

Н.Ю. Цаплина¹, Г.З. Михайлова², Р.Ш. Штанчаев² и Д.А. Мошков^{1,2}

СТАБИЛИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ МАУТНЕРОВСКИХ НЕЙРОНОВ ПРИ АДАПТАЦИИ ЗОЛОТОЙ РЫБКИ К КОНТРАЛАТЕРАЛЬНОЙ ОПТОКИНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ

¹ Магистерская образовательная программа медико-биологические науки (зав. — проф. Э.И. Лежнев) Учебного центра биофизики и биомедицины Пущинского государственного университета; ² лаборатория ультраструктуры нейрона (зав. — проф. Д.А. Мошков) Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино

Ранее нами было показано, что контралатеральная оптокинетическая (зрительная) стимуляция (КОС) вызывает инверсию моторной асимметрии золотых рыбок и трехкратное уменьшение объема вентрального дендрита их ипсилатерального маутнеровского нейрона (МН). Повторяющиеся же в тренировочном режиме ежедневные сеансы КОС вызвали устойчивость моторного поведения рыбок к данному воздействию. В настоящей работе исследовали влияние тренировочных сеансов КОС на структуру МН и их частей. Установлено, что ежедневные зрительные тренировки стабилизируют размер вентральных дендритов МН, существенно увеличивая их сопротивляемость однократной длительной КОС. Таким образом, повторяющаяся стимуляция индивидуального дендрита индуцирует в нем и в нейроне в целом адаптированное морфофункциональное состояние. Это позволяет более детально исследовать роль отдельного дендрита в модификации функциональной активности всего нейрона и в механизмах адаптации и памяти на клеточном уровне.

Ключевые слова: маутнеровские нейроны, контралатеральная оптокинетическая стимуляция, адаптация, моторная асимметрия.

Дендриты — главный морфологический компонент нейронов. Предполагается, что от их числа и размеров зависит степень афферентных влияний и интегральная активность постсинаптического нейрона [10, 11]. Однако пока не удалось полностью оценить, какой отдельный вклад индивидуальные дендриты вносят в поведение животного при адаптации и обучении, как это сделано для нейрона в целом [12]. Также не ясно, насколько автономно или, наоборот, в кооперации с остальными дендритами участвует в пластических перестройках конкретного нейрона каждый из его дендритов [14].

В исследованиях данной проблемы перспективны классические объекты нейробиологии — парные маутнеровские нейроны (МН) золотой рыбки, имеющие 2 главных дендрита: латеральный (ЛД), принимающий статоакустический афферентный вход, и вентральный (ВД), являющийся приемником зрительной афферентации [13, 15]. Стимуляция любого из этих дендритов способна вызывать в соответствующем МН электрическое возбуждение, которое, распространяясь по аксону, передается на мотонейроны спинного мозга и приводит к С-образному повороту тела рыбки в контралатеральную от данного МН сторону [6, 13]. Таким образом, структурно-функциональные особенности системы МН позволяют отдельно изучать роль каждого из дендритов в интегральной активности нейрона на клеточном уровне и в поведении рыбки. Установлено, что морфофункциональное состояние МН можно модифи-

цировать, отдельно стимулируя вестибулярный либо зрительный аппараты [2, 4, 5, 9]. Так, однократная длительная вестибулярная стимуляция одного из двух МН снижает функциональную активность нейрона в целом, что сопровождается изменением моторной асимметрии рыбок и существенным уменьшением размеров ЛД и тела нейрона. Вестибулярная стимуляция, повторяющаяся в тренировочном режиме, индуцирует адаптированное состояние, сопротивляемость функции и структуры ЛД к утомляющей стимуляции [5]. В то же время, длительная однократная контралатеральная оптокинетическая стимуляция (КОС) инвертирует моторную асимметрию рыбки и значительно уменьшает размер (объем) ВД [8, 9]. Повторяющаяся же в виде тренировок зрительная стимуляция рыбок повышает резистентность их моторной асимметрии к длительной тестовой стимуляции [2]. Таким образом, у рыбок и у их МН выявлена схожесть реакции на однократную или повторяющуюся стимуляцию афферентного входа, независимо от его модальности. Оставалось невыясненным, сопровождается ли повторяющаяся оптокинетическая стимуляция рыбок стабилизацией размера ВД их МН. Исследование этого вопроса и явилось целью настоящей работы.

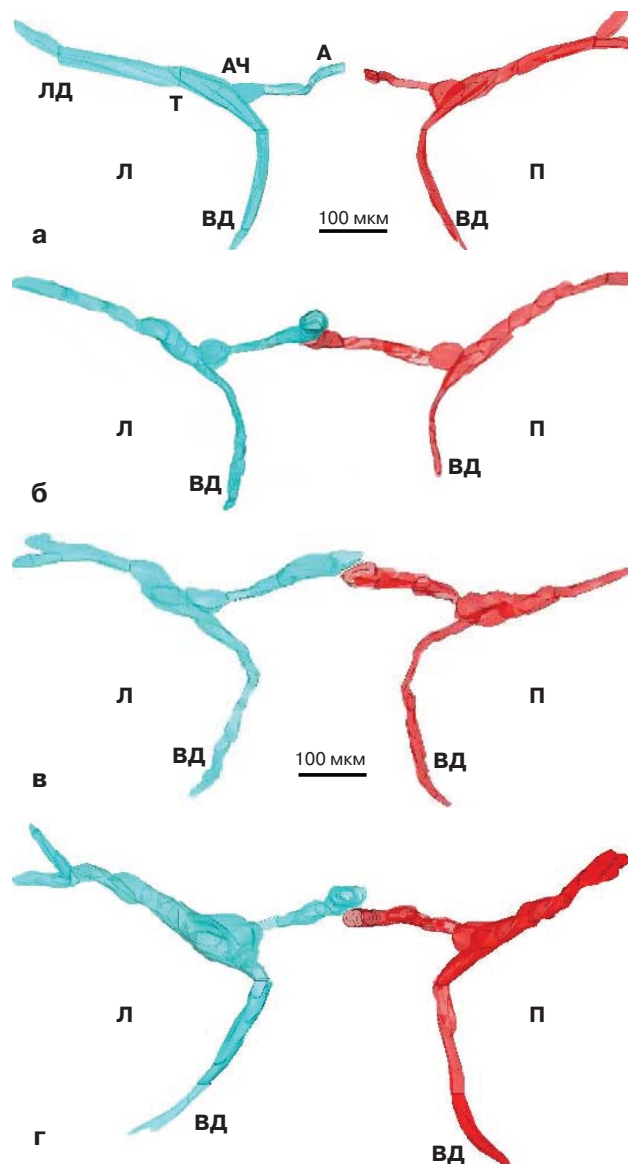
Материал и методы. Работа проведена на 161 мальке золотой рыбки (*Carassius auratus*) породы Оранда длиной около 3 см, 3–6-месячного возраста, приобретенных в индивидуальном рыбозаводном хозяйстве Москвы. С каждой рыбкой работали отдельно на протяжении всего эксперимента. Из обследованной группы для дальнейших опытов

выбирали рыбок-правшей и рыбок-левшей, отобранных по предпочтению стороны поворота, т.е. по их индивидуально выраженной моторной асимметрии, представляемой в виде соответствующего коэффициента (КМА). Его определяли как отношение числа поворотов в предпочитаемую сторону к общей сумме поворотов, совершенных рыбкой за 5 мин тестирования в узком прямом канале [4].

Контралатеральную к предпочитаемой стороне поворотов рыбки оптокинетическую стимуляцию, основанную на врожденной реакции следования рыбок за движущимися зрительными ориентирами (вертикальными черно-белыми полосками), проводили по описанной ранее методике [8]. Режимы адаптации к КОС — умеренный ($1/4$ длительности от максимальной, 10-часовой стимуляции), приводящий к адаптации низкого уровня, и усиленный (вплоть до максимальной длительности КОС), приводящий к адаптации высокого уровня, — опубликованы ранее [2]. Тренировки, заключающиеся в градуально нарастающих по длительности повторяющихся КОС, продолжались 15 сут. Затем рыбкам давали отдыхать до восстановления у них исходной моторной асимметрии (5–7 сут), после чего для проверки состояния адаптации подвергали 10-часовой тестовой КОС, в норме приводящей к инверсии моторной асимметрии у интактных рыбок.

Морфологические исследования МН — определение объемов их частей (тела, ЛД и ВД, начального сегмента аксона и аксонной чаши) и суммарных объемов, анализ значимости структурных различий проводили на основании трехмерной реконструкции МН. Реконструкцию нейронов осуществляли по серийным гистологическим срезам продолговатого мозга, фиксированного и залитого по протоколу, используемому в электронной микроскопии, толщиной 3 мкм. Методики и перечень применяемых при этом компьютерных программ опубликованы ранее [3, 9]. Для морфологических исследований из группы подопытных и контрольных животных были отобраны 15 особей. Для оценки связи структурной асимметрии МН и их частей с асимметрией поворотов рыбки использовали коэффициент структурной асимметрии (КСА) — отношение объема доминантного МН (или его части) к сумме объемов двух нейронов (частей).

Результаты исследования. На рисунке представлены МН контрольных и подопытных золотых рыбок, характерные для каждой из рассматриваемых групп. У рыбки-правши, адаптированной к контралатеральной зрительной стимуляции (см. рисунок, в), заметно превышение объема левого (контралатерального) МН над правым, т.е. наблюдается та же картина, что и в контроле (у интактной правши, см. рисунок, а). При этом сохраняется прямая корреляция структурной асимметрии МН с моторной асимметрией рыбки (КМА данной адаптированной рыбки перед фиксацией составлял 0,55). Однако реакция МН на длительную однократную стимуляцию у рыбок из этих групп существенно различается, в то время как после данного воздействия ВД ипсилатерального МН интактной рыбки сильно редуцируется (см. рисунок, б), у адаптированной рыбки размер этого дендрита практически не изменяется (см. рисунок, г). Таким образом, наблюдается струк-



Изображения объемно реконструированных маутнеровских нейронов (МН) золотых рыбок-правшей (типичные примеры среди групп интактных и адаптированных особей до и после длительной контралатеральной оптокинетической стимуляции — КОС).

а — МН интактной рыбки; левый (контралатеральный) нейрон крупнее правого (ипсилатерального); б — МН рыбки, подвергнутой КОС; вентральный дендрит (ВД) ипсилатерального МН уменьшен в несколько раз; в — МН рыбки в состоянии адаптации к КОС высокого уровня; исходная асимметрия нейронов сохраняется; г — МН адаптированной рыбки, подвергнутой тестовой КОС; ВД ипсилатерального нейрона сохраняет свой первоначальный размер. Т — тело нейрона; А — аксон; ЛД — латеральный дендрит; АЧ — аксонная чаша; Л и П — левый и правый МН; вид со стороны спинного мозга рыбки.

турная резистентность дендрита, вызванная предварительными тренировками.

Эти качественные данные подтверждаются и детализируются результатами измерения реальных объемов отдельных частей и суммарных

Коэффициент моторной асимметрии (КМА) и объемы маутнеровских нейронов (МН) и их частей интактных и адаптированных к контралатеральной оптокинетической стимуляции (КОС) золотых рыбок до и после тестовой КОС

Исследованные рыбки	МН	Объем МН, $\times 10^3$ мкм ³							Исходный КМА	КМА перед КОС	КМА после КОС	КСА МН
		Тело	ЛД	ВД	Аксон	АЧ	Σ МН	Σ 2МН				
Интактные (n=3)	К	169 $\pm$ 8	66 $\pm$ 5	63 $\pm$ 8	92 $\pm$ 78	31 $\pm$ 25	298 $\pm$ 11	488 $\pm$ 16	0,59 $\pm$ 0,03	–	–	0,610 $\pm$ 0,010
	И	96 $\pm$ 15*	42 $\pm$ 4*	52 $\pm$ 15	97 $\pm$ 69	33 $\pm$ 5	190 $\pm$ 7*					
Интактные после 10-часовой КОС (n=3)	К	209 $\pm$ 112	64 $\pm$ 15	82 $\pm$ 6	99 $\pm$ 39	42 $\pm$ 15	355 $\pm$ 121	546 $\pm$ 151	0,59 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,08***	0,64 $\pm$ 0,05
	И	128 $\pm$ 20	43 $\pm$ 9	20 $\pm$ 7**	100 $\pm$ 44	37 $\pm$ 19	192 $\pm$ 31*					
Рыбка-правша после адаптации низкого уровня и 10-часовой КОС	К	85	17	89	53	27	191	364	0,59 $\pm$ 0,04	0,75	0,48	0,52
	И	83	15	75	64	16	173					
Адаптированные рыбки, контроль (n=3)	К	175 $\pm$ 77	32 $\pm$ 15	63 $\pm$ 11	110 $\pm$ 47	49 $\pm$ 38	271 $\pm$ 93	523 $\pm$ 186	0,58 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,03	–	0,52 $\pm$ 0,03
	И	170 $\pm$ 85	38 $\pm$ 14	45 $\pm$ 9	85 $\pm$ 30	72 $\pm$ 35	252 $\pm$ 95					
Адаптированные рыбки после 10-часовой КОС (n=3)	К	146 $\pm$ 107	78 $\pm$ 23	80 $\pm$ 28	154 $\pm$ 53	80 $\pm$ 13	302 $\pm$ 137	558 $\pm$ 189	0,61 $\pm$ 0,04	0,570 $\pm$ 0,010	0,58 $\pm$ 0,05	0,53 $\pm$ 0,08
	И	128 $\pm$ 80	57 $\pm$ 11	70 $\pm$ 21	168 $\pm$ 32	43 $\pm$ 21	256 $\pm$ 69					

Примечание. Вследствие идентичности эффектов КОС на рыбок-правшей и левшей данные по обеим группам рыбок были объединены. К — контралатеральный (доминантный) МН (левый — у рыбок-правшей, правый — у рыбок-левшей); И — ипсилатеральный МН; ЛД и ВД — латеральный и вентральный дендриты соответственно; АЧ — аксонная чаша; Σ МН — суммарный объем одного МН; Σ 2МН — суммарный объем правого и левого МН. При вычислении суммарных объемов МН, а также их коэффициента структурной асимметрии (КСА) объемы аксонов не учитывали, исходя из того, что изменения при сенсорных воздействиях, по нашим данным, подвергаются лишь объемы тела и главных дендритов нейронов.

* Различия значимы по сравнению с соответствующим показателем у контралатерального МН.

** Различия значимы по сравнению с соответствующим показателем у ипсилатерального МН интактной рыбки.

*** Различия значимы по сравнению с соответствующими показателями до стимуляции. Во всех случаях $P < 0,05$.

усредненных и индивидуальных объемов МН рыбок из контрольных и подопытных групп, представленными в таблице.

Адаптация к КОС сама по себе не изменяет объемных пропорций МН и их частей, хотя заметно сглаживание структурной асимметрии нейронов (см. таблицу). Сглаживалась структурная асимметрия всех частей, в том числе и ВД, и суммарных объемов МН. Однако превышение объема контралатерального МН над объемом ипсилатерального сохраняется в каждом индивидуальном случае, как это видно на примере рыбки-правши, подвергнутой адаптации низкого уровня и последующей тестовой стимуляции (см. таблицу). На том же примере можно наблюдать, что даже слабая адаптация, не приводящая к значительной устойчивости моторной асимметрии рыбок к инвертирующей стимуляции, оказывает стабилизирующее действие на структуру нейронов, и в частности ВД ипсилатерального МН. Соотношение объемов ВД правого и левого нейронов после тестовой КОС сохраняется на уровне интактного состояния.

Для анализа структурных изменений МН после тестовой КОС были использованы фиксированные препараты мозга тех рыбок, у которых моторная асимметрия не испытывала никаких отчетливых изменений, т.е. не инвертировалась и не сглаживалась. Асимметрия суммарных объемов правых и левых МН у этих рыбок сохранялась, и, что существенно, соотношение объемов ВД МН тоже практически не отличалось от исходного уровня, характерного для адаптированных и интактных рыбок (см. таблицу).

Таким образом, тренировка и индукция у рыбок состояния адаптации как низкого, так и высокого уровня стабилизировала не только моторную асимметрию рыбок, но также объемы МН и их составных частей, сохраняя значения данных параметров на уровне, свойственном интактному состоянию, и препятствовала их изменению под действием КОС.

Обсуждение полученных данных. Одной из важных проблем

нейробиологии является выяснение роли индивидуальных дендритов в поддержании функциональной интегральной активности нейрона и определение степени их участия в модификациях нейрональной функции, вызванных повторяющимися стимуляциями соответствующих афферентных входов, в целом представляющими собой аналогии обучения, адаптации и памяти. Ранее подобная задача была поставлена и успешно решена на примере иннервируемого статоакустическим нервом ЛД МН [5]. Было установлено, что избирательная вестибулярная стимуляция, повторяющаяся в виде тренировки, приводит к выработке в нейронах адаптированного состояния. Последнее характеризуется повышением резистентности моторной асимметрии рыбок, в норме прямо коррелирующей со структурной асимметрией их левого и правого МН [3].

В настоящей работе исследована возможность индукции морфофункционального адаптированного состояния в ВД МН. В норме ВД правого и левого МН имеют объемы, соизмеримые друг с другом. Однако после специфической зрительной стимуляции размер ВД ипсилатерального, в норме субдоминантного (функционально менее активного), МН уменьшается в 2–4 раза по сравнению с размером того же дендрита у контралатерального нейрона [9]. Такая закономерность характерна для интактных, т.е. не адаптированных рыбок-правшей и левшей. При этом моторная асимметрия этих рыбок после КОС испытывает значительную инверсию: рыбки-правши становятся левшами (КМА снижается с $0,61 \pm 0,02$ до $0,35 \pm 0,06$, $n=20$), а рыбки-левши становятся правшами (КМА снижается с $0,61 \pm 0,02$ до $0,37 \pm 0,06$, $n=20$). Это, в свою очередь, может свидетельствовать о перераспределении доминирующей роли с одного МН на другой [8].

В то же время, влияние тестовой стимуляции на моторную асимметрию рыбок, адаптированных в ходе многократной КОС, показывает различия с тем, что наблюдается у интактных рыбок [2]. Моторная асимметрия рыбок, подвергнутых адаптации низкого уровня, после проверочной стимуляции сглаживается или испытывает незначительную инверсию (от $0,67 \pm 0,11$ перед стимуляцией до $0,42 \pm 0,04$ после нее; $n=4$). У рыбок, подвергнутых адаптации высокого уровня, в большинстве случаев после тестовой КОС не происходит инверсии асимметрии поворотов (в среднем КМА изменяется от значения $0,58 \pm 0,02$ до $0,53 \pm 0,04$, $n=12$), что свидетельствует о сохранении баланса функциональной активности между доминантным и субдоминантным нейронами [2].

Морфологические исследования, проведенные в настоящей работе, показали, что вместе с возрастанием функциональной резистентности МН, проявляющейся в поведении в виде устойчивой моторной асимметрии рыбок, наблюдается также и структурная стабилизация ВД, принимающего локализованные в дистальной области афферентные входы от зрительного анализатора [15]. При этом адаптированное состояние достигается именно за счет специфических зрительных стимуляций, повторяющихся в тренировочном режиме.

Таким образом, впервые установлено, что индивидуальный ВД можно локально адаптировать с помощью избирательной повторяющейся стимуляции афферентного зрительного входа. Вместе с тем, есть основания предположить, что адаптация индивидуального дендрита происходит не локально, а благодаря вовлечению в этот процесс всего МН, т.е. на системном уровне. На это указывают функциональные исследования [2], показавшие, что при перекрестной адаптации МН к стимуляции одного афферентного входа (например зрительного) рыбки приобретают резистентность к утомительной стимуляции другого входа (в данном случае вестибулярного). Ранее было установлено, что укрепление структуры МН, точнее его тела и ЛД, сопряжено со стабилизацией нейронального актинового цитоскелета [1, 7]. Можно предположить, что и в случае адаптации ВД МН к зрительной стимуляции механизм морфофункциональной резистентности основан на преобразовании актинового цитоскелета всего нейрона, возможно, с преобразованием активных зон афферентных синапсов, подобно тому, как это происходит на ЛД и теле нейрона при адаптации к вестибулярной стимуляции [6].

Работа финансировалась грантами поддержки научных школ НШ № 217.2008.4 и РФФИ № 09-04-00451а, а также Аналитической ведомственной целевой программой «Развитие научного потенциала высшей школы», проект № 3840.

Работа проведена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям — Федеральная целевая программа «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России». Номер государственного контракта 02.740.11.0301.

ЛИТЕРАТУРА

1. Безгина Е.Н., Павлик Л.Л., Михайлова Г.З. и др. Морфофункциональные исследования взаимодействия глутамата и дофамина с маутнеровскими нейронами. *Нейрофизиология/Neurophysiology*, 2006, т. 38, № 6, с. 411–421.
2. Дектярева Н.Ю., Штанчаев Р.Ш., Михайлова Г.З. и Мошков Д.А. Стабилизация моторной асимметрии у золотой рыбки под влиянием оптокинетической стимуляции. *Нейрофизиология/Neurophysiology*, 2008, т. 40, № 3, с. 487–493.

3. Михайлова Г.З., Павлик В.Д., Тирас Н.Р. и Мошков Д.А. Корреляция размеров маутнеровских нейронов с предпочтением золотых рыбок поворачиваться вправо или влево. *Морфология*, 2005, т. 127, вып. 2, с. 16–19.
4. Михайлова Г.З., Тирас Н.Р., Григорьева Е.Е. и Мошков Д.А. Изменение моторной асимметрии золотой рыбки при адаптации к эффектам ротационной стимуляции. *Нейрофизиология/Neurophysiology*, 2005, т. 37, № 5/6, с. 432–442.
5. Михайлова Г.З., Тирас Н.Р., Павлик В.Д. и др. Морфологические характеристики маутнеровских нейронов золотых рыбок с измененной асимметрией моторного поведения. *Нейрофизиология/Neurophysiology*, 2006, т. 38, №1, с. 18–31.
6. Мошков Д.А. Адаптация и ультраструктура нейрона. М., Наука, 1985.
7. Тирас Н.Р., Михайлова Г.З. и Мошков Д.А. Эффекты, вызываемые полимеризующим актин пептидом, в маутнеровских нейронах золотой рыбки. *Нейрофизиология/Neurophysiology*, 2006, т. 38, № 5/6, с. 389–400.
8. Штанчаев Р.Ш., Михайлова Г.З., Дектярёва Н.Ю. и др. Влияние оптокинетической стимуляции на моторную асимметрию у золотой рыбки. *Нейрофизиология/Neurophysiology*, 2007, т. 39, № 2, с. 133–145.
9. Штанчаев Р.Ш., Михайлова Г.З., Дектярёва Н.Ю. и др. Изменения вентрального дендрита маутнеровского нейрона золотой рыбки под воздействием оптокинетической стимуляции. *Морфология*, 2007, т. 132, вып. 6, с. 29–34.
10. Bekkers J.M. and Hausser M. Targeted dendrotomy reveals active and passive contributions of the dendritic tree to synaptic integration and neuronal output. *Prog. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, v. 104, № 27, p. 11447–11452.
11. Cuntz H., Borst A. and Segev I. Optimization principles of dendritic structure. *Theor. Biol. Med. Model.*, 2007, v. 4, № 21, p. 1186–1194.
12. Houweling A.R. and Brecht M. Behavioral report of single neuron stimulation in somatosensory cortex. *Nature*, 2008, v. 451, p. 65–68.
13. 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. 13–28.
14. Samsonovich A.V. and Ascoli G.A. Morphological homeostasis in cortical dendrites. *Prog. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, v. 103, № 5, p. 1569–1574.
15. 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 28.10.08
Получена после доработки 14.02.09

STABILIZATION OF THE STRUCTURE OF MAUTHNER NEURONS IN THE GOLDFISH ADAPTED TO CONTRALATERAL OPTOKINETIC STIMULATION

N.Yu. Tsaplina, G.Z. Mikhailova, R.Sh. Shtanchayev and D.A. Moshkov

Previously we have demonstrated, that the contralateral optokinetic (visual) stimulation (COS) induces an inversion of goldfish motor asymmetry and three-fold decrease of the ventral dendrite of ipsilateral Mauthner neuron (MN) volume, whereas repetitive in training mode daily COS sessions induced a motor behavior resistance to this influence in fish. In the the present investigation we have examined the effect of the training COS sessions on the structure of MN and their parts. It was found that daily visual training stabilizes the size of the ventral dendrites, significantly increasing their resistance to single prolonged COS. Thus, the adapted morpho-functional state was induced in the individual dendrite and in the whole neuron by repetitive stimulation of that dendrite. These results make it possible to investigate in more detail the role of an individual dendrite in the modification of functional activity of the whole neuron and in adaptation and memory mechanisms at the cellular level.

Key words: *Mauthner neurons, contralateral optokinetic stimulation, adaptation, motor asymmetry.*

“Biomedical Sciences” Master Educational Program, Educational Center for Biophysics and Biomedicine, Pushchino State University; Laboratory of Neuron Ultrastructure, RAS Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino