### SEROTONINERGIC SYNAPSES ON THE VENTRAL DENDRITE OF THE MAUTHNER NEURON (ULTRASTRUCTURAL STUDY WITH IMMUNOGOLD LABELING)

*I. B. Mikheyeva, Ye. Ye. Grigoriyeva, G. Z. Mikhailova,  
R. Sh. Shtanchayev, L. L. Pavlik and D. A. Moshkov*

Using immunogold labeling, excitatory serotonergic synapses of both chemical and mixed types, were found on the ventral dendrite (VD) of goldfish Mauthner neuron (MN). They are characterized by the presence of several mitochondria in the bouton and by an obligatory desmosome-like contact (DLC) besides the active zone (AZ). Their AZs were commonly found to make contact with the unlabeled chemical crested synapses, which, in turn, directly interacted with VD. These synapses were practically devoid of mitochondria and had no DLCs, thus allowing to identify them as the inhibitory ones. This «two-level» organization of excitatory serotonergic and inhibitory synapses appears to be related to the reciprocal mechanism of the regulation of MN functional activity by visual input.

**Key words:** Mauthner neuron, ventral dendrite, immunogold labeling, serotonin, synapses, ultrastructure

Laboratory of Neuron Ultrastructure, RAS Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino