УДК 591.543.42

СТРУКТУРНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ В НЕЙРОНАХ РЫБ PERCCOTTUS GLEHNI В ПРОЦЕССЕ ГИБЕРНАЦИИ

Санталова И.М., Михеева И.Б., Пенькова Н.А.

ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», Пущино, e-mail: cima@rambler.ru

В экспериментально созданных условиях зимовки рыб Perccottus glehni с использованием методов трехмерной реконструкции и электронной микроскопии было выявлено уменьшение объемов обоих основных дендритов маутнеровских нейронов и существенная трансформация их ультраструктуры. Предполагается, что в условиях воздействия длительной гипотермии в сочетании с естественной деафферентацией маутнеровских нейронов определяющим фактором пластических перестроек в нейронах является снижение метаболической активности вследствие необходимости экономии энергетических ресурсов животного. В условиях гипометаболизма, а также в результате снижения потоков афферентной информации объем обоих главных дендритов маутнеровских нейронов уменьшается, поскольку отсутствуют условия и необходимость поддерживать их в полноценном состоянии. Изменения ультраструктуры дендритов подтверждают наше предположение

Ключевые слова: гибернация, рыбы, ультраструктура Маутнеровских нейронов, 3d реконструкция

EFFECT OF HIBERNATION ON THE STRUCTURE OF THE NEURONS IN PERCCOTTUS GLEHNI FISH

Santalova I.M., Mikheeva I.B., Penkova N.A.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, e-mail: cima@rambler.ru

We studied the structure of the fish Mauthner neurons in a state of hibernation using the methods of three-dimensional reconstruction and electron microscopy. It was revealed the decrease in the volume of both lateral and ventral dendrites in fish neurons in the winter compared to the neurons of fish in the summer. Electron-microscopic study found changes in the ultrastructure of of both the main dendrites of Mauthner neurons of fish in the hibernation state. It was suggested that a decrease in the volume of both the main neuron dendrites and the apparent transformation of their ultrastructure caused not only hypothermia but also a natural deafferentation of this neurons. Under these conditions (hypometabolism and reducing afferent information flow), the volume of both dendrites decreases, since there are no conditions and the need to maintain theim in the full-fledged state. Changes in the structure of both dendrites revealed by electron microscopic studies confirm our assumption.

Keywords: hibernation, fish, Mauthner neurons , ultrastructure, 3D reconstruction

Известно, что гибернирующие животные проявляют уникальные адаптивные способности к неблагоприятным факторам среды (гипотермия, радиация, окислительный стресс). Во время зимовки у животных и птиц глубоко подавляется метаболизм, вследствие чего снижается температура тела, частота сердечных сокращений, замедляются другие функции [1, 2, 4]. Рыбы, которые способны адаптироваться к разным температурным условиям обитания, являются также интересным научным объектом. Например, ротан Perccottus glehni – представитель пойкилотермных гидробионтов – населяет пруды и мелкие озера, в которых вода промерзает зимой до дна, он отличается устойчивостью к различным воздействиям, низкой оксифильностью и не требует специальных условий для содержания. Основным регулирующим звеном в перестройке организма при разных адаптациях, в том числе и при длительных холодовых воздействиях, является центральная нервная система [1, 2]. Поэтому при изучении механизмов гибернации очень важно проследить за структурными изменениями в нейронах. Цель работы – исследование пластических изменений в центральных нейронах пресноводных рыб Perccottus glehni при формировании гипометаболического состоянии с использованием метода трехмерной реконструкции нейронов и ультраструктурного анализа [3, 5, 6].

Объектами исследования были маутнеровские нейроны (МН), парные симметрично расположенные в правой и левой части продолговатого мозга нервные клетки, присутствующие почти у всех костистых рыб и амфибий. МН получают окончания от разных анализаторов через многочисленные афферентные входы. Основными являются статоакустический вход и опосредованный через тектум зрительный вход [3, 9, 10]. Примечательно что, афферентные входы от этих важнейших анализаторов, оканчивающихся на МН, морфологически разделены. Слуховой вход покрывает в виде смешан-

ных синапсов дистальную часть латерального дендрита (ЛД), вестибулярный – в виде химических синапсов всю поверхность ЛД, а также сомы. Зрительный вход [3, 10] располагается исключительно на поверхности вентрального дендрита (ВД). Аксоны нейронов иннервируют мускулатуру хвостового плавника. Каждый МН у рыб является своеобразным командным центром, управляющим специфическим поведением животных («реакция страха» [9, 10].

Наличие четкой корреляции между уровнем двигательной активности рыб и морфологическими характеристиками их МН позволяет использовать эти уникальные клетки в качестве модели для изучения взаимосвязи структуры и функции нейронов при различных состояниях организма [5, 6, 7].

Материалы и методы исследования

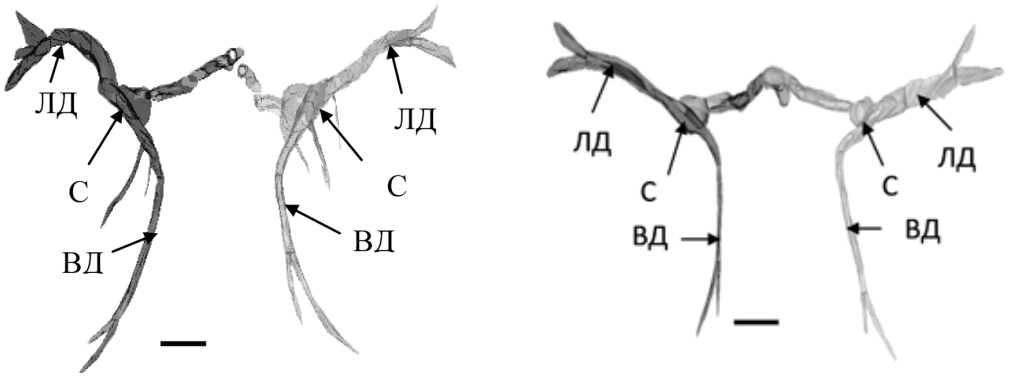
В работе использовали пресноводную рыбу ротан Perccottus glehni из озера Тульчино Московской области. Половозрелых животных длиной 8-12 см и массой около 200 г, делили на группы: первая (n = 6) – контроль, активное состояние, (июль); вторая (n = 6) – период зимнего оцепенения (конец декабря). Все эксперименты проводили в соответствии с общепринятыми биоэтическими нормами. Рыб контрольной группы, выловленных летом, сразу брали в эксперимент. Рыб опытной группы, выловленных в начале зимы, хранили до конца декабря в 5-литровых сосудах в холодильной камере с температурой 1 °С (± 1 °С). На 2-3-и сутки вода в сосудах частично замерзала, что соответствовало состоянию рыб в природе в процессе зимовки: ротаны содержались в пресной холодной воде, темноте, тишине, без пищи и с ограниченным доступом кислорода, т. е. в условиях, максимально приближенных к естественным. В день эксперимента рыб доставали из воды и декапитировали на льду. Под бинокулярной лупой выделяли фрагмент продолговатого мозга, содержащий МН. Фиксировали 12 ч в 4 %-м растворе формальдегида и 2,5 %-м растворе глутаральдегида на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,2). Дофиксировали в 2 %-м растворе четырехокиси осмия, обезвоживали и заключали в эпоксидную смолу по стандартной методике [5, 6]. Для получения серии последовательных срезов толщиной 5 мкм эпоновые блоки резали на пирамитоме («LKB», Швеция). Гистологические срезы, содержащие сому, латеральный (ЛД) и вентральный (ВД) дендриты последовательно фотографировали при ×250 под микроскопом «NU 2E» («Carl Zeiss», Германия), снабженным цифровой фотокамерой «Nikon D 5100» («Seiko», Япония). Каждый срез фотографировали по частям. Трехмерные изображения объектов выполняли с помощью программы «IGL Trace» (Dr. J. Fiala, США), количественные данные получали с помощью программы «3D View 3.5» («Actify, Inc.», США). Отдельно вычисляли объем сомы, ЛД и ВД, а также суммарный объем каждого нейрона [5, 9, 11]. Для сравнения данных применяли непараметрический критерий Манна-Уитни (U-критерий). Для ультраструктурного анализа гистологические срезы, содержащие соответствующие части МН, переклеивали на отдельные эпоновые блоки и резали ультратонко на ультратоме EM UC6 (Leika, ФРГ). Окрашивали полученные ультратонкие срезы уранилацетатом и цитратом свинца просматривали в электронном микроскопе Tesla BS-500 (Чехословакия). Съемку вели на фотопленку, негативы анализировали после оцифровки с помощью сканера Epson Perfection 4990 Photo (Seiko, Япония).

Результаты исследования и их обсуждение

На гистологических препаратов мозга контрольных рыб (лето, июль) МН идентифицировались как две симметрично расположенные гигантские клетки с типичным строением: сома и два основных дендрита – латеральный и вентральный. Структурная организация МН, трехмерно реконструированных по серийным гистологическим срезам в разные периоды наблюдения, представлена на рис. 1. Измерения показали, что суммарный объем всех компонентов нейрона (сомы, ВД и ЛД) в контрольной группе рыб (рис. 1, а) в среднем составлял $231{,}3 \pm 53{,}1 \times 10^3$ мкм^3.

При анализе структуры МН рыб, находящихся в состоянии оцепенения (зима, декабрь) были выявлены существенные изменения (рис. 1, б). Было обнаружено уменьшение их суммарных объемов до $157 \pm 58{,}1 \times 10^3$ мкм^3 ($p \geq 0{,}05$), причем в основном трансформировались дендриты, они истончались и укорачивались, а соматическая часть нейронов не претерпевала выраженных изменений (рис. 1, б). Примечательно, что редукция обоих основных дендритов была не пропорциональной, ВД сокращался значительно, более чем на 60 % ($p \leq 0{,}05$), а ЛД в меньшей степени на 45 % ($p \geq 0{,}05$).

Изучение МН контрольных рыб на ультраструктурном уровне показало, что синаптические окончания нервных волокон, приходящих от зрительного анализатора и контактирующих с ВД нейронов имеют обычный вид, синаптические пузырьки светлые, округлые, на срезе почти всех синапсов встречаются 1-2 митохондрии, иногда обнаруживаются гранулы гликогена (рис. 2, а). На ЛД, принимающих информацию от акустического и вестибулярного анализаторов, синаптические окончания также имеют обычную ультраструктуру (рис. 2, б). Цитоскелет всех дендритов умеренно рыхлый; гладкий эндоплазматический ретикулум (ГЭР) представлен в виде цистерн и канальцев, имеющих продольное и поперечное направление. В контрольных препаратах не наблюдается никаких видимых различий в плотности цитоскелета обоих дендритов, а также в структуре ГЭР.



а) *б)*

Рис. 1. Трехмерная реконструкция МН рыб в разные сезонные периоды: а – летний период, июль; б – зимовка, декабрь. ЛД, ВД – латеральный, вентральный дендриты, С – сома. Масштабный отрезок: 100 мкм

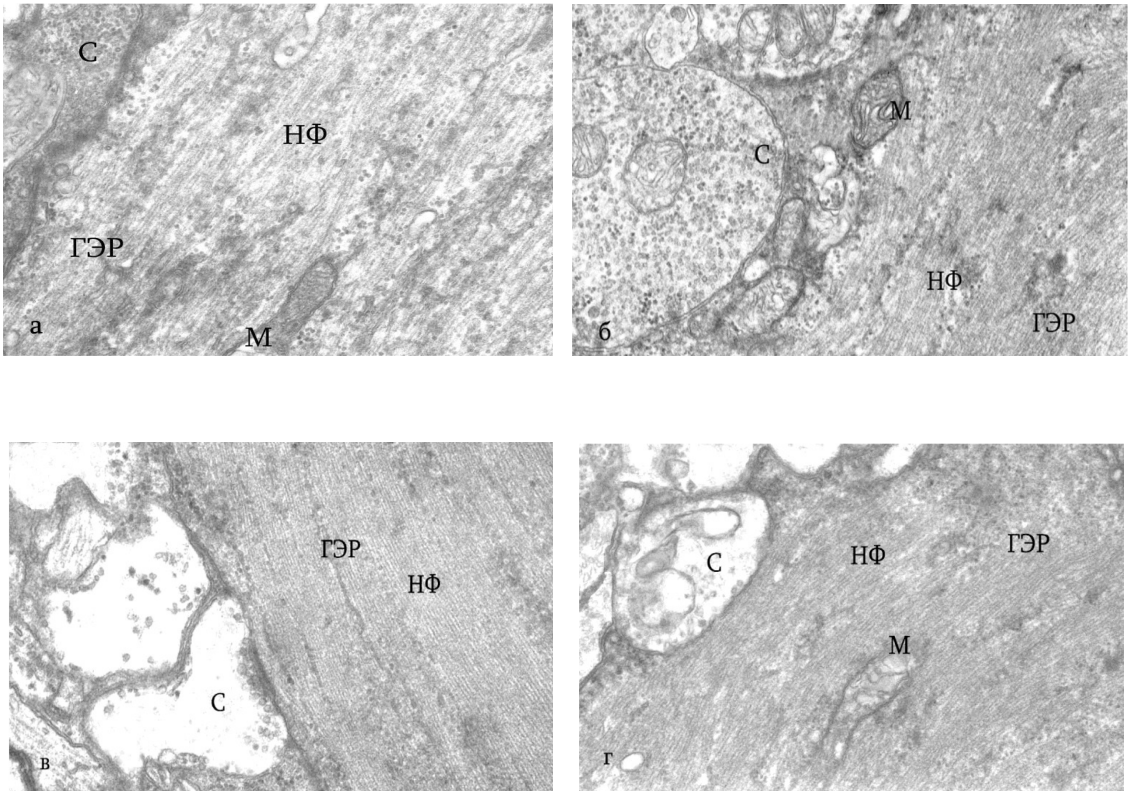


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изучение. Ультраструктура дендритов МН с синапсами: а, б – ВД и ЛД интактных рыб, в, г – ВД и ЛД зимующих рыб; ГЭР – гладкий эндоплазматический ретикулум; М – митохондрия; С – синапс, НФ – нейрофиламенты

Изучение ультраструктуры МН зимних ротанов выявило существенные отличия, особенно заметные в отношении ВД (рис. 2, в). На всей поверхности этих дендритов обнаруживаются многочисленные запустевшие синаптические окончания, с небольшим количеством синаптических пузырьков или вовсе лишенные таковых. Структура митохондрий в запустевших бутонах выглядит поврежденной, они теряют часть крист, их матрикс просветляется. Специализированные контакты – активные

зоны и десмосомоподобные контакты в таких синапсах часто не идентифицируются, хотя изредка встречаются синапсы, сохранившие свою обычную ультраструктуру. Вероятно, в период зимнего оцепенения происходит частичная разборка постсинаптических уплотнений и перераспределение рецепторных белков в мембране, аналогично тому, что обнаружено на нейронах гибернирующих сусликов [1, 8]. В цитоплазме проксимальных отделов ВД увеличивается количествово лизосом и миелиновых фигур, сама дендроплазма уплотняется, приобретает осмиофильный вид, ее объем уменьшается. Нейрофиламенты цитоскелета приобретают более упорядоченную структуру, расстояния между ними уменьшается. Структура ретикулума редуцируется, в большей степени за счет уменьшения количества поперечных компонентов. И в синапсах, и в дендроплазме отмечается большое количество гранул гликогена.

В ультраструктуре ЛД фиксируются меньшие изменения. Большинство синаптических окончаний в проксимальном отделе дендритов сохраняют свою морфологию, в них обнаруживаются многочисленные синаптические пузырьки и неповрежденные митохондрии (рис. 2, г). Однако в более дистальных отделах латеральных дендритов выявляется дисфункция синапсов: синаптические окончания полностью или частично запустевшие, немногочисленные пузырьки локализуются возле активных зон (см. рис. 2, г). Митохондрии в синапсах имеют поврежденный вид. В то же время цитоскелет в обоих латеральных дендритах также уплотняется за счет более строгой ориентации и уменьшения расстояния между филаментами. Выявленные изменения морфологии дендритов МН зимующих рыб свидетельствуют о пониженной способности нейронов принимать в этот период афферентные сигналы.

В процессе приспособления к сложным условиям среды обитания (холод, голод, сниженная сенсорная информация и др.) у животных формируются необходимые адаптивные механизмы [2, 4]. В основе этого лежит специфический процесс метаболического регулирования, связанный с необходимостью экономии энергетических резервов. Установлено, что при входе сусликов в спячку в тормозятся процессы, требующих больших энергетических трат, каковыми, в частности, является поддержание структуры и функции нейронов: подавляются биоэлектрическая и белоксинтезирующая активность клеток, уменьшаются размеры нейронов и степень ветвления дендритов, происходит ретракция шипиков, уменьшается активная зона синапсов [1, 2, 8]. Достоверно установлено, что благодаря этому такие животные во время зимней спячки экономят более 80% энергии, которая требуется для поддержания обычного уровня метаболизма [2]. Мы предполагаем, что в нашем эксперименте, у рыб, находящихся в состоянии гипометаболизма именно необходимость экономии энергетических ресурсов в условиях длительного охлаждения приводит к значительному сокращению объемов МН. Однако мы обнаружили, что структурные изменения в разных локусах МН выражены в разной степени. Вероятно, это может быть обусловлено разным уровнем функциональной активности синапсов в разных частях нейронов. Очевидно, что в зимний период года функция зрения рыб из-за низкой освещенности становится мало актуальной и поступление информации от зрительных анализаторов практически прекращается. Лишенные афферентной импульсации синаптические бутоны запустевают, ультраструктура дендроплазмы трансформируется. Поскольку известно, что зрительный вход располагается исключительно на поверхности ВД [3, 10], понятно, что именно эти дендриты оказываются в состоянии практически полной естественной депривации. Логично предположить, что в данных условиях отсутствует необходимость поддерживать в активном состоянии весь дендрит, вследствие чего объемы значительно редуцируются. С другой стороны, структура ЛД также трансформируется, хотя и в меньшей степени. Известно, что на поверхности данных дендритов оканчиваются входы от акустического и вестибулярного анализаторов, причем важно – слуховой вход имеет синапсы на дистальной части ЛД, а вестибулярный на всей поверхности ЛД и сомы [7, 9]. Слуховая информация, как и зрительная, в период зимовки становится также неактуальной, в связи с чем дистальная часть дендритов редуцируется и меняются ультраструктурные характеристики данного отдела ЛД. С другой стороны, поддержание нормального стабильного положения тела рыбы в толще воды важно в любое время года, поэтому избирательно сохраняется функциональная активность вестибулярного анализатора и ультраструктурные характеристики синаптических окончаний и дендроплазмы в проксимальном отделе ЛД трансформируются в значительно меньшей степени (рис. 2).

Это предположение косвенно подтверждается работами нашей лаборатории. В ряде экспериментов было показано, что искусственно вызванная деафферента-

ции МН рыб путем энуклеации, приводит к значительному уменьшению объема их ВД [5], при этом результаты электронно-микроскопического анализа свидетельствуют о перестройке ультраструктуры ВД [3], аналогично данным, полученным в нашем эксперименте. Повреждение рецепторной выстилки внутреннего уха, т.е разрушение статоакустического входа, соответственно приводит к сокращению объемов ЛД [7].

Мы полагаем, что выявленные изменения структуры МН не являются следствием патологических проявлений, но отражают определенную фазу нормальных метаболических процессов в МН при гипометаболизме, они закономерны и физиологически целесообразны. Очевидно, на объем МН главным образом влияет гипометаболизм, а деафферентация нейронов вносит дополнительный вклад в этот процесс.

Пластические изменения в структуре нейронов зимоспящих млекопитающих, находящихся в состоянии гибернации, были обнаружены еще в начале 90-х годов прошлого века. Однако исключительное разнообразие и численность клеточного состава мозга млекопитающих затрудняет получение данных о роли отдельных клеток; исследование структурных перестроек на уровне одного нейрона в процессе проведения нескольких экспериментов невозможно или сильно затруднено. Рыбы для подобных исследований являются более удачной моделью. Использование идентифицированных нейронов Маутнера при изучении сложных механизмов адаптации клеток в процессе гибернации позволяет исследовать структурные изменения не только на отдельном нейроне, но даже в отдельных локусах клетки.

Выводы

В экспериментально созданных условиях зимовки рыб Perccottus glehni с использованием метода трехмерной реконструкции было выявлено существенное изменение объема и ультраструктуры маутнеровских нейронов. Возможно, что в условиях воздействия длительной гипотермии в сочетании с естественной деафферентацией маутнеровских нейронов определяющим фактором пластических перестроек в нейронах является снижение метаболической активности вследствие необходимости экономии энергетических ресурсов животного. В условиях гипометаболизма, а также в результате снижения потоков афферентной информации объем МН уменьшается, поскольку отсутствуют условия и необходимость поддерживать их в полноценном состоянии.

Список литературы

1. Игнатьев Д.А. Функциональное состояние головного мозга зимоспящих и незимоспящих при различных температурах животных / Д.А. Игнатьев, Р.Я. Гордон, И.В. Патрушев, И.В. Попов // Успехи физиол.наук. – 2012. – Т. 43(1). – С. 48-74.

2. Израилова Г.Р., Халилов Р.А. и Адиева А.А. / Современные подходы к исследованию гипотермии. Фундаментальные исследования. – 2014. – № 11(5). – С.1046-1058.

3. Михеева И.Б. Ультраструктура маутиеровских нейронов при оптокинетической стимуляции и энуклеации глаза / И.Б. Михеева, Н.Ю. Цаплина, Е.Е. Григорьева, Р.Ш. Штанчаев, Д.А. Мошков // Морфология. – 2011. – Т. 139. – № 3. – С. 30-35.

4. Carey H.V., Andrews M.T., Martin S.L. /Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. // Physiol. Rev. – V. 83. – P. 1153–1181.

5. Grigorieva E.E. Correlation between the size of individual parts Mauthner neurons in goldfish and their integral function after enucleation of the eye. / E.E. Grigorieva, R.S. Shtanchaev, G.Z. Mikhailova, N.R. Tiras, Moshkov D.A. // Neuroscience and Behavioral Physiology. – 2012. – V. 42. – № 1. – P. 52-57.

6. Mikhailova G.Z. Morphological parameters of Mauthner neurons of goldfishes with modified asymmetry of motor behavior. / G.Z. Mikhailova, N.R. Tiras, V.D. Pavlik, I.M. Santalova, D.A. Moshkov // Neurophysiology. – 2006. – V. 38. – № 1. – P. 15-26.

7. Moshkov D.A. Role of different dendrites in the functional activity of the central neuron controlling goldfish behavior. / D.A. Moshkov, G.Z. Mikhailova, E.E. Grigorieva, R. S. Shtanchaev. // J. Integrative Neuroscience. – 2009. – V. 8. – № 4. – P. 441–451.

8. von der Ohe C.G., Darian-Smith C., Garner C.C. and Heller H.C. Ubiquitous and temperature-dependent neural plasticity in hibernators. / C.G. von der Ohe, C. Darian-Smith, C.C. Garner, H.C. Heller. // J Neurosci. – 2006. – V. 26(41). – P. 10590-8.

9. Szabo T.M., McCormick C.A., Faber D.S. Otolith endorgan input to the Mauthner neuron in the goldfish. // J. Comp. Neurol. – 2007. – V.505. – № 5. – P. 511-525.

10. Zottoli S.J., Hordes, A.R., Faber, D.S. //Localization of optic tectal input to the ventral dendrite of the goldfish Mauthner cell. J. Brain res. – 1987. – V.401. – № l. – P. 113-121.