

ТРЕХМЕРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СИНАПСОВ И АСТРОГЛИИ В ГИППОКАМПЕ КРЫС И СУСЛИКОВ: НОВЫЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАДИГМЫ РАБОТЫ СИНАПСА

© 2003 г. В.И. Попов, Н.И. Медведев*, В.В. Рогачевский, Д.А. Игнатьев,
М.Г. Стюарт**, Е.Е. Фесенко

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области;

E-mail: popvi@mail.ru

**Филиал института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, 142290,*

Пущино Московской области;

***The Open University, Milton Keynes, MK7 6AA, UK*

E-mail: M. G. Stewart@open.ac.uk

Поступила в редакцию 09.10.02 г.

Обобщены литературные и собственные данные по синаптической пластичности и перестройке синаптических органелл в центральной нервной системе. Обсуждаются современные методы лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и серийных ультратонких срезов в исследованиях *in vivo* и *in vitro* дендритных шипиков, включая связь между морфологическими изменениями и эффективностью синаптической передачи, в частности, при использовании модели длительной потенциации. Проанализированы различные категории дендритных шипиков и постсинаптических уплотнений, а также роль филоподий в генезисе шипиков. Показано, что метод серийных ультратонких срезов является наиболее эффективным для непредвзятого количественного стереологического анализа и трехмерных реконструкций. С использованием усовершенствованного метода ультратонких серийных срезов и компьютерной программы трехмерных реконструкций продемонстрированы гигантские митохондрии в дендритах нейронов в различных областях гиппокампа. Показано, что гладкий эндоплазматический ретикулум образует непрерывный континуум с наружной мембраной оболочки митохондрий. Предполагается, что такой континуум обеспечивает туннелирование ионов кальция, способствуя работе внутриклеточной системы сигнальной трансдукции в процессе синаптической передачи. Приведены данные, свидетельствующие о наличии щелевых контактов («электрических синапсов») в синапсах мозга млекопитающих, а также между глиальными отростками и глиальными клетками и нейронами. С использованием собственных и литературных данных показано, что отростки глиальных клеток формируют глиальную сеть, которая модулирует работу нейрональной сети. Связь дендритных шипиков с глиальной сетью показана на примере трехмерных реконструкций нейропилейных объемов в поле СА1 гиппокампов сусликов в трех функциональных состояниях: в нормотермии; спустя 2,5 ч после начала пробуждения от спячки; и в состоянии холодового оцепенения при температуре мозга ниже 6°C. Обсуждаются собственные данные по образованию более чем пяти синапсов как на грибовидных шипиках нейронов поля СА1, так и на колючих шишках нейронов поля СА3. Представленный анализ данных свидетельствует о новых парадигмах как в организации, так и в функционировании синапсов.

Ключевые слова: гиппокамп; нейрон; глиальная клетка; синапс; щелевой контакт; дендритный шипик; постсинаптическое уплотнение; серийные ультратонкие срезы; трехмерные реконструкции.

Два года назад профессором О.С. Виноградовой был опубликован обзор [1], посвященный состоянию нейронауки на стыке двух тысяче-

летий и смене парадигм по взаимоотношениям как между нейронами, так и между нейронами и глиальными клетками. Нам представлялось

Сокращения: ПСУ - постсинаптические уплотнения, ДП - долговременная потенция, шЭР - шероховатый эндоплазматический ретикулум, гЭР - гладкий эндоплазматический ретикулум, ГАМК - γ-аминомасляная кислота.

необходимым дополнить эту информацию последними данными о синапсах, обеспечивающих работу мозга млекопитающих, и о роли глиальных клеток в этих процессах, что и явилось целью настоящего сообщения.

В связи с развитием компьютерных технологий и легким доступом в Internet в настоящее время практически сложилась новая наука - информатика. Достижения в области информатики совместно с достижениями в биологии позволили сформировать новое направление в естествознании - биоинформатику и, в частности, нейроинформатику. Основные два компонента нервной системы - нейроны и глия - взаимодействуют посредством синаптических и других механизмов, входящих в систему контроля поведения, памяти и забывания, включая и процессы мышления. В этой связи нейроинформатика представляет собой ряд современных информационных технологий для исследования различных уровней работы нервной системы, включающих комплекс компьютерных программ для проведения количественного стереологического анализа синаптических структур и их реконструкции. К сожалению, результаты количественного анализа и моделирования различных субклеточных структур на основе одиночных срезов приводят к недоразумениям, поскольку дают слишком большую ошибку [2]. В работах [1-14] подробно обосновывается значение как непредвзятого количественного стереологического анализа, так и необходимость реализации трехмерных реконструкций. В последние годы на базе IBM PC разработаны относительно простые и всем доступные программы для проведения трехмерных реконструкций, позволяющие не только создавать объёмные модели, но и оценивать их количественные параметры, например площадь поверхности и объем [4-5].

Традиционно проблемы обучения, памяти и забывания связывают с нейрональной пластичностью, в основе которой лежат изменения в синапсах. Термин «синапсы» (греч. *synapsis* - соединение) был введен М.А. Foster и С.С. Sherrington [15] и означал «связи» между нейронами. Согласно [16-17] пластичность условно может быть разделена на две категории: 1) изменение в уже существующих синапсах без изменения нейрональных связей [18] и 2) изменение собственно межнейрональных связей за счет как образования *de novo*, так и исчезновения синапсов [19]. В конце 40-х годов D.O. Hebb ввел понятие «*химический синапс*», представляющий собой область контакта дендрита с пресинаптической частью или «*пресинаптиче-*

ским бутон» аксона, содержащим везикулы с нейротрансмиттером, выделение которого в синаптическую щель активирует постсинапс или шипик. Дендритные шипики были открыты более 100 лет назад [18-19]. За прошедшее столетие с использованием различных методов световой и электронной микроскопии по дендритным шипикам было получено огромное число данных, однако до сих пор многие аспекты организации, генезиса и непосредственно функционирования шипиков остаются неясными. В отечественной литературе в последнее время таким исследованиям уделяется мало внимания, поэтому нам представлялось важным заполнить этот пробел с использованием литературных и собственных данных.

Гиппокамп, наиболее удобная структура мозга для изучения шипиков, представляет собой «старую кору», в которой организация межнейрональных связей и работа синапсов принципиально мало отличаются от таковых в «новой коре». Как показывают электрофизиологические и биохимические исследования это наиболее изученная структура мозга, все области которой легко идентифицируются на морфологическом уровне. Переживающие срезы/слайсы гиппокампа являются распространенной моделью в нейробиологических исследованиях. Гиппокамп можно быстро и легко изолировать из мозга с последующим использованием идентифицированных областей как для органотипических культур [20], так и культур изолированных нейронов [21].

В центральной нервной системе обычно выделяют три типа дендритов: 1) дендриты, покрытые шипиками (*spiny dendrites*); 2) дендриты, редко покрытые шипиками (*sparse spiny dendrites*); 3) дендриты без шипиков или гладкие дендриты (*nospiny dendrites*) [22]. Типы 1 и 2 методом световой микроскопии часто трудно различить как из-за малого размера шипиков, так и из-за большой вариабельности их числа в различных участках протяженных дендритов.

В последние годы изучению дендритных шипиков посвящается все большее число работ [8,11,23-31], например, в 2000 г. весь номер журнала *Hippocampus* (V.10, № 5) был посвящен обзорам по исследованию дендритных шипиков в гиппокампе.

Во многих исследованиях для анализа дендритных шипиков по-прежнему применяется способ серебрения или хромирования нейронов по методу Гольджи и его модификациям [26]. В конце 70-х годов A. Peters и I.R. Kaiserman-Abramof [32], обобщив свето- и электронно-

микроскопические данные, предложили относительно простую классификацию шипиков, выделив три основные категории: 1) тонкие шипики (thin spines), длина которых превышает их диаметр; 2) грибовидные шипики (mushroom spines), имеющие длинную или короткую «ножку» с большой головкой; 3) пеньковые шипики (stubby spines), длина и диаметр которых практически совпадают. Во многих исследованиях согласно этой классификации выделяют четыре категории синапсов: 1) тонкие; 2) грибовидные; 3) пеньковые и 4) стволовые синапсы (shaft synapses), когда пресинаптический бутон контактирует непосредственно с дендритным стволом. Позднее была предложена еще одна категория, так называемые разветвленные шипики (branched spines), - два тонких шипика, сидящие на одной ножке [33]. Иногда используется и более простая классификация [34], выделяющая только две категории: 1) шипики без ножки (sessile spines), соответствующие пеньковым шипикам и 2) шипики, сидящие на ножке (pedunculated spines), которые соответствуют тонким и грибовидным шипикам. Часто используются такие термины, как «аксо-дендритные» синапсы (соответствуют стволовым синапсам) и «аксо-шипиковые». Это связано с тем, что в ЦНС существуют нейроны, дендриты которых образуют уникальные шипики, например, дендриты пирамидных нейронов в СА3/СА4 и частично в СА2 полях гиппокампа наряду с обычными категориями шипиков образуют так называемые «колючие шишки» (thorny excrescences) или просто «шишки» (thorns). Согласно данным [3] около 90% дендритных шипиков в проксимальной области апикальных дендритов пирамидных нейронов в поле СА3 гиппокампа крыс относятся к категории «колючие шишки». Как показали проведенные нами трехмерные реконструкции подобных шипиков в поле СА3/СА4 гиппокампа сусликов, эти «колючие шишки» представляют собой короткие ветви апикального дендрита, с расположенными на них обычными шипиками. В пользу того, что это ветви апикального дендрита свидетельствует присутствие в них митохондрий, всегда отсутствующих в шипиках нейронов из других областей гиппокампа млекопитающих. Благодаря такой организации происходит локализация в ограниченном объеме большого числа шипиков, одновременно контактирующих с несколькими, например пятью, пресинаптическими бутонами, образованными разными мшистыми волокнами, идущими от нейронов зубчатой фассии (собственные наблюдения с использованием трехмерных реконструкций «колючих шишек»

на основе серийных срезов [35]). Такая специфическая организация синапсов в полях СА3/СА4 согласуется с представлением [36] о том, что именно эти поля обеспечивают гиппокамп компараторные свойства, с возможностью переработки информации и на уровне маленькой части дендрита.

Следует отметить, что в мозжечке также существуют маленькие нейроны, на дендритах которых образуются так называемые «коралловые шишки» (coralline excrescences), представляющие собой шипики в виде многочисленных и часто длинных выростов [37]. На дендритах клеток Пуркинье мозжечка существует относительно гомогенная по форме популяция шипиков, которые можно условно отнести к категории грибовидных [38].

На поверхности шипиков часто выявляются тонкие выросты постсинаптической мембраны, так называемые «иглопочки» (spinules), глубоко проникающие внутрь пресинаптического бутона. Собственные и литературные данные [39] свидетельствуют о том, что подобные «иглопочки» могут присутствовать как в области постсинаптических уплотнений (ПСУ), так и по периферии головок шипиков. Возможная функция «иглочек» обычно обсуждается с позиции их вклада в эффективность синаптической передачи за счет увеличения площади контакта между пре- и постсинаптической мембранами, в частности, при образовании новых шипиков [40], однако пока не приведено экспериментальных фактов, подтверждающих эту роль «иглочек» в синаптической передаче [39]. Отметим, что в состоянии холодового оцепенения суслика, когда электрическая активность мозга практически не регистрируется, «иглопочки», проникающие внутрь пресинаптического бутона, можно встретить даже на поверхности дендритного ствола [35].

Особым образованием являются филоподии (filopodia), которые представляют собой заполненные актиновыми микрофиламентами тонкие до 10 мкм длиной выросты дендритной мембраны [41]. Филоподии играют важную роль в образовании новых шипиков [41-44]. Показано [43], что в поле СА1 гиппокампа крыс *in vivo* филоподии образуются на поверхности дендритов в первые две недели постнатального периода и обеспечивают поиск пресинаптических бутонов с образованием новых ПСУ с последующим переходом филоподии в «прото-шипик» с формированием конечного итоге новых тонких шипиков. В исследованиях [41,43,45,46] предполагается, что в росте и рет-

рации (втягивании) филоподий при их переходе в шипики активное участие принимает цитоскелет, основным компонентом которого является актин. Как показал детальный электронно-микроскопический анализ филоподий в постнатальном развитии синапсов поля CA1 гиппокампа крысы [43], в первые две недели после рождения филоподий являются промежуточным звеном в формировании новых дендритных шипиков. В этой связи основная парадигма нейробиологии - активный поиск аксоном (эфферентными волокнами) «мишени» - дополняется новым положением, а именно тем, что дендриты также способны «искать» аксоны. Известны уникальные случаи присутствия у мутантных линий мышей шипиков с ПСУ на дендритах клеток Пуркинью мозжечка при отсутствии гранулярных клеток, которые в норме образуют пресинаптические бутоны [47,48]. Отметим также, что по данным [49] введение в желудочки мозга субстанции Р не влияло на дендритные шипики клеток Пуркинью, которые содержали ПСУ в отсутствие контактов с пресинаптическими бутонами параллельных волокон гранулярных клеток. Филоподий обычно редко видны на дендритах зрелых нейронов в нормальном мозге, однако в органотипических культурах и культурах изолированных нейронов они легко идентифицируются методами электронной и конфокальной микроскопии [27,28,31,50-56]. Удивительно, что имеются данные, свидетельствующие и о способности аксона образовывать структуры, подобные дендритным шипикам [57].

Основная парадигма в исследованиях механизмов памяти связана с феноменом долговременной потенциации (ДП) (long-term potentiation), открытой в конце 60-х годов прошлого столетия Bliss и Lomo [58] для нейронов зубчатой фасции гиппокампа кролика *in vivo*. Модель ДП интересна с позиции сохранения информации: 1) после электрической кратковременной тетанической стимуляции аксонов перфорирующего пути возросшая эффективность синаптической передачи в синапсах гранулярных клеток сохраняется в течение нескольких суток; 2) ДП требует одновременно как пресинаптической активации, так и достаточного уровня постсинаптической деполяризации; 3) поздние этапы ДП проявляются и через несколько часов, индуцируя белковый синтез и, возможно, требуют транскрипции новых генных продуктов [30,59]. Пока не ясны клеточные и молекулярные механизмы, обеспечивающие ДП. В настоящее время рассматриваются три основные возможности образования ДП: 1) из-

менения в состоянии уже существующих молекул в синапсе, например изменения в состоянии фосфорилирования синаптических белков, однако в этом случае непонятно, как посттрансляционные модификации синаптических белков сохраняются в течение многих часов и суток;

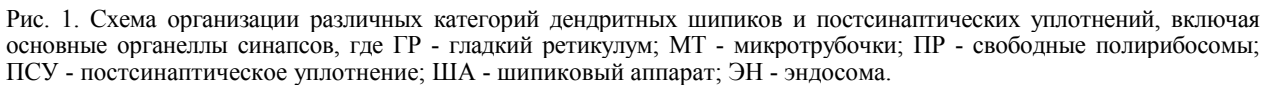
2) при образовании ДП могут происходить изменения молекулярного состава уже существующих синапсов, например, имеются данные о том, что некоторые рецепторы включаются в образование ДП [60], тогда как при образовании длительной депрессии они отсутствуют;

3) образование ДП может быть обусловлено изменениями в морфологии синапсов, например, за счет изменений размеров и формы дендритных шипиков или за счет втягивания или образования новых дендритных шипиков.

В образовании ДП большая роль отводится такому нейротрансмиттеру, как глутамат. Глутаматные рецепторы обычно разделяют на две основные группы: 1) метаботропные рецепторы, которые сопряжены через ГТФ-связывающие белки с внутриклеточной системой трансдукции сигнала; 2) ионотропные рецепторы, представляющие лиганд-управляемые катионные каналы, которые согласно их основным агонистам М-метил-В-аспартату, аминокислоты-3-гидрокси-5-метил-4-изоазолу и каинату разделены соответственно на: NMDA; AMPA и каинатные рецепторы. Между глутаматными рецепторами существует сложная кооперация [60].

Отметим, что любые модификации или образование новых синапсов прямо связаны как с белками постсинаптических уплотнений [25,61-63], так и с рецепторами и каналами, обеспечивающими синаптическую передачу и требующими постоянного обновления; важную роль при этом играет толщина ножки шипика [64] (см. рис. 1-2). Можно выделить три основных пути, по которым возможно обновление ключевых белков: 1) синтез на мРНК, локализованной вблизи синапса [30,59]; 2) синтез в соме нейронов и относительно равномерное распределение по всем дендритам с попаданием в синапсы с помощью специальных механизмов захвата [65]; 3) синтез в соме нейронов и включение в специализированные органеллы - эндосомы, которые селективно транспортируются к синапсам [66].

Все эти пути не исключают друг друга и требуют специальных транспортных систем. Для клеток позвоночных широко известны две такие системы: 1) движение вдоль актиновых микрофиламентов/Ф-актина моторных белков, например динактина, и 2) движение вдоль ту-



рофиламенты). Однако роль нейрофиламентов в нейрональном транспорте все еще мало изучена.

Следующий аспект обволакивания синапсов связан с организацией белок-синтезирующих систем в нейроне. Существуют два типа полирибосом, где происходит синтез белков: 1) свободные полирибосомы/свободные полисомы и 2) полирибосомы, связанные с мембранами эндоплазматического ретикулума с образованием такой органеллы, как шероховатый эндоплазматический ретикулум (шЭР). Пока нет точной информации о том, какие белки синтезируются на свободных полисомах, предполагается только, что это водорастворимые цитоскелетные белки, не требующие «созревания» в аппарате Гольджи. Основное внимание в последние годы сконцентрировано на шЭР, на котором происходит синтез «мембранных» белков (например, субъединиц рецепторов, каналов и т.д.), которые в конечном итоге представляют интегральные белки клеточной мембраны нейрона. Большой прогресс в понимании роли полисом на шЭР в синтезе мембранных белков был достигнут с разработкой новой методики в лаборатории J. Lippincott-Schwartz [68-69]: на при-

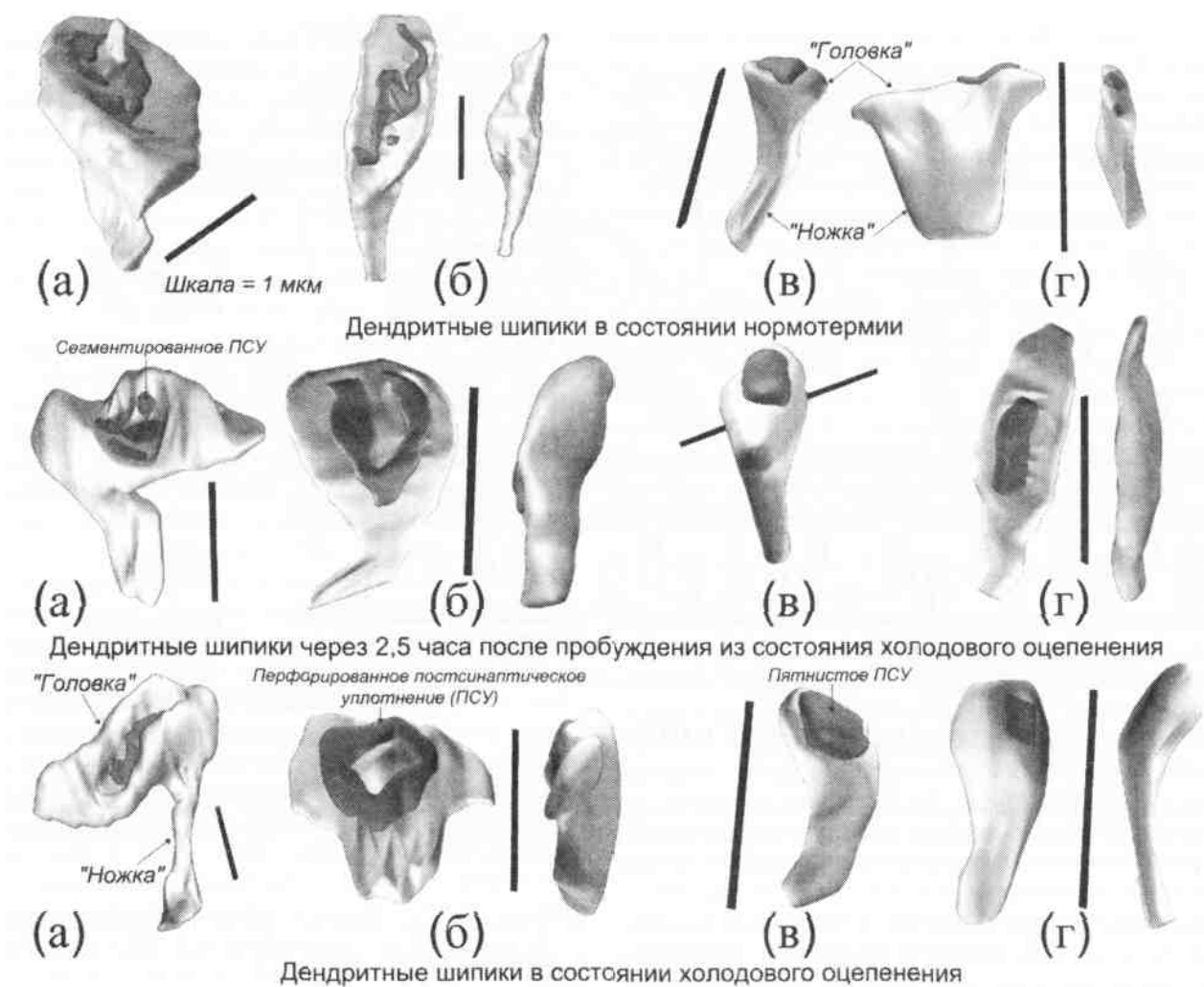


Рис. 2. Трехмерные реконструкции грибовидных и тонких шипиков на дендритах пирамидных нейронов из поля СА1 гиппокампа суслика во время зимней спячки/гибернации. Показаны типичные примеры как «объемных» (а,в), так и «плоских» (б,г) грибовидных и тонких шипиков соответственно. Темным цветом на поверхности шипиков показаны постсинаптические уплотнения. Для всех шипиков шкала = 1 мкм. Температура мозга: 1) в состоянии нормотермии в промежутках между баутами спячки - 36-37°C; 2) спустя 2,5 ч после начала пробуждения из состояния холодного оцепенения - 33-34°C; 3) в состоянии холодного оцепенения - 2-6°C.

мере широко известного гликопротеида ts045, входящего в состав оболочки мутантного штамма ts045 вируса везикулярного стоматита, в клетках линии COS была создана генетическая конструкция, позволяющая прикрепить белок зеленой флуоресценции (GFP-green fluorescence protein) к цитоплазматическому хвосту гликопротеида и с помощью конфокальной микроскопии проследить место синтеза и пути транспорта вновь синтезированного мембранного белка в живой клетке. Результаты этих исследований прямо согласуются с идеей так называемого «везикулярного транспорта белков» [70-71], согласно которой «мембранные» белки синтезируются на шЭР, включаясь в его мембрану, после чего этот домен мембраны шЭР отпочковывается в виде «окаймленной везику-

лы» (coated vesicle) и транспортируется к *цис*-компарменту аппарата Гольджи по микротрубочкам, например, с помощью «минус-конец»-направленного динеин/динактин моторного комплекса. После «созревания» в аппарате Гольджи «мембранный» белок выходит из *транс*-компармента аппарата Гольджи в составе также «окаймленной везикулы» и транспортируется с помощью динеин/динактинового комплекса по микротрубочке к плазматической мембране [70]. Вероятно, этот механизм универсален для всех типов клеток млекопитающих, в которых идет синтез «мембранных» белков. Динактин является одним из основных компонентов синапсов [72]. Для нейронов основная проблема заключается в том, что синапсы располагаются на относительно больших

расстояниях от сомы, где расположен белок-синтезирующий аппарат, включающий следующие органеллы: ядро-ядрышко-полирибосомы-эндоплазматический ретикулум-аппарат Гольджи [73-78]. Теоретически транспорт «мембранных» белков может осуществляться за счет латеральной диффузии вдоль непрерывной клеточной мембраны из сомы в различные мембранные компартменты аксонов и дендритов, но пока не приведено доказательств такого пути обновления белков синапсов.

Хорошо известно, что полирибосомы локализируются как в дендроплазме, так и в шипиках [8,12,13,23-24,29,30,33,59,65,66,77]. В последнее время широко обсуждаются два возможных варианта обновления и рециклинга «мембранных» белков синапсов. Согласно [30,59], синтез, по крайней мере, цитоскелетных белков постсинаптических уплотнений локализован непосредственно на полисомах в дендритных шипиках. В нейронах существует механизм, в соответствии с которым вновь синтезируемые мРНК направлены «двигаются» к активным синапсам, где обеспечивают локальный синтез синаптических белков на уже существующих полирибосомах. Рассматривается роль «раннего» гена Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein), который регулирует подобно другим «ранним» генам активность нейронов [30,59]. Экспрессия Arc-гена, доставка мРНК в дендриты и синтез белков происходят в течение нескольких часов после тетанической стимуляции, что практически совпадает со временем синтеза как синаптических белков, так и синаптической модификацией, главным образом, белков ПСУ. Эти данные хорошо согласуются с возможностью синтеза на свободных полирибосомах цитозоль-растворимых белков ПСУ, которые не требуют шЭР, последующего их «созревания» и выхода из *транс*-компартамента аппарата Гольджи [54].

Многочасовая ДП требует доставки в область постсинаптической мембраны синапса как интегральных, так и секреторных белков [78]. Электронно-микроскопический анализ организации различных нейронов млекопитающих показал, что гладкий эндоплазматический ретикулум (гЭР) распространяется из сомы и в дендриты, и в шипики [8,12,23,24,66,79,80]. Имеются данные о том, что гЭР образует единую непрерывную сеть [79]. По-видимому, гЭР и шЭР образуют единую непрерывную внутриклеточную сеть, по крайней мере, между сомой и дендритами, что крайне важно для внутриклеточной кальциевой регуляции [81]. В такой непрерывной сети за счет латеральной подвиж-

ности интегральные белки могут локально мигрировать по дендриту в шипики и в конечном итоге прямо контактировать с ПСУ [65].

Вопрос о транспорте вновь синтезируемых в соме интегральных белков из *транс*-компартамента аппарата Гольджи в составе эндосом по дендриту к синапсам остается открытым. В дендроплазме вблизи шипиков часто можно обнаружить шЭР и «окаймленные везикулы», которые также присутствуют и в дендритных шипиках [66], что гипотетически не исключает синтез интегральных белков в дендроплазме с последующим их «созреванием» в шипиковом аппарате как некоем аналоге аппарата Гольджи [82]. Однако пока отсутствуют данные о природе и функции шипикового аппарата, который локализован преимущественно в грибовидных шипиках.

Другая возможность обновления рецепторов, не требующая их синтеза *de novo*, связана с рециклингом. Присутствие «окаймленных» везикул и «омега-подобных» профилей на мембранах дендритов и шипиков обсуждается в последнее время с точки зрения рециклинга постсинаптических рецепторов при активации синапсов [66]. «Омега-подобные» профили свидетельствуют об эндо- и экзоцитозе. Так, известно, что постсинаптический эндо- и экзоцитоз играют важную роль в индукции как ДП, так и длительной депрессии [83-88]: блокирование экзоцитоза препятствует индукции ДП, тогда как блокирование эндоцитоза препятствует образованию длительной депрессии. Согласно имеющимся данным о механизме синаптической пластичности после стимуляции синапсов [84], глутаматные рецепторы могут в течение нескольких минут как включаться, так и выходить из постсинаптической мембраны, что предполагает локализацию вблизи синапсов органелл, являющихся своеобразными хранилищами глутаматных рецепторов. В рециклинге глутаматных рецепторов принимают участие такие органеллы, как эндосомы; гЭР; «окаймленные везикулы»; «омега-подобные» профили; везикулы; трубчатые мембранные компартменты; мультивезикулярные тельца и трубчатые мембранные комплексы, связанные с мультивезикулярными тельцами [66]. Предложена модель взаимосвязи эндосом с рециклингом глутаматных рецепторов [66], согласно которой связи между «окаймленными» везикулами и шипиковым аппаратом отсутствуют, а шипиковый аппарат при этом рассматривается как система мембран гЭР, обеспечивающая кальциевую регуляцию.

В результате исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе ДП, выявлена определенная последовательность событий: 1) вход в шипик ионов кальция активирует ряд белковых киназ; 2) происходящее вслед за этим фосфорилирование синаптических белков активирует каскад процессов в ядре нейрона с включением синтеза новых синаптических белков [78,83,86,89], что в конечном итоге ведет к изменению в форме и плотности дендритных шипиков [27,28]. Ряд исследований свидетельствует о том, что основными компонентами цитоскелета дендритного шипика являются актин и белки ПСУ [25,45,61-63,87,90]. Известно, что в дендритных шипиках нейрофиламенты и тубулиновые микротрубочки отсутствуют [9,45,91]. В работе [92] с использованием высокоскоростной конфокальной микроскопии прямо показана динамика изменений актина с помощью GFP белка в культуре изолированных нейронов. Существенно и то обстоятельство, что интенсивная стимуляция глутаматных рецепторов ведет к разборке филаментозного актина [45]. Подробный анализ организации актинового цитоскелета можно найти в обзорах [25,45,63,87].

Изменения в актиновом цитоскелете прямо связаны с изменениями в белках ПСУ, которые являются единственно надежным критерием идентификации синапсов на электронно-микроскопическом уровне. Существуют два основных типа ПСУ: асимметричные и симметричные; в отличие от асимметричных симметричные ПСУ тоньше. Возле асимметричных ПСУ в пресинаптической части синапса располагаются пресинаптические пузырьки (везикулы) округлой формы, обычно имеющие диаметр около 30-50 нм, а возле симметричных ПСУ располагаются уплощенные по форме (овальные) везикулы. Предполагается [93], что возле асимметричных ПСУ пресинаптические везикулы обычно содержат возбуждающий нейротрансмиттер/медиатор глутамат, тогда как везикулы возле симметричных ПСУ содержат тормозные нейротрансмиттеры: у-аминомасляную кислоту (ГАМК) или глицин, а также нейромодуляторные пептиды. Согласно имеющимся данным, в зрительной области коры мозга кошки 84% синапсов являются асимметричными и только 16% симметричными. Большинство асимметричных ПСУ (около 79%) встречается на дендритных шипиках, а меньшая часть (21%) - непосредственно на дендритных стволах и только около 0,1% найдено на телах нейронов; 62% симметричных ПСУ локализуется на дендритных стволах; 31% - в дендритных шипиках и

только 7% - на телах нейронов. Таким образом, только 7% симметричных ПСУ локализовано на дендритных шипиках, тогда как 93% расположено на сомах нейронов зрительной коры кошки [94].

При анализе трехмерных реконструкций ПСУ на серийных ультратонких срезах обычно выделяют «пятнистые» (macular postsynaptic densities), «перфорированные» (perforated postsynaptic densities) и «сегментированные» ПСУ (segmented postsynaptic densities) [3,8,9,11,13,29,40,43,80,95-99]. Пятнистые ПСУ обычно локализуются на сравнительно маленьких шипиках, имеют округлую форму и в отличие от перфорированных ПСУ не содержат перфораций. Особый случай перфорированных ПСУ представляют сегментированные ПСУ, которые на трехмерных реконструкциях обычно состоят из нескольких уплотнений, среди которых по крайней мере одно является перфорированным.

Рассмотренные выше результаты исследований дендритных шипиков схематично обобщены на рис. 1.

Известно, что некоторые дендритные шипики пирамидных нейронов гиппокампа млекопитающих связаны с пресинаптической частью с помощью десмосом [12,13,38], основной функцией которых в различных типах клеток является, по-видимому, обеспечение механической прочности ткани. Во многих типах тканей, включая мозг, существуют также «электрические синапсы» или щелевые контакты (gap junctions), обеспечивающие прямой межклеточный обмен ионами и соединениями с молекулярной массой до 1000 Да [47,48]. «Электрические синапсы» обнаружены в последнее время не только, например, в ГАМК-ергических синапсах интернейронов [100], но и на дендритных шипиках пирамидных нейронов [101-103]. Согласно данным [101-103], полученным методом замораживания-скалывания-травления, в синапсах мозга млекопитающих обычно каждый щелевой контакт не превышает 100 нм и содержит только несколько коннексонов (каналов). Такой размер щелевых контактов сопоставим с толщиной обычных ультратонких срезов (70-100 нм), что крайне усложняет их выявление. Для идентификации щелевых контактов в зубчатой фасции и поле СА1 гиппокампа крысы нами были использованы более тонкие срезы, толщиной 10-20 нм. Полученные при этом данные указывают на присутствие «электрических синапсов» исключительно на грибовидных шипиках [35].

Известно, что коннексины (белки коннексонов) в щелевых контактах между глиальными клетками иммунологически отличаются от таковых на дендритных шипиках [101-103]. Особая же роль «электрических синапсов» в функционировании нейрональных сетей пока не ясна.

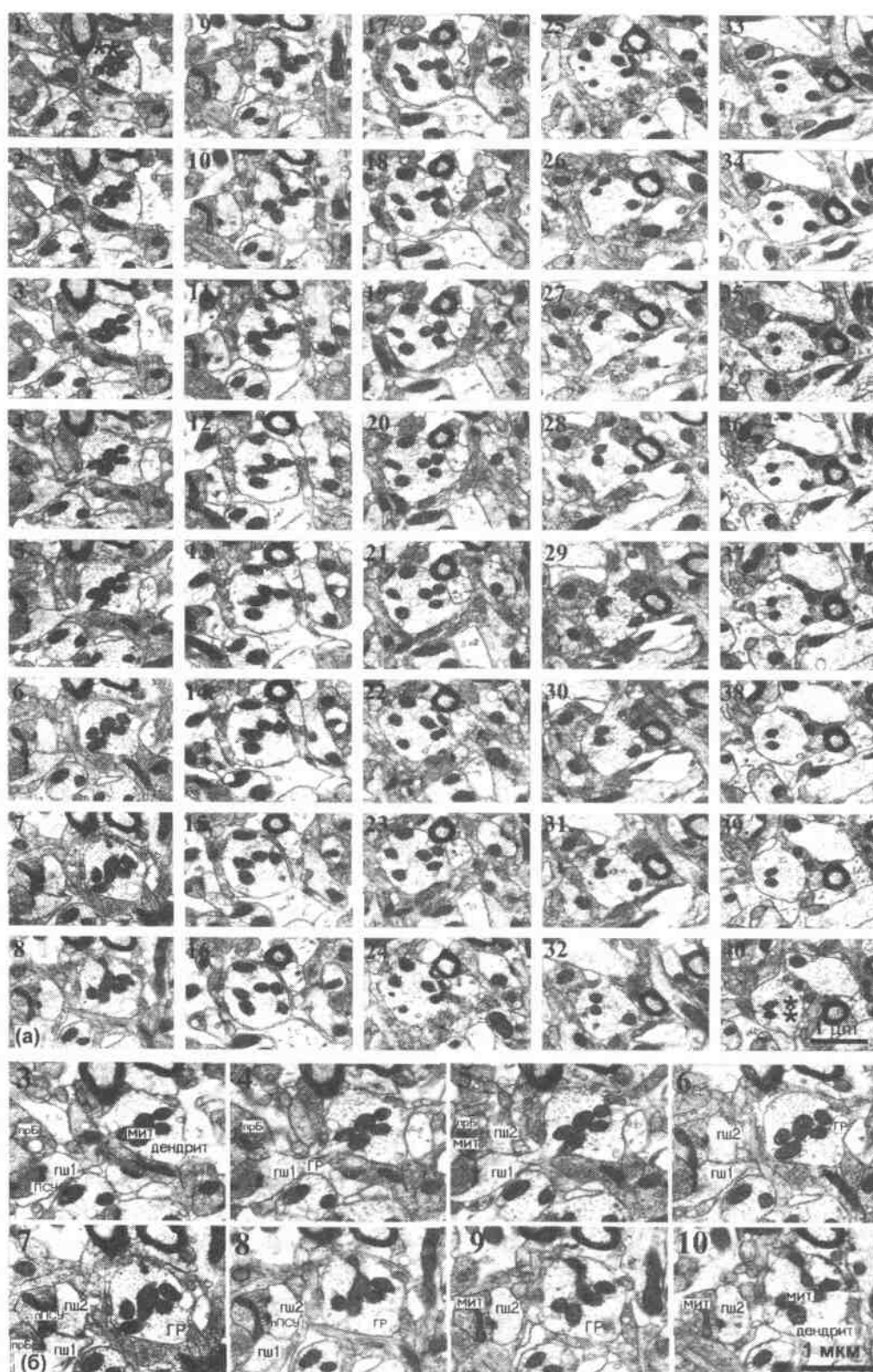
В последние годы разработаны уникальные методы прижизненного анализа дендритных шипиков. Одним из таких методов является локальная суперфузия в пирамидные нейроны поля CA1 в органотипических культурах гиппокампа флуоресцентного красителя кальцеина с последующим получением трехмерных изображений с помощью двухфотонного лазерного сканирующего конфокального микроскопа [51]. Было показано, что индукция ДП, в противоположность её блокировке, вызывает достоверное увеличение числа новых шипиков [51]. Другим методом прижизненного исследования поведения дендритных шипиков является экспрессия в нейронах GFP белка. В работе [54] в качестве вектора, несущего ген GFP, был использован нейротропный рекомбинантный обо-лочечный РНК-овый вирус Синдбис, которым заражали CA1 пирамидные нейроны в органотипической культуре срезов гиппокампа, концентрация вирусов подбиралась из расчета инфицирования от 1 до 10 нейронов на слайс [54]. Было установлено, что инфицированные нейроны сохраняли активность в течение по крайней мере трех дней. При этом использовали гиппокампы крыс на седьмой постнатальный день, так как выживаемость нейронов, полученных от взрослых крыс, была крайне низкой. С использованием двухфотонной сканирующей лазерной конфокальной микроскопии был проведен анализ трехмерной организации дендритных шипиков на глубине от 50 до 200 мкм в гиппокампальных срезах. Обнаружено, что на дендритах филоподии возникали только в тех случаях, когда стимулирующий электрод располагался на расстоянии около 30 мкм от исследуемой зоны дендритов. Присутствие на этих структурах «головок» авторы трактовали в пользу образования новых зрелых дендритных шипиков в ответ на посттетаническую стимуляцию и активацию ионотропных NMDA-рецепторов. Эти результаты прямо коррелируют с данными [51] по суперфузии нейронов с помощью флуоресцентных красителей.

Наряду с таким бесспорным достоинством, как возможность прижизненного исследования субклеточных структур, существенным недостатком любого метода световой микроскопии является сравнительно низкая разрешающая

способность, которая теоретически не может быть больше половины длины волны используемого света в видимой области. Даже в лучшем случае, при использовании специальных компьютерных программ в двухфотонной лазерной конфокальной микроскопии разрешение не может превышать 300-400 нм. В электронном же микроскопии при использовании метода ультратонких срезов разрешение обычно лучше 2-3 нм. Возможные артефакты при химической фиксации образцов мозга могут быть устранены при совместном использовании криофиксации и криоультратомии быстро замороженной нервной ткани.

На рис. 2 приведены полученные нами данные об ультраструктуре грибовидных (рис. 2а,б) и тонких (рис. 2в,г) шипиков на примере трехмерных реконструкций дендритов пирамидных нейронов в поле CA1 гиппокампа сусликов в трех функциональных состояниях: 1) нормотермии (активные зимние суслики, температура мозга: $t^{\circ}_m = 35-36^{\circ}\text{C}$); 2) через 2,5 ч после начала пробуждения от зимней спячки (по достижении $t^{\circ}_m = 32-34^{\circ}\text{C}$) и 3) в состоянии глубокого оцепенения ($t^{\circ}_m = 1-6^{\circ}\text{C}$). Ранее было показано, что переход суслика из состояния нормотермии в состояние холодного оцепенения сопровождается ретракцией дендритных шипиков пирамидных нейронов поля CA3 [76,78,104-106]. Через 2,5 ч после начала пробуждения происходит восстановление шипиков. Эти результаты впервые продемонстрировали скорость процессов изменения *in vivo* [76,104-106]. Зимняя спячка сусликов не является непрерывным процессом, а представляет собой последовательность циклов (баутов), продолжительностью от одной до трех-четырех недель, с относительно кратковременными, до суток, периодическими пробуждениями. Бауты в экспериментальных условиях достаточно просто контролируются [106].

У зимоспящих животных биоэлектрическая активность, например, неокортекса, подавлена уже при t°_m ниже 20°C ; в структуре же лимбического комплекса и в глубокой спячке при t°_m ниже 7°C регистрируется регулярная активность. Гиппокамп, ключевая структура лимбического комплекса, играет особую роль в процессах гибернации, являясь своеобразным «сторожевым пунктом» контроля ЦНС за ходом протекания спячки. Взаимное торможение гиппокампа и ретикулярной активирующей системы функционирует по принципу положитель-



ной обратной связи, ускоряя впадение в спячку и выход из этого состояния. (Штарк, 1973; Heller, 1979; Beckman et al., 1982; цит. по [104-106]).

Процесс погружения животных в зимнюю спячку позволяет проследить *in vivo* два альтернативных функциональных состояния нервной ткани: 1) при нормотермии, когда функ-

Рис. 3. Структура дендрита и митохондрий на поперечных серийных ультратонких срезах (толщиной 70 нм) на примере поля CA1 гиппокампа суслика через 2,5 ч после начала пробуждения из состояния холодового оцепенения. Детально метод описан в [34,88]; (а) - серия, состоящая из 40 срезов. Цифры - номера последовательных срезов. На первом *срезе* видно пять поперечных митохондриальных профилей (звездочки), в то время как на 40-м срезе выявляются только два поперечных митохондриальных профиля на поперечном разрезе дендрита (звездочки); (б) - показана организация двух грибовидных шипиков и синаптических органелл на восьми поперечных срезах дендрита, где ГР - гладкий ретикулум; гш1 и гш2 - грибовидные шипики 1 и 2 соответственно; мнт - митохондриальная проекция; пПСУ - перфорированное постсинаптическое уплотнение; прБ - пресинаптический бутон с везикулами; цифры - номера срезов, соответствующие срезам на рис. 3а. Шкала = 1 мкм.

ционирование нервной системы сусликов мало отличается от таковой у обычных теплокровных, например у крыс, и 2) при холодовом оцепенении, когда t_m^o животных может снижаться до 1-6°C, что связано с практически полным подавлением синаптической активности [76,104-106]. Суслик, извлеченный из гнезда, в состоянии холодового оцепенения при комнатной температуре пробуждается, и в этот период появляется возможность получения полного набора состояний активации синапсов в процессе разогрева мозга [73,76,104-106]. В состоянии холодового оцепенения происходит переход ядрышка в неактивное состояние; распад свободных и мембранно-связанных полирибосом до моносом; разборка аппарата Гольджи и ретракция дендритных шипиков. И уже через 2,5 ч после начала пробуждения происходит восстановление белоксинтезирующего аппарата и дендритных шипиков [73,76,104-106]. В отличие от эстрогенрегулируемой ретракции дендритных шипиков в эструсе у крыс [107-109] обратимая ретракция шипиков у сусликов связана с другими, пока неизвестными механизмами. Удивительная особенность зимоспящих - большой размах колебаний функционирования систем жизнедеятельности организма - позволяет использовать этих животных в качестве уникальной модели для изучения пластичности, например, ЦНС, в частности процессов обучения и памяти [ПО]. Мы надеемся, что со временем это направление исследований получит должное развитие.

На рис. 2 приведены типичные примеры грибовидных (рис. 2а) и тонких (рис. 2в) дендритных шипиков в поле CA1 гиппокампа суслика. Как правило, грибовидные шипики имеют «ножку» и «головку», на которой располага-

ются перфорированные и сегментированные ПСУ. В частности, как это видно на рис. 2б, у гибернирующих сусликов в центре перфорированного ПСУ расположена «иголочка». Наряду с «объемными» можно выявить и «плоские» грибовидные шипики во всех функциональных состояниях суслика (рис. 2б). Аналогичная ситуация и для тонких шипиков, когда наряду с объемными (рис. 2в) имеются также плоские шипики (рис. 2г), причем на тонких шипиках мы наблюдали только пятнистые ПСУ. В литературных источниках пока нет данных о наличии плоских грибовидных и тонких дендритных шипиков в гиппокампе крысы. Проведенные нами исследования *in vivo* дендритных шипиков в различных функциональных состояниях гиппокампа суслика (гибернация) и крысы (ДП) свидетельствуют о том, что обратимая ретракция шипиков характерна только для популяций тонких, пеньковых и стволовых синапсов, содержащих исключительно асимметричные ПСУ [35].

Результаты, представленные на рис. 2, наглядно демонстрируют преимущества трехмерных реконструкций на основе серийных ультратонких срезов для выяснения тонкой морфологии шипиков по сравнению с методами световой микроскопии. Необходимо отметить, что пока неясно, какую роль играют в синаптической передаче как синапсы каждой из четырех категорий, так и изменения в их морфологии [27-28]. В равной мере этот вопрос относится и к ПСУ. Последние в силу их малых размеров практически нельзя исследовать методами световой микроскопии. Кроме того, наряду с чисто техническими проблемами, в исследованиях с применением одно- и двухфотонной сканирующей лазерной микроскопии при использовании как переживающих, так и культивируемых слайсов анализ дендритных шипиков обычно проводится только в поверхностном слое гиппокампа на глубине 25-75 мкм, который находится вблизи зоны повреждения при их приготовлении [31]. Следовательно, нейроны, на дендритах которых анализируются шипики, подвержены неспецифическим воздействиям, например, нейротрансмиттеров и различных ферментов, высвобождающихся из разрушенных клеток при приготовлении слайсов. Не менее сложна ситуация с культивируемыми нейронами: во-первых, для получения культуры нейронов используются новорожденные животные, когда синаптогенез еще не закончен [43]; во-вторых, при изоляции клеток из интактной ткани нейроны теряют аксоны и дендриты, и такие клетки в культуральной среде имеют ок-

руглую форму. Хотя в течение первой недели культивирования формируются синапсы между соседними нейронами, но при этом крайне сложно бывает определить происхождение исследуемого нейрона [21]. Как в органотипических культурах гиппокампа, так и в культуре изолированных нейронов практически постоянно идет *de novo* синаптогенез и образование филоподий, длина которых может достигать 10 мкм [41,42,44,50]. Имеются данные о том, что в обычно используемых переживающих срезах гиппокампа также идет синаптогенез [8,9,27-29,31,98,99]. Как показал сравнительный анализ дендритных шипиков культивируемых нейронов и интактного гиппокампа, *in vitro* примерно половина возбуждающих синапсов располагалась на дендритах, тогда как *in vivo* основная часть их была локализована на шипиках [111]. Кроме того, оказалось, что на пятый день культивирования объем шипиков значительно превышал соответствующий *in vivo* параметр на пятый постнатальный день. Таким образом, трудно соотнести полученные *in vitro* данные по изменению синапсов с тем, что происходит *in vivo*.

Наглядным примером использования серийных срезов для анализа нейрональных субструктур могут служить трехмерные реконструкции митохондрий в аксонах и дендритах. Митохондрии представляют в этом плане особый интерес, поскольку играют ключевую роль в путях сигнализации апоптоза и поддержания кальциевого гомеостаза в нейрональных клетках [8,23,53,55,56,79,81,112-115]. Вопрос о наличии в клетках одной или нескольких митохондрий всё еще актуален [113]. Предполагается возможность существования гигантской митохондрии, внутренняя мембрана которой могла бы служить «электрическим кабелем», обеспечивающим «перенос энергии» в различные компартменты клетки [116]. Не менее важной ролью такой гигантской митохондрии могло бы быть «туннелирование ионов кальция» в пределах клетки [81,112,113]. Известно, что в пресинаптических бутонах аксонов содержатся небольшие по размерам митохондрии. В некоторых пресинапсах они даже могут отсутствовать [80]. Наши исследования подтверждают данные, согласно которым обычная длина митохондрий не превышает 2-3 мкм [113]. В отдельных случаях можно обнаружить и митохондрии длиной до 4-5 мкм.

Организация митохондрий в дендритах менее изучена. С помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа и специфических флуоресцентных красителей были прове-

дены трехмерные реконструкции митохондрий в культурах нервных клеток [113]. Было показано, что как нейроны, так и другие типы клеток содержат гетерогенные популяции многочисленных митохондрий, максимальная длина которых не превышает 5 мкм [113]. В наших исследованиях трехмерной организации митохондрий в дендритах различных нейронов гиппокампа суслика и крысы с использованием серийных ультратонких срезов (более 100 срезов на серию) были получены совершенно другие результаты. Основным выводом является присутствие во всех апикальных дендритах пирамидных нейронов полей CA3, CA1 и зубчатой фации гиппокампа гигантских разветвленных митохондрий длиной не менее 20-25 мкм. На рис. 3-4 приведен пример использования серийных срезов для трехмерных реконструкций митохондрий. На рис. 3а представлены 40 серийных фотографий поперечно разрезанного дендрита нейрона поля CA1 гиппокампа суслика. На первом срезе видны пять поперечных профилей митохондрий (звездочки), тогда как на сороковом изображении видно уже только два профиля митохондрий (звездочки). В конечном итоге, как показал анализ, все эти профили относятся к одной гигантской митохондрии (см. рис. 4). На рис. 3б показаны некоторые детали организации дендритных шипиков. Видно, что митохондрии не проникают даже в самые крупные грибовидные шипики.

Выравнивание электронно-микроскопических изображений, снятых с одной и той же области дендрита на разных срезах, было проведено с использованием компьютерной программы «Alignment». Для генерации трехмерных изображений в *wrl/vrml* формате строились контуры каждой структуры, и в программе «Trace» [35-36] (<http://synapse.bu.edu>) для них были созданы собственные файлы, которые далее трансформировались в *raw* формат и в коммерческой программе «3D View Actify» собирались в общую модель, пример которой приведен на рис. 4. Таким образом, представленные на рис. 4 трехмерные реконструкции дендритного сегмента с шипиками и сложной митохондрии хорошо иллюстрируют возможности серийных срезов. Существенно, что детали, которые видны на этих реконструкциях, не могут быть получены методами световой микроскопии. Кроме того, эти результаты показывают, что при подсчете числа митохондрий на данную конкретную проекцию одиночного среза число митохондриальных профилей может варьировать от двух (рис. 3а, изображения 38-40) до шести (рис. 3а, изображения 16-23),

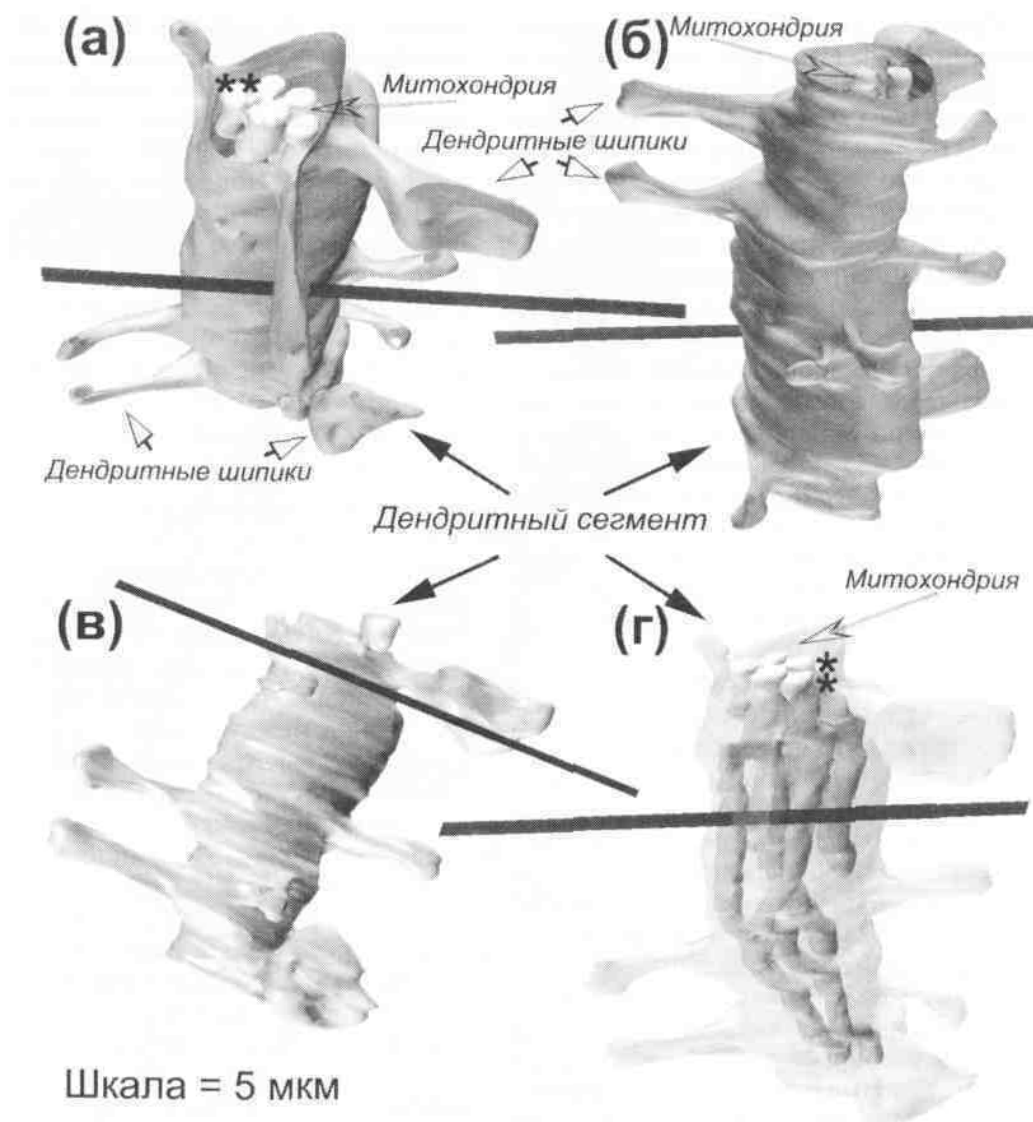


Рис. 4. Трехмерная реконструкция дендритного сегмента нейрона из поля CA1 гиппокампа суслика на основании 40 серийных срезов, представленных на рис. 3а. Показаны пять (а) и два (б) митохондриальных профиля внутри дендрита, что соответствует изображениям 1 и 40 на рис. 3а соответственно.

тогда как в данном сегменте дендрита локализована только одна митохондрия. Проведенные нами исследования более 100 проксимальных и дистальных дендритных сегментов в сериях, содержащих от 70 до 130 серийных срезов, в целом подтверждают возможность существования гигантских митохондрий во всех типах дендритов гиппокампа. В аксонах и их пресинаптических бутонах присутствует множество мелких митохондрий, максимальная длина которых не превышает 5 мкм.

Согласно нашей гипотезе, непрерывность митохондриальной системы обеспечивается гЭР, который прямо сливается с наружной мембраной митохондрий (см. схему на рис. 1). Не

вполне понятно, каким образом происходит передача в сому сигналов с сотен синапсов для генерации одного потенциала действия; взаимосвязанная и непрерывная компартментализация митохондрий с непрерывной системой гЭР [115] могла бы обеспечивать направленный «перенос энергии» через внутреннюю митохондриальную мембрану, выступающую в качестве «электрического кабеля» [116], и «туннелирование ионов кальция» как основного звена во внутриклеточной системе сигнальной трансдукции [81,112].

Традиционно считается, что приблизительно 50% клеток головного мозга представлено нейронами, тогда как остальные представлены,

главным образом, глиальными и эпендимальными клетками [117]. Известно, что астроциты образуют функциональный синцитий, в котором клетки связаны между собой щелевыми контактами [118]. Уже в ранних исследованиях было показано, что на астроглиальных клетках возникает деполяризация в ответ на увеличение экстраклеточной концентрации калия при работе синапсов [119,120]. В исследованиях *in vivo* астроцитов в поле CA1 гиппокампа установлено, что при электрической стимуляции коллатералей Шаффера высвобождение глутамата из синапсов вызывает в астроцитах возрастание концентрации ионов кальция за счет стимуляции метаботрофных глутаматных рецепторов, локализованных в астроцитарной плазматической мембране [121]. Данные о присутствии в плазматической мембране глутаматных рецепторов, реагирующих на экстраклеточный глутамат при ДП, имеются и для клеток Пуркинье мозжечка [122]. Недавно было показано, что зрелые астроциты в гиппокампе содержат как метаботропные, так и ионотропные глутаматные рецепторы [123]. Установлено также, что изменения концентрации ионов кальция в физиологическом диапазоне от 84 до 140 нМ стимулируют высвобождение глутамата из астроцитов, который модулирует синаптическую передачу между нейронами [124]. Особый интерес представляют исследования [125-128], где показано наличие щелевых контактов между глиальными клетками и нейронами. В настоящее время это направление интенсивно развивается электрофизиологическими и современными молекулярно-биологическими методами с использованием как культур глиальных клеток и нейронов, так и интактного мозга, включая гиппокамп. Целесообразность присутствия электрических синапсов между глиальными клетками и нейронами, возможно, объясняется тем обстоятельством, что осцилляции мембранного потенциала на глиальных клетках могут играть важную роль в модуляции синаптической передачи в нейрональных сетях [126-127]. Предполагается, что астроциты участвуют в модуляции нейрональной активности в онтогенезе [128-129] при различных патологиях мозга [126,127], включая эпилепсии [130] и ишемию мозга [126].

Локализация глиальных клеток и их отростков в межнейрональном пространстве является крайне важной для понимания того, как межнейрональные и астроцит-нейрональные взаимосвязи участвуют в механизмах синаптической передачи. Активно развивается идея о том, что избыток (*spillover*) высвобожденного глутамата из одного синапса способен мигри-

ровать по экстраклеточному пространству и активировать близлежащие синапсы [131,132], в связи с чем крайне важно определить расстояние между соседними синапсами и их связь с астроцитами [117,132]. Трехмерные реконструкции, проведенные в молекулярном слое поля CA1 гиппокампа крыс [117], позволили оценить среднее расстояние между синапсами, которое составило 0,65 мкм. Близкое значение получено в работе [131], в которой линейное расстояние между синапсами было оценено в 0,436 мкм, а с учетом введенного авторами так называемого «фактора извилистости» экстраклеточного пространства, равного 1,34, среднее расстояние составляло 0,584 мкм.

Готовые трехмерные реконструкции имеют точные координаты (X , Y и Z) для каждой структуры, которые во многих программах, например «Trace» (<http://synapse.bu.edu>) или «3D View Actify» (<http://www.actify.com/v2/index.htm>), позволяют количественно оценить, например площадь поверхности и объем, а также расстояния между этими структурами. На рис. 5 представлены трехмерные реконструкции глиальных отростков и контактирующих непосредственно с ними тонких и грибовидных шипиков дендритов поля CA1 гиппокампа сусликов в следующих функциональных состояниях: 1) в нормотермии (рис. 5а); 2) спустя 2,5 ч после начала пробуждения от спячки (рис. 5б) и 3) в состоянии холодового оцепенения (рис. 5в). Для реконструкции было использовано 50 серийных срезов для каждого из трех образцов так, чтобы были проанализированы приблизительно одинаковые объемы (около 500 мкм³) нервной ткани. На рис. 5-1 показаны астроцитарные отростки (темный цвет) и лежащие на их поверхности тонкие и грибовидные шипики (белый цвет), на которых локализуются как пятнистые, так и перфорированные или сегментированные ПСУ (черный цвет); на рис. 5-2 показаны астроцитарные отростки, которые образуют за счет десмосом и щелевых контактов непрерывную сеть; на рис. 5-3 приведены дендритные шипики, между которыми определялись как минимальное, так и среднее расстояние между всеми шипиками. В таблице представлены количественные данные, из которых следует, что минимальное расстояние между шипиками составляет около 0,9 мкм, и это расстояние практически не зависит от функционального состояния нервной ткани. Результаты, представленные на рис. 5 и в таблице, касаются только приблизительно 10% от всей популяции синапсов (маркером являются ПСУ) в исследуемом объеме. Остальные 90% синапсов связаны с аст-

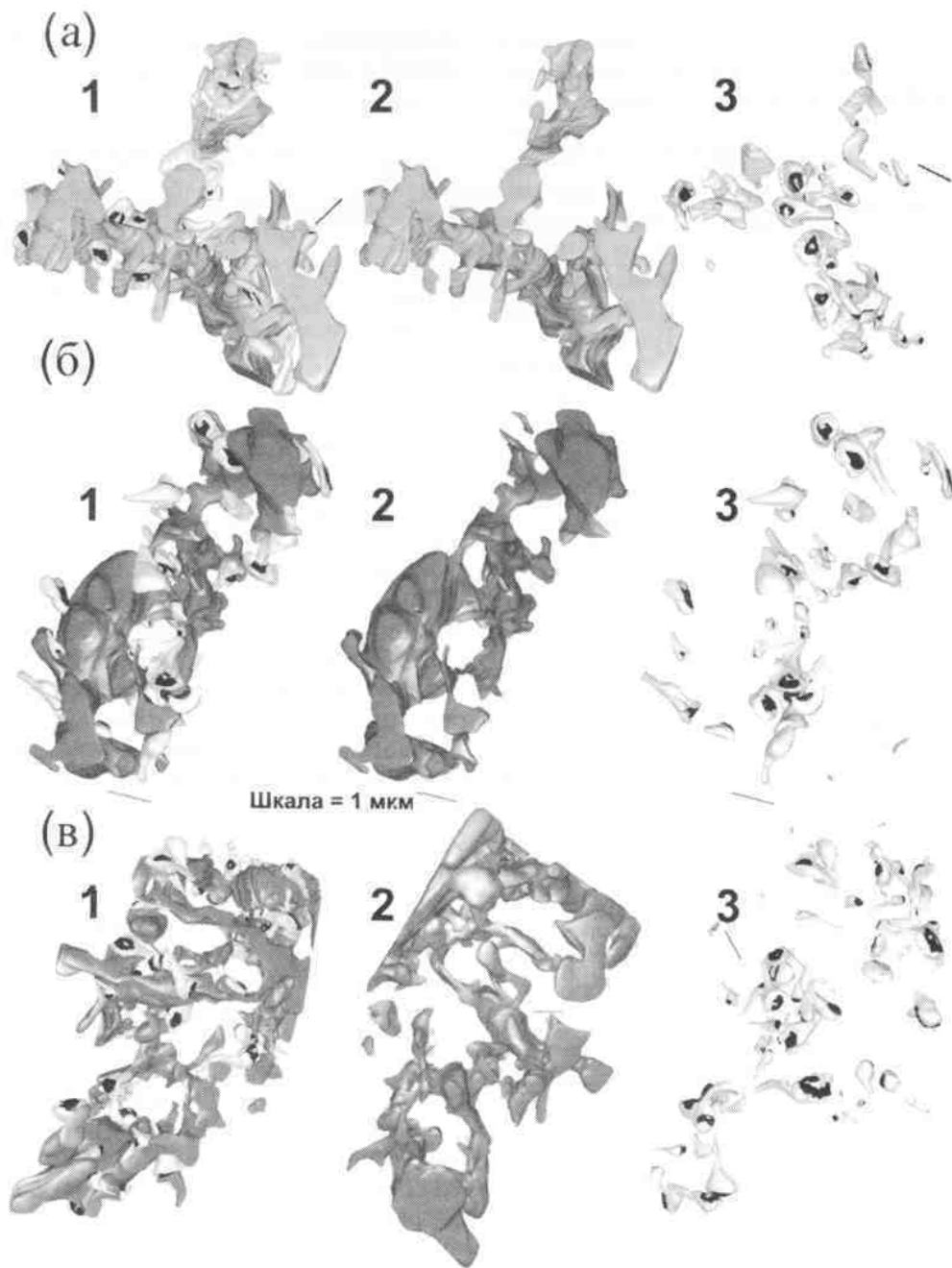


Рис. 5. Трехмерные реконструкции глиальных отростков и дендритных шипиков (тонкие и грибовидные), прямо контактирующих с поверхностью астроцитов: (а) - в состоянии нормотермии; (б) - при спровоцированном пробуждении; (в) - в центре баута гибернации. Функциональные состояния сусликов и исследуемая область в поле СА1 гиппокампа суслика те же, что на и рис. 2-3. Цифрами 1, 2, 3 показаны шипики, контактирующие с глиальной сетью (1); глиальная сеть, в которой полости представляют дендриты и пресинаптические бутоны (2); тонкие и грибовидные шипики с локализованными на них постсинаптическими уплотнениями (окрашены в темный цвет). На всех изображениях шкала = 1 мкм.

роглиальной сетью через дендриты и пресинаптические бутоны. Важно отметить, что согласно данным стереологического анализа плотность синапсов/ПСУ не изменяется и для исследуемой зоны поля СА1 составляет около 170 синапсов на 100 мкм^3 . Ранее было показано, что вход в

состояние гибернации сопровождается ретракцией дендритных шипиков, в частности для дендритов поля СА3 [76,104,105]. Уже через 2,5 ч после начала пробуждения происходит восстановление «втянутых» шипиков [76,104,105]. Существенно, что в поле СА1 плотность си-

Минимальные и средние расстояния между тонкими и грибовидными дендритными шипиками, прямо контактирующими с поверхностью астроцитарных отростков в молекулярном слое поля СА1 гиппокампа суслика в трех функциональных состояниях

Функциональное состояние	Дендритные шипики		Постсинаптические уплотнения	
	минимальное расстояние, мкм	среднее расстояние между всеми шипиками, мкм	минимальное расстояние, мкм	среднее расстояние между всеми шипиками, мкм
Нормотермия	$1,052 \pm 0,071$	$3,968 \pm 0,068$ W=741	$1,052 \pm 0,071$	$4,029 \pm 0,070$ N = 741
Пробуждение	$0,822 \pm 0,063$	$3,429 \pm 0,064$ N = 703	$0,868 \pm 0,059$	$3,428 \pm 0,065$ N = 703
Гибернация	$0,940 \pm 0,064$	$5,199 \pm 0,071$ N = 1485	$0,996 \pm 0,059$	$5,305 \pm 0,072$ N = 1485

Примечание. Минимальные расстояния как между шипиками, так и ПСУ для всех функциональных состояний достоверно не различаются. Средние расстояния как между шипиками, так и ПСУ для всех функциональных состояний достоверно различаются, $p < 10^{-8}$. Статистический анализ данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

напсов не зависит от функционального состояния нервной ткани. Однако вход в состояние гибернации индуцировал достоверное уменьшение почти на 20% пропорции тонких шипиков за счет увеличения пропорций пеньковых и стволовых синапсов. Через 2,5 ч пропорция тонких шипиков практически восстанавливалась до нормотермного состояния. Пропорция грибовидных шипиков оставалась постоянной во всех трех функциональных состояниях сусликов. В этой связи достоверное увеличение среднего расстояния между тонкими и грибовидными шипиками в состоянии холодового оцепенения по сравнению с нормотермией (таблица) может быть объяснено ретракцией тонких шипиков, так как пеньковые и стволовые синапсы в данном исследовании не фиксировались. В пользу этого свидетельствуют также данные о достоверном уменьшении среднего расстояния между шипиками спустя 2,5 ч после начала пробуждения, когда идет активное восстановление ранее ретрагированных шипиков из пеньковых и стволовых синапсов. Необходимо также отметить, что расстояния между центрами масс шипиков полностью совпадают с центрами масс ПСУ (таблица), которые более чем в 10 раз меньше по объему шипиков. Пока не ясно, как обратимая ретракция (переход тонких в пеньковые, а пеньковых в стволовые синапсы) может быть связана с активностью астроглиальной сети и каким образом эта сеть влияет на электрическую активность сети нейронов в процессе выхода суслика из спячки, когда за сравнительно короткое время из состояния холодового оцепенения мозг разогревается от 1-6°C до 32-34°C. При пробуждении уже в течение десятков минут происходит ак-

тивация белоксинтезирующего аппарата [73,75,76,104,105] с активным синтезом различных соединений. При этой температуре суслик реагирует на внешние стимулы, т.е. происходит активация работы синапсов коры и гиппокампа с вероятным выбросом различных нейротрансмиттеров в экстраклеточное пространство.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ключевым звеном в работе мозга является химический синапс, включающий пресинаптический бутон с нейротрансмиттерами и постсинаптическую часть, представленную дендритным шипиком. В гиппокампе самыми крупными шипиками являются грибовидные, которые содержат свободные полирибосомы, шипиковый аппарат, гЭР и окаймленные везикулы, участвующие в рециклинге рецепторов. Существенно, что число грибовидных шипиков постоянно, тогда как тонкие шипики способны к ретракции с переходом в пеньковые шипики и далее в стволовые синапсы. Этот процесс перехода является обратимым и может служить реальным механизмом, обеспечивающим пластичность синапсов. Кроме того, все категории шипиков способны менять свою форму, объем и площадь поверхности. Реальным маркером синапса являются три основных типа постсинаптических уплотнений: пятнистые, перфорированные и сегментированные, которые также могут изменять свою форму.

Особый тип шипиков выявляется в полях СА2-СА3-СА4 гиппокампа - колючие шишки, представляющие собой короткую ветвь дендрита, на которой располагаются многочисленные шипики. Возможно, что такая организация

шипики в этих полях связана с «компараторными» свойствами гиппокампа [36], так как именно эти области гиппокампа потенцируются мшистыми немиелинизированными волокнами/аксонами, образованными гранулярными нейронами из зубчатой фасции, которая содержит пресинаптические бутоны аксонов из различных структур мозга.

Парадигма: «один шипик - один синапс» в настоящее время, благодаря использованию серийных ультратонких срезов и трехмерных реконструкций, сменяется примерами присутствия на одном грибовидном шипике в поле СА1 гиппокампа до восьми независимых пресинаптических бутонов. Примеры контактов нескольких (до пяти) пресинаптических бутонов мшистых волокон нами также обнаружены и на «колючих шишках» дендритов пирамидных нейронов из полей СА2-СА3-СА4 [35]. Целесообразность присутствия множественных синапсов на одном шипике может быть связана с возможностью переработки поступающей информации уже на уровне малой части дендрита - отдельном шипике. Наши исследования показывают, что число таких множественных синапсов на грибовидных шипиках не превышает 0,1% от всей их популяции, тогда как число грибовидных шипиков в поле СА1 гиппокампа крысы и суслика обычно составляет около 12-14% от всей популяции синапсов.

Благодаря химическим и электрическим синапсам нейрональные сети представляют реальный функциональный синцитий. Трехмерные реконструкции показывают, что глиальные отростки в различных областях гиппокампа образуют единую морфологически непрерывную сеть, которая благодаря щелевым контактам между глиальными отростками также представляет функциональный синцитий. Таким образом, уже имеющиеся собственные и литературные данные свидетельствуют о важной электрофизиологической роли глии. Действительно, трудно объяснить только опорными функциями глии, клетки которой составляют почти 50% от всех клеток мозга. Следовательно, в различных полях гиппокампа, а по-видимому, и коры, существуют две взаимосвязанные системы, способные генерировать электрические осцилляции: медленные - в астроглии и быстрые - в нейрональных сетях.

Представленные нами результаты показывают, что дендриты практически всех нейронов в гиппокампе *in vivo* имеют «гигантские» сильно разветвленные митохондрии как в проксимальной, так и в дистальных участках. Непрерывная

связь мембран гЭР с наружной мембраной оболочки дендритных митохондрий, возможно, свидетельствует о том, что «пассивные свойства дендрита» [1], а точнее его плазматической мембраны, реализуются как активные через непрерывный континуум - гЭР с наружной мембраной оболочки митохондрий, обеспечивая, по крайней мере, кальциевую регуляцию [89]. Если внутренняя мембрана гигантской митохондрии является непрерывной, то она, согласно предположению [116], может выполнять роль «электрического кабеля», обеспечивая передачу сигналов от разных шипиков в сому. Вместе с тем мы уже имеем примеры трехмерных реконструкций митохондрий, когда непрерывность гигантской митохондрии обеспечивается только через наружную мембрану, с которой сливаются мембраны гЭР. В этом случае внутренние мембраны отдельных митохондрий между собой не связаны, однако, и в такой системе передача возбуждения с различных шипиков в сому могла бы происходить за счет кальциевых токов на мембранах гЭР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №02-04-48890, №02-04-48877). Материалы о трехмерных реконструкциях синапсов были продемонстрированы 25 апреля 2002 г. по теме: «Морфология синапсов» в передаче А. Гордон (<http://www.ntv-tv.ru/ntv/AGordon@ntv-tv.ru>).

I

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Виноградова О.С. // Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова. 2000. Т. 50, № 5. С. 743-774.
2. Coggeshall R.E., Lekan H.A. // J. Comp. Neurol. 1996. V. 364, № 1. P. 6-15.
3. Chicurel M.E., Harris K.M. // J. Comp. Neurol. 1992. V. 325, № 2. P. 69-82.
4. Fiala J.C., Harris K.M. // J. Microsc. 2001. V. 202, № 3. P. 468-472.
5. Fiala J.C., Harris K.M. // J. Am. Med. Inform. Assoc. 2001. V. 8, № 1. P. 1-16.
6. Geinisman Y., deToledo-Morrell L., Morrell F. // Brain Res. 1991. V. 566, № 1-2. P. 77-88.
7. Geinisman Y., Gimdersen H.J., van der Zee E., West M.J. // J. Neurocytol. 1996. V. 25, № 12. P. 805-819.
8. Harris K.M. // Curr. Opin. Neurobiol. 1999. V. 9, № 3. P. 343-448.
9. Harris K.M., Kater S.B. // Annu. Rev. Neurosci. 1994. V. 17. P. 341-371.
10. Moser M.B., Trommald M., Andersen P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91, № 26. P. 12673-12675.
11. Sorra K.E., Fiala J.C., Harris K.M. // J. Comp. Neurol. 1998. V. 398, № 2. P. 225-240.
12. Spacek J., Harris K.M. // J. Neurosci. 1997. V. 17, № 1. P. 190-203.

13. *Spacek J., Harris K.M.* // J. Comp. Neurol. 1998. V. 393, № 1. P. 58-68.
14. *West M.J.* // Trends Neurosci. 1999. V. 22, № 2. P. 51-61.
15. *Foster M.* A Textbook of Physiology. N.Y.: The MacMillan Co, 1897. P. 929.
16. *Bailey C.H., Gintetto M., Huang Y.Y., Hawkins R.D., Kandel E.R.* // Nature Rev. Neurosci. 2000. V. 1, № 1. P. 11-20.
17. *Bailey C.H., Kandel E.R.* // Annu. Rev. Physiol. 1993. V. 55. P. 397-426.
18. *Tanzi E.* // Riv. Sper. Freniatr. 1893. V. 19. P. 419-472.
19. *Ramon-y-Cajal S.* // Arch. Anat. Physiol. Anat. Abt. Suppl. 1893. P. 319-428.
20. *Bahr B.A.* // J. Neurosci. Res. 1995. V. 42, № 3. P. 294-305.
21. *Banker G., Goslin K.* // Nature. 1988. V. 336, № 6195. P. 185-186.
22. Cerebellar Cortex. Volume 1: Cellular Components of the Cerebral Cortex / By eds. A. Peters, E.G. Jones. N.Y.: Plenum Press, 1984.
23. *Harris K.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1999. V. 96, № 22. P. 12213-12215.
24. *Harris K.M., Kater S.B.* // Annu. Rev. Neurosci. 1994. V. 17. P. 341-371.
25. *Hering H., Sheng M.* // Nature Rev. Neurosci. 2001. V. 2, № 12. P. 880-888.
26. *Homer C.H.* // Prog. Neurobiol. 1993. V. 41, № 3. P. 281-321.
27. *Segal M.* // Prog. Neurobiol. 2001. V. 63, № 1. P. 61-70.
28. *Segal M., Andersen P.* // Curr. Opin. Neurobiol. 2000. V. 10, № 5. P. 582-586.
29. *Sorra K.E., Harris K.M.* // Hippocampus. 2000. V. 10, № 5. P. 501-511.
30. *Steward O., Schuman E.M.* // Annu. Rev. Neurosci. 2001. V. 24. P. 299-325.
31. *Yuste R., Bonhoeffer T.* // Annu. Rev. Neurosci. 2001. V. 24. P. 1071-1089.
32. *Peters A., Kaiserman-Abramof I.R.* // Am. J. Anat. 1970. V. 127, № 4. P. 321-355.
33. *Harris K.M., Jensen F.E., Tsao B.* // J. Neurosci. 1992. V. 12, № 7. P. 2685-2705.
34. *Jones E.G., Powell T.P.* // J. Cell Sci. 1969. V. 5, № 2. P. 509-529.
35. Попов В.П., Медведев Н.И., Патрушев И.В., Рогачевский В.В., Краев И.В., Клименко О.А., Игнатъев Д.А., Хуцян С.С., Stewart M.G. // Колосовские чтения, IV Междунар. конф. по функциональной нейроморфологии. СПб: Изд-во РАН, 2002. С. 230-231.
36. *Vinogradova O.S.* // Hippocampus. 2001. V. 11, № 5. P. 578-598.
37. *Chan-Palay V.* // Brain Res. 1974. V. 79, № 2. P. 280-284.
38. *Spacek J., Hartmann M.* // Anat. Embryol. (Berl). 1983. V. 167, № 2. P. 289-310.
39. *Sorra K.E., Fiala J.C., Harris K.M.* // J. Comp. Neurol. 1998. V. 398, № 2. P. 225-240.
40. *Geinisman Y.* // Hippocampus. 1993. V. 3, № 4. P. 417-433.
41. *Smith S.J.* // Science. 1988. V. 242, № 4879. P. 708-715.
42. *Dailey M.E., Smith S.J.* // J. Neurosci. 1996. V. 16, № 9. P. 2983-2994.
43. *Fiala J.C., Feinberg M., Popov V., Harris K.M.* // J. Neurosci. 1998. V. 18, № 21. P. 8900-8911.
44. *Z/v N.E., Smith S.J.* // Neuron. 1996. V. 17, № 1. P. 91-102.
45. *Krucker T., Siggins G.R., Halpain S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97, № 12. P. 6856-6861.
46. *Star E.N., Kwiatkowski D.J., Murthy V.N.* // Nature Neurosci. 2002. V. 5, № 3. P. 239-246.
47. *Sotelo C.* // J. Exp. Biol. 1990. V. 153. P. 225-249.
48. *Sotelo C., Korn H.* // Int. Rev. Cytol. 1978. V. 55. P. 67-107.
49. *Baloyannis S.J., Costa V., Deretzi G.* // Int. J. Neurosci. 1992. V. 62, № 3-4. P. 251-262.
50. *Dunaevsky A., Tashiro A., Majewska A., Mason C., Yuste R.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96, № 23. P. 13438-13443.
51. *Engert F., Bonhoeffer T.* // Nature. 1999. V. 399, № 6731. P. 66-70.
52. *Majewska A., Brown E., Ross J., Yuste R.* // J. Neurosci. 2000. V. 20, № 5. P. 1722-1734.
53. *Majewska A., Tashiro A., Yuste R.* // J. Neurosci. 2000. V. 20, № 22. P. 8262-8268.
54. *Maletic-Savatic M., Malinow R., Svoboda K.* // Science. 1999. V. 283, № 5409. P. 1923-1927.
55. *Yuste R., Majewska A.* // Neuroscientist. 2001. V. 7, № 5. P. 387-395.
56. *Yuste R., Majewska A., Holthoff K.* // Nature Neurosci. 2000. V. 3, № 7. P. 653-659.
57. *Anderson J.C., Martin K.A.* // Nature Neurosci. 2001. V. 4, № 12. P. 1166-1167.
58. *Bliss T.V., Lomo T.* // J. Physiol. 1973. V. 232, № 2. P. 331-356.
59. *Steward O., Worley P.P.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98, № 13. P. 7062-7068.
60. *Colwell C.S., Altemus K.L., Cepeda C., Levine M.S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93, № 3. P. 1200-1204.
61. *Kennedy M.B.* // Trends Neurosci. 1997. V. 20, № 6. P. 264-268.
62. *Marrs G.S., Green S.H., Dailey M.E.* // Nat. Neurosci. 2001. V. 4, № 10. P. 1006-1013.
63. *Sheng M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98, № 13. P. 7058-7061.
64. *Svoboda K., Tank D.W., Denk W.* // Science. 1996. V. 272, № 5262. P. 716-719.
65. *Pierce J.P., van Leyen K., McCarthy J.B.* // Nature Neurosci. 2000. V. 3, № 4. P. 311-313.
66. *Cooney J.R., Hurlburt J.L., Selig D.K., Harris K.M., Fiala J.C.* // J. Neurosci. 2002. V. 22, № 6. P. 2215-2224.
67. *Baas P.W.* // J. Chem. Neuroanat. 1998. V. 14, № 3-4. P. 175-180.
68. *Lippincott-Schwartz J., Snapp E., Kenworthy A.* // Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2001. V. 2, № 6. P. 444-456.
69. *Presley J.F., Cole N.B., Schroer T.A., Hirschberg K., Zaal K.J., Lippincott-Schwartz J.* // Nature. 1997. V. 389, № 6646. P. 81-85.
70. *Orci L., Perrelet A., Rothman J.E.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95, № 5. P. 2279-2283.

71. *Pelham H.R., Rothman J.E.* // Cell. 2000. V. 102, № 6. P. 713-719.
72. *Eaton B.A., Fetter R.D., Davis G.W.* // Neuron. 2002. V. 34, № 5. P. 729-741.
73. *Гордон Р.Я., Боcharова Л.С., Попов В.И., Карнаухов В.Н.* // Цитология. 1989. Т. 31, № 1. С. 73-79.
74. *Bocharova L.S., Gordon R.Ya., Popov V.L.* // Mechanisms of Natural Hypometabolic States / By eds. S. Kolaeva, N. Popova, N. Solomonov, L. Wang. Pushchino, 1992. P. 125-132.
75. *Gordon R.Y., Bocharova L.S., Kruman I.I., Popov V.L., Kazantsev A.P., Khutizian S.S., Karnaukhov V.N.* // Cytochemistry. 1997. V. 29, № 3. P. 215.
76. *Popov V.L., Bocharova L.S., Gordon R.Ya., Brag in A.G.* // Signal Molecules and Behaviour / By eds. W. Winlow, O.S. Vinogradova, D.A. Sakharov. Manchester, N.Y.: Manchester Univ. Press, 1991. V. 4. P. 302-305.
77. *Ostroff L., Fiala J., Allwardt B., Harris K.* // Neuron. 2002. V. 35, № 3. P. 535.
78. *Lledo P.M., Zhang X., Sudhof T.C., Malenka R.C., Nicoll R.A.* // Science. 1998. V. 279, № 5349. P. 399-403.
79. *Petersen O.H., Tepikin A., Park M.K.* // Trends Neurosci. 2001. V. 24, № 5. P. 271-276.
80. *Shepherd G.M., Harris K.M.* // J. Neurosci. 1998. V. 18, № 20. P. 8300-8310.
81. *Berridge M.J.* // Neuron. 1998. V. 21, № 1. P. 13-26.
82. *Tarrant S.B., Routtenberg A.* // Neurosci. Lett. 1979. V. 11, № 3. P. 289-294.
83. *Carroll R.C., Lissin D. V., von Zastrow M., Nicoll R.A., Malenka R.C.* // Nature Neurosci. 1999. V. 2, № 5. P. 454-460.
84. *Ehlers M.D.* // Neuron. 2000. V. 28, № 2. P. 511-525.
85. *Hayashi Y., Shi S.H., Esteban J.A., Piccini A., Poncer J.C., Malinow R.* // Science. 2000. V. 287, № 5461. P. 2262-2267.
86. *Luscher C., Xia H., Beattie E.G., Carroll R.C., von Zastrow M., Malenka R.C., Nicoll R.A.* // Neuron. 1999. V. 24, № 3. P. 649-658.
87. *Man H.Y., Lin J.W., Ju W.H., Ahmadian G., Liu L., Becker L.E., Sheng M., Wang Y.T.* // Neuron. 2000. V. 25, № 3. P. 649-662.
88. *Tarabal O., Caldero J., Llado J., Oppenheim R.W., Esquerda J.E.* // J. Neurosci. 2001. V. 21, № 20. P. 8072-8081.
89. *Finch E.A., Augustine G.J.* // Nature. 1998. V. 396, № 6713. P. 753-756.
90. *Fischer M., Kaech S., Knutti D., Matus A.* // Neuron. 1998. V. 20, № 5. P. 847-854.
91. *Fifkova E.* // Brain Res. 1985. V. 356, № 2. P. 187-215.
92. *Kaech S., Parmar H., Roelandse M., Bornmann C., Matus A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98, № 13. P. 7086-7092.
93. *Peters A., Palay S.L.* // J. Neurocytol. 1996. V. 25, № 12. P. 687-700.
94. *Beaulieu C., Colonnier M.* // J. Comp. Neurol. 1985. V. 231, № 2. P. 180-189.
95. *Fiala J.C., Allwardt B., Harris K.M.* // Nature Neurosci. 2002. V. 5, № 4. P. 297-298.
96. *Geinisman Y., Berry R.W., Disterhoft J.F., Power J.M., Van der Zee E.A.* // J. Neurosci. 2001. V. 21, № 15. P. 5568-5573.
97. *Harris K.M., Stevens J.K.* // J. Neurosci. 1988. V. 8, № 12. P. 4455-4469.
98. *Kirov S.A., Harris K.M.* // Nature Neurosci. 1999. V. 2, № 10. P. 878-883.
99. *Sorra K.E., Harris K.M.* // J. Neurosci. 1998. V. 18, № 2. P. 658-671.
100. *Fukuda T., Kosaka T.* // J. Neurosci. 2000. V. 20, № 4. P. 1519-1528.
101. *Rash J.E., Dillman R.K., Bilhartz B.L., Duff y H.S., Whalen L.R., Yasumura T.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93, № 9. P. 4235-4239.
102. *Rash J.K., Yasumura T., Dudek F.E., Nagy J.I.* // J. Neurosci. 2001. V. 21, № 6. P. 1983-2000.
103. *Rash J.E., Staines W.A., Yasumura T., Patel D., Furman C.S., Stelmack G.L., Nagy J.I.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97, № 13. P. 7573-7578.
104. *Popov V.L., Bocharova L.S.* // Neuroscience. 1992. V. 48, № 1. P. 53-60.
105. *Popov V.L., Bocharova L.S., Bragin A.G.* // Neuroscience. 1992. V. 48, № 1. P. 45-51.
106. *Popov V.L., Ignat'ev D.A., Lindemann B.* // J. Electron Microsc. (Tokyo). 1999. V. 48, № 6. P. 957-969.
107. *Woolley C.S., McEwen B.S.* // J. Neurosci. 1992. V. 12, № 7. P. 2549-2554.
108. *Woolley C.S., McEwen B.S.* // J. Comp. Neurol. 1993. V. 336, № 2. P. 293-306.
109. *Yankova M., Hart S.A., Woolley C.S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98, № 6. P. 3525-3530.
110. *Mihailovic L., Petrovic-Minic B., Protic S., Divac L.* // Nature. 1968. V. 218, № 137. P. 191-192.
111. *Boyer C., Schikorski T., Stevens C.F.* // J. Neurosci. 1998. V. 18, № 14. P. 5294-5300.
112. *Babcock D.F., Herrington J., Goodwin P.C., Park Y.B., Hille B.* // J. Cell Biol. 1997. V. 136, № 4. P. 833-844.
113. *Co II ins T.J., Berridge M.J., Lipp P., Boot man M.D.* // EMBO J. 2002. V. 21, № 7. P. 1616-1627.
114. *Herrington J., Park Y.B., Babcock D.F., Hille B.* // Neuron. 1996. V. 16, № 1. P. 219.
115. *Terasaki M., Slater N.T., Fein A., Schmidek A., Reese T.S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91, № 16. P. 7510-7514.
116. *Skulachev V.P.* // Trends Biochem. Sci. 2001. V. 26, № 1. P. 23-29.
117. *Ventura R., Harris K.M.* // J. Neurosci. 1999. V. 19, № 16. P. 6897-6906.
118. *Konietzko U., Muller C.M.* // Hippocampus. 1994. V. 4, № 3. P. 297-306.
119. *Роїтбак А.И.* Глия и её роль в нервной деятельности. СПб: Наука, 1993.
120. *Roitbak A.L., Fanardjian V.V.* // Neuroscience. 1981. V. 6, № 12. P. 2529-2537.
121. *Porter J.T., McCarthy K.D.* // J. Neurosci. 1996. V. 16, № 16. P. 5073-5081.
122. *Linden D.J.* // Neuron. 1997. V. 18, № 6. P. 983-994.
123. *Shelton M.K., McCarthy K.D.* // Glia. 1999. V. 26, № 1. P. 1-11.
124. *Parpura V., Haydon P.O.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97, № 15. P. 8629-8634.
125. *Alvarez-Maubecin V., Garcia-Hernandez K., Williams J.T.* // J. Neurosci. 2000. V. 20, № 11. P. 4091-4098.

126. Cotrina M.L., Kang J., Lin J.H., Bueno E., Hansen T. IV., He L., bin Y., Nedergaard M. // J. Neurosci. 1998. V. 18, № 7. P. 2520-2537.
127. Nedergaard M. // Science. 1994. V. 263, № 5154. P. 1768-1771.
128. Rozental R., Andmde-Rozental A.F., Zheng X., Urban M., Spray D.C., Chiu F.-C. // Dev. Neurosci. 2001. V. 23, № 6. P. 420-431.
129. Megias L., Guerri C., Fornas E., Azorin I., Bendala E., Sancho-Tello M., Duran J.M., Tomas M., Gomez-Lechon M.J., Renau-Piqueras J. // Int. J. Dev. Biol. 2000. V. 44, № 2. P. 209-221.
130. Carlen P.L., Skinner F., Zhang L., Naus C., Kushnir M., Velazquez J.L.P. // Brain Res. Rev. 2000. V. 32, № 1. P. 235-241.
131. Hosokawa T., Rusakov D.A., Bliss T.V., Fine A. // J. Neurosci. 1995. V. 15, № 8. P. 5560-5573.
132. Rusakov D.A., Kullmann D.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95, № 15. P. 8975-8980.

The Three-dimensional Organization of Synapses and Astroglia in the Hippocampus of Rat and Ground Squirrel: New Paradigms of Synapse Structure and Function

V.I. Popov*, N.I. Medvedev**, V.V. Rogachevskii*, D.A. Ignat'ev*, M.G. Stewart***, and E.E. Fesenko*

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

**Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

***The Open University, Milton Keynes, MK7 6AA, UK

The literature data and our own data on the synaptic plasticity and remodeling of synaptic organelles in the central nervous system are reviewed. Modern techniques of laser scanning confocal microscopy and serial thin sectioning for *in vivo* and *in vitro* studies of dendritic spines, including the relationship between morphological changes and the efficacy of synaptic transmission, are discussed using, in particular, a model of long-term potentiation. The organization of dendritic spines and postsynaptic densities of different categories as well as the role of filopodia in spine genesis were analyzed. It was shown that the method of serial ultrathin sections is the most effective for unbiased quantitative stereological analysis and 3D reconstructions. By using the refined method of serial ultrathin sections with subsequent three-dimensional reconstructions, the presence of giant mitochondria in hippocampal neuronal dendrites was demonstrated. It was shown that smooth endoplasmic reticulum forms a unified continuum with the outer membrane of the mitochondrial envelope within dendrites. It was suggested that this continuum provides calcium tunneling, which makes possible intracellular signal transduction during synaptic transmission. Evidence is presented indicating the presence of gap junctions («electrical synapses») in the synapses of mammalian brain, as well as between glial processes, and between glial cells and neurons. Our data and the data of other authors show that glial cell processes form a structural and functional glial network, which modulates the functioning of the neuronal network. The connection of dendritic spines with the glial network is shown on 3D reconstructions by analyzing the neuropil volume in CA1 hippocampal area of ground squirrels in three functional states: normothermia, provoked arousal, and hibernation when brain temperature falls below 6°C. The own data of the authors are discussed indicating the formation of more than five presynaptic boutons (multiple synapses) on both CA1 mushroom-like dendritic spines and CA3 thorny excrescences. On the basis of the analysis, new ideas of the organization and functioning of synapses were suggested.

Key words: hippocampus, neuron, glial cell, synapse, gap junction, dendritic spine, postsynaptic density, serial ultrathin sections, 3D reconstructions