

ЩЕЛЕВЫЕ КОНТАКТЫ НЕЙРОНОВ В КОРКОВЫХ КОЛОНКАХ И В ВЕНТРАЛЬНЫХ ЯДРАХ ТАЛАМУСА КРЫС

© *Е. Ю. Кириченко,¹ А. К. Логвинов, С. Ю. Филиппова*

Лаборатория функциональной геномики и морфологии Академии биологии и биотехнологии им. И. Д. Ивановского Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, 344090;

¹ *электронный адрес: kiriche.evgeniya@yandex.ru*

Функциональные корковые колонки и вентральные таламические ядра таламуса играют ключевую роль в процессах обработки сенсорной информации, поэтому исследование деталей формирования нейро-нейрональных щелевых контактов (ЩК) в этих областях имеет большое теоретическое и практическое значение. Методами электронной микроскопии в работе исследованы строение и особенности распределения нейро-нейрональных ЩК в четвертом слое коры, а также в каждом ядре таламуса (VPM, RTN, Pom и VPL). В коре выявлено больше нейро-нейрональных ЩК по сравнению с таламическими ядрами. Во всех исследованных структурах выявлены и описаны аксодендритические, дендро-дендритические, а также «смешанные» синапсы. Аксодендритические ЩК выявлены нами впервые. Предполагается, что этот тип контактов может играть определенную функциональную роль в локальной синхронизации активности нейронов одного ансамбля на пресинаптическом уровне.

Ключевые слова: кора, таламус, щелевой контакт, электрический синапс, электронная микроскопия, ритмогенез.

Принятые сокращения: ЩК — щелевой контакт.

В настоящее время на основе данных электрофизиологии, электронной и конфокальной микроскопии можно сказать, что все отделы зрелой центральной нервной системы, начиная от сетчатки глаза, обонятельной луковицы и заканчивая спинным и первичным сенсорным ганглием, содержат клетки, соединенные щелевыми контактами (ЩК) (Nagy, Rash, 2000; Deans et al., 2001; Galaretta, Hestrin, 2002; Fukuda, Kosaka, 2003; Connors, Long, 2004; Gibson et al., 2005; Fukuda et al., 2006, и др.). В головном мозге млекопитающих возможно формирование двух типов ЩК: глия-глиальных, формирующихся между отростками как астроцитов, так и олигодендроцитов (Nagy, Rash, 2000), и нейро-нейрональных ЩК, функционирующих как электрические синапсы.

Во взрослом мозге при схожих морфологических характеристиках глия-глиальные ЩК и электрические синапсы имеют различное функциональное назначение. Благодаря формированию межклеточных ЩК астроглия может приобретать функцию пространственного буфера, регулируя внутриклеточный и экстраклеточный ионный гомеостаз (Yamamoto et al., 1990; Ransom, Otland, 1996). Кроме того, ЩК глиии способствуют проведению метаболитических субстратов (Giaume et al., 1997), регулируют объем сомы клетки астроцита (Scemes, Spray, 1998), распространяют сигналы клеточной гибели и являются нейропротекторами в случае окислительного стресса (Blanc et al., 1998). В предыдущей работе мы провели подробное ультраструктурное и иммуноэлектронно-микроскопическое исследование глия-глиальных ЩК в таламических

ядрах и их пространственного взаимоотношения с химическими синапсами (Кириченко и др., 2016).

В отличие от глиальных ЩК электрические синапсы рассматриваются как структуры, обеспечивающие электротонический этап синхронизации локального эндогенного ритмогенеза в условиях отсутствия импульсной активности в элементарных нейронных корковых и подкорковых ансамблях (Deans et al., 2001; Galaretta, Hestrin, 2002; Landisman et al., 2002; Fukuda, Kosaka, 2003; Connors, Long, 2004; Gibson et al., 2005; Кириченко и др., 2008; Логвинов и др., 2010). Между тем функциональные корковые колонки и вентральные таламические ядра таламуса (VPM, RTN, Pom и VPL) играют ключевую роль в процессах обработки сенсорной, в том числе тактильной, информации и формирования поведенческих реакций (Серков, Казаков, 1980; Сухов, 1992; Kivtrak, Erzurumlu, 2013). Поэтому исследование деталей формирования нейро-нейрональных ЩК в этих областях имеет большое теоретическое и практическое значение.

Целью настоящей работы являлось ультраструктурное и морфометрическое исследование ЩК нейронов в корковых и таламических модулях мозга крысы.

Материал и методика

Представлены результаты, полученные в экспериментах на пяти белых беспородных половозрелых лабораторных крысах обоего пола массой 150—200 г. Содер-

жание животных и экспериментальные исследования осуществляли в соответствии с протоколом, утвержденным 18 апреля 2012 г. комиссией по биоэтике Южного федерального университета. Животным вводили нембутал в дозе 60 мг/кг и проводили транскардиальную перфузию посредством системы Perfusion Two (Leica, Германия). На первом этапе перфузию проводили изотоническим фосфатным буферным раствором (100 мл, 37 °C) в течение 1 мин, на следующем этапе — раствором 4%-ного параформальдегида и 0.1%-ного глутаральдегида на 0.1 М фосфатном буфере (200 мл), pH 7.2—7.3. Через 2 ч после окончания перфузии головной мозг извлекали и оставляли для дофиксации в том же растворе при 4 °C на ночь.

Электронная микроскопия. Из головного мозга выделяли секцию по координатам: первый разрез — 0.2 мм рострально от брегмы, второй разрез — 6.04 мм каудально от брегмы, при этом латерально мозг не рассекали. Иссеченный фрагмент мозга прикрепляли каудальной стороной среза вниз. На вибраторе VT 1000E (Leica, Германия) на холоде изготавливали фронтальные срезы толщиной 60 мкм под углом 45°. Нарезку продолжали до тех пор, пока под стереотаксической лупой не обнаруживали на срезах структуры таламуса в соответствии с атласом (Рахинос, Watson, 1998). Отобранные срезы постфиксировали в течение 1.5 ч в 1%-ном растворе OsO₄ на 0.1 М фосфатном буфере и далее обрабатывали стандартными методами для электронной микроскопии. Заливку срезов в эпоксидную смолу производили между двумя предметными стеклами с предварительно нанесенным тефлоновым покрытием. После полимеризации из полученных срезов лезвием под стереотаксической лупой из каждого среза иссекали фрагменты четвертого слоя коры и фрагменты ядер таламуса и приполимеризовывали к заранее изготовленному блоку из эпоксидной смолы. Ультратонкие срезы толщиной 50 нм получали с помощью ультрамикротомы Ultracut-E (Leica, Германия) и алмазного ножа ultra 45° (Diatome, Швейцария), контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и просматривали под электронными микроскопами Jem 1011 (Jeol, Япония).

Реагенты: параформальдегид и OsO₄ (Sigma-Aldrich, США); глутаральдегид (EMS, США).

Результаты и обсуждение

Электронно-микроскопическое исследование показало, что как в области колонок коры, так и в ядрах таламуса основная часть ЩК локализована между отростками астроцитов, реже олигодендроцитов.

В группу электрических синапсов были отнесены ЩК, локализованные на отростках, имеющих неоспоримые ультраструктурные признаки принадлежности к нейронам: наличие синаптических везикул, дендротрубочек, дендрофиламентов, а также активной зоны химического синапса с возможным постсинаптическим уплотнением. На малых увеличениях электрические синапсы определяются как более электронно-плотные зоны мембран отростков нервных клеток. При больших увеличениях ЩК обладают характерной семислойной структурой: две контактирующие трехслойные мембраны, между которыми располагается узкая щель шириной около 3 нм.

Выявленные электрические синапсы были представлены следующими типами: аксодендритические, дендро-дендритические, а также «смешанные» синапсы. В ряде

случаев обнаруживалось несколько рядом расположенных электрических синапсов в одном поле зрения, локализованных на аксонах, содержащих синаптические везикулы (рис. 1, а—в). При этом в одном случае было четко видно, что зона нексуса более протяженного ЩК располагалась в одной плоскости среза с активной зоной химического синапса, расположенного на этом же аксоне (рис. 1, а). Помимо контактов с короткими зонами нексуса нами визуализировались протяженные электрические синапсы, расположенные между аксонами и предположительно дендритами (рис. 1, г, д). При этом протяженная зона контакта иногда может выходить из плоскости среза. Вероятно, контакт имеет некоторую изогнутость.

В таламических ядрах нами обозначены случаи локализации двух параллельно расположенных ЩК на отростке со светлой электронно-прозрачной цитоплазмой, предположительно дендрите, находящемся между двумя аксонами. Контакты имеют небольшую перфорацию и преломления, однако их нексусы располагаются в плоскости среза. При этом отмечено небольшое расстояние (около 85 нм) между двумя электрическими синапсами, что может обеспечивать быструю межклеточную передачу (рис. 1, е). В некоторых случаях электрический синапс был локализован между двумя дендритами, которые формируют одновременно аксодендритические химические синапсы. В случаях дендро-дендритических электрических синапсов на цитоплазматической стороне мембран, формирующих ЩК, имеются небольшие скопления хлопьевидного электронно-плотного материала, «опущающего» контактирующие мембраны (рис. 2, а, б). Единичные случаи «смешанных» синапсов, обнаруженных нами в области формирования баррелей коры, представляют собой близкую локализацию на одной мембране поперечно срезанного дендрита как дендро-дендритического ЩК, так и симметричного аксодендритического химического синапса (рис. 2, в, г).

Проведенное морфометрическое исследование было предназначено для выявления общего числа ЩК коры и таламических ядер, а также соотношения количества глия-глиальных и нейро-нейрональных ЩК. Всего была проанализирована площадь 1000 мкм². Для морфометрического исследования ЩК коры нами была выбрана область четвертого слоя, наиболее насыщенная исследуемым типом межклеточных контактов в соответствии с проведенными нами ранее исследованиями (Logvinov et al., 2009). В области четвертого слоя коры, а также в каждом ядре таламуса (VPM, RTN, Pom и VPL) изучено по две ячейки площадью 100 мкм² каждой сетки для электронной микроскопии, на которой располагался срез ткани. При подсчете учитывали только ЩК с четкой визуализацией всех 7 слоев при больших увеличениях.

В результате последовательного просмотра полей зрения в четвертом слое коры на площади 200 мкм² было обнаружено 11 нейро-нейрональных и 19 глия-глиальных ЩК из общего числа 30 обнаруженных ЩК. В исследуемых ядрах таламуса на площади 200 мкм² число нейро-нейрональных ЩК оказалось значительно меньше. Так, в ретикулярном ядре (RTN) из 30 обнаруженных ЩК 29 являлись глия-глиальными и 1 — нейро-нейрональным. В вентропостеромедиальном (VPM) ядре из 41 ЩК 37 являлись глия-глиальными и 4 нейро-нейрональными. В прилежащем к VPM ядру вентропостлатеральном ядре (VPL) обнаружено 48 ЩК, из которых 44 являлись глия-глиальными, а 4 ЩК являлись нейро-нейрональными.

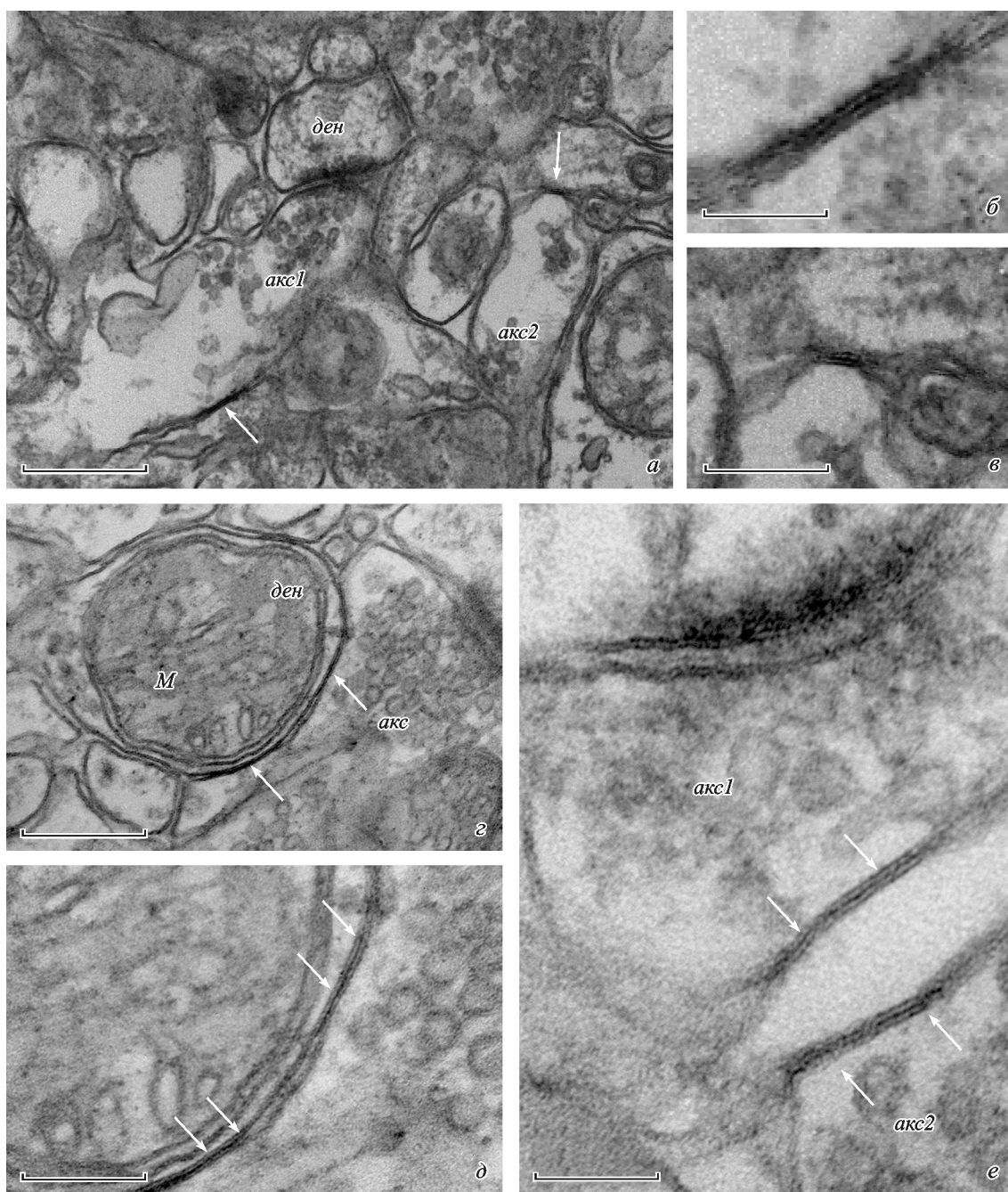


Рис. 1. Ультраструктура щелевых контактов (ШЦК) на отростках нейронов коры и таламуса крыс.

a–в — два ШЦК, локализованных на аксонах в одном поле зрения: *a* — общий вид (ШЦК отмечены белыми стрелками); *б* — увеличенный фрагмент, демонстрирующий ультраструктуру ШЦК на аксоне, формирующем на противоположном конце аксодендритический синапс; *в* — увеличенный фрагмент, демонстрирующий аксодендритический щелевой контакт с небольшой зоной некуса. *г, д* — ШЦК с протяженной активной зоной, между аксоном и дендритом: *г* — общий вид (ШЦК отмечены белыми стрелками); *д* — увеличенный фрагмент, демонстрирующий места попадания ШЦК в плоскость среза (стрелки) и близость синаптических везикул к зоне некуса. *е* — два ШЦК (белые стрелки) на двух аксонах (*акс1, акс2*), между которыми предположительно расположен дендрит. *акс* — аксон, *ден* — дендрит, *М* — митохондрия. Масштабные отрезки — 50 (*б, в*), 100 (*д, е*) и 200 (*а, г*) нм.

ми. В постеромедиальном (Pom) ядре из 30 обнаруженных ШЦК 28 были представлены глия-глиальными и 2 нейрон-нейронными ШЦК.

Таким образом, проведенное морфометрическое исследование выявило большее число нейрональных ШЦК в коре по сравнению с таламическими ядрами. Кроме того, по нашим данным, наибольшее количество электрических синапсов среди исследуемых ядер в таламусе локализовано в области формирования баррелоидов — в ядре

VPM. Согласно данным из литературы, в модульных группировках коры (баррели) и таламуса (баррелоиды) наблюдаются асимметричный характер ветвления дендритов и их ориентация в полость баррелей и баррелоидов (Сухов, 1992). Эта морфологическая особенность может определять более высокую степень синхронизации осцилляторной активности внутри отдельных подкорковых модулей, что соответствует данным известных электрофизиологических исследований (Lubke, Feldmeyer, 2007).

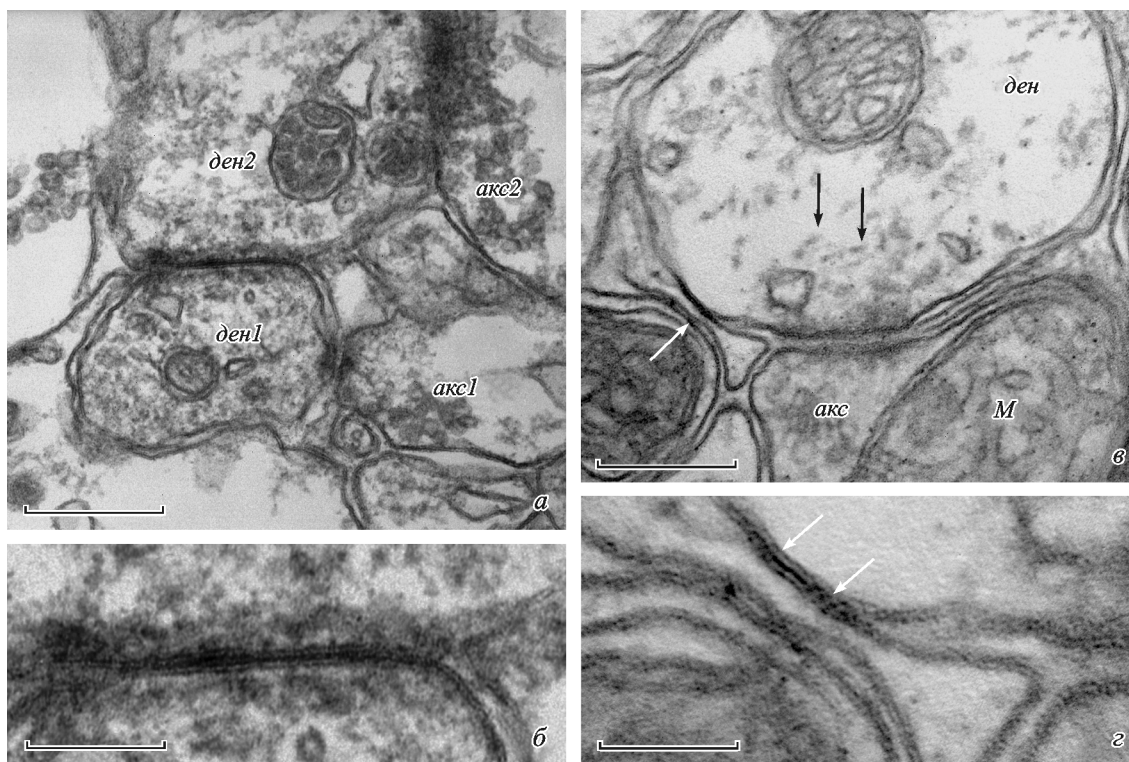


Рис. 2. Ультраструктура щелевых контактов (ЩК) на отростках нейронов коры и таламуса крыс.

а, б — дендродендритический (ден1, ден2) ЩК: а — общий вид; б — увеличенный фрагмент рисунка, демонстрирующий зону некуса в плоскости среза с развитым «опущающим» хлопьевидным материалом вокруг контактирующих мембран. в, г — «смешанный» электрический и химический синапс: в — общий вид (ЩК отмечен белой стрелкой); г — увеличенный фрагмент, демонстрирующий ультраструктуру ЩК на дендрите. Черными стрелками обозначены дендротрубочки, другие обозначения те же, что и на рис. 1. Масштабные отрезки — 50 (г) и 100 (б) и 200 (а, в) нм.

Структурно-функциональная особенность баррелей и баррелоидов также способствует формированию электрических дендро-дендритических связей между нейронами одного модуля для обеспечения локальной подпороговой синхронизации активности нейронов в пределах одного подкоркового модуля, более поздние этапы синхронизации при этом обеспечиваются химическими синапсами. По данным из литературы, многие пары тормозных быстрospайковых нейронов соединены одновременно и электрическими дендро-дендритными синапсами и ГАМКергическими тормозными химическими синапсами, образуя сеть в коре и гиппокампе, активность которой и обеспечивает синхронизацию подпорогового гиперполяризационного ритма отдельных модулей в этих структурах (Fukuda, Kosaka, 2003; Fukuda et al., 2006). При этом ведущая роль в функционировании этой сети отводится электрическим синапсам, содержащим коннексин 36 (Deans et al., 2001).

Смешанные синапсы, обнаруженные в нашей работе, представляют собой близко локализованные на одной мембране дендрита дендро-дендритический ЩК и симметричный аксодендритический химический синапс. Смешанные синапсы в неокортексе впервые описал Слорер (Sloper, 1972), однако до сих пор мало известно о той роли, которую они играют в нервной системе позвоночных. На основании модельных исследований у низших позвоночных показано, что электротонический компонент в смешанных синапсах у млекопитающих может быть связан с долговременной потенциацией (Kosaka et al., 2005; Hamzei-Sichani et al., 2012) и (или) синхронизацией высокочастотных колебаний (Traub et al., 2010).

По литературным данным, такие структуры также могут быть связаны с пластическими изменениями в нейрональных цепях (Pereda, 2014).

В настоящей работе впервые выявлены аксодендритические ЩК как в области коры, так и в ядрах таламуса. Этот тип контактов может играть определенную функциональную роль в локальной синхронизации активности нейронов одного ансамбля на пресинаптическом уровне. При этом возникновение потенциала действия в одном из синаптических контактов приводит к потенциалу действия в другом синаптическом контакте при помощи ЩК с низким антидромным сопротивлением и распространением потенциала в обоих афферентах. Выявление подобных случаев локализации ЩК представляет собой новые уникальные сведения, до сих пор никем не полученные. Мы полагаем, что такие механизмы проведения сигнала при помощи электрических синапсов наравне с тесным пространственным взаимодействием астроглиальных ЩК и асимметричных химических синапсов отражаются в особенностях функциональной организации специфических и неспецифических ядер таламуса, являющихся основными центрами афферентных и эфферентных влияний коры больших полушарий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ № 6.6047.2017/8.9 и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-03035).

Список литературы

- Кириченко Е. Ю., Повилайтите П. Е., Сухов А. Г. 2008. Роль щелевых контактов в локальном ритмогенезе корковых колонок. Морфология. 133 (1) : 31—34. (Kirichenko E. Yu., Povilaitite P. E., Sukhov A. G. 2008. Gap junctions role in local rhythmogenesis in cortical columns. Morphology. 133 (1) : 31—34.)
- Кириченко Е. Ю., Чурюмова Г. А., Логвинов А. К. 2016. Ультраструктурное исследование глиальных щелевых контактов в ядрах таламуса крысы. Биол. мембраны: журн. мембранной и клеточной биологии. 33 (3) : 194—206. (Kirichenko E. Yu., Churyumova G. A., Logvinov A. K. 2016. Ultrastructural study of glial gap junctions in the thalamic nuclei of rat. Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane Cell Biol. 10 (3) : 207—217.)
- Логвинов А. К., Кириченко Е. Ю., Повилайтите П. Е., Сухов А. Г. 2010. Структурная организация баррельной коры мозга крысы (иммуногистохимическое исследование). Морфология. 137 (1) : 10—13. (Logvinov A. K., Kirichenko E. Yu., Povilaitite P. E., Sukhov A. G. 2010. Structural organization of rat barrel cortex (immunohistochemical study). Morphology. 137 (1) : 10—13.)
- Серков Ф. Н., Казаков В. Н. 1980. Нейрофизиология таламуса. Киев: Наукова думка. 260 с. (Serkov F. N., Kazakov V. N. 1980. Neurophysiology of thalamus. Kiev: Naukova dumka. 260 p.)
- Сухов А. Г. 1992. Нейронная организация тактильного анализатора крысы. Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ. 101 с. (Sukhov A. G. 1992. Neuronal organization of rat tactile analyzer. Rostov-on-Don: RSU Publ. 101 p.)
- Blanc E. M., Bruce-Keller A. J., Mattson M. P. 1998. Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca²⁺ homeostasis and cell death. J. Neurochem. 70 : 958—970.
- Connors B. W., Long M. A. 2004. Electrical synapses in the mammalian brain. Annu. Rev. Neurosci. 27 : 393—418.
- Deans M., Gibson J., Sellitto C., Connors B., Paul D. 2001. Synchronization activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin 36. Neuron. 31 : 477—485.
- Fukuda T., Kosaka T. 2003. Ultrastructural study of gap junctions between dendrites of parvalbumin-containing GABAergic neurons in various neocortical areas of the adult rat. Neuroscience. 120 : 5—20.
- Fukuda T., Kosaka T., Singer W., Galuske R. A. W. 2006. Gap junctions among dendrites of cortical GABAergic neurons establish a dense and widespread intercolumnar network. J. Neuroscience. 26 : 3434—3443.
- Galarreta M., Hestrin S. 2002. Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast-spiking GABAergic interneurons in adult mouse neocortex. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 12 438—12 443.
- Giaume C., Tabernero A., Medina J.M. 1997. Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. Glia. 21 : 114—123.
- Gibson J. R., Beierlein M., Connors B. W. 2005. Functional properties of electrical synapses between inhibitory interneurons of neocortical layer 4. J. Neurophysiol. 93 : 467—480.
- Hamzei-Sichani F., Davidson K. G. V., Yasumura T., Janssen W. G. M., Wearne S. L., Hof P. R., Traub R. D., Gutierrez R., Ottersen O. P., Rash J. E. 2012. Mixed electrical-chemical synapses in adult rat hippocampus are primarily glutamatergic and coupled by connexin—36. Front. Neuroanat. 6 : 13. Doi: 10.3389/fnana.2012.00013.
- Kivrak B., Erzurumlu R. 2013. Development of the principal nucleus trigeminal lemniscal projections in the mouse. J. Comp. Neurol. 521 : 299—311.
- Kosaka T., Deans M. R., Paul D. L., Kosaka K. 2005. Neuronal gap junctions in the mouse main olfactory bulb: morphological analyses on transgenic mice. Neuroscience. 134 : 757—769.
- Landisman C., Long M., Beierlein M., Deans M., Paul D., Connors B. 2002. Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. J. Neurosci. 22 : 1002—1009.
- Logvinov A. K., Kirichenko E. Yu., Povilaitite P. E. 2009. Laminar distribution of Gap-junctions in rat somatic cortical columns. J. Integr. Neurosci. 8 : 425—431.
- Lübke J., Feldmeyer D. 2007. Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex. Brain Struct. Funct. 212 : 3—17.
- Nagy J. I., Rash J. E. 2000. Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. Brain Res. Brain Res. Rev. 32 : 29—44.
- Paxinos G., Watson C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Acad. Press. 237 p.
- Pereda A. E. 2014. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. Nat. Rev. Neurosci. 15 (4) : 250—263.
- Ransom B. R., Orkand R. K. 1996. Glial-neuronal interactions in non-synaptic areas of the brain: studies in the optic nerve. Trends Neurosci. 19 : 352—358.
- Scemes E., Spray D. C. 1998. Increased intercellular communication in mouse astrocytes exposed to hyposmotic shocks. Glia. 24 : 74—84.
- Sloper J. J. 1972. Gap junctions between dendrites in the primate neocortex. Brain Res. 44 : 641—646.
- Traub R. D., Duncan R., Russell A. J. C., Baldeweg T., Tu Y., Cunningham M. O., Whittington M. A. 2010. Spatiotemporal patterns of electrocorticographic very fast oscillations (>80 Hz) consistent with a network model based on electrical coupling between principal neurons. Epilepsia. 51 : 1587—1597.
- Yamamoto T., Ochalski A., Hertzberg E. L., Nagy J. I. 1990. On the organization of astrocytic gap junctions in rat brain as suggested by LM and EM immunohistochemistry of connexin-43 expression. J. Comp. Neurol. 302 : 853—883.

Поступла 30 VI 2017

NEURONAL GAP JUNCTIONS IN FUNCTIONAL CORTICAL COLUMNS AND VENTRAL THALAMIC NUCLEI

E. Yu. Kirichenko,¹ A. K. Logvinov, S. Yu. Filippova

Functional Genomics and Morphology Laboratory of Academy of Biology and Biotechnology of Southern Federal University, Rostov-on-Don, 344090;

¹ e-mail: kiriche.evgeniya@yandex.ru

Functional cortical columns and ventral thalamic nuclei play an important role in sensory information processing, therefore, the study of neuronal gap junctions (GJ) formation details in these areas is of great theoretical and practical importance. Electron microscopy methods were used to study the structure and distribution of neuronal GJ in the fourth layer of the cortex, as well as in each thalamic nucleus (VPM, RTN, Pom and VPL). The study revealed a greater relative amount of neuro-neuronal GJ in the cortex compared with thalamic

nuclei. In all the structures studied, axo-dendritic, dendro-dendritic, and also «mixed» synapses were identified and described. In the present study, axo-dendritic GJ were identified for the first time. It is assumed that this type of contacts can play a certain functional role in the distribution of neuronal activity in a single ensemble at the presynaptic level.

Key words: cortex, thalamus, gap junction, electrical synapse, electron microscopy, rhythmogenesis.
