

ГАМК- И ГЛИЦИН-ИММУНОРЕАКТИВНЫЕ СИНАПСЫ В СПИННОМ МОЗГЕ ЛЯГУШКИ *RANA TEMPORARIA*

© В. О. Аданина,¹ Ж.-П. Рио,² А. С. Аданина,¹ Ж. Реперан,² Н. П. Веселкин¹

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург,
и ² Национальный музей естественной истории, Париж, Франция;
электронный адрес: Adanina@rambler.ru

Методом двойной иммунной метки с помощью комбинации двух антител — моноклональных к гамма-аминомасляной кислоте (ГАМК) и поликлональных к глицину — изучали распределение ГАМК- и глицин-иммунореактивных синапсов на предварительно маркированных пероксидазой хрена мотонейронах и первичных афферентных аксонах спинного мозга лягушки *Rana temporaria*. На телах и дендритах мотонейронов наблюдались три категории иммунореактивных синапсов: ГАМК-иммунореактивные, которые составляли 7 % от общего числа иммунореактивных синапсов, иммунореактивные к глицину — 23 %, остальные были иммунореактивны к обеим аминокислотам. Полученные данные свидетельствуют о доминирующей роли глицина в постсинаптическом торможении мотонейрональной активности, а также о том, что ГАМК и глицин колокализуются в большинстве синапсов на мотонейроне, что предполагает их котрансмиссию. Эти три группы синапсов отмечались и на первичных афферентных аксонах. Из них 25 % обнаруживали ГАМК-иммунореактивность и 5 % были глицин-иммунореактивны. Эти результаты подтверждают существующие представления о значении ГАМК-ергической передачи в пресинаптическом торможении. Большая часть синапсов на афферентных аксонах обнаруживала иммунореактивность и к ГАМК, и к глицину одновременно. Как правило, они входили в состав так называемых триад. В таких синаптических комплексах глицин, вероятно, играет двойственную роль, выступая как медиатор постсинаптического торможения и как нейромодулятор, опосредующий процесс ауторецепции глутамата.

Ключевые слова: ГАМК- и глицин-иммунореактивные синапсы, лягушка *Rana temporaria*, мотонейроны, первичные афферентные аксоны, спинной мозг.

Принятые сокращения: мТПСТ — миниатюрные тормозные постсинаптические токи, ПАД — первичная афферентная деполяризация, ПСП — постсинаптический потенциал.

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) и глицин — основные медиаторы, опосредующие тормозные процессы в центральной нервной системе. Считается, что глицин как нейротрансмиттер наиболее распространен в филогенетически древних областях: спинном мозге и стволовых ядрах головного мозга (Van den Pol, Gorcs, 1988; Russier et al., 2002; Lynch, 2004). Оба медиатора обладают сходным механизмом действия, увеличивая проницаемость хлорных каналов на мембране постсинаптического элемента (Hamill et al., 1983; Bormann et al., 1987; Takahashi, Momiyama, 1991; Donato, Nistri, 2000). В спинном мозге как низших, так и высших позвоночных обе аминокислоты участвуют в постсинаптическом торможении мотонейрональной активности (Jonas et al., 1998; Chery, De Koninck, 1999; O' Brien, Berger, 1999; Russier et al., 2002; Кожанов и др., 2004; Полина и др., 2006; Калинина и др., 2008).

Иммуноцитохимические исследования, выполненные на крысах и кошках, показали, что в значительной части тормозных синапсов на мотонейронах спинного мозга (Ornung et al., 1994; Taal, Holstege, 1994; Watson, Bazzaz, 2001; Somogyi, 2002), а также нейронах ствола мозга (Wentzel et al., 1993; Maxwell et al., 1995; Lahjouji et al.,

1996; Yang et al., 1997; Bae et al., 1999, 2002) ГАМК и глицин колокализуются в одной синаптической терминали, что, очевидно, предполагает их совместное влияние на постсинаптическую структуру (Jonas et al., 1998; Chery, De Koninck, 1999; O' Brien, Berger, 1999).

Результаты ряда электрофизиологических экспериментов подтверждают это предположение. Так, было показано, что тормозный ПСП, опосредованный клетками Реншоу, которые рассматриваются как один из источников тормозных влияний на мотонейроны у млекопитающих, содержит стрихнин-резистентный компонент, который блокируется антагонистами ГАМК, и тормозный эффект возвратного ПСП полностью подавляется, если стрихнин действует в комбинации с антагонистами ГАМК (Cullheim, Kellerth, 1981). Ранее считалось, что медиатором возвратного торможения мотонейрональной активности является глицин (Curtis et al., 1976). Эксперименты с использованием метода пэтч-кламп регистрации миниатюрных постсинаптических токов показали, что мТПСТ состоит из двух компонентов: опосредованного глицином быстрого, стрихнин-чувствительного, и ГАМК-опосредованного бикакуллин-чувствительного компонента, обладающего пролонгированным действием (Ni-

coll, Malenka, 1998; O'Brien, Berger, 1999; Russier et al., 2002). Анализ мГПСТ показал, что обе аминокислоты выделяются из одной синаптической терминали и колокализуются в одном синаптическом пузырьке (Jonas et al., 1998; Chery, De Koninck, 1999; O'Brien, Berger, 1999; Russier et al., 2002; Wu et al., 2002).

Данные электрофизиологических исследований нашли свое подтверждение в результатах иммуноцитохимических исследований о колокализации ГАМК и глицина (или геферина — протеина, входящего в структуру глицинового рецептора) на постсинаптической мембране в зоне синаптических контактов смешанных ГАМК- и глицин-иммунореактивных синапсов (Triller et al., 1987; Bohhalter et al., 1994; Todd et al., 1996; Dumoulin et al., 2000). Было показано мозаичное расположение рецепторов глицина и ГАМК на постсинаптической мембране активной зоны смешанного синапса (Levi et al., 1999) и сходство ГАМК и глицинового транспортеров (Christenson et al., 1991; Dumoulin et al., 1999). Согласно мнению других исследователей, однако, они имеют общий везикулярный транспортер (McIntire et al., 1997; Chaudhry et al., 1998; Gasnier, 2000). Вероятно, колокализация двух аминокислот, обладающих разной кинетикой опосредуемых ими процессов, обеспечивает более тонкую и пластичную динамику тормозного процесса, что имеет значение в сенсорной интеграции.

В ряде нейроморфологических исследований, выполненных на электронно-микроскопическом уровне, показано, что ГАМК и глицин колокализуются также в большинстве синапсов на афферентных аксонах спинного (Todd et al., 1995, 1996; Maxwell, Riddell, 1999; Watson, Bazzaz, 2001; Sutherland et al., 2002; Watson et al., 2002; Watson, 2003) и головного (Lahjouji et al., 1996; Dumba et al., 1998) мозга. Вместе с тем на первичных афферентных аксонах наряду со смешанными обнаруживаются синапсы, иммунореактивные только к ГАМК или только к глицину.

Еще полвека назад были получены экспериментальные данные об участии ГАМК в генерации ПАД (Eccles et al., 1963). Электронно-микроскопические исследования показали наличие синапсов на аксонах первичных афферентов как морфологического субстрата пресинаптического торможения (Gray, 1962). Согласно результатам иммуноцитохимических исследований, выполненных методами лазерной конфокальной и электронной микроскопии, эти синапсы являются ГАМК-иммунореактивными (Maxwell et al., 1990; Destombes et al., 1996; Lamotte d'Incamps et al., 1998; Веселкин и др., 2001; Vesselkin et al., 2001; Аданина и др., 2008).

Функциональный смысл колокализации ГАМК и глицина в аксо-аксональных синапсах неясен. Кроме того, собственно, и участие глицина в пресинаптическом торможении афферентной активности подвергается сомнению, поскольку на мембране афферентных аксонов глициновый рецептор не обнаружен (Mitchell et al., 1993). Более того, еще ранее было показано, что стрихнин — антагонист глицина — не влияет на пресинаптическое торможение (Eccles et al., 1963; Jimenez et al., 1987). В то же время в аксо-аксональных синапсах дорсального рога крысы обнаружен глициновый везикулярный транспортер GlyT2 (Spike et al., 1997).

Аксо-аксональные синапсы, в которых ГАМК колокализуются с глицином, описаны также в тригеминальном комплексе ствола мозга (Dumba et al., 1998). Однако эти данные также неоднозначны. Например, в тригеминаль-

ном моторном ядре крысы глицин-иммунореактивность в аксо-аксональных синапсах на афферентах не обнаружена, хотя присутствует в аксосоматических и аксодендритных синапсах, из чего следует, что контроль возбуждающей передачи в данной структуре осуществляется исключительно ГАМК-ергическими синапсами (Yang et al., 1997). Наряду с этим имеются данные о том, что в каудальном ядре (subnucleus caudalis) более половины синапсов на тригеминальных первичных афферентах обнаруживают колокализацию двух аминокислот, что, по мнению авторов, позволяет говорить о кумулятивном действии этих нейротрансмиттеров в пресинаптическом торможении (Dumba et al., 1998).

Настоящая работа посвящена исследованию ультраструктуры и локализации ГАМК- и глицин-иммунореактивных синапсов в спинном мозге лягушки *Rana temporaria*.

Материал и методика

Работа выполнена на 5 самцах травяной лягушки *R. temporaria* массой 25—30 г. Для морфологической идентификации нервных элементов использован пероксидазный метод. Поясничный отдел спинного мозга лягушки извлекали под анестезией, которая достигалась путем погружения животного в раствор трикаина метансульфоната (MS-222; Sigma, США), и помещали в ванночку с проточным, постоянно аэрируемым карбогеном (98 % O₂ и 2 % CO₂) физиологическим раствором следующего состава (в мМ): 98.0 NaCl, 2.0 KCl, 2.0 Na₂HPO₄, 1.2 NaH₂PO₄, 9.0 NaHCO₃, 1.5 CaCl₂, 0.5 MgCl₂ и 5.5 глюкозы, pH 7.4—7.6. Температуру раствора поддерживали на уровне 10—12 °С. Дорсальный или вентральный корешок 9-го или 10-го сегмента засасывался в специально изготовленную канюлю, диаметр кончика которой точно соответствовал толщине корешка. Канюлю заполняли 10%-ным раствором пероксидазы хрена (Boehringer, Германия). Инъекцию осуществляли с помощью постоянного положительного тока силой 2—5 нА с интервалами. Суммарное время введения составляло 30—40 мин. Затем мозг оставляли в течение ночи в физиологическом растворе, после чего фиксировали 3%-ным раствором глутаральдегида на 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.4—7.6. Выявление пероксидазы хрена осуществляли на срезах толщиной 60 мкм. В качестве хромогена использовали диаминобензидин с кобальтовой интенсификацией.

Для электронно-микроскопического исследования срезы, содержащие маркированные элементы, подвергали стандартной обработке и заливали в аралдит. Для дальнейшего иммуноцитохимического исследования ультратонкие срезы монтировали на никелевые сетки.

Имуноцитохимическое исследование проводили методом маркирования частицами коллоидного золота, так называемым методом *postembedding immunogold*, с использованием комбинации двух антител одновременно. Процедура выявления иммунореактивности состояла из нескольких этапов: короткого этчинга и деосмификации с помощью 1%-ной периодической кислоты и 1%-ного периодата натрия, подавления эндогенной иммунореактивности 5%-ным бычьим сывороточным альбумином (30 мин) с последующей инкубацией в течение ночи при 4—5 °С в смеси антител: моноклональных мышинных против ГАМК (Sigma, США) и поликлональных кроличьих против глицина (Chemicon, США) в разведениях 1 : 250 и

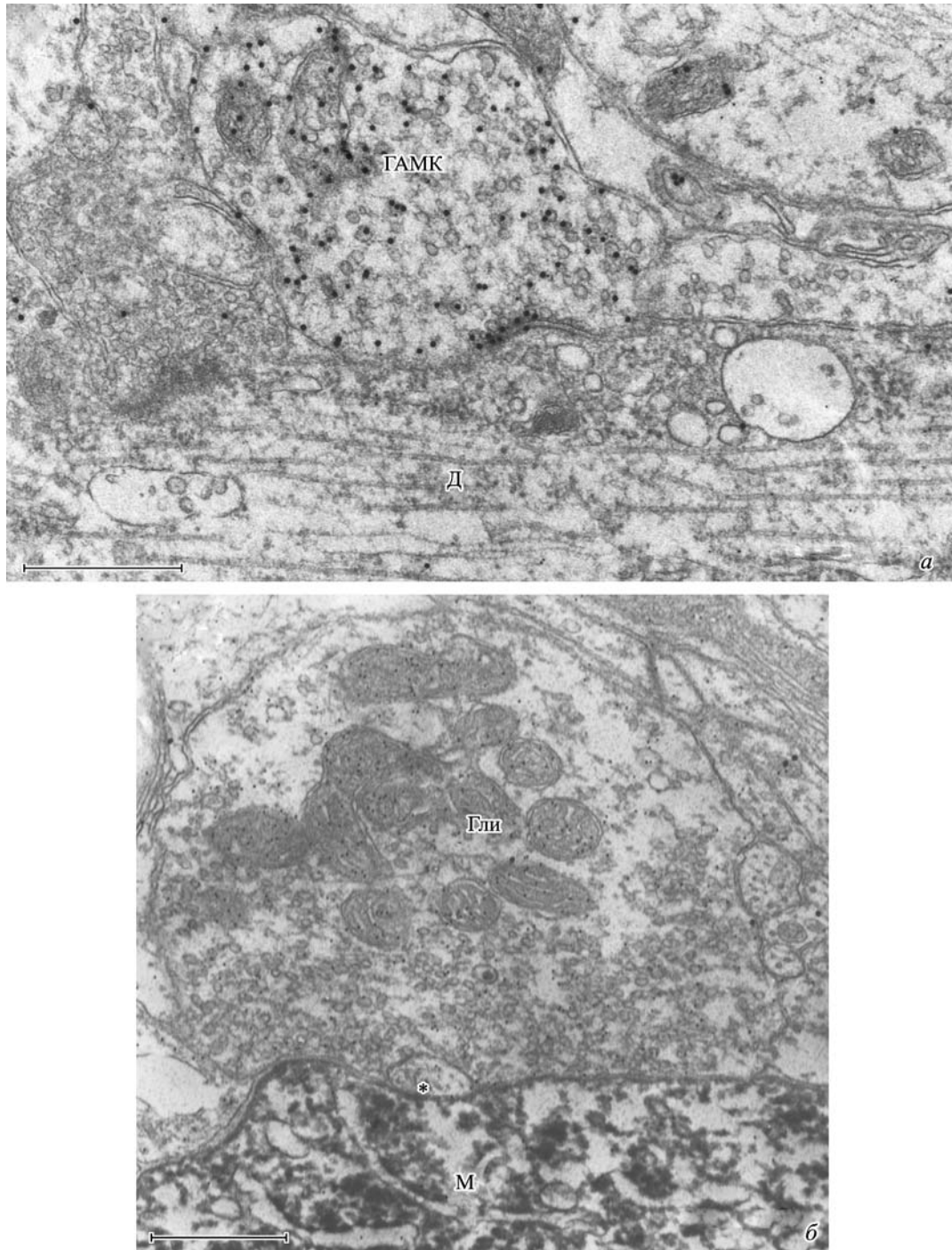


Рис. 1. Электронограммы (а) ГАМК-иммунореактивной терминали (ГАМК) на проксимальном сегменте дендрита (Д) мотонейрона и глицин-иммунореактивной терминали (Гли) на перикарионе мотонейрона (М) (б).

Звездочкой отмечен дендрит неидентифицированного нейрона. Масштабные отрезки — 0,5 мкм.

1 : 1000 соответственно. После промывки срезы помещали на 1 ч при комнатной температуре в смесь вторых антител: против кролика — IgG, меченный золотыми частицами диаметром 10 нм, для выявления глицин-иммунореактивности и иммуноглобулина против мыши — с диаметром золотых частиц 20 нм для определения ГАМК-иммунореактивности. Вторые антитела использовали в разведении 1 : 10. Для контроля иммуноцитохимическую процедуру проводили без первых антител, в результате чего иммунная метка полностью отсутствовала.

Иммунопозитивными считали синаптические терминалы, в которых плотность золотых частиц превышала фон в 5 раз и более.

Результаты

В настоящем исследовании использовали фронтальные ультратонкие срезы спинного мозга, так как известно, что у лягушки дендриты мотонейронов и коллатерали

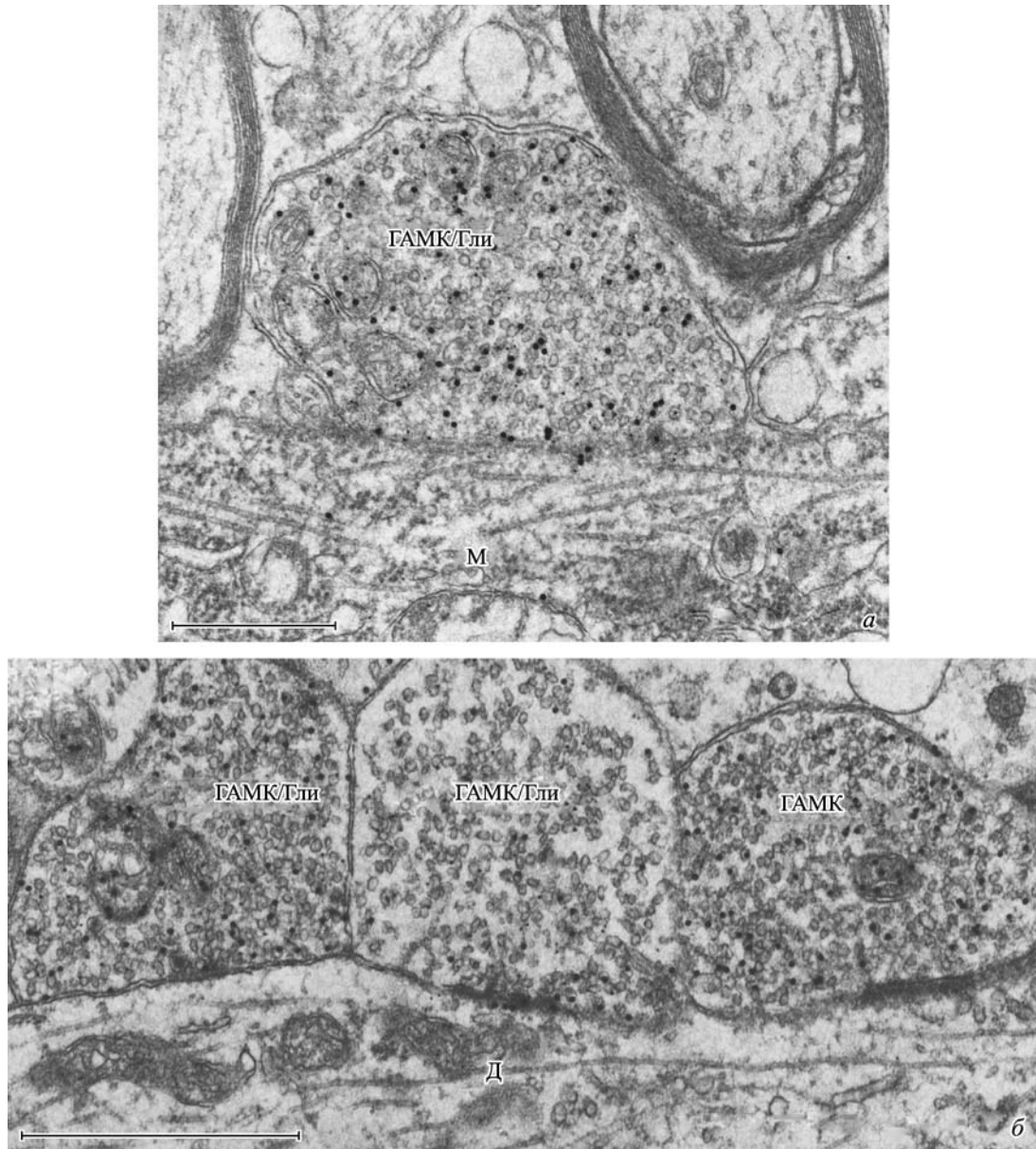


Рис. 2. Электронограммы (а) синаптической терминали, иммунореактивной к ГАМК и глицину на перикарионе мотонейрона, и терминалей, иммунореактивных к ГАМК и глицину и только к ГАМК на дендрите (Д) (б) неидентифицированного нейрона.

Остальные обозначения те же, что и на рис. 1. Масштабные отрезки — 0.5 (а) и 1 (б) мкм.

первичных афферентных аксонов ветвятся преимущественно во фронтальной плоскости (Adanina et al., 1983). На электронно-микроскопическом уровне маркированные мотонейроны и афферентные волокна идентифицированы по наличию в цитоплазме мелкодисперсного электронно-плотного материала. Применение метода комбинации двух антител — моноклональных против ГАМК и поликлональных против глицина — позволило выявить иммунопозитивность синапсов одновременно к обеим аминокислотам на одном и том же срезе.

На мотонейронах, ретроградно маркированных пероксидазой хрена, наблюдались три категории иммунореактивных синапсов: ГАМК-иммунореактивные (рис. 1, а), глицин-иммунореактивные (рис. 1, б) и иммунореактивные к обеим аминокислотам (рис. 2, а) в соотношениях 7, 23 и 70 % соответственно. Все три группы иммунореактивных синапсов имели одинаковое пространственное

распределение на мембране мотонейрона как на перикарионе, так и на дендритах разного диаметра, преимущественно располагаясь на теле и главных стволах дендритного дерева. Аналогичную картину наблюдали и на немаркированных нейронах в интермедиальной области серого вещества, очевидно, являющихся интернейронами (рис. 2, б). На перикарионе и крупных дендритных стволах преобладали терминальные контакты, в то время как на удаленных сегментах дендритов — так называемые контакты en passant, устанавливаемые проходящими немиелинизированными аксонами по ходу волокна (рис. 3, а). Ультраструктурные характеристики синапсов в основном соответствовали критериям синапсов симметричного типа. Однако форма синаптических везикул несколько различалась в зависимости от иммунореактивности пресинаптического бутона. Так, в ГАМК-иммунореактивных терминалях форма синаптических пузырьков

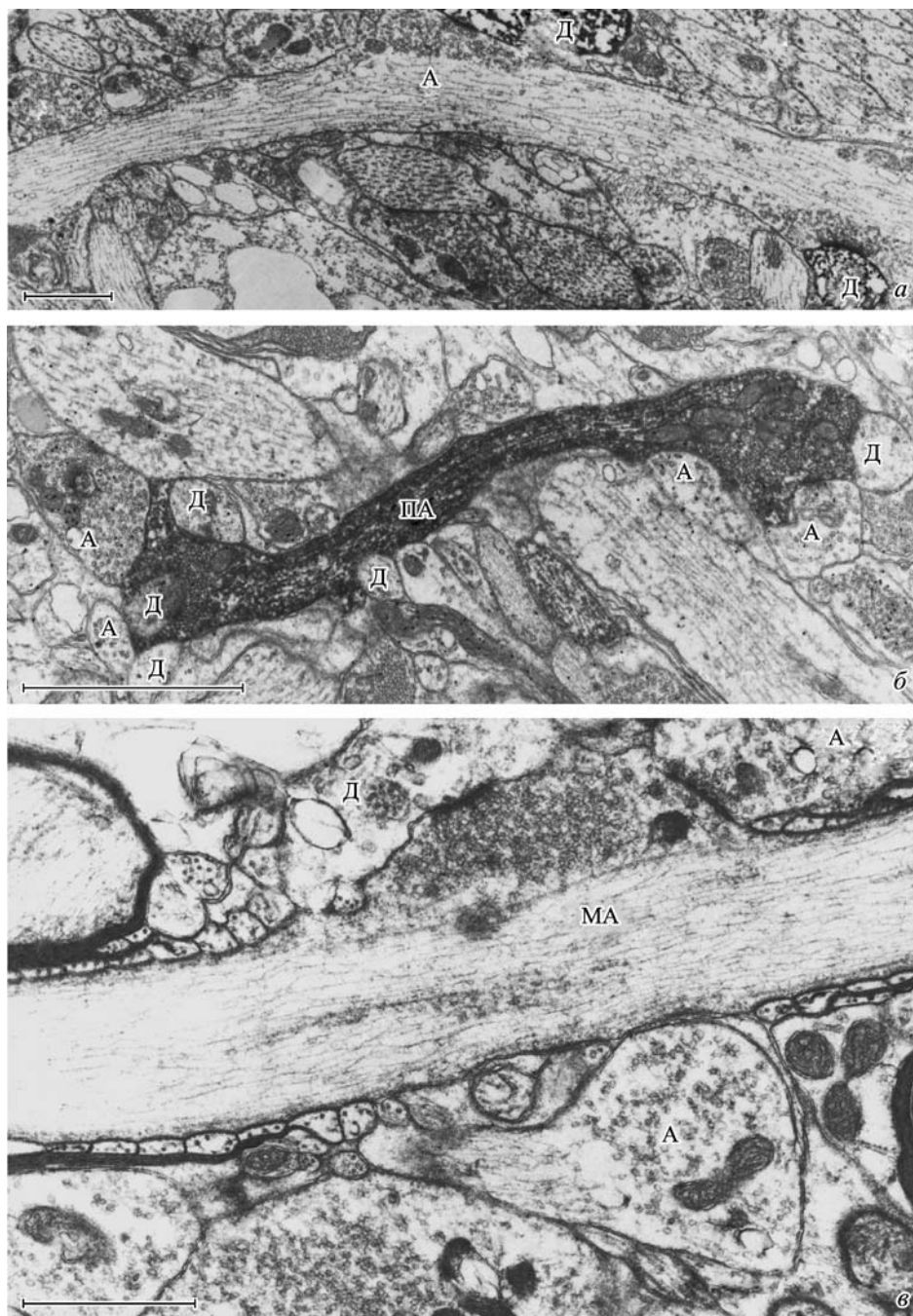


Рис. 3. Примеры электронограмм (а) и аксо-аксональных (А) и аксодендритных (Д) контактов по ходу волокна (en passant) неидентифицированного аксона, где дендриты принадлежат мотонейронам, меченным пероксидазой хрена, первичного афферентного (ПА) аксона (б, в) трехкомпонентный синаптический комплекс в области перехвата Ранвье неидентифицированного миелинизированного аксона (МА).

Масштабные отрезки — 2 мкм (а, б) и 1 мкм (в) мкм.

была, как правило, сферической, в глицин-иммунореактивных — уплощенной, а синапсы, иммунореактивные к ГАМК и глицину, содержали плеоморфные синаптические пузырьки. Во всех синапсах независимо от их иммунореактивности наблюдали одиночные синаптические везикулы с электронно-плотной сердцевиной.

Исследуя иммунореактивность синапсов на первичных афферентах, мы не обнаружили аксо-аксональных контактов в области вентрального рога, хотя известно, что определенный контингент афферентных аксонов достигает мотонейронального пула и контактирует с телами

мотонейронов по всему его объему (Adanina et al., 1983). По-видимому, это объясняется тем, что количество этих аксонов невелико, что значительно снижает частоту обнаружения их контактов с мотонейронами на электронно-микроскопическом уровне. В нейропиле серого вещества интермедиальной зоны коллатерали первичных афферентных аксонов утрачивают миелиновую оболочку и аксо-аксональные контакты в основном обнаруживаются по ходу афферентных аксонов (рис. 3, б). Как правило, иммунореактивные пресинаптические бутоны располагались в непосредственной близости или в месте синапти-

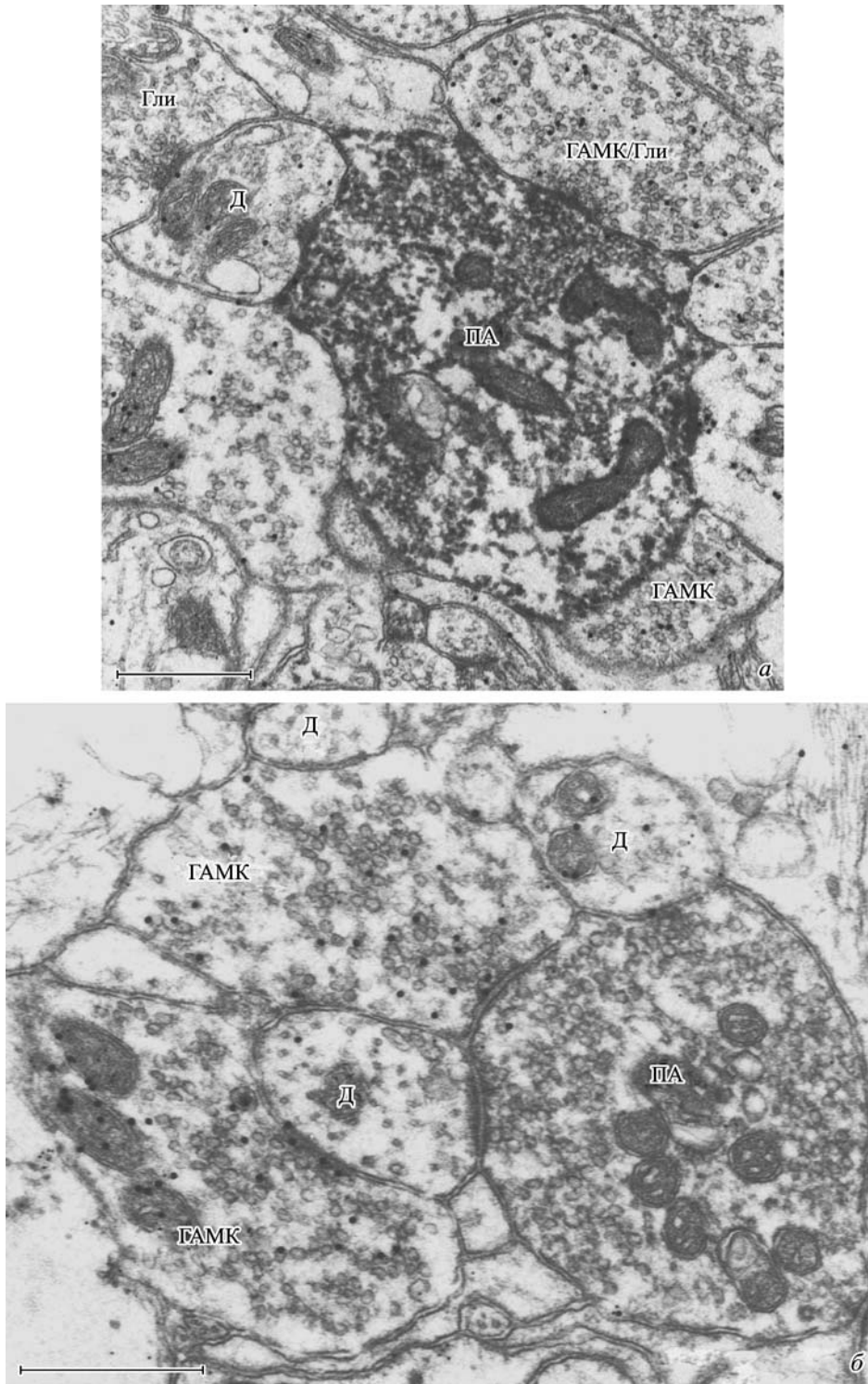


Рис. 4. Электронограммы (а) иммунореактивных к ГАМК и к ГАМК и глицину синаптических терминалей на первичном афферентном аксоне и ГАМК-иммунореактивной терминали в синаптическом контакте с терминалью первичного афферентного аксона (б).

Обозначения те же, что и на рис. 1 и 3. Масштабные отрезки — 0,5 мкм.

ческого контакта афферентного аксона с постсинаптической структурой, хотя в некоторых случаях они были локализованы на некотором (1—3 мкм) расстоянии от области синапса афферентного волокна с дендритом.

Иногда аксо-аксональные контакты наблюдались на миелинизированных аксонах в области перехватов Ранвье

(рис. 3, в). Однако в таких аксонах отсутствовала пероксидазная метка, что, очевидно, свидетельствует о принадлежности их к надсегментарным структурам мозга.

Наибольшую плотность аксо-аксональных контактов наблюдали в медиальной части дорсального рога и дорсальной части интермедиальной зоны. Приблизительно

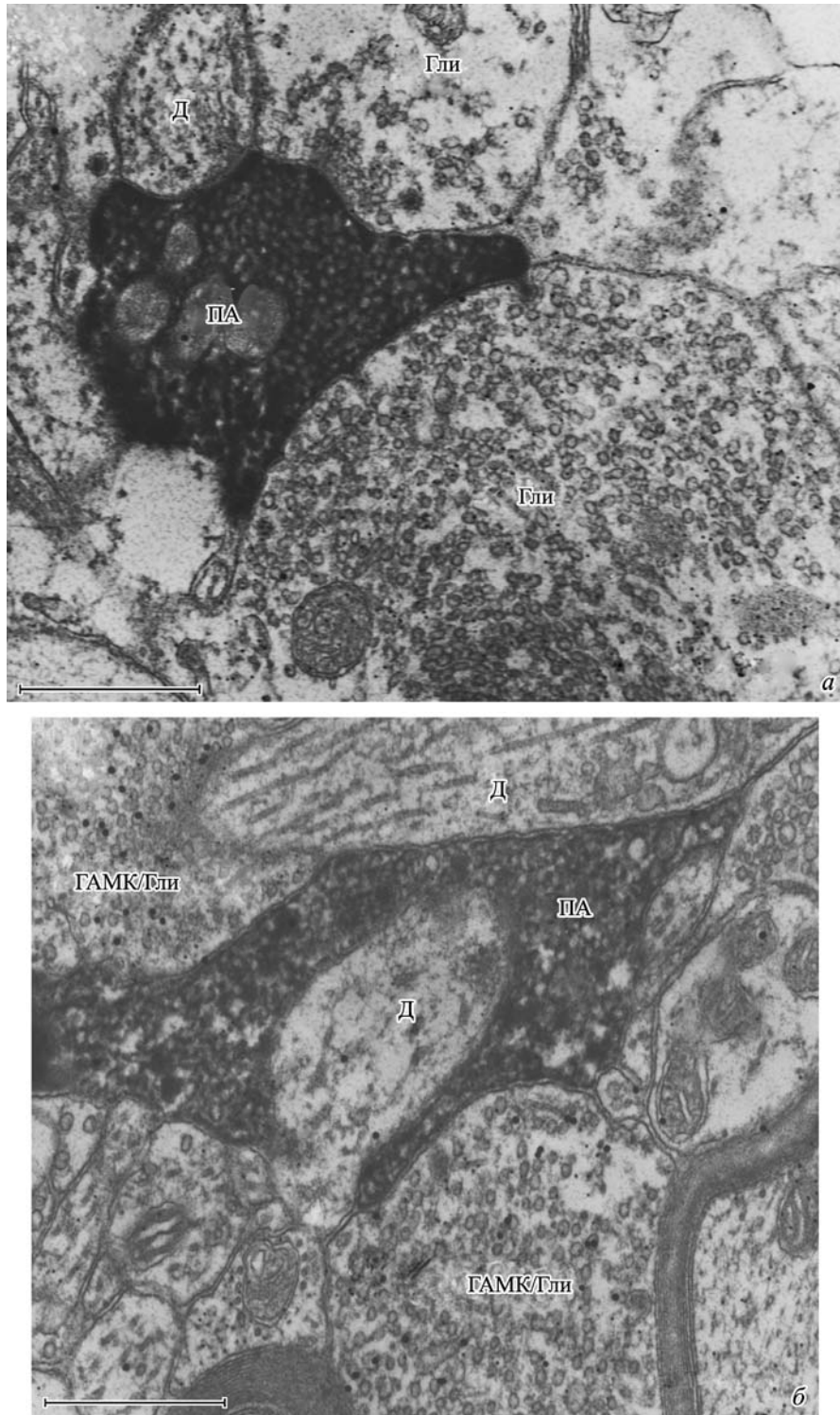


Рис. 5. Электронограммы (а) глицин-иммунореактивных терминалей на синаптическом бутоне первичного афферентного аксона и терминалей, иммунореактивных к ГАМК и глицину, содержащих синаптические пузырьки с электронно-плотной сердцевиной (dense core vesicles) (б).

Обозначения те же, что и на рис. 1 и 3. Масштабные отрезки — 0,5 мкм.

2/3 всех иммунореактивных синапсов на первичных афферентах были иммунореактивны и к ГАМК, и к глицину (рис. 4, а), 25 % — только к ГАМК (рис. 4, б) и 5 % — только к глицину (рис. 5, а). В пресинаптических бутонах аксо-аксональных синапсов независимо от иммунореактивности, как и в афферентных аксонах, часто наблюда-

лись одиночные везикулы с электронно-плотной сердцевиной (рис. 5, б).

Во многих случаях пресинаптический бутон находили в контакте не только с афферентным аксоном, но и с постсинаптическим по отношению к афференту дендритом, что образовывало так называемую триаду (рис. 4, б; 6). В та-



Рис. 6. Электронограмма трехкомпонентного синаптического комплекса (триады). Иммунореактивная к ГАМК и глицину терминаль в синаптическом контакте с терминалью первичного афферентного аксона и дендритом, который является постсинаптическим компонентом к обоим элементам комплекса.

Обозначения те же, что и на рис. 1 и 3. Масштабные отрезки — 0.5 мкм.

ких триадах бифокальная пресинаптическая терминаль, как правило, была иммунореактивна одновременно и к ГАМК, и к глицину.

Обсуждение

В материале, полученном после инъекции пероксидазы хрена в вентральный корешок, на телах и дендритах маркированных мотонейронов наблюдались наряду с иммунонегативными три категории иммунореактивных синапсов: иммунопозитивные к ГАМК или к глицину, а также синапсы, иммунопозитивные к обоим аминокислотам. Ультраструктура этих контактов и паттерн их пространственного распределения на мембране мотонейрона спинного мозга лягушки полностью соответствовали описанным ранее у миноги (Веселкин и др., 1999; Vesselkin et al., 2000) и млекопитающих (Ornung et al., 1994, 1996, 1998; Taal, Holstege, 1994). Эти данные свидетельствуют о том, что у низших позвоночных, как и у млекопитающих, ГАМК и глицин участвуют в постсинаптическом торможении мотонейрональной активности (Krnjevic et al., 1977; Jonas et al., 1998; Полина и др., 2006). Согласно полученным результатам, ГАМК-иммунореактивные синапсы составляли 7% от общего числа иммунореак-

тивных синапсов, в то время как глицин-иммунопозитивные синапсы — 23%. Данные о преобладании глицин-иммунореактивных синапсов на мембране мотонейрона были получены также в иммуноцитохимических исследованиях на крысе (Somogyi, 2002) и кошке (Ornung et al., 1996, 1998). Настоящее исследование также показало, что более половины синаптических контактов обнаруживают иммунореактивность к обоим аминокислотам. Несмотря на то что физиологический смысл колокализации двух нейротрансмиттеров в одном синапсе до конца неясен, известно, однако, что в смешанных синапсах ГАМК и глицин действуют как котрансмиттеры, активизируя соответствующий тип рецепторов на постсинаптической мембране (Bormann et al., 1987; Jonas et al., 1998; O'Brien, Berger, 1999; Dumoulin et al., 2001; Wu et al., 2002; Dugue et al., 2005; Lu et al., 2008). Очевидно, что характер распределения рецепторов определяет физиологию этих синапсов. Такая корреляция была отмечена в антеровентральном кохлеарном ядре крысы, где, с одной стороны, вызванный тормозный ПСП, регистрируемый в кустистых клетках, на 81% опосредован глицином, а с другой — на мембране кустистых клеток глициновый рецептор образует кластеры, в то время как ГАМК_A-рецептор слабо представлен и имеет диффузное расположение (Lim et al., 2000).

Результаты настоящего исследования о доминировании глицин-иммунореактивных синапсов на мотонейронах спинного мозга соответствуют данным о доминирующей роли глицина как нейротрансмиттера в физиологии этих синапсов как у низших (Батуева, Судеревская, 1990; Кожанов и др., 2004; Полина и др., 2006; Калинина и др., 2008), так и высших (Takahashi, 1992; Jonas et al., 1998; Rekling et al., 2000) позвоночных. Показано, что в случае колокализации ГАМК и глицина в одном синапсе компонент унитарного ППСТ, опосредованный глициновым рецептором, доминирует над ГАМК опосредуемыми реакциями (Кожанов и др., 2004).

Существует предположение о том, что у млекопитающих одним из источников смешанных синапсов, очевидно, являются клетки Реншоу. Было показано, что ГАМК и глицин опосредуют возвратное торможение мотонейрональной активности (Cullheim, Kellerth, 1981; Schneider, Fyffe, 1992; Marchetti et al., 2002). Однако нет морфологических доказательств ГАМК- и глицин-иммунореактивности интернейронов, расположенных в вентральной части пластины VII — области расположения клеток Реншоу (Lagerback, Kellerth, 1985). В связи с этим остается открытым вопрос о том, колокализованы ли эти нейромедиаторы в клетках Реншоу или существуют две нейрохимически различающиеся популяции интернейронов.

У амфибий возвратное торможения до настоящего времени не зарегистрировано, кроме того, считается, что клетки Реншоу у них отсутствуют. По-видимому, смешанные синапсы на мотонейронах спинного мозга лягушки не связаны с возвратным торможением, а принадлежат интернейронам, опосредующим влияние супраспинальных моторных центров либо внутриспинальные связи. Таким образом, полученные данные о количественном преобладании глицин-иммунореактивных синапсов на мотонейронах спинного мозга лягушки подтверждают существующее мнение о том, что глицин является главным медиатором постсинаптического торможения мотонейрональной активности.

Три категории синапсов, наблюдаемых на телах и дендритах мотонейронов, отмечались и на аксонах первичных афферентов, также маркированных пероксидазой хрена в другой серии экспериментов. И в том и в другом случае большинство составляли синапсы, иммунореактивные и к ГАМК, и к глицину. Однако соотношение синапсов, иммунопозитивных только к ГАМК или глицину, было обратным. Так, количество ГАМК-иммунореактивных синапсов на первичных афферентах составляло 25 %, в то время как глицин-иммунореактивные синапсы были редки и число их не превышало 5 % от общего числа наблюдаемых на афферентных аксонах иммунореактивных контактов. Очевидно, эти три категории синапсов обусловлены существованием трех групп интернейронов, участвующих в генерации ПАД. Если роль ГАМК в пресинаптическом торможении является доказанной, то роль глицина в аксо-аксональных синапсах на первичных афферентах остается неясной, так как известно, что специфический антагонист глицина стрихнин не влияет на ПАД, кроме того, ни глициновый рецептор, ни геферин, структурный компонент глицинового рецептора, в аксо-аксональных синапсах не обнаружены (Mitchel et al., 1993; Todd et al., 1996).

Согласно нашим наблюдениям, а также данным исследований, выполненных на крысе (Watson et al., 2002; Watson, 2003) и кошке (Maxwell, Riddell, 1999; Sutherland

et al., 2002), смешанные ГАМК-глициновые синапсы входят в состав так называемых триад — синаптических комплексов, в которых пресинаптическая по отношению к афферентному аксону терминаль находится в синаптическом контакте одновременно с афферентным аксоном и дендритом, с которым этот афферент контактирует. По мнению исследователей, и с этим нельзя не согласиться, в такой ситуации глицин выступает в роли медиатора постсинаптического торможения. Вместе с тем путем диффузии растекания (spill-over) из активной зоны аксо-аксонального контакта он может активировать экстрасинаптические рецепторы, например рецепторы NMDA-типа (Danysz, Parsons, 1998; Parsons et al., 1998), которые наряду с другими ионотропными глутаматными AMPA- (Lee et al., 2002; Lu et al., 2002) и каинатными (Hwang et al., 2001; Kerchner et al., 2001) рецепторами присутствуют на мембране первичных афферентных аксонов (Sato et al., 1993; Ma, Hargreaves, 2000; Marvizon et al., 2002). В электрофизиологических экспериментах показано, что глицин является коагонистом глутамата в его действии на NMDA-рецепторы (Thomson, 1990; Berger, Isaacson, 1999) и может модулировать NMDA-опосредованные реакции (Johnson, Ascher, 1987; Budai et al., 1992; Parsons et al., 1998), действуя на стрихнин-нечувствительный сайт NMDA-рецептора. Более того, глицин является необходимым компонентом для активации NMDA-рецепторов глутаматом (Berger et al., 1998). Можно предположить, что глицин-иммунореактивность в аксо-аксональных синапсах на первичных афферентных аксонах отражает факт его участия в пресинаптической регуляции в качестве нейромодулятора синаптической передачи, опосредующей процесс ауторецепции глутамата.

Анализ полученных нами данных показал, что в спинном мозге лягушки, как и у млекопитающих, определенное количество синапсов на первичных афферентах являются глицин-иммунореактивными. Поскольку факт участия глицина как нейромедиатора в пресинаптическом торможении не установлен, можно предположить, что в таких терминалях глицин может быть колокализован с другим нейромедиатором основного действия и таким образом выступать в роли нейромодулятора синаптической передачи. Таким нейромедиатором может быть, например, глутамат, поскольку результаты иммуноцитохимического исследования, проведенного нами ранее, свидетельствуют о существовании глутамат-иммунопозитивных синапсов на первичных афферентных аксонах в спинном мозге лягушки (Vesselkin et al., 2003). В пользу возможности такой комбинации нейротрансмиттеров свидетельствуют и результаты ряда иммуноцитохимических исследований. Например, колокализация глутамата и глицина была обнаружена в синапсах в вестибулярных сенсорных афферентах у лягушки и крысы (Reichenberger, Dieringer, 1994), в синапсах гигантских ретикулярных аксонов в спинном мозге речной миноги (Vesselkin et al., 1995), в синаптических терминалях на мотонейронах спинного мозга крысы (Somogyi, 2002).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-000-98) и программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Механизмы физиологических функций: от молекулы до поведения».

Список литературы

- Аданина В. О., Рио Ж.-П., Аданина А. С., Реперан Ж., Веселкин Н. П. 2008. Иммунореактивность синапсов на первичных афферентных аксонах и сенсорных нейронах спинного мозга речной миноги *Lampetra fluviatilis*. Цитология. 50 (11) : 947—952.
- Батуева И. В., Судеревская Е. И. 1990. Влияние глицина и гамма-аминомасляной кислоты на вызванную активность мотонейронов спинного мозга миноги. Нейрофизиология. 22 (3) : 391—394.
- Веселкин Н. П., Аданина В. О., Рио Ж.-П., Реперан Ж. 1999. Колокализация нейротрансмиттеров в пресинаптических бутонах тормозных синапсов спинного мозга миноги. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 85 (4) : 515—522.
- Веселкин Н. П., Аданина В. О., Рио Ж.-П., Реперан Ж. 2001. О функциональных и структурных основах пресинаптического торможения первичных афферентов спинного мозга позвоночных. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 87 (8) : 1085—1094.
- Калинина Н. И., Курчавый Г. Г., Амахин Д. В., Веселкин Н. П. 2008. Различия в активации тормозных рецепторов мотонейрона лягушки *Rana ridibunda* ГАМК и глицином и их взаимовлияние. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 94 (9) : 1005—1016.
- Кожанов В. М., Карамян О. А., Чмыхова Н. М., Веселкин Н. П., Клеманн Х. П. 2004. Модуляция миниатюрных тормозных потенциалов мотонейронов спинного мозга черепахи метаботропными глутаматными рецепторами группы II. Цитология. 46 (4) : 326—336.
- Полина Ю. А., Амахин Д. В., Кожанов В. М., Курчавый Г. Г., Веселкин Н. П. 2006. Три типа тормозных миниатюрных потенциалов в мотонейронах спинного мозга лягушки: возможность ко-медиации ГАМК и глицина. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 92 (1) : 18—26.
- Adanina V. O., Shapovalov A. I., Shiriaev B. I., Tamarova Z. A. 1983. Tracing of motoneurons and primary afferent projections after intracellular staining with Lucifer Yellow: dye-coupling. Neuroscience. 9 : 453—461.
- Bae Y. C., Choi B. J., Lee M. G., Lee H. J., Park K. R., Zhang L. F., Honma S., Fukami H., Yoshida A., Ottersen O. P., Shigenaga Y. 2002. Quantitative ultrastructural analysis of glycine and gamma-aminobutyric acid-immunoreactive terminals on trigeminal alpha- and gamma-motoneuron somata in the rat. J. Comp. Neurol. 442 : 308—319.
- Bae Y. C., Nakamura T., Ihn H. J., Choi M. H., Yoshida A., Moritani M., Honma S., Shigenaga Y. 1999. Distribution pattern of inhibitory and excitatory synapses in the dendritic tree of single masseter — motoneurons in the cat. J. Comp. Neurol. 414 : 454—468.
- Berger A. J., Dieudonne S., Ascher P. 1998. Glycine uptake governs glycine site occupancy at NMDA receptors of excitatory synapses. J. Neurophysiol. 80 : 3336—3340.
- Berger A. J., Isaacson J. S. 1999. Modulation of motoneuron N-methyl-D-aspartate receptors by the inhibitory neurotransmitter glycine. J. Physiol. Paris. 93 : 23—27.
- Bohlhalter S., Mohler H., Fritschy J. M. 1994. Inhibitory neurotransmission in rat spinal cord: colocalization of glycine- and GABA-receptors at GABAergic synaptic contacts demonstrated by triple immunofluorescence staining. Brain Res. 642 : 59—69.
- Bormann J., Hamill O. P., Sakmann B. 1987. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurons. J. Physiol. 385 : 243—286.
- Budai D., Wilcox G. L., Larson A. A. 1992. Enhancement of NMDA-evoked neuronal activity by glycine in the rat spinal cord *in vivo*. Neurosci. Lett. 135 : 265—268.
- Chaudhry F. A., Reimer R. J., Bellocchio E. E., Danbolt N. C., Ozen K. K., Edwards R. H., Storm-Mathisen J. 1998. The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. J. Neurosci. 18 : 9733—9750.
- Chery N., De Koninck Y. 1999. Junctional versus extrajunctional glycine and GABA(A)receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord. J. Neurosci. 19 : 7342—7355.
- Christensen H., Fonnum F. 1991. Uptake of glycine, GABA, and glutamate by synaptic vesicles isolated from different regions of rat CNS. Neurosci. Lett. 129 : 217—220.
- Cullheim S., Kellerth J. O. 1981. Two kinds of recurrent inhibitions of cat spinal a-motoneurons as differentiated pharmacologically. J. Physiol. 312 : 209—224.
- Curtis D. R., Game C. J., Lodge D., McCulloch R. M. 1976. A pharmacological study of Renshaw cell inhibition. J. Physiol. 258 : 227—242.
- Danysz W., Parsons C. G. 1998. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. Pharmacol. Rev. 50 : 597—650.
- Destombes J., Horcholle-Bossavit G., Simon M., Thiesson D. 1996. GABA-like immunoreactive terminals on lumbar motoneurons of the adult cat. A quantitative ultrastructural study. Neurosci. Res. 24 : 123—130.
- Donato R., Nistri A. 2000. Relative contribution by GABA or glycine to Cl-mediated synaptic transmission on rat hypoglossal motoneurons *in vitro*. J. Neurophysiol. 84 : 2715—2724.
- Dugue G. P., Dumoulin A., Triller A., Dieudonne S. 2005. Target-dependent use of coreleased inhibitory transmitters at central synapses. J. Neurosci. 25 (28) : 6490—6498.
- Dumba J. S., Irish P. S., Anderson N. L., Westrum L. E. 1998. Electron microscopic analysis of gamma-aminobutyric acid and glycine colocalization in rat trigeminal subnucleus caudalis. Brain Res. 806 : 16—25.
- Dumoulin A., Levi S., Riveau B., Gasnier B., Triller A. 2000. Formation of mixed glycine and GABAergic synapses in cultured spinal cord neurons. Eur. J. Neurosci. 12 : 1—11.
- Dumoulin A., Rostaing P., Bedet C., Levi S., Isambert M. F., Henry J. P., Triller A., Gasnier B. 1999. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. J. Cell Sci. 112 : 811—823.
- Dumoulin A., Triller A., Dieudonne S. 2001. IPSC kinetics at identified GABAergic and mixed GABAergic and glycinergic synapses onto cerebellar Golgi cells. J. Neurosci. 21 : 6045—6057.
- Eccles J. C., Schmidt R., Willis W. D. 1963. Pharmacological studies on presynaptic inhibition. J. Physiol. 168 : 500—530.
- Gasnier B. 2000. The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. Biochimie. 82 : 327—337.
- Gray E. G. 1962. A morphological basis for pre-synaptic inhibition. Nature (Lond.). 193 : 82—83.
- Hamill O. P., Bormann J., Sakmann B. 1983. Activation of multiple-conductance state chloride channels in spinal neurons by glycine and GABA. Nature (Lond.). 305 : 805—808.
- Hwang S. J., Pagliardini S., Rustioni A., Valtschanoff A. 2001. Presynaptic kainate receptors in primary afferents to the superficial laminae of the rat spinal cord. J. Comp. Neurol. 436 : 275—289.
- Jimenez I., Rudomin P., Solodkin M. 1987. Mechanisms involved in the depolarization of cutaneous afferents produced by segmental and descending inputs in the cat spinal cord. Exp. Brain Res. 69 : 195—207.
- Johnson J. W., Ascher P. 1987. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. Nature. 325 : 529—531.
- Jonas P., Bischofberger J., Sandkuhler J. 1998. Co-release of two fast neurotransmitters at a central synapse. Science. 281 : 419—424.
- Kerchner G. A., Wilding T. J., Li P., Zhuo M., Huettner J. E. 2001. Presynaptic kainate receptors regulate spinal sensory transmission. J. Neurosci. 21 : 59—66.
- Krnjevic K., Puil E., Werman R. 1977. GABA and glycine actions on spinal motoneurons. Can. J. Physiol. Pharmacol. 55 : 658—669.
- Lagerback P., Kellerth J.-O. 1985. Light microscopic observations on cat Renshaw cells after intracellular staining with horseradish peroxidase. II. The cell bodies and dendrites. J. Comp. Neurol. 240 : 368—376.

- Lahjouji F., Barbe A., Chazal G., Bras H. 1996. Evidence for colocalization of GABA and glycine in afferents to retrogradely labeled rat abducens motoneurons. *Neurosci. Lett.* 206 : 161—164.
- Lamotte d'Incamps B., Destombes J., Thiesson A., Hellio R., Lasserre X., Kouchtir-Devanne N., Jami L., Zytnicki D. 1998. Indications for GABA-immunoreactive axo-axonic contacts on the intraspinal arborization of a Ib fiber in cat: a confocal microscope study. *J. Neurosci.* 18 : 10 030—10 036.
- Lee C. J., Bardoni R., Tong C. K., Hengelman H. S., Joseph D. J., McDermott A. B. 2002. Functional expression of AMPA receptors on central terminals of dorsal root ganglion neurons and presynaptic inhibition of glutamate release. *Neuron.* 35 : 135—146.
- Levi S., Chesnoy-Marchais D., Sieghart W., Triller A. 1999. Synaptic control of glycine and GABA(A) receptors and gephyrin expression in cultured motoneurons. *J. Neurosci.* 19 : 7434—7449.
- Lim R., Alvarez F. J., Walmsley B. 2000. GABA mediates presynaptic inhibition at glycinergic synapses in a rat auditory brainstem nucleus. *J. Physiol.* 525 : 447—459.
- Lu Ch.-R., Hwang S. L., Phend K. D., Rustioni A., Valtschanoff A. 2002. Primary afferent terminals in spinal cord express presynaptic AMPA receptors. *J. Neurosci.* 22 : 9522—9529.
- Lu T., Rubio M. E., Trussell L. O. 2008. Glycinergic transmission shaped by the corelease of GABA in mammalian auditory synapse. *Neuron.* 57 : 524—535.
- Lynch J. W. 2004. Molecular structure and function of glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev.* 84 : 1051—1095.
- Ma Q.-P., Hargreaves R. J. 2000. Localization of N-methyl D-aspartate NR2B subunits on primary sensory neurons that give rise to small-caliber sciatic nerve fibres in rats. *Neuroscience.* 101 : 699—707.
- Marchetti C., Pagnotta S., Donato R., Nistri A. 2002. Inhibition of spinal or hypoglossal motoneurons of the newborn rat by glycine or GABA. *Eur. J. Neurosci.* 15 : 975—983.
- Marvizon J. C. G., McRoberts J. A., Ennes H. S., Song B., Wang X., Jinton L., Corneliussen B., Mayer E. A. 2002. Two N-methyl-D-aspartate receptors in adult dorsal root ganglia with different subunit composition and localization. *J. Comp. Neurol.* 446 : 6325—6341.
- Maxwell D. J., Christie W. M., Short A. D., Brown A. G. 1990. Direct observations of synapses between GABA-immunoreactive boutons and muscle afferent terminals in lamina VI of the cat's spinal cord. *Brain Res.* 530 : 215—222.
- Maxwell D. J., Riddell J. S. 1999. Axo-axonic synapses on terminals of group II muscle spindle afferent axons in the spinal cord of the cat. *Eur. J. Neurosci.* 11 : 2151—2159.
- Maxwell D. J., Todd A. J., Kerr R. 1995. Colocalization of glycine and GABA in synapses on spinomedullary neurons. *Brain Res.* 690 : 127—132.
- McIntire S. L., Reimer R. J., Schuske K., Edwards R. H., Jorgensen E. M. 1997. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature.* 389 : 870—876.
- Mitchell K., Spike R. C., Todd A. J. 1993. An immunocytochemical study of glycine receptor and GABA in laminae I—III of rat spinal dorsal horn. *J. Neurosci.* 13 : 2371—2381.
- Nicoll R. A., Malenka R. C. 1998. A tale of two transmitters. *Science.* 281 : 360—361.
- O'Brien J., Berger A. 1999. Cotransmission of GABA and glycine to brain stem motoneurons. *J. Neurophysiol.* 82 : 1638—1641.
- Ornung G., Ottersen O. P., Cullheim S., Ulfhake B. 1998. Distribution of glutamate- glycine and GABA-immunoreactive nerve terminals on dendrites in the cat spinal motor nucleus. *Exp. Brain Res.* 118 : 517—532.
- Ornung G., Shupliakov O., Linda H., Ottersen O. P., Storm-Mathisen J., Ulfhake B., Cullheim S. 1996. Qualitative and quantitative analysis of glycine- and GABA-immunoreactive nerve terminals on motoneuron cell bodies in the cat spinal cord: a postembedding electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 365 : 413—426.
- Ornung G., Shupliakov O., Ottersen O. P., Storm-Mathisen J., Cullheim S. 1994. Immunohistochemical evidence for coexistence of glycine and GABA in nerve terminals on cat motoneurons: an ultrastructural study. *Neuroreport.* 5 : 889—892.
- Parsons C. G., Danysz W., Hesselink M., Hartmann S., Lorenz B., Wollenburg C., Quack G. 1998. Modulation of NMDA receptors by glycine-introduction to some basic aspects and recent developments. *Amino Acids.* 14 : 207—216.
- Reichenberger L., Dieringer N. 1994. Size-related colocalization of glycine and glutamate immunoreactivity in frog and rat vestibular afferents. *J. Comp. Neurol.* 349 : 603—614.
- Rekling J. C., Funk G. D., Bayliss D. A., Dong X.-W., Feldman J. L. 2000. Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol. Rev.* 80 : 767—852.
- Russier M., Kopysova I., Ankri N., Ferrand N., Debanne D. 2002. GABA and glycine co-release optimizes functional inhibition in rat brainstem motoneurons *in vitro*. *J. Physiol.* 541 : 123—137.
- Sato K., Kiyama H., Park H. T., Tohyama M. 1993. AMPA, KA and NMDA receptors are expressed in the rat DRG neurons. *Neuroreport.* 4 : 1263—1265.
- Schneider S. P., Fyffe R. E. 1992. Involvement of GABA and glycine in recurrent inhibition of spinal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 68 : 397—406.
- Somogyi J. 2002. Differences in ratios of GABA, glycine and glutamate immunoreactivities in nerve terminals on rat hindlimb motoneurons: a possible source of post-synaptic variability. *Brain Res. Bull.* 59 : 151—161.
- Spike R. C., Watt C., Zafra F., Todd A. J. 1997. An ultrastructural study of the glycine transporter GLYT2 and association with glycine in the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn. *Neuroscience.* 77 : 543—551.
- Sutherland F. I., Bannatyne B. A., Kerr R., Riddell J. S., Maxwell D. J. 2002. Inhibitory amino acid transmitters associated with axons in presynaptic apposition to cutaneous primary afferent axons in the cat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 452 : 154—162.
- Taal W., Holstege J. C. 1994. GABA and glycine frequently colocalize in terminals on cat spinal motoneurons. *Neuroreport.* 21 : 2225—2228.
- Takahashi T. 1992. The minimal inhibitory synaptic currents evoked in neonatal rat motoneurons. *J. Physiol.* 450 : 593—611.
- Takahashi T., Momiyama A. 1991. Single-channel currents underlying glycinergic inhibitory postsynaptic responses in spinal neurons. *Neuron.* 7 : 965—969.
- Thomson A. M. 1990. Glycine is a co-agonist at the NMDA receptor / channel complex. *Prog. Neurobiol.* 35 : 53—74.
- Todd A. J., Spike R. C., Chong D., Neilson M. 1995. The relationship between glycine and gephyrin in synapses of the rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 7 : 1—11.
- Todd A. J., Watt C., Spike R. C., Sieghart W. 1996. Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 16 : 974—982.
- Triller A., Cluzeaud F., Korn H. 1987. Gamma-aminobutyric acid-containing terminals can be apposed to glycine receptors at central synapses. *J. Cell Biol.* 104 : 947—956.
- Van den Pol A. N., Gorcs T. 1988. Glycine and glycine receptor immunoreactivity in brain and spinal cord. *J. Neurosci.* 8 : 472—492.
- Vesselkin N. P., Adanina V. O., Rio J.-P., Reperant J. 2001. Axo-axonic GABA-immunopositive synapses on the primary afferent fibers in the frogs. *J. Chem. Neuroanat.* 22 : 209—217.
- Vesselkin N. P., Adanina V. O., Rio J.-P., Reperant J. 2003. Ultrastructural study of glutamate- and GABA-immunoreactive terminals contacting the primary afferent fibers in frog spinal cord. A double postembedding immunocytochemical study. *Brain Res.* 960 : 267—272.
- Vesselkin N. P., Rio J.-P., Adanina V. O., Kenigfest N. B., Reperant J. 1995. Colocalization of glutamate and glycine in giant fiber synapses of the lamprey spinal cord. *Brain Res.* 36 : 229—237.
- Vesselkin N. P., Rio J.-P., Adanina V. O., Reperant J. 2000. GABA- and glycine-immunoreactive terminals contacting motoneurons in lamprey spinal cord. *J. Chem. Neuroanat.* 19 : 69—80.
- Watson A. H. 2003. GABA- and glycine-like immunoreactivity in axons and dendrites contacting the central terminals of rapidly adapting glabrous skin afferents in rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 464 : 497—510.

Watson A. H., Bazzaz A. A. 2001. GABA and glycine-like immunoreactivity at axoaxonic synapses on Ia muscle afferent terminals in the spinal cord of the rat. *J. Comp. Neurol.* 433 : 335—348.

Watson A. H., Hughes D. I., Bazzaz A. 2002. Synaptic relationships between hair follicle afferents and neurones expressing GABA and glycine-like immunoreactivity in the spinal cord of the rat. *J. Comp. Neurol.* 452 : 367—380.

Wentzel P. R., De Zeeuw C. I., Holstege J. C., Gerrits N. M. 1993. Colocalization of GABA and glycine in the rabbit oculomotor nucleus. *Neurosci. Lett.* 164 : 25—29.

Wu L.-J., Li Y., Xu T.-L. 2002. Co-release and interaction of two inhibitory co-transmitters in rat sacral dorsal commissural neurons. *Neuroreport.* 13 : 977—981.

Yang H. W., Min M. Y., Appenteng K., Batten T. F. 1997. Glycine-immunoreactive terminals in the rat trigeminal motor nucleus: light and electron-microscopic analysis of their relationships with motoneurons and with GABA-immunoreactive terminals. *Brain Res.* 749 : 301—319.

Поступила 23 XI 2009

GABA- AND GLYCINE-IMMUNOREACTIVE SYNAPSES IN THE SPINAL CORD OF THE FROG *RANA TEMPORARIA*

V. O. Adanina,¹ J.-P. Rio,² A. S. Adanina,¹ J. Reperant,² N. P. Vesselkin¹

¹ I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, Russia,
and ² Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France;
e-mail: Adanina@rambler.ru

Postembedding immunogold method was used to examine the distribution of gamma-aminobutyric acid- and glycine-immunoreactives synapses on the motoneurons and primary afferent axons in frog spinal cord. Analysis of all labeled boutons on dendrites and somata of motoneurons showed that 7 % were labeled for GABA, 23 % only for glycine and approximately 70 % were immunoreactive for both GABA and glycine. These results confirm the predominant role of glycine in postsynaptic inhibition of motoneuronal activity. Three populations of synaptic boutons were found on primary afferent axons: GABA-immunoreactive (25 %), glycine-immunoreactive (5 %) and the majority of the immunoreactive synapses exhibited colocalization of two inhibitory transmitters. Greater proportion of axo-axonal synapses was organized in synaptic triads. The possible roles of glycine in the axo-axonal synapses on the primary afferent fibers are discussed.

Key words: GABA- and glycine-immunoreactive synapses, frog *Rana temporaria*, motoneurons, primary afferent axons.