

© Н. В. Самосудова, В. П. Реутов, 2015
УДК 611.817.1.018

Н. В. Самосудова¹, В. П. Реутов²

ПЛАСТИЧЕСКИЕ ПЕРЕСТРОЙКИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ СИНАПСОВ В МОЗЖЕЧКЕ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ГЛУТАМАТА И NO-ГЕНЕРИРУЮЩЕГО СОЕДИНЕНИЯ

¹ Лаборатория изучения информационных процессов на клеточном и молекулярном уровнях (зав. — д-р биол. наук Ю. В. Панчин), Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича РАН; ² лаборатория функциональной нейробиологии (зав. — канд. биол. наук М. М. Свинов), Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Исследовали ультраструктурные изменения в синапсах бутонов параллельных волокон (ПВ) и шипиков дендритов клеток Пуркинье (ДКП) мозжечка лягушки при воздействии высоких концентраций (1 mM) глутамата (Glu) и NO-генерирующего соединения в условиях модели инсульта. Показано, что при воздействии Glu происходит обхватывание терминального бутона шипиком, а под влиянием NO-генерирующего соединения, наоборот, — шипика бутоном. Морфологическое исследование показало, что в растворе Glu преобладают синапсы, в которых глиальными клетками окружены шипики, тогда как в присутствии NO — бутоны. При электрической стимуляции ПВ относительное содержание синапсов, бутоны которых окружены глиальными клетками, превышает долю синапсов, в которых глиальные клетки окружают шипики, в 10 раз. Наблюдаемые морфологические изменения отражают функциональное состояние синапсов ПВ и ДКП в ответ на повреждающее воздействие избытка Glu и NO, что выражается в разной форме синаптических контактов и нейрон-глиальных структур.

Ключевые слова: мозжечок, параллельные волокна, дендриты клеток Пуркинье, глутамат, нитрат натрия

При воздействии на организм внешних и внутренних факторов, существенно превышающих физиологическую норму, происходят нарушения структуры и функции клеток, как это имеет место при ишемических и геморрагических инсультах [1, 5, 7]. Как известно, мозжечок (МЖ) осуществляет важную функцию регуляции движений, обеспечивая при этом равновесие и контроль положения тела. Влияя на неокортекс, он участвует в различных формах пластичности и когнитивных процессах. Основным возбуждающим медиатором в МЖ является глутамат (Glu). Согласно современным представлениям, основной причиной поражения нервных клеток при ишемии, гипоксии, травме мозга и ряде других распространенных неврологических заболеваний, сопровождающихся структурными перестройками, является гиперактивация рецепторов Glu, стойкое повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция (Ca^{2+}) и оксида азота (NO) [1, 5, 11]. Длительная активация рецепторов Glu его токсическими дозами может приводить к некротическим и апоптотическим изменениям нейронов. Этот процесс получил название эксайтотоксического действия Glu [1, 4, 7].

Под нейропластичностью понимают способность мозга, нейронов или глии осуществлять компенсаторные структурно-функциональные перестройки под воздействием каких-либо факторов и сохранять их после его окончания [3, 12]. На клеточном и субклеточном уровнях рассматривают ультраструктурные изменения, связанные с белками, липидами и нуклеиновыми кислотами [1, 2, 10, 12–15]. Изучение нейропластичности, ее резервов в условиях ишемии/гипоксии, инсульта, а также компенсаторно-приспособительных реакций, имеет не только теоретическое, но и практическое значение. Цель данной работы — исследование пластических перестроек на уровне синапсов параллельных волокон (ПВ) МЖ и дендритов клеток Пуркинье (ДКП), которые могут быть способом защиты при токсическом воздействии Glu и NO (модель инсульта).

Материал и методы. Объектом исследования служил изолированный МЖ лягушки (*Rana temporaria*). При этом были созданы условия, характерные для инсульта путем повышения концентрации таких веществ, как Glu и NO. Glu, как основной нейромедиатор, осуществляет взаимодействие в синаптическом контакте ПВ—ДКП. Использован МЖ 23 взрослых лягушек. Исследования проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием

Сведения об авторах:

Самосудова Нина Васильевна (e-mail: nsamos@iitp.ru), лаборатория изучения информационных процессов на клеточном и молекулярном уровнях, Институт проблем передачи информации им. А. А. Харкевича РАН, 127051, Москва, Большой Каретный переулок, 19, стр. 1;

Реутов Валентин Палладиевич (e-mail: valentinreutov@mail.ru), лаборатория функциональной нейробиологии, Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485, Москва, ул. Бутлерова, 5А

экспериментальных животных» (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Были выполнены 7 экспериментальных вариантов: 1-й вариант — фиксация головного мозга сразу же после извлечения из черепной коробки, с последующей изоляцией МЖ (норма); 2-й вариант — инкубация 2 ч в чистом растворе Рингера (РР) — контроль инкубации; 3-й вариант — инкубация в РР с Glu (1 mM, 2 ч); 4-й вариант — инкубация в РР с NO (1 mM, 2 ч); 5-й вариант — стимуляция ПВ (1 ч, 0,1 Гц) в чистом РР, затем инкубация (1 ч) в том же растворе; 6-й вариант — стимуляция ПВ (1 ч, 0,1 Гц) в РР с 1 mM Glu, затем инкубация в той же среде (1 ч); 7-й вариант — стимуляция ПВ (1 ч, 0,1 Гц) в РР с NO (1 mM, 1 ч), затем инкубация в той же среде (1 ч). Стимуляцию проводили одиночными прямоугольными импульсами электрического тока нихромовыми биполярными электродами, запаянными в стекло (диаметр нихромовой проволоки 40 мкм), расположенными на поверхности молекулярного слоя МЖ, частота стимуляции 0,1 Гц, длительность импульсов 100 мкс, сила тока 10^4 – 10^5 А. Состав оксигенированного раствора Рингера: 115 mM Na^+ , 2,5 mM K^+ , 1,2 mM Ca_2^+ , 6,0 mM NaHCO_3 , 2 г глюкозы на 1 л раствора, pH 7,2–7,4. NaNO_2 использовали как вещество, способное превращаться в NO в результате восстановления ионов NO_2^- [6, 14]. Препараты для электронно-микроскопических исследований готовили по стандартной методике: фиксацию осуществляли 2,5% раствором глутаральдегида, приготовленном на 0,1 M Na-какодилатном буфере (pH 7,2), содержащем 0,5% танниновой кислоты и 3% сахарозы (1,5 ч при 4 °C). Далее материал фиксировали в 1% OsO_4 (pH 7,2) в том же буфере в течение 1 ч при 4 °C. Материал обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и ацетоне, заключали в смесь эпона—аралдита. Срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и исследовали с помощью электронного микроскопа JEM 100 SX (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 90 кВ.

Во всех 7 экспериментальных вариантах на электронно-микроскопических снимках, сделанных при одинаковых увеличении (8000) и величине кадра — 8×12 см в каждом кадре в 10 разных полях зрения подсчитывали количество синапсов, бутонов и шипиков. В каждом экспериментальном варианте определяли относительное содержание (%) синапсов различной конфигурации. Оценку статистической значимости полученных данных проводили по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования. Привоздействию избытка Glu (1 mM) или NO-генерирующего соединения (NaNO_2 , 1 mM) на МЖ лягушки происходит изменение конфигурации исследованных синапсов (рис. 1, а–д).

Так, под влиянием Glu преобладает обхватывание бутонов шипиками, а под влиянием NO — шипиков бутонами. Наблюдалось большое разнообразие формы синапсов при воздействии одного и того же нейромедиатора (Glu). Например, бутон почти наполовину мог быть обхвачен дендритным шипиком, при этом в бутоне сохранялись синаптические пузырьки, с открытой стороны он был окружен глиальной клеткой (см. рис. 1, б). В других случаях при значительном обхвате бутона шипиком между ними полностью (см. рис. 1, в) или частично (см. рис. 1, г) сохранялось пост-

синаптическое уплотнение — ПУ (post synaptic density). Встречались синапсы, где бутон был обхвачен шипиком, а весь синапс, в свою очередь, со всех сторон окружен глиальными клетками (см. рис. 1, д). Еще одна глиальная клетка могла быть связана с шипиком так называемым мостиковым контактом.

Если в присутствии избытка Glu происходило увеличение объема шипиков, то в среде с избытком NO-генерирующего соединения значительно увеличился объем бутонов и наблюдался обхват шипика бутонем подобно шляпке гриба (рис. 2, а, б). В обоих случаях в шипике следует отметить присутствие микротрубочек, а также значительное разрушение синаптических пузырьков. При менее значительном обхвате шипика бутонем шипик мог быть покрыт спиралевидной структурой — глиальной «обкруткой» (см. рис. 2, в). Встречались сильно поврежденные синапсы (см. рис. 2, г), шипик полностью был окружен «обкруткой», образованной глиальной клеткой.

Морфометрическое исследование и статистический анализ данных подтвердили, что в растворе Glu преобладают синапсы, в которых наблюдается обхват терминальных бутонов дендритными шипиками (таблица, Ш–Б-синапсы), а в среде с NO-генерирующим соединением — шипиков бутонами (см. таблицу, Б–Ш-синапсы). В норме приблизительно 70% синапсов более чем наполовину окружены глиальными клетками (см. таблицу, Г–С-синапсы). При инкубации МЖ в РР доля таких синапсов значимо не уменьшается по сравнению с нормой (см. таблицу). Значимое снижение доли таких синапсов по сравнению с нормой происходит при инкубации с Glu и NO (см. таблицу, опыты 3 и 4).

Стимуляция возвращает долю Г–С-синапсов к норме. При инкубации МЖ в РР значимо снижается доля синапсов, бутоны которых окружены глиальными клетками (см. таблицу, Г–Б-синапсы), но не снижается доля синапсов, у которых глиальными клетками окружены шипики (см. таблицу, Г–Ш-синапсы). Стимуляция значимо не повышает долю Г–Б-синапсов, относительное содержание Г–Ш-синапсов при этом значимо выше нормы (см. таблицу). Инкубация МЖ в присутствии Glu значимо снижает долю Г–С-синапсов по сравнению с нормой и не снижает при стимуляции в Glu (см. таблицу), при этом наблюдаются различия между относительным содержанием Г–Б- и Г–Ш-синапсов. При инкубации в Glu доли Г–Б- и Г–Ш-синапсов снижаются приблизительно в 2 раза, но относительное содержание Г–Ш-синапсов превышает таковое Г–Б-синапсов. Стимуляция в Glu увеличивает долю тех и других по срав-

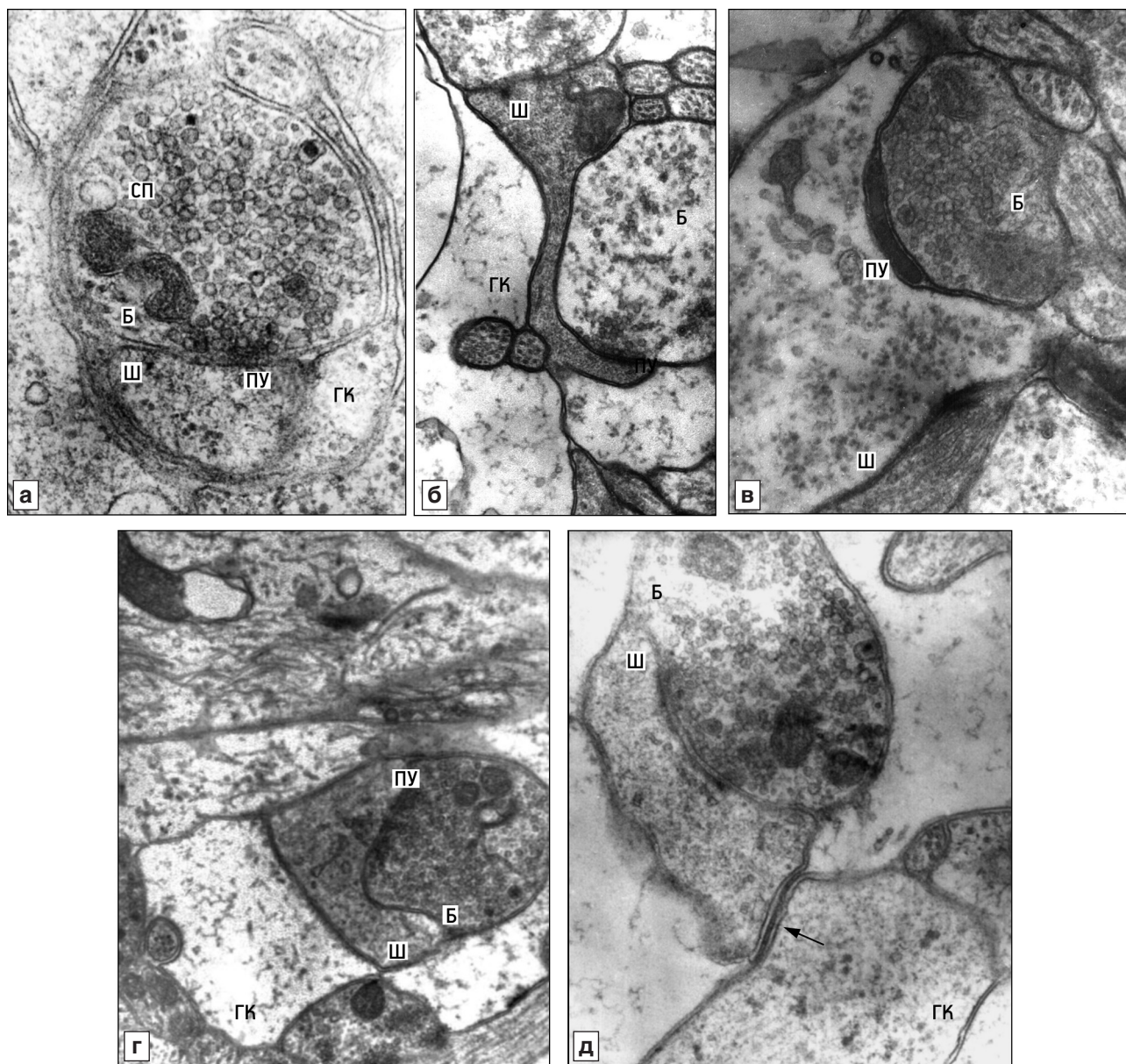


Рис. 1. Синапсы параллельных волокон и дендритных шипиков клеток Пуркинье в норме (а) и при инкубации мозжечка лягушки в растворе Рингера с глутаматом (1 мМ, 2 ч) (б–д).

а — пограничная линия между бутоном и шипиком практически прямая; видно скопление синаптических пузырьков в районе постсинаптического уплотнения; синапс окружен глиальной клеткой; б–г — обхват бутона шипиком. б — глиальная клетка окружает синапс со стороны шипика; в — постсинаптическое уплотнение между бутоном и шипиком; г — частично сохранившееся постсинаптическое уплотнение; глиальная клетка окружает шипик со всех сторон; д — бутон, обхваченный шипиком; «мостиковый» контакт между шипиком и глиальной клеткой (стрелка). Ш — дендритный шипик клетки Пуркинье; Б — терминальный бутон; ГК — глиальная клетка; СП — синаптические пузырьки; ПУ — постсинаптическое уплотнение. Ув.: а — 60 000; б, д — 37 000; в — 36 000; г — 25 500

нению с таковой при инкубации в Glu, однако по сравнению с нормой при инкубации в Glu доли Г–Б- и Г–Ш-синапсов были значимо ниже. Инкубация и стимуляция МЖ в присутствии NO-генерирующего соединения (см. таблицу, варианты 4 и 7) показали, что доля Г–Б-синапсов была значительно выше, чем Г–Ш-синапсов. При инкубации доля Г–Б-синапсов превышала долю Г–Ш-синапсов в 2 раза, а при стимуляции — в 10 раз. Таким образом, анализ нейрон-глиальных

структур показал, что в растворе Glu преобладает окружение глиальными клетками шипиков, тогда как в присутствии NO-генерирующего соединения — бутонов. Отсюда следует, что разное функциональное состояние синапсов ПВ и ДКП в ответ на повреждающие воздействия избытка Glu и NO выражается в разной форме их синаптических контактов и нейрон-глиальных структур.

Обсуждение полученных данных. Сравнительное исследование нейрон-нейронных

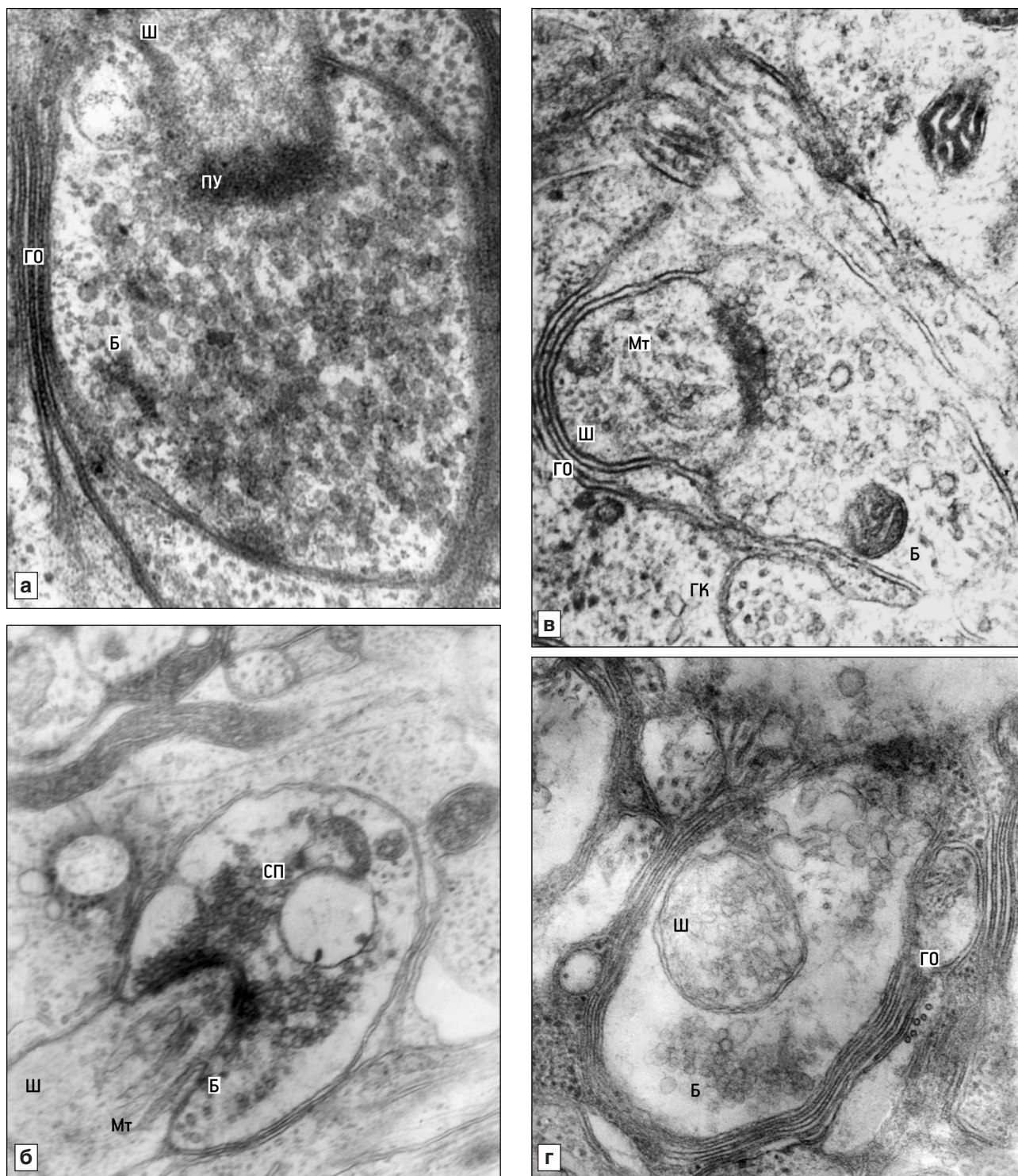


Рис. 2. Синапсы параллельных волокон и дендритных шипиков клеток Пуркинье при инкубации мозжечка лягушки в растворе Рингера, содержащего NO (1 mM, 2 ч).

а, б — обхват шипика бутоном. а — постсинаптическое уплотнение сохранно, синапс окружен рядами глиальных клеток — глиальная обкрукта; б — структура синаптических пузырьков значительно разрушена; в шипике видны микротрубочки; в — обхват шипика бутоном менее значительный, чем на рис. а, б; шипик покрыт глиальной «обкруктой»; г — значительно поврежденный синапс; шипик полностью окружен бутоном, а синапс, в целом, окружен рядами глиальных клеток. Мт — микротрубочки; ГО — глиальная обкрукта. Остальные обозначения те же, что на рис. 1. Ув.: а — 66 000; б — 36 500; в — 39 000; г — 50 000

(синаптических) и нейрон-глиальных структур при воздействии Glu и NO позволило обнаружить не только необратимые патологические изменения, но и развитие компенсаторно-приспособительных

реакций, показывающих эффективность функционирования нейронной сети МЖ. При воздействии избытка Glu и NO наблюдается изменение объема и формы синапсов. Эти данные свидетельствуют

Относительное содержание различных синапсов параллельных волокон и шипиков дендритов клеток Пуркинье в мозжечке лягушки *R. temporaria* в норме и при воздействии избыточных доз глутамата NO-генерирующего соединения и электрической стимуляции ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

№ опыта	Варианты исследования	Г–Б	Г–Ш	Г–С	Б–Ш	Ш–Б
1-й	Норма	46±6	65±6	72±3	5±3	41±6
2-й	КИ	27±6*	76±6	65±5	47±3***	26±7
3-й	И-Glu	18,9±2,0***	34±4***	60±4*	14±4*	67±10**
4-й	И-NO	24,5±2,1*	13,0±1,5***	62±3*	59±6***	24±7
5-й	КС	49±6	90±4*	80±4	58±6***	13,6±2,6***
6-й	С-Glu	26±3**	59±4	67,6±2,6	32±8**	61±8*
7-й	С-NO	55±5	5,6±2,8***	12±4***	83±7***	6,2±2,1***

Различия по сравнению с нормой значимы: * при $P < 0,05$; ** при $P < 0,01$; *** при $P < 0,001$.

Примечание. Описание вариантов исследования см. в разделе «Материал и методы». Обозначения различных синапсов пояснены в тексте статьи.

о том, что при избытке Glu наблюдается увеличение объема шипиков, обхватывающих бутоны, а в среде с избытком NO-генерирующего соединения значительно увеличивается объем бутонов, которые обхватывают шипики.

Митохондрии представляют собой мишени для действия токсических концентраций Glu и NO [1, 4, 11]. Набухание шипиков и бутонов может происходить вследствие деэнергизации митохондрий и нарушения ионного гомеостаза, за счет снижения активности Ca^{2+} - и Na^{+} -аденозинтрифосфатаз (АТФаз) в условиях дефицита АТФ и снижения мембранного потенциала. Активация входа ионов Na^{+} в клетку, как известно, сопровождается входом молекул H_2O и отёком клеток [11]. Таким образом, в ответ на действие повреждающих факторов — Glu и NO — синапсы ПВ—ДКП могут защищаться с помощью обволакивания бутона или шипика, а также при прямом участии глиальных клеток (нейрон-глиальное окружение). Сравнение нейрон-нейронных (синаптических) и нейрон-глиальных структур позволило объяснить, как в ответ на повреждающее воздействие Glu и NO-генерирующего соединения изменяется структура и развиваются компенсаторно-приспособительные реакции [8–11].

В этом плане важно отметить сохранность ПУ в некоторых случаях, так как известно, что эта структура является местом локализации рецепторов Glu [13]. Кроме того, известно, что в структурной пластичности дендритных шипиков участвует механизм, основанный на динамике актиновых нитей, также примыкающих к ПУ [15]. Поэтому сохранность последних чрезвычайно важна для функционирования синапса, т.е. для дальнейшей передачи сигнала от зернистой клетки МЖ к ДКП. По-видимому, изменения, наблюдаемые нами в структуре синапсов, связаны с функционированием актиновой структуры

шипика, действующей совместно с микротрубочками, в которых присутствует белок динеин, обладающий АТФазной активностью, присущей двум тяжелым цепям в его структуре. Естественнo предположить, что актин шипиков, действуя совместно с динеином микротрубочек, локализованных в тех же шипиках (подобно актину и миозину мышц), осуществляет изменение структуры синапсов ПВ—ДКП лягушки в ответ на действие повышенной концентрации Glu и NO [12, 13, 15]. Возможно, пластические перестройки как синапсов, так и глиальных клеток лежат в основе функционирования нейронной сети МЖ в норме и при патологии [8, 9, 12, 13, 15]. Мы полагаем, что результаты настоящей работы могут иметь не только научное, но и практическое значение. Так, NO может вызывать не только значительные изменения (повреждения) нейронов при гиперстимуляции рецепторов Glu [4], но и играть роль фактора защиты, как это было показано при развитии геморрагического инсульта под влиянием акустического стресса у генетической линии крыс Крушинского—Молодкиной [2, 7]. Конкретный характер действия NO зависит от того, в какое время при развитии геморрагического инсульта происходит его активация или ингибирование. Таким образом, результаты настоящей работы, свидетельствуя о конкретных пластических перестройках в МЖ в условиях модельного инсульта, расширяют представления о защитных механизмах, уже обнаруженных в нейронах мозга виноградной улитки [3]. Можно ожидать, что они могут быть использованы при анализе клинических данных у больных с черепно-мозговой травмой и будут полезными для понимания механизма действия некоторых лекарственных препаратов (новых пептидных препаратов), таких как «Кортексин», которые уже применяются при повреждениях мозга [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Викторов И. В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга // Вестн. РАМН. 2000. № 4. С. 5–10.
2. Гранстрем О. К., Сорокина Е. Г., Салыкина М. А. и др. Кортексин (нейропротекция на молекулярном уровне) // Нейроиммунология. 2010. Т. 8, № 1–2. С. 34–40.
3. Дьяконова Т. Л., Реутов В. П. Влияние нитрита на возбудимость нейронов мозга виноградной улитки // Росс. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 1998. Т. 84, № 11. С. 1264–1272.
4. Пинелис В. Г., Сорокина Е. Г., Винская Н. П. и др. Влияние токсического воздействия глутамата и нитрита на содержание циклического ГМФ в нейронах и их выживаемость // Докл. РАН. 1997. Т. 352, № 2. С. 259–261.
5. Раевский К. С., Башкатова В. Г., Ванин А. Ф. Роль оксида азота в глутаматергической патологии мозга // Вестн. РАМН. 2000. № 4. С. 11–15.
6. Реутов В. П., Ажипа Я. И., Каюшин Л. П. Кислород как ингибитор нитритредуктазной активности гемоглобина // Изв. АН СССР. Сер. биол., 1983. № 3. С. 408–418.
7. Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Швалева В. Н. и др. Возможная роль диоксида азота, образующегося в местах бифуркации сосудов, в процессах их повреждения при геморрагических инсультах и образовании атеросклеротических бляшек // Успехи физиол. наук. 2012. Т. 43, № 4. С. 73–93.
8. Самосудова Н. В., Реутов В. П., Ларионова Н. П., Чайлахян Л. М. Возможное участие оксида азота в межнейронном взаимодействии // Докл. РАН. 2001. Т. 378, № 3. С. 417–420.
9. Самосудова Н. В., Реутов В. П., Ларионова Н. П., Чайлахян Л. М. Нейроно-глиальные контакты, образующиеся в мозжечке при электрической стимуляции в присутствии NO-генерирующего соединения // Морфология. 2007. Т. 131, вып. 2. С. 53–58.
10. Сорокина Е. Г., Пинелис В. Г., Винская Н. П. и др. Механизм потенцирующего действия альбумина при токсическом воздействии глутамата: возможная роль окиси азота. Биологические мембраны // Журн. мембранной и клеточной биологии. 1999. Т. 16, № 3. С. 318–323.
11. Сурин А. М., Горбачева Л. Р., Савинкова И. Г. и др. Исследование изменений [АТФ] в цитозоле индивидуальных нейронов при развитии глутамат-индуцированной дисрегуляции кальциевого гомеостаза // Биохимия. 2014. Т. 79, № 2. С. 196–208.
12. Chen S., Hillman D. Plasticity of the parallel fiber — Purkinje cell synapse by spine takeover and new synapse formation in the adult rat // Brain Res. 1982. Vol. 240. P. 205–220.
13. Kennedy M. B. Signal-Processing machines at the postsynaptic density // Science. 2000. Vol. 290. P. 750–754.
14. Lunberg J. O., Gladwin M. T., Shiva S. et al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics // Nat. Chem. Biol. 2009. Vol. 5, № 12. P. 865–869.
15. Matus A. Actin — based plasticity in dendritic spines // Science. 2000. Vol. 290. P. 754–758.

Поступила в редакцию 15.04.2014

Поступила после доработки 09.04.2015

PLASTIC REORGANIZATION OF THE ULTRASTRUCTURE OF SYN- APSES IN THE CEREBELLUM DUE TO TOXIC EFFECTS OF GLUTAMATE AND NO-GENERATING COMPOUND

N. V. Samosudova¹, V. P. Reutov²

Ultrastructural changes in synapses between parallel fibers (PF) and the spines of Purkinje cell dendrites (PCD) in frog cerebellum were studied after exposure to high concentrations (1 mM) of glutamate (Glu) and NO-generating compound in experimental model. It was shown that exposure to Glu resulted in the envelopment of the terminal bouton by the spine, while under the influence of NO-generating compound, on the contrary, the spine was surrounded by the bouton. Morphological study has shown that in Glu solution there was the predominance of synapses in which the glial cells surrounded the spines, while in the presence of NO they covered the boutons. After the electrical stimulation of PF, the relative number of synapses, containing the boutons surrounded by glial cells, was 10 times higher as compared to those in which the glial cells surrounded the spines. The observed morphological changes reflect the functional state of synapses between PF and PCD in response to the damaging effects of excess Glu and NO, that is expressed in different forms of synaptic contacts and neuron-glia structures.

Key words: *cerebellum, parallel fibers, Purkinje cell dendrites, glutamate, sodium nitrate*

¹ Laboratory for the Study of Information Processes at Cellular and Molecular Levels, RAS A.A. Kharkevich Institute of Information Transmission Problems, Moscow; ² Laboratory of Functional Neurocytology, RAS Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Moscow