

© Коллектив авторов, 2015
УДК 611.815.5.018:599.323.4

Р.Ш.Штанчаев, И.Б.Михеева, Н.А.Пенькова, Л.Л.Павлик

УЛЬТРАСТРУКТУРА МОТОНЕЙРОНОВ И СИНАПСОВ В ЯДРАХ ГЛАЗОДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВОВ У МЫШИ

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

Проведено исследование ультраструктуры мотонейронов и синапсов в соматической зоне ядер глазодвигательных нервов у мышей C57 Black/6. Показано, что аксодендритные и аксосоматические синапсы характеризуются наличием округлых уплотнений (субконтактные округлые уплотнения), расположенных в постсинаптической части синапса на некотором расстоянии от постсинаптического уплотнения. В месте расположения субконтактных уплотнений синаптическая щель расширена до 30 мкм. В этом же синапсе щель может быть и уменьшена почти в 2 раза. Встречаются аксосоматические и аксодендритные шипиковые синапсы. На соме и дендрите мотонейронов встречаются синапсы типа en passant. Щелевые контакты не обнаружены.

Ключевые слова: головной мозг, глазодвигательные ядра, мышь, мотонейроны, синапсы

Нейроны глазодвигательной системы мозга, включающей в себя ядра III, IV и VI пар черепных нервов, контролируют быстрые и точные движения глаз, участвуя в саккадических движениях, осуществлении нистагмов и в вестибулоокулярных рефлексх. Организация ядер глазодвигательных нервов (ЯГДН) достаточно подробно исследована у некоторых млекопитающих (кошки, макака-резуса, крысы). Структурно и функционально нейроны этих ядер тесно связаны с другими сенсомоторными образованиями в головном мозгу, такими как вестибулярные ядра, прилежащее ядро, ядро отводящего нерва и др. Биохимическая и физиологическая регуляция активности этих нейронов и афферентные связи с другими структурами головного мозга детально описаны в норме и при заболеваниях различной этиологии [1, 5, 10, 16, 17].

Известно, что в ЯГДН мотонейроны подразделяются на 2 пула [5]. К первому пулу относятся крупные мотонейроны, локализованные в центре ядра и иннервирующие быстро сокращающиеся мышечные волокна с помощью одиночного нервно-мышечного окончания. Их цитоплазма содержит нефосфорилированные нейрофилamenty, парвальбумин и хондроитин-сульфат-протеогликан [7]. Мотонейроны второго пула характеризуются небольшим размером, расположены по периферии ядра, иннервируют с помощью множества нервно-мышечных окончаний медленные, устойчивые к утомлению, мышеч-

ные волокна и не участвуют в саккадическом движении глаз, вестибулоокулярных рефлексх, осуществляя, по-видимому, поддержание тонуса мышцы в целом [5]. Крупные мотонейроны ЯГДН иннервируют глазные мышцы и контролируют вращение глаз в вертикальной и горизонтальной плоскости.

Между тем, имеется мало информации об ультраструктуре нейронов ЯГДН у мышей (широко распространенного объекта нейробиологических и биомедицинских исследований) как у интактных, так и после стрессорных воздействий. Имеющиеся публикации содержат данные только гистологических и иммуногистохимических исследований ЯГДН у мышей [13, 14, 18]. В связи с этим цель настоящей работы — электронномикроскопическое изучение крупных мотонейронов ЯГДН у мышей.

Материал и методы. Работа выполнена на 5 самцах мышей C57 Black/6 (массой 20–25 г) с соблюдением «Правил проведения работ с использованием лабораторных животных». Животных умерщвляли методом цервикальной дислокации. Материалом для исследований служили фронтальные полоски головного мозга (по одной от каждого животного), содержащие ЯГДН. Выделение нужных участков производили по реперным структурам мозга между мозжечком и полушариями большого мозга, причем главными ориентирами были пластинки четверохолмия и центральное серое вещество среднего мозга. Вырезанные участки мозга фиксировали погружением в раствор альдегидного фиксатора, традиционно используемого в лаборатории при изучении нервной ткани, на 12–16 ч. Основными компонентами фик-

Сведения об авторах:

Штанчаев Рашид Шамильевич (e-mail: rshtanch@mail.ru), Пенькова (Коканова) Надежда Александровна (e-mail: kokanchik@rambler.ru), Михеева Ирина Борисовна (e-mail: mikhirina@mail.ru), Павлик Любовь Леоновна (e-mail: pavlikl@mail.ru), лаборатория ультраструктуры нейрона, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино, ул. Институтская, 3

сатора были формальдегид и глутаральдегид на 0,1 М какодилатном буфере [2]. Блоки дополнительно фиксировали 2% раствором четырехокси осмия на том же буфере в течение 4 ч, обезвоживали в этаноле возрастающих концентраций и ацетоне и после заливки в эпон для идентификации исследуемых ядер на микротоме Ругамитоме LKB 11800 (KB, Швеция) готовили серийные гистологические срезы толщиной 5 мкм, которые изучали под световым микроскопом NU-2E (Carl Zeiss, ГДР). Главным критерием поиска местоположения исследуемых ядер была ориентировка по форме и взаиморасположению реперных структур — центрального серого вещества среднего мозга, среднего мозга водопровода, медиальных продольных пучков и т.д. Собственно идентификацию ЯГДН проводили, сопоставляя данные различных стереотаксических атласов, применяемых в изучении головного мозга мышей [8, 9, 11].

Для дальнейшего электронно-микроскопического исследования выбирали срезы, содержащие крупные мотонейроны ЯГДН, переклеивали их на чистый эпоновый блок по методу, разработанному в лаборатории [2], и с него получали ультратонкие срезы на ультрамикротоме Leica EM UC6 (Leica, ФРГ). После контрастирования уранилацетатом и цитратом свинца срезы просматривали в электронном микроскопе BS-500 (Tesla, Чехословакия). Съемку вели на фотопленку, информацию получали, анализируя электронные изображения фотонегативов, оцифрованные с помощью сканера Epson V700 (Seiko, Япония).

Морфометрическое исследование проводили вручную на оцифрованных изображениях гистологических и ультратонких срезов. На уровне световой микроскопии для определения размеров клеток применяли оцифрованную шкалу объектомикрометра ОМО (Россия) с ценой деления 10 мкм. На электронно-микроскопическом уровне производили перерасчет значений (размеров синапсов и их компонентов), исходя из увеличения электронного микроскопа (10 000 либо 14 000) и цифрового разрешения изображений сканированных фотонегативов.

Результаты исследования. Гистологическое изучение ткани мозга показало, что в месте локализации ЯГДН (рис. 1, а) видны 2 пула нейронов. Это крупные мотонейроны диаметром 20–30 мкм, которые в дальнейшем использовали для электронно-микроскопического изучения, и окружающие их более мелкие нейроны до 10–12 мкм в диаметре (см. рис. 1, б).

При электронно-микроскопическом анализе мотонейронов выявлено, что в изучаемом участке крупные нейроны близко расположены друг к другу (рис. 2, а). В соме нейрона имеется большое ядро с глубокими инвагинациями. В цитоплазме расположена гранулярная эндоплазматическая сеть, цистерны которой часто имеют разветвления (см. рис. 2, а). Непосредственно под плазмолеммой нейрона встречаются цистерны разной протяженности, разделенные электронно-плотным материалом (см. рис. 2, б). Имеются аксосоматические синапсы размером до 2 мкм (см. рис. 2, в). Эти синапсы формируют с плазмолеммой нейрона несколько синаптических уплотнений, разделенных небольшими промежутками (см. рис. 2, г). От сомы нейронов может отходить шипик с ножкой (см. рис. 2, г). Встречаются также синапсы по ходу (en passant). Пресинаптическая часть синапса заполнена небольшими электронно-прозрачными синаптическими пузырьками. Среди них встречаются и крупные пузырьки, и пузырьки с электронно-плотным содержимым, а также опущенные пузырьки (см. рис. 2, в, г). В постсинаптической части можно видеть субконтактные округлые синаптические уплотнения, которые

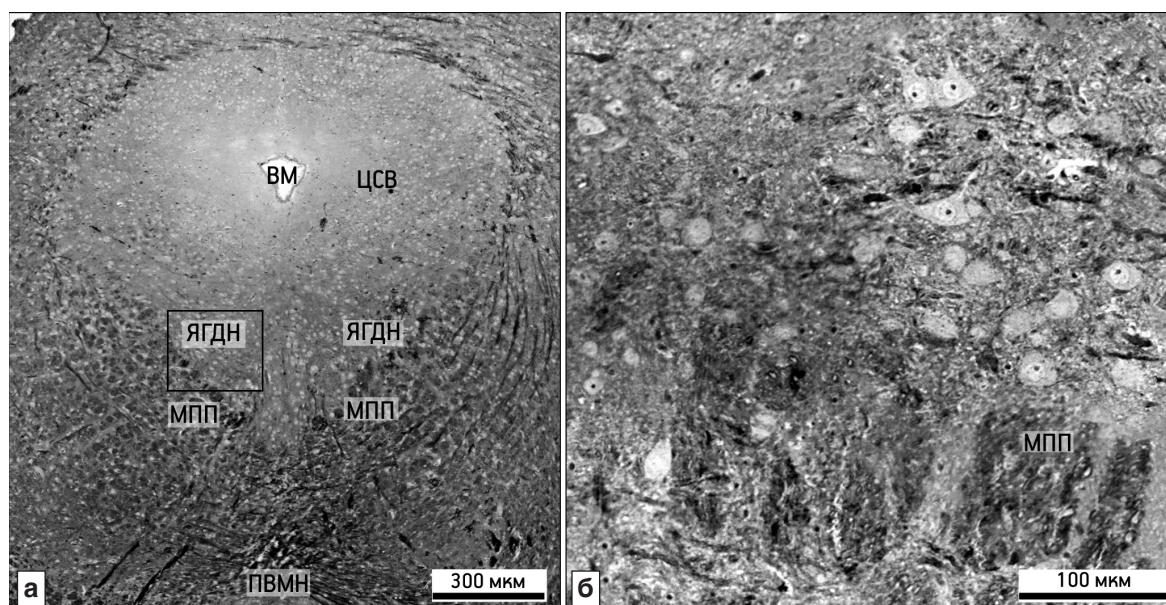


Рис. 1. Ядра глазодвигательных нервов мыши.

а — фронтальный срез головного мозга мыши, содержащий крупные мотонейроны правого и левого (обведено квадратом) ядер глазодвигательных нервов (ЯГДН); б — участок, выделенный квадратом на рис. а, с крупными мотонейронами. ЦСВ — центральное серое вещество; ВМ — водопровод мозга; МПП — медиальный продольный пучок; ПВМН — перекрест верхних мозжечковых ножек

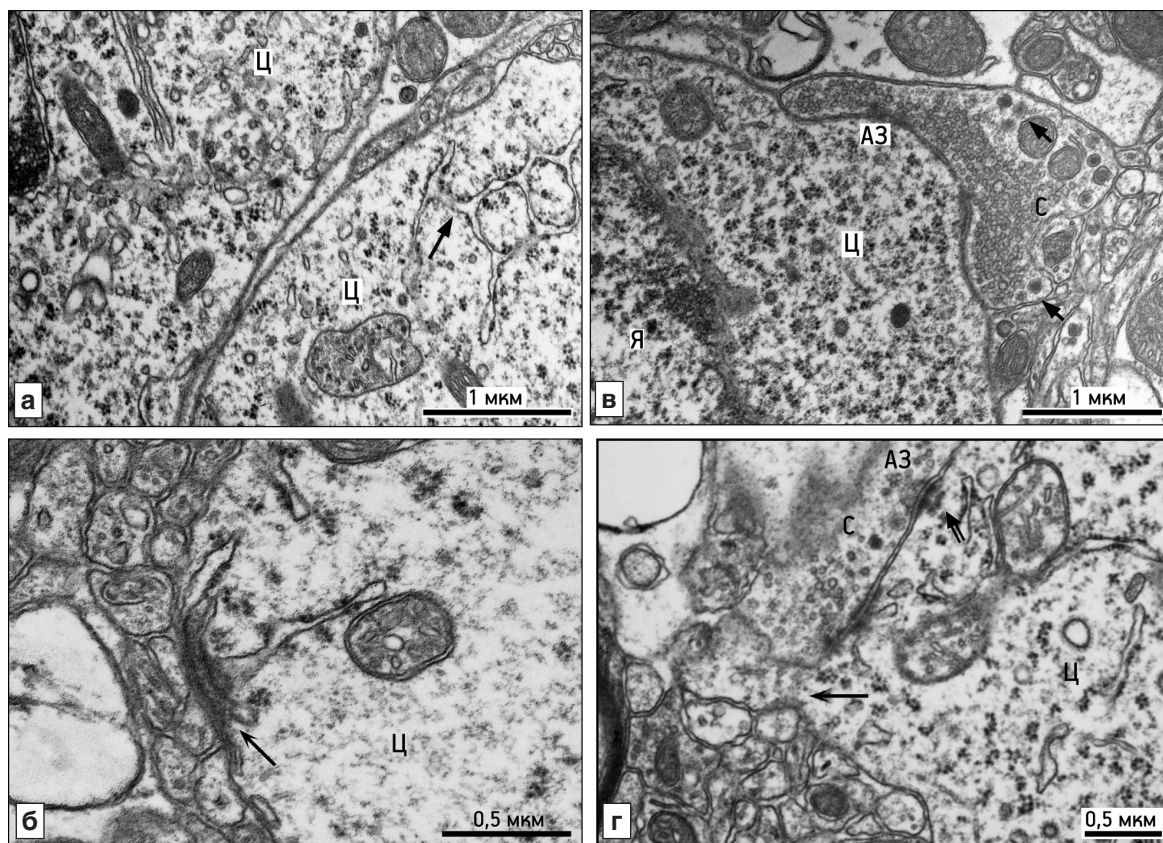


Рис. 2. Ультраструктура нейронов соматической части ядер глазодвигательных нервов мозга мыши.

а — два близко расположенные нейрона с разветвленными цистернами гранулярной эндоплазматической сети (стрелка); б — субповерхностные цистерны в соме нейрона (электронно-плотный материал — стрелка); в, г — аксосоматические синапсы. Я — ядро нейрона; Ц — цитоплазма; АЗ — активные зоны; С — пресинаптическая часть контакта. Короткие стрелки — пузырьки с электронно-плотным содержимым; длинная стрелка — ножка шипика, отходящего от сомы нейрона; двоянная стрелка — субконтактное уплотнение под АЗ синапса

были упомянуты ранее, размером до 30 нм. Они находятся на некотором расстоянии (70 нм) от постсинаптической мембраны (см. рис. 2, г).

В нейропиле в большом количестве располагаются аксодендритные синапсы (рис. 3). Поперечные и продольные сечения дендритов содержат небольшое количество микротрубочек и элементы агранулярной эндоплазматической сети (см. рис. 3, а, в), а также митохондрии. С одним профилем дендрита могут формировать контакты несколько аксонных окончаний. Синапсы встречаются в основном асимметричного типа с отчетливо выраженным постсинаптическим уплотнением (см. рис. 3, а–в). Так же, как и в аксосоматических синапсах, здесь можно видеть субконтактные уплотнения, расположенные на расстоянии от постсинаптического уплотнения (см. рис. 3, а, б). В этом месте, где есть такие уплотнения, синаптическая щель расширена до 30 нм (см. рис. 3, а). Эти расширения чередуются с участками, где синаптическая щель сужается более чем в 2 раза.

В пресинаптических частях аксодендритных синапсов пузырьки электронно-прозрачные, плеоморфные, часто встречаются опушенные пузырь-

ки и пузырьки с электронно-плотным содержимым. Можно было видеть аксодендритные — аксошиповые синапсы, у которых прослеживается ножка, отходящая от дендрита (см. рис. 3, в). Чаще в плоскость среза попадают только головки шипиков. В случае аксошипового синапса головка шипика образует довольно протяженный контакт с пресинаптическим окончанием (см. рис. 3, в). Шипиковый аппарат не прослеживается. Среди специализированных контактов в одном синапсе можно встретить в соседстве с активной зоной десмосомоподобный контакт (*puncta adherentia*), пронизанный фибриллярными структурами (см. рис. 3, г).

Обсуждение полученных данных. Изучение мотонейронов ЯГДН у мышей показало, что ультраструктурные признаки, характерные только для этого вида животных, по всей вероятности, отсутствуют. Все установленные признаки присущи мотонейронам ЯГДН и их синаптической организации, описанным ранее у приматов [17], кошек [10] и у форели [12]. По имеющимся литературным данным «серийные синапсы», когда одно синаптическое окончание образует контакт

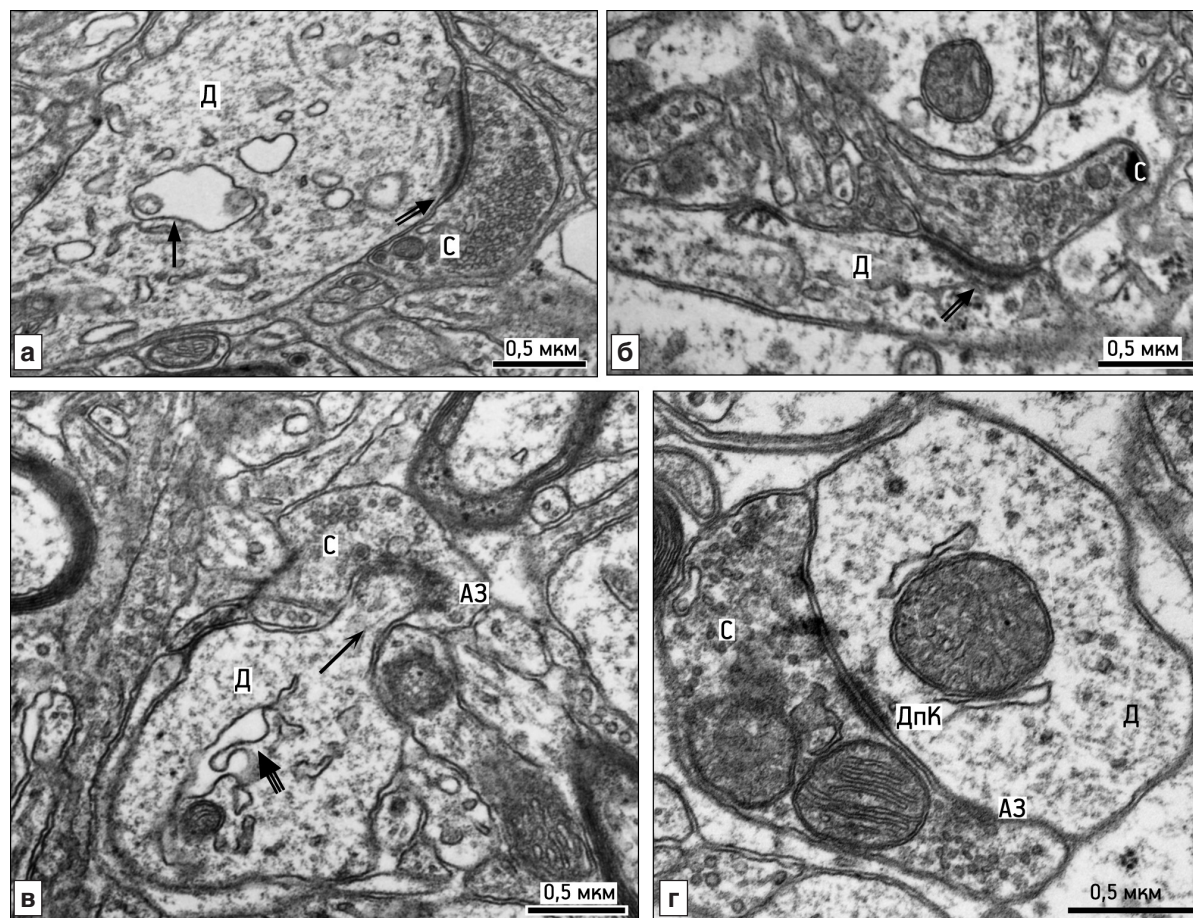


Рис. 3. Ультраструктура аксодендритных синапсов в нейропиле ядер глазодвигательных нервов мозга мыши.

а — типичный синапс; видны субконтактные уплотнения (сдвоенная стрелка); цистерны агранулярной эндоплазматической сети (одиночная стрелка) в профиле дендрита (Д); С — пресинаптическое окончание; б — аксодендритный синапс по ходу (en passant), видно субконтактное уплотнение (сдвоенная стрелка); в — аксошиповый синапс, шипик соединяется с дендритом ножкой (стрелка); в дендрите видны элементы агранулярной эндоплазматической сети (строенная стрелка), пресинаптическое окончание содержит плеоморфные пузырьки, на шипике видна протяженная активная зона (АЗ); г — десмосомоподобный контакт (ДпК) в аксодендритном синапсе, расположенный вблизи АЗ

с другим окончанием, являющимся пресинаптическим для третьего, были обнаружены в нейропиле ЯГДН у приматов в большем числе, чем у кошек, подчеркивая более значимую роль пресинаптического торможения в контроле над движением глаз у приматов [17]. В отличие от этих результатов синапсы такого типа мы не нашли в изученном нами материале. Нам не удалось также обнаружить синапсы, имеющие щелевые контакты, что указывало бы на существование материального субстрата электротонической передачи в основе быстрых движений глаз, и этим наши данные не отличаются от уже имеющихся результатов, полученных на макаках [17]. Ранее в электрофизиологических экспериментах в мотонейронах спинного мозга у лягушки была продемонстрирована электрическая связь [6], хотя морфологически специализированные мембранные структуры обнаружены не были [15]. Поэтому было предположено, что морфологическим субстратом электротонической проводимости могут служить

не только щелевые контакты, но и близко расположенные мембраны достаточно большой протяженности без включения глиальных клеток. Также высказываются предположения, что материальным субстратом электротонической передачи могут служить и другие специализированные структуры, например длинные дендро-дендритные мембранные контакты без вмешательства глиальных структур и без специализированных структур, описанные между дендритами глазодвигательного и блокового ядер у лягушки. Они могут служить морфологическим субстратом синхронизированного сокращения билатеральных глазных мышц и обеспечивать электротоническую связь между этими мотонейронами [4]. Кроме того, структурным аналогом электрического синапса может быть контакт между плазмолеммами нейронов с шириной щели до 7–9 нм, а также близкое расположение соседних дендритных мембран [12]. По нашим данным, роль морфологического субстрата электротонической связи, помимо

щелевых, могут выполнять и десмосомоподобные контакты, описанные в настоящей работе и изученные нами ранее на примере смешанных синапсов на латеральном дендрите маутнеровского нейрона золотой рыбки, входящие, наряду со щелевыми контактами и активными зонами, в состав смешанных синапсов. Десмосомоподобные контакты и мостики в их щели включают актин, как мы показали с помощью маркировки фаллоидином, меченным золотом. При этом оказалось, что размеры десмосомоподобных контактов и число мостиков в щели контакта коррелировали с уровнем электротонической связи за счет дополнительной полимеризации актина [3]. Поэтому мы предположили, что десмосомоподобный контакт может выполнять не только механическую функцию.

Полученные результаты можно использовать при исследованиях ЯГДН с позиций их вовлечения в осуществление оптокинетического нистагма при нарушенном сенсорном (вестибулярном или зрительном) афферентном притоке, в частности, длительном пребывании в условиях микрогравитации во время космического полета или продолжительного выполнения оптокинетической реакции во время соответствующей зрительной стимуляции.

Работа поддержана грантом РФФИ (№ 12-04-00699а).

Авторы благодарят сотрудника Института медико-биологических проблем РАН И.Б.Краснова и сотрудника Института биофизики клетки РАН И.В.Нестерова за консультации и неоценимую помощь в проведении работ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корнилова Л.Н., Наумов И.А., Азаров К.А. и др. Компьютерный способ комплексного отоневрологического обследования и нефармакологической коррекции вестибуло-сенсорных нарушений // Вестн. оторинолар. 2009, № 1. С. 28–33.
2. Мошков Д.А., Павлик Л.Л., Шубина В.С. и др. Цитоскелетная регуляция клеточной функции дофамином // Биофизика. 2010. Т. 55. С. 850–856.
3. Павлик Л.Л., Тирас Н.Р., Мухтасимова Н.Ф. и др. Участие актина в электротонической проводимости смешанных синапсов маутнеровских нейронов золотой рыбки // Морфология. 2003. Т. 123, вып. 1. С. 41–47.
4. Basckai T., Veress G., Halasi G. et al. Dendrodendritic and dendrosomatic contacts between oculomotor and trochlear motoneurons of the frog, *Rana esculenta* // Brain Res. Bull. 2008. Vol. 75, № 2–4. P. 419–423.
5. Büttner-Ennever J.A. The extraocular motor nuclei: organization and functional neuroanatomy // Prog. Brain Res. 2006. Vol. 151. P. 95–125.
6. Cheh G. Dendritic responses of frog motoneurons produced by antidromic activation // Neuroscience. 1976. Vol. 1. P. 469–475.
7. Eberhorn A.C., Büttner-Ennever J.A., Horn A.K. Identification of motoneurons supplying multiply- or single-innervated extraocular muscle fibres in the rat // Neuroscience. 2006. Vol. 137, № 3. P. 891–903.
8. Hof P.R., Young W.G., Bloom F.T. et al. Comparative Cytoarchitectonic Atlas of the C57BL/6 and 129/Sv Mouse Brains. Amsterdam: Elsevier, 2000.
9. Lein E.S., Hawrylycz M.J., Ao N. et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain // Nature. 2007. Vol. 445. P. 168–176.
10. Nguyen L.T., Baker R., Spencer R.F. Abducens internuclear and ascending tract of Deiters inputs to medial rectus motoneurons in the cat oculomotor nucleus: synaptic organization // J. Comp. Neurol. 1999. Vol. 405. P. 141–159.
11. Paxinos G., Franklin K. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego: Acad. Press, 2012.
12. Schuster Th.J. Experimental alterations in number and length of different membrane complexes on axosomatic contacts in the trout (*Salmo iridens*) // J. Hirnforsch. 1978. Vol. 19, № 1. P. 45–73.
13. Shiraki K., Myazaki S., Shimo-Oku M. Influence of visual deprivation on the visual and oculomotor system: acetylcholinesterase activity in oculomotor neurons // Exp. Neurol. 1988. Vol. 99. P. 342–352.
14. Shin M., Moghadam S.H., Sekirnjak C. et al. Multiply types of cerebellar target neurons and their circuitry in the vestibulo-ocular reflex // J. Neurosci. 2011. Vol. 31, № 30. P. 10776–10786.
15. Stensaas L.J., Stensaas S.S. Light and electron microscopy of motoneurons and neuropil in the amphibian spinal cord // Brain Res. 1971. Vol. 31. P. 67–84.
16. Suzuki M., Izawa A., Takahashi K., Yamazaki Y. The coordination of eye, head and arm movements during rapid gaze orienting and arm pointing // Exp. Brain Res. 2008. Vol. 184, № 4. P. 579–85.
17. Waxman S.G., Pappas G.D. Ultrastructure of synapses and cellular relationships in the oculomotor nucleus of the rhesus monkey // Cell Tissue Res. 1979. Vol. 204. P. 161–169.
18. Vanselow B.K., Keller B.U. Calcium dynamics and buffering in oculomotor neurons from mouse that are particularly resistant during amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-related motoneurone disease // J. Physiol. 2000. Vol. 525, № 2. P. 433–445.

Поступила в редакцию 21.07.2014

ULTRASTRUCTURE OF MOTOR NEURONS AND SYNAPSES IN THE OCULOMOTOR NERVE NUCLEI IN MICE

R.Sh.Shtanchayev, I.B.Mikheyeva, N.A.Pen'kova, L.L.Pavlik

Motor neuron and synapse ultrastructure in the somatic area of oculomotor nerve nuclei (cranial nerve III nuclei) was studied in C57 Black/6 mice. It was shown that that axodendritic and axosomatic synapses were characterized by rounded subjunctional bodies, located at the postsynaptic side of the synaptic contact at some distance from postsynaptic density. At the site of the subjunctional densities, the synaptic gap was expanded to 30 µm. In the same synapse, the synaptic gap could be reduced twice or more. Axosomatic and axodendritic synapses occurred on spines. On the soma and dendrites of motoneurons, en passant type of synapses were found. No gap junctions were observed.

Key words: brain, oculomotor nuclei, motor neurons, synapses, mouse

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