

И.Б. Михеева¹, Н.Ю. Цаплина¹, Е.Е. Григорьева¹, Е.Н. Безгина¹, Р.Ш. Штанчаев¹,
Г.З. Михайлова¹, Н.Р. Тирас^{1,2} и Д.А. Мошков^{1,2}

УЛЬТРАСТРУКТУРА МАУТНЕРОВСКИХ НЕЙРОНОВ ПРИ ОПТОКИНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ И ЭНУКЛЕАЦИИ ГЛАЗА

¹ Лаборатория ультраструктуры нейрона (зав. — проф. Д.А. Мошков), Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино; ² Магистерская образовательная программа «Медико-биологические науки» (зав. — проф. Э.И. Лежнев), Пущинский государственный университет, e-mail: mikheirina@yandex.ru; d_moshkov@mail.ru

Ранее было показано, что контралатеральная (к предпочитаемой стороне поворотов) оптокинети́ческая стимуляция и ипсилатеральная энуклеация глаза приводят к значительному, 2–4-кратному уменьшению объема вентрального дендрита (ВД) у одного из двух маутнеровских нейронов (МН) золотой рыбки, который становится функционально более активным. В настоящей работе исследована ультраструктура МН после указанных односторонних зрительных воздействий. В обоих случаях по всей длине уменьшенного ВД выявлено запустевание синапсов и уплотнение его цитоскелета по сравнению с цитоскелетом ВД противоположного МН и цитоскелетом латеральных дендритов и сомы обоих нейронов. Предполагается, что запустевшие синапсы принадлежат возбуждающему зрительному входу, и что в регуляцию функциональной активности МН через ВД вовлечены как цитоскелетные, так и синаптические механизмы.

Ключевые слова: маутнеровские нейроны, ультраструктура, оптокинети́ческая стимуляция, энуклеация глаза

Глаза и статоакустический аппарат оказывают существенное влияние на функционирование маутнеровских нейронов (МН) золотой рыбки [9, 14]. Зрительная, вестибулярная или слуховая стимуляция, по данным электрофизиологических экспериментов, способны вызывать в соответствующем МН потенциал действия, который инициирует реакцию испуга (startle-reflex) в виде быстрого С-образного изгиба тела рыбки в противоположную от этого нейрона сторону [7, 13]. Вместе с тем, статоакустический афферентный путь, оканчивающийся на соме и латеральном дендрите ипсилатерального МН, влияет на его интегральную функциональную активность прямо: односторонняя вестибулярная стимуляция или деафферентация угнетают функцию нейрона, что проявляется изменением моторной асимметрии рыбки, и существенно уменьшают интегральный размер нейрона [4]. В противоположность этому, зрительный афферентный путь, проецируемый из контралатерального глаза через ипсилатеральный тектум на вентральный дендрит, влияет на интегральную функциональную активность МН реципрокно: длительная зрительная стимуляция или энуклеация глаза усиливают активность МН, хотя при этом наблюдается значительное уменьшение размера вентрального дендрита [3, 6]. Причина такой организации управления МН со стороны зрительного аппарата остается неясной. Прояснить этот вопрос, по нашему мнению, могут электронно-микроскопические исследования,

позволяющие видеть детали взаимодействия зрительного входа с МН через вентральный дендрит, ускользающие при гистологическом изучении из-за низкого разрешения световой микроскопии. Это и стало задачей настоящей работы.

Материал и методы. Работа проведена на 11 мальках золотых рыбок *Carassius auratus* породы оранда, 3–6-месячного возраста, размером около 3 см. *Физиологическая часть работы* заключалась в определении моторной асимметрии рыбок, которую выражали в виде коэффициента моторной асимметрии и в оценке влияния на нее контралатеральной оптокинети́ческой стимуляции или ипсилатеральной энуклеации глаза по разработанному в лаборатории методикам, описанным ранее [2, 5].

Для морфологического исследования МН мозг рыбок после воздействия на зрительный аппарат фиксировали в момент наибольшего проявления функционального эффекта: сразу после зрительной стимуляции и через 1 мес после энуклеации глаза [2, 5]. Сначала проводили трехмерную реконструкцию и рассчитывали объемы индивидуальных частей МН (сома, латеральный и вентральный дендриты) по серийным гистологическим срезам (толщиной 3 мкм) продолговатого мозга, фиксированного и залитого по протоколу, используемому в электронной микроскопии [4]. Гистологические срезы изготовляли на пирамитоме (LKB, Швеция) и фотографировали с помощью микроскопа NU-2E (Carl Zeiss, ГДР) на цифровую камеру CoolPix E995 (Nikon, Япония). Затем прицельно изучали ультраструктуру латеральных и вентральных дендритов правого и левого реконструированных МН интактных рыбок (рис. 1, а) и подопытных (рис. 2, а, б) с отчетливо выраженной инверсией или атрофией вентрального дендрита. Для этого содержащие исследуемые части МН гистологические срезы, переклеенные со стекол на отдельные эпоновые блоки, резали ультратонко на ультрамикротоме EM UC6

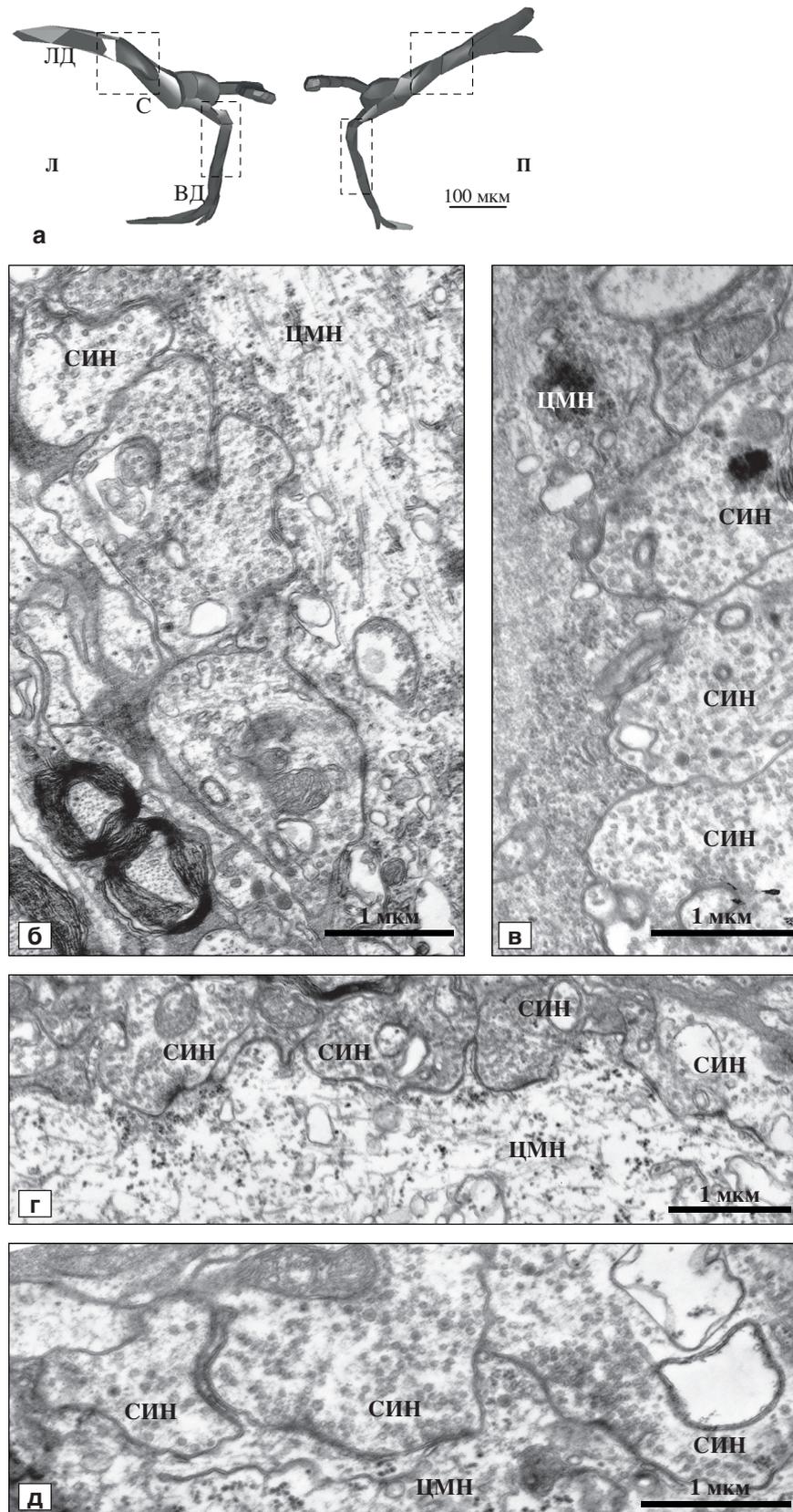


Рис. 1. Структура маутнеровских нейронов (МН) интактной рыбки-правши (коэффициент моторной асимметрии=0,64).

а — объемная реконструкция доминантного левого (Л) и субдоминантного правого (П) МН. Объем левого вентрального дендрита (ВД)= $92 \cdot 10^3$ мкм³, правого ВД= $58 \cdot 10^3$ мкм³. ЛД — латеральный дендрит; С — сома. Рамками выделены участки МН, подвергавшиеся электронно-микроскопическому исследованию; б-д — ультраструктура поверхности МН с синапсами (СИН); б — участок ЛД левого МН; в — участок ЛД правого МН; г — участок ВД левого МН; д — участок ВД правого МН. Здесь и на рис. 2: ЦМН — цитоплазма МН.

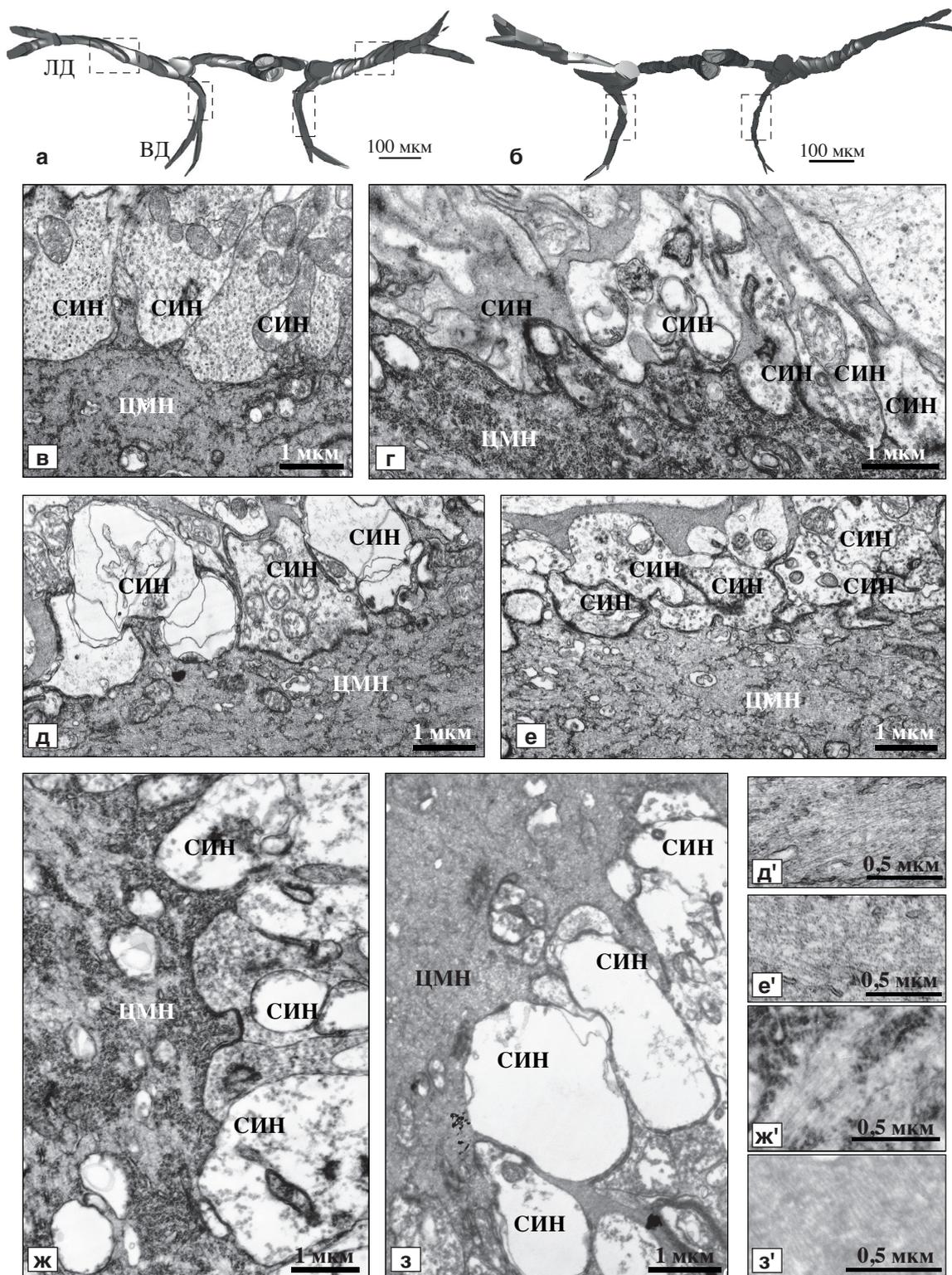


Рис. 2. Структура маутнеровских нейронов (МН) рыбки-правши после энуклеации правого глаза (коэффициент моторной асимметрии — КМА изменился от 0,54 до 0,68) (а) и рыбки-правши после контралатеральной оптокинетической стимуляции (КОС) (КМА изменился от 0,60 до 0,31) (б).

а — объемная реконструкция МН рыбки-правши после энуклеации правого глаза. Объем левого вентрального дендрита (ВД)= $47 \cdot 10^3$ мкм³, правого ВД= $91 \cdot 10^3$ мкм³; б — реконструкция МН рыбки-правши после КОС. Объем левого ВД= $42 \cdot 10^3$ мкм³, правого ВД= $18 \cdot 10^3$ мкм³. Рамками выделены участки МН, ультраструктура которых представлена на рисунках в-з. в-е — ультраструктура поверхности МН с синапсами (СИН) после энуклеации: в — участок латерального дендрита (ЛД) левого МН; г — участок ЛД правого МН; д — участок ВД левого МН; е — участок ВД правого МН; ж-з — ультраструктура поверхности ВД правого (ж) и левого (з) МН с СИН после КОС; д¹-з¹ — состояние цитоскелета в ВД: левого (д¹) и правого (е¹) МН после энуклеации; левого (ж¹) и правого (з¹) МН после КОС.

(Leica, ФРГ) и исследовали в электронном микроскопе Tesla BS-500 (Чехословакия). Съемку вели на фотопленку, негативы обрабатывали и анализировали после их оцифровки с помощью сканера Epson V700 (Seiko, Япония).

Результаты исследования. У интактной рыбки-правши синаптические окончания стахоакустического нерва на латеральных дендритах левого (доминантного) и правого (субдоминантного) МН имеют неизменный вид и представлены, главным образом, возбуждающими химическими и смешанными синапсами (см. рис. 1, б, в). Цитоскелет латеральных дендритов обоих МН умеренно рыхлый, агранулярная эндоплазматическая сеть (АЭС) выражена слабо как слегка набухшие вакуоли и редкие цистерны различного размера и формы. Синаптические нервные окончания волокон, приходящих из тектума и контактирующие с вентральными дендритами левого и правого МН (см. рис. 1, г, д), также имеют неизменную ультраструктуру. Видно, что на обоих дендритах эти синапсы весьма похожи друг на друга. Не наблюдается также никаких видимых различий и в плотности цитоскелета левых и правых вентральных дендритов, а также латеральных дендритов и соматических частей. Цистерны и вакуоли АЭС в последних схожи с таковыми в латеральных дендритах. В синаптическом аппарате, цитоскелете и АЭС не обнаружено ультраструктурных признаков, о которых можно было бы уверенно говорить как об основе функционального доминирования одного МН над другим, обуславливающего моторную асимметрию рыбки.

В ультраструктуре МН рыбок, подвергнутых ипсилатеральной энуклеации глаза, выявлены существенные отличия от таковой у интактных рыбок, выражающиеся в том, что на вентральных дендритах МН, расположенных контралатерально к стороне энуклеации, в большом количестве обнаруживаются запустевшие аксонные окончания, лишенные основной массы синаптических пузырьков (см. рис. 2, д). Митохондрии в запустевших бутонах, как правило, отсутствуют. Активные зоны и десмосомоподобные контакты практически не идентифицируются. В то же время, синаптические бутоны на вентральном дендрите противоположного МН, не затронутого операцией, остаются неизменными (см. рис. 2, е). Наблюдаются также ультраструктурные различия между правыми и левыми латеральными дендритами. Химические и смешанные синапсы на латеральном дендрите деафферентированного МН не изменены, они равномерно заполнены

многочисленными синаптическими пузырьками и содержат неповрежденные митохондрии (см. рис. 2, в). Однако синапсы на латеральном дендрите МН, расположенного на оперированной стороне, выглядят частично запустевшими, синаптические пузырьки в них собираются в цепочки, направленные из глубины бутонов к активным зонам, возле которых они группируются (см. рис. 2, г). Митохондрии набухают, теряют часть крист, их матрикс просветляется, в нем появляются темные включения. В то же время цитоскелет в обоих латеральных дендритах остается одинаковым и неизменным. Цитоскелет же в вентральных дендритах претерпевает перестройку. Так, у рыбки-правши в вентральном дендрите правого МН (на оперированной стороне) он остается неизменным (см. рис. 2, е¹), а в левом МН уплотняется за счет более строгой ориентации и уменьшения расстояния между филаментами (см. рис. 2, д¹). В обоих дендритах левого МН, вентральном и латеральном, АЭС разрастается за счет появления массы поперечно расположенных цистерн. Вместе с тем, АЭС аналогично гипертрофируется и в правом МН, прямо операцией не затрагиваемом.

Ультраструктура вентральных дендритов МН рыбки-правши после зрительной (оптокинетической) стимуляции существенно отличается от таковой у интактной рыбки. На вентральном дендрите правого МН, ставшего функционально доминантным после стимуляции, появляются многочисленные аксонные окончания, в разной степени запустевшие и частично потерявшие специализированные синаптические контакты (см. рис. 2, з). Митохондрии в них повреждаются или исчезают. В дендроплазме под синапсами появляются миелоноподобные тела. В то же время, синаптические бутоны на вентральном дендрите противоположного МН сохраняют свой неизменный вид (см. рис. 2, ж), хотя в некоторых из них можно видеть перегруппировку пузырьков и их концентрацию вблизи активных зон. Цитоскелет в вентральных дендритах правого и левого МН после стимуляции различается. В вентральном дендрите левого МН он сохраняет неизменный вид (см. рис. 2, ж¹), а в правом МН — уплотняется (см. рис. 2, з¹). АЭС в вентральных дендритах правого и левого МН несколько гипертрофируется, но в меньшей степени, чем это наблюдалось после энуклеации.

Обсуждение полученных данных. В нашей работе после энуклеации глаза вдоль всего ствола вентрального дендрита МН выявлены запу-

стевшие синапсы, что, безусловно, связано с перерезкой зрительного нерва и является структурным признаком постоперационной дегенерации по светлomu типу [1]. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что синаптические окончания зрительного входа распространены диффузно по всей поверхности дендрита, а не расположены на дистальных его веточках, как выявлено ранее с помощью гистохимической реакции при изучении МН взрослой золотой рыбки [14]. Расхождения данных настоящего исследования и полученных ранее, возможно, связаны с различием применяемых методик, но могут объясняться и неодинаковым возрастом рыбок. Существенно, что похожие структурные изменения вентральных дендритов МН обнаруживаются у рыбок после контралатеральной оптокинетической стимуляции и после энуклеации, при этом происходит атрофия вентрального дендрита, и изменяется моторная асимметрия рыбки [5, 6]. Оба эти факта свидетельствуют о принадлежности запустевших синапсов к возбуждающему зрительному входу. Дисфункция этих синапсов в обоих случаях дает аналогичный функциональный эффект, увеличивая активность МН, т. е. действует по принципу отрицательной обратной связи [10]. Известно, что блокада (дисфункция) серотонинергической системы усиливает, а активация, напротив, снижает функциональную активность МН, т. е. обнаруживается точно такое же реципрокное влияние [8]. Поэтому можно предположить, что дегенерирующие синапсы, обнаруженные нами на вентральном дендрите МН после зрительной стимуляции или деафферентации, имеют серотонинергическую природу, и что реципрокная взаимосвязь функции МН и структуры вентрального дендрита основана на синаптическом механизме. Для подтверждения этого необходимы специальные эксперименты.

Кроме того, после зрительной стимуляции или энуклеации глаза в соответствующих вентральных дендритах наблюдаются избирательные локальные уплотнения цитоскелета, тогда как в других частях тех же и в зеркально расположенных МН цитоскелет не изменяется. Это наводит на мысль об определенной автономности цитоскелета в структурообразовании разных дендритов и в их функциональном проявлении на уровне МН и в поведении рыбки, по крайней мере, в остром эксперименте, а также о вовлечении цитоскелетных механизмов в реципрокную регуляцию функциональной активности индивидуальных нейронов с помощью зрения через вентральный дендрит. Определено, что на латеральном дендрите и some

МН со стороны энуклеированного глаза окончания статоакустического нерва проявляют структурные признаки функционального напряжения, что указывает на активацию этого входа для контроля над «слепым пространством», подтверждая наши догадки на этот счет, высказанные ранее [3]. Наконец, во всех МН у подопытных рыбок отмечены изменения в организации АЭС. Подобные перестройки, ранее исследованные после энуклеации и после вестибулярной стимуляции, связаны с интенсификацией транспорта кальциевых ионов внутрь нейрона и с его инактивацией захватом во внутриклеточные депо [11, 12]. Поскольку они одинаковы во всех наблюдаемых нейронах и их частях, их можно считать неспецифической реакцией клеток на раздражение, вызванное стимуляцией или операцией. В целом, результаты данной работы позволили приблизиться к пониманию механизма реципрокного взаимоотношения размера (структуры) вентрального дендрита и интегральной функциональной активности МН, лежащей в основе управления моторной асимметрией золотой рыбки.

Работа поддержана грантом РФФИ 09-04-00451 и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» Госконтракт № 02.740.11.0301.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боголепов Н.Н. Современные проблемы синапсоархитектоники мозга. Морфол. ведомости, 2010, № 1, с. 7–12.
2. Григорьева Е.Е., Штанчаев Р.Ш., Михайлова Г.З. и др. Изменения моторной асимметрии золотых рыбок и структуры их маутнеровских нейронов после энуклеации глаза. Нейрофизиология / *Neurophysiology*, 2010, т. 42, № 3, с. 225–237.
3. Григорьева Е.Е., Штанчаев Р.Ш., Михайлова Г.З. и др. Корреляция размеров отдельных частей маутнеровского нейрона золотой рыбки с его интегральной функцией после энуклеации глаза. Морфология, 2010, т. 138, вып. 6, с. 10–15.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Casagrand J.L., Guzik A.L. and Eaton R.C. Mauthner and reticulospinal responses to the onset of acoustic pressure and acceleration stimuli. *J. Neurophysiol.*, 1999, v. 82, p. 1422–1437.

8. Kolaeva S.G., Semenova T.P., Santalova I.M. et al. Effects of L-thyrosyl-L-arginine (kyotorphin) on the behavior of rats and goldfish. *Peptides*, 2000, v. 21, № 9, p. 1331–1336.
9. 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.
10. 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.
11. Moshkov D.A. and Santalova I.M. Distribution of calcium pyroantimonate precipitates in *Xenotoca* Mauthner cells at normal and increased functional activity. *Neuroscience*, 1995, v. 65, № 3, p. 917–925.
12. Santalova I.M. and Moshkov D.A. Smooth endoplasmic reticulum in fish Mauthner cells at different functional states. *Neuroscience*, 1999, v. 89, № 2, p. 593–602.
13. Weiss S.A., Preuss T. and Faber D.S. Phase encoding in the Mauthner system: implications in left-right sound source discrimination. *J. Neurosci.*, 2009, v. 29, № 11, p. 3431–3441.
14. 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 13.01.11

MAUTHNER NEURONS ULTRASTRUCTURE AFTER OPTOKINETIC STIMULATION AND EYE ENUCLEATION

I.B. Mikheyeva, N.Yu. Tsaplina, Ye.Ye. Grigorieyva, Ye.N. Bezgina, R.Sh. Shtanchayev, G.Z. Mikhailova, N.R. Tiras and D.A. Moshkov

It was previously shown that the contralateral (relative to preferred side of turns) optokinetic stimulation and ipsilateral eye enucleation cause a significant, 2- to 4-fold reduction of the ventral dendrite (VD) volume in one of two goldfish Mauthner neurons (MN) that becomes more active functionally. In this study, we investigated the MN ultrastructure after mentioned unilateral visual effects. In both cases, devastation of the afferent synapses was detected along the full length of the reduced VD, with simultaneous compaction of its cytoskeleton, in contrast to those of VD of the contralateral MN and of lateral dendrites and cell bodies of both neurons. It is suggested that the depleted synapses belong to the excitatory visual afferent input, and both cytoskeletal and synaptic mechanisms are involved in the regulation of MN functional activity through VD.

Key words: *Mauthner neurons, ultrastructure, optokinetic stimulation, eye enucleation*

Laboratory of Neuron Ultrastructure, RAS Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino; «Biomedical Sciences» Master's Educational Program, Pushchino State University

© Г.Д. Сафонова, 2011
УДК 611.892:616.718.5/6-089.843:636.7

Г.Д. Сафонова

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ УЗЛОВ СПИНОМОЗГОВЫХ НЕРВОВ ПРИ УДЛИНЕНИИ ГОЛЕНИ ВЗРОСЛЫХ СОБАК

Лаборатория морфологии (зав. — проф. Ю.М. Ирьянов), Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова, г. Курган; e-mail: galdm@mail.ru

Аппаратом Илизарова удлинляли голень 9 взрослых беспородных собак. С применением нейрогистологического и количественного методов исследования изучали морфофункциональное состояние нейронов чувствительных узлов (L_{VII}) спинномозговых нервов, принимающих участие в иннервации голени после distraction с темпом 1 мм за 4 приема в течение 28 сут, после фиксации в течение 1 мес и через 1 мес после снятия аппарата. Контролем служил материал от трех интактных животных. Наиболее интенсивное нарастание структурных изменений в различных популяциях чувствительных нейронов прослежено в период distraction, они характерны и через 1 мес после снятия аппарата. В популяциях крупных, средних и малых нейронов по сравнению с таковым у интактных животных выявлено уменьшение в 2–3 раза количества нормохромных клеток с центральным положением ядра и ядрышка при одновременном пропорциональном увеличении числа клеток с сочетанием периферического хроматолиза и дислокации ядерно-ядрышкового аппарата.

Ключевые слова: *чувствительные узлы спинномозговых нервов, чувствительные нейроны, морфометрия, distractionный остеосинтез*

На этапе становления метода distractionно-компрессионного остеосинтеза выполнены морфологические исследования, позволившие выявить сроки и особенности формирования костного регенерата [13], влияние distraction на состояние мягкотканых структур удлиняемого сегмента конечности [3, 10] и периферических

нервов [4, 14]. Однако морфологические работы, касающиеся центральной нервной регуляции процессов перестройки костного регенерата, адаптации вовлеченных в эти процессы структур, малочисленны и фрагментарны. Выполнены лишь исследования, в которых показаны изменения в эфферентной части рефлекторной дуги при