

УДК 591.543.42+612.821.2+151

ТРЕХМЕРНЫЕ РЕКОНСТРУКЦИИ СИНАПСОВ И ДЕНДРИТНЫХ ШИПИКОВ В ГИППОКАМПЕ КРЫС И СУСЛИКОВ: НОВЫЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАДИГМЫ РАБОТЫ СИНАПСА

© 2004 г. В. И. Попов*, А. А. Деев **, О. А. Клименко*, И. В. Краев*,
С. Б. Кузьминых*, Н. И. Медведев***120120, И. В. Патрушев*, Р. В. Попов*,
В. В. Рогачевский*, С. С. Хуцян*, М. Г. Стюарт****, Е. Е. Фесенко*

* Институт биофизики клетки РАН,

** Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, e-mail: popvi@mail.ru,

*** Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино,

**** The Open University, Milton Keynes, United Kingdom, e-mail: M.G.Stewart@open.ac.uk

Поступила в редакцию 17.10.2002 г.

Принята в печать 28.10.2002 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. Проведен анализ различных категорий как дендритных шипиков, так и постсинаптических уплотнений, а также роль филоподий в генезисе шипиков. Обсуждается роль серийных ультратонких срезов для непредвзятого количественного стереологического анализа и 3D реконструкций. Обсуждаются собственные данные по образованию более двух синапсов на одном грибовидном шипике нейрона поля CA1 гиппокампа. 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.

Three-dimensional Reconstructions of Synapses and Dendritic Spines in the Hippocampus of Rats and Ground squirrels: New Paradigms of the Structure and Function of a Synapse

V.I. Popov, A.A. Deev, O.A. Klimenko, I.V. Kraev, S.B. Kouzminykh, N.I. Medvedev,
I.V. Patrushev, R.V. Popov, V.V. Rogachevsky, S.S. Khutzian, M.G. Stewart, E.E. Fesenko

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia,

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences;

Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia,

The Open University, Department of Biological Sciences, Milton Keynes, United Kingdom

e-mail: popvi@mail.ru, e-mail: M.G.Stewart@open.ac.uk

The article reviews the literature data and results obtained by the authors concerning synaptic plasticity and remodeling of synaptic organelles in the central nervous system. Modern techniques of laser scanning confocal microscopy and serial thin sectioning for *in vivo* and *in vitro* studies of dendritic spines including a correlation between morphological changes and synaptic transmission efficiency are discussed, particularly, in relation to long-term potentiation. Organization of different types of dendritic spines and involvement of filopodia in spine genesis are examined. Significance of serial ultrathin sections for unbiased quantitative stereological analysis and three-dimensional reconstructions is discussed. The contact of one dendritic spine with two presynaptic boutons (multiple synapses) on both CA1 mushroom dendritic spines is discussed. The analyzed findings suggest new ideas for organization and functioning of synapses.

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

Ранее О.С. Виноградовой был опубликован обзор [1], посвященный состоянию нейронауки на стыке двух тысячелетий и смене парадигм по взаимоотношениям как между нейронами, так и между нейронами и глиальными клетками. Нам представлялось необходимым дополнить эту информацию последними данными о синапсах, обеспечивающих работу мозга млекопитающих, что и явилось целью настоящей работы. В ней анализируются последние данные литературы и оригинальные собственные данные.

Традиционно проблемы обучения, памяти и забывания связывают с нейронной пластичностью, в основе которой лежат изменения в синапсах. Термин “синапсы” (греч. *synapsis* – соединение) был введен М. Фостером и Ч. Шеррингтоном в конце позапрошлого века [22] и означает “связи”. Позднее этот термин стали широко использовать в современном значении для обозначения связи между нейронами [47]. Согласно [5, 6] пластичность условно может быть разделена на две категории: 1) изменения в уже существующих синапсах без изменения нейронных связей [71] и 2) изменения собственно межнейронных связей за счет как образования *de novo*, так и исчезновения синапсов [52]. “Химический синапс”, представляющий собой область контакта дендрита с пресинаптической частью или “пресинаптическим бутонном” аксона, содержит везикулы с нейротрансмиттером, выделение которых в синаптическую щель активирует постсинаптическую мембрану, например мембрану шипика.

Дендритные шипики были открыты более 100 лет назад. Какую функцию выполняет дендрит? Почему существует большое разнообразие дендритов? Почему дендриты имеют сложную форму? Зачем на поверхности дендритов выявляются сложные по форме шипики? С. Рамон-и-Кахал [52] стал первым исследователем, который попытался ответить на эти и другие вопросы. За прошедшее столетие с использованием различных методов световой и электронной микроскопии о дендритных шипиках был накоплен большой материал, однако до сих пор многие аспекты организации, генезиса и непосредственно функционирования шипиков остаются неясными.

В последние годы дендритным шипикам посвящается все большее число работ [2, 3, 11, 13–19, 23–25, 27–31, 33–35, 38, 41, 45–50, 55, 56, 61–70, 72, 74–77].

В конце 70-х годов А. Петерс и И. Кайзерман-Абрамов [47], обобщив данные, полученные методами световой и электронной микроскопии, предложили относительно простую классификацию шипиков, выделив три основные категории: 1) тонкие шипики (*thin spines*), у которых длина шипиков превышает их диаметр; 2) грибовидные шипики (*mushroom spines*), имеющие длинную или

короткую “ножку” с большой головкой; 3) пеньковые шипики (*stubby spines*), у которых длина и диаметр практически совпадают. Во многих исследованиях согласно этой классификации выделяют четыре категории синапсов: 1) тонкие; 2) грибовидные; 3) пеньковые и 4) ствольные синапсы (*shaft synapses*), когда пресинаптический бутон контактирует непосредственно с дендритным стволом. Позднее [58] была предложена пятая категория, так называемые разветвленные шипики (*branched spines*), представленные двумя тонкими шипиками, сидящими на одной ножке. Иногда используется и более простая классификация [35], 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 ствольным синапсам) и “аксо-шипиковые” в связи с тем, что в ЦНС существуют нейроны, дендриты которых образуют уникальные шипики; например, дендриты пирамидных нейронов в CA3 / CA4 и частично в CA2 полях гиппокампа наряду с обычными категориями шипиков образуют так называемые колючие шипики (*thorny excrescences*) [13, 54].

На дендритах клеток Пуркинье мозжечка присутствует относительно гомогенная по форме популяция шипиков, которые можно условно отнести к категории грибовидных [67].

На поверхности шипиков часто выявляются тонкие выросты постсинаптической мембраны, так называемые иголки (*spinules*), глубоко проникающие внутрь пресинаптического бутона. Имеются данные [61, 62], что подобные “иголки” могут присутствовать как в области постсинаптических уплотнений (ПСУ), так и по периферии головок шипиков. Возможная функция “иголочек” 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 [23, 25], однако пока не приведено экспериментальных фактов, подтверждающих эту роль “иголочек” в синаптической передаче [61]. Отметим, что в состоянии холодового оцепенения суслика, когда электрическая активность мозга минимальна, “иголки”, проникающие внутрь пресинаптического бутона, можно встретить и на поверхности дендритного ствола [2, 3].

Особым образованием являются “филоподии” (*filopodia*), которые представляют собой заполненные актиновыми микрофиламентами тонкие, до 10 мкм длиной выросты дендритной мембраны [58]. Филоподии играют важную роль в образовании новых шипиков [15, 18, 21, 41, 55, 56, 60, 76, 77]. В поле CA1 гиппокампа крыс *in vivo* показано

[18], что филоподии образуются на поверхности дендритов в первые две недели постнатального периода и обеспечивают поиск пресинаптических бутонов с образованием новых ПСУ с последующим переходом филоподий в “протошипики” с формированием, в конечном итоге, новых тонких шипиков. В исследованиях [18, 36, 39, 68] предполагается, что в росте и ретракции (втягивании) филоподий при их переходе в шипики активное участие принимает цитоскелет, основным компонентом которого является актин [20, 60]. Как показал детальный электронно-микроскопический анализ филоподий в постнатальном развитии синапсов поля CA1 гиппокампа крысы [18], в первые две недели после рождения филоподии являются промежуточным звеном в формировании новых (*de novo*) дендритных шипиков. В этой связи основная парадигма нейробиологии – активный поиск аксоном (эфферентными волокнами) “мишени” – дополняется новым утверждением, что дендриты также способны “искать” аксоны. Известны уникальные случаи присутствия у мутантных линий мышей шипиков с ПСУ на дендритах клеток Пуркинье мозжечка при отсутствии гранулярных клеток, которые в норме образуют пресинаптические бутоны [64]. Есть также данные [7], что введение в желудочки мозга субстанции Р не влияло на дендритные шипики клеток Пуркинье, которые содержали ПСУ в отсутствие контактов с пресинаптическими бутонами параллельных волокон гранулярных клеток. Филоподии обычно редко видны на дендритах зрелых нейронов в нормальном мозге, однако в органо-типических культурах и культурах изолированных нейронов они легко идентифицируются методами электронной и конфокальной микроскопии [16, 41, 55, 56, 76]. Имеются данные [4] и о способности аксона образовывать структуры, подобные дендритным шипикам.

Отметим, что любые модификации или образование новых синапсов прямо связаны как с белками постсинаптических уплотнений [32, 36, 40, 55], так и рецепторами и каналами, обеспечивающими синаптическую передачу и требующими постоянного обновления, важную роль при этом играет толщина ножки шипика [68].

Изменения в цитоскелете дендритного шипика прямо связывают с изменениями в белках ПСУ, присутствие которых является единственным надежным критерием идентификации синапсов на электронно-микроскопическом уровне. Существуют два основных типа ПСУ: 1) асимметричные и 2) симметричные; симметричные ПСУ тоньше асимметричных. Возле асимметричных ПСУ в пресинаптической части синапса располагаются пресинаптические пузырьки (везикулы) округлой формы, обычно имеющие диаметр около 30–50 нм, а для симметричных ПСУ характерно присутствие уплощенных по форме (овальных) везикул.

Предполагается [8, 12, 48], что возле асимметричных ПСУ пресинаптические везикулы обычно содержат возбуждающий нейротрансмиттер/медиатор глутамат, тогда как везикулы возле симметричных ПСУ содержат тормозные нейротрансмиттеры: гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) или глицин, а также нейромодуляторные пептиды.

При анализе трехмерных (3D) реконструкций ПСУ на серийных ультратонких срезах обычно выделяют три основных категории: 1) “пятнистые” ПСУ (macular postsynaptic densities); 2) “перфорированные” ПСУ (perforated postsynaptic densities) и 3) “сегментированные” (segmented postsynaptic densities) [12, 16, 17, 22–24, 37, 56, 59–61, 63, 64]. Пятнистые ПСУ обычно локализуются на относительно маленьких шипиках, имеют округлую форму и 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.

Зимняя спячка якутского суслика *Citellus undulatus* представляет собой уникальную модель для исследования синапсов. У зимоспящих животных биоэлектрическая активность, например неокортекса, подавлена уже при температуре мозга ниже 20°C; в структуре же лимбического комплекса и в глубокой спячке при температуре мозга ниже 7°C регистрируется регулярная активность. Гиппокамп, ключевая структура лимбического комплекса, играет особую роль в процессах гистерезиса, являясь своеобразным “сторожевым пунктом” контроля ЦНС за ходом протекания спячки. Взаимное торможение гиппокампа и ретикулярной активирующей системы функционирует по принципу положительной обратной связи, ускоряя вход в спячку и выход из этого состояния [9, 32, 40, 59]. Зимняя спячка сусликов не является непрерывным процессом, а состоит из последовательности циклов (баутов), продолжительностью от 1 до 3–4 недель, с относительно кратковременными – до 1 сут – периодическими пробуждениями. Бауты в экспериментальных условиях достаточно просто контролируются [51].

В процессе зимней спячки можно получить *in vivo* два альтернативных функциональных состояния нервной ткани: 1) нормотермия, когда функционирование нервной системы сусликов мало отличается от таковой у обычных теплокровных, например у крыс; 2) холодное оцепенение, когда температура мозга у животных может падать до 1–6°C, что связано с практически полным подавлением синаптической активности [2, 25, 32, 48–50]. Суслик, извлеченный из гнезда в состоянии холодного оцепенения, при комнатной температуре пробуждается, что дает возможность получить полный набор состояний активации синап-

сов в процессе разогрева мозга. В состоянии холодового оцепенения происходит переход ядрышка в неактивное состояние; распад свободных и мембранно-связанных полирибосом до отдельных субъединиц; разборка аппарата Гольджи и ретракция дендритных шипиков. И уже через 2.5 ч после начала пробуждения происходит восстановление белок-синтезирующего аппарата и дендритных шипиков [2, 26, 49–51]. В отличие от эстроген-регулируемой ретракции дендритных шипиков в эструсе у крыс [74, 75] обратимая ретракция шипиков у сусликов связана с другими, пока мало изученными механизмами. Удивительная особенность зимоспящих – большой размах колебаний функционирования систем жизнедеятельности организма – делает этих животных уникальной моделью для изучения пластичности, например центральной нервной системы, в частности процессов обучения, памяти и забывания [43].

Ранее было показано [26, 49–51], что вход суслика из нормотермии в состояние холодового оцепенения сопровождается ретракцией дендритных шипиков пирамидных нейронов поля СА3. Через 2.5 ч после начала пробуждения из гибернации происходит восстановление шипиков. Эти результаты впервые продемонстрировали скорость процессов изменения *in vivo* [49–51].

В центральной нервной системе обычно выделяют три типа дендритов: 1) дендриты покрытые шипиками (spiny dendrites); 2) дендриты редко покрытые шипиками (sparse spiny dendrites) и 3) дендриты без шипиков или гладкие дендриты (non-spiny dendrites) [47, 48]. Тип 1 и 2 на светомикроскопическом уровне часто трудно различить как из-за малого размера шипиков, так и из-за большой вариабельности числа шипиков на различных участках протяженных дендритов.

Известно [28–31, 45, 63, 65, 69], что в дендроплазме и в шипиках локализуются полирибосомы. В последнее время широко обсуждаются два возможных варианта обновления и рециклинга “мембранных” синаптических белков. Согласно [69] синтез цитоскелетных белков постсинаптических уплотнений локализован непосредственно на полирибосомах в дендритных шипиках; в нейронах существует механизм, в соответствии с которым вновь синтезируемая м-РНК направленно “двигается” к активным синапсам, где обеспечивает локальный синтез синаптических белков. Рассматривается роль “раннего” гена “Arc” (activity-regulated cytoskeleton-associated protein), который регулирует активность нейронов подобно другим “ранним” генам [69], причем экспрессия “Arc”-гена, доставка м-РНК в дендриты и синтез белков происходят в течение нескольких часов после тетанической стимуляции, что практически совпадает со временем синтеза как синаптических белков, так и с синаптической модификацией, главным образом белков

ПСУ. Эти данные хорошо согласуются с возможностью синтеза на свободных полирибосомах цитозоль-растворимых белков ПСУ, которые не требуют шероховатого эндоплазматического ретикулума, последующего их “созревания” и выхода из транс-компартамента аппарата Гольджи [42].

В последние годы разработаны уникальные методы прижизненного исследования дендритных шипиков. Одним из таких методов является локальная суперфузия в пирамидные нейроны поля СА1 в органотипических культурах гиппокампа флуоресцентного красителя кальцеина с последующим получением трехмерных изображений с помощью двухфотонного лазерного сканирующего конфокального микроскопа [16]. Было показано, что индукция длительной потенциации (long-term potentiation) [10], в противоположность ее блокировке, вызывает достоверное увеличение числа новых шипиков [16]. Другим методом прижизненного исследования поведения дендритных шипиков является экспрессия гена GFP белка в нейронах. В исследовании [41] в качестве вектора, несущего ген GFP, был использован нейротропный рекомбинантный оболочечный РНК-содержащий вирус Синдбис, которым заражали СА1-пирамидные нейроны в органотипической культуре срезов гиппокампа. Концентрация вирусов подбиралась из расчета инфицирования от 1 до 10 нейронов на слайс. Было установлено, что инфицированные нейроны сохраняли активность в течение по крайней мере 3 дней. При этом использовали гиппокамп крыс на 7-й 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 возникают филоподии 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 работы [16] по суперфузии нейронов с помощью флуоресцентных красителей.

Наряду с таким бесспорным достоинством, как возможность прижизненного исследования субклеточных структур, существенным недостатком любого светомикроскопического метода является относительно низкая разрешающая способность, которая теоретически не может быть больше половины длины волны используемого света. Даже в лучшем случае, при использовании специальных компьютерных программ в двухфотонной лазерной конфокальной микроскопии разрешение принци-

пиально не может превышать 300–400 нм. В электронной же микроскопии при использовании метода ультратонких срезов разрешение обычно лучше 2–3 нм. Возможные артефакты при химической фиксации образцов мозга могут быть устранены параллельным использованием криофиксации и криоультратомии быстро замороженной нервной ткани.

Необходимо отметить, что пока неясно, какую роль играют в синаптической передаче как синапсы каждой из четырех категорий, так и изменения в их морфологии [55, 56]. В равной мере этот вопрос относится и к ПСУ. Последние в силу их малых размеров практически нельзя исследовать светомикроскопическими методами. Кроме того, наряду с чисто техническими проблемами при исследованиях как переживающих, так и культивируемых слайсов с применением одно- и двухфотонной сканирующей лазерной микроскопии анализ дендритных шипиков обычно проводится только в поверхностном слое гиппокампа на глубине 25–75 мкм, который находится вблизи зоны повреждения при их приготовлении [76]. Следовательно, нейроны, на дендритах которых анализируются шипики, подвержены воздействию 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; во-вторых, при изоляции клеток из интактной ткани нейроны теряют аксоны и дендриты, и такие клетки имеют округлую форму в культуральной среде. Хотя в течение 1-й недели культивирования формируются синапсы между соседними нейронами, но при этом крайне сложно бывает определить происхождение исследуемого нейрона. 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 [15, 60, 77]. Имеются данные о том, что в обычно используемых переживающих срезах гиппокампа также идет синаптогенез [28, 38, 55, 56, 61–63, 76]. 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 [11]. Кроме того, оказалось, что на 5-й день культивирования объем шипиков значительно превышал соответствующий параметр *in vivo* на 5-й постнатальный день. Таким образом, трудно соотнести данные по изменению синапсов, полученные *in vitro*, с тем, что происходит *in vivo*.

Наши данные позволяют оценить пластические изменения, происходящие в шипиковом аппа-

рате *in vivo*, на примере генерализованных перестроек в мозге зимнеящих животных. Для их анализа использовали серийные ультратонкие срезы (более 100 срезов на серию), которые изучались в электронном микроскопе с последующей обработкой полученных микрофотографий с помощью компьютерных методов. На рис. 1 представлена серия из восьми микрофотографий синапсов поля CA1 гиппокампа суслика через 2.5 ч после начала пробуждения (по достижении температуры мозга 32–34°C) от зимней спячки (температура мозга 1–6°C). Это состояние было выбрано не случайно, так как при выходе суслика из холодового оцепенения происходит активация практически всех процессов в мозге. Следовательно, это состояние представляет собой модель “активных синапсов”. Только благодаря серийным срезам можно выявить реальное расположение и трехмерную организацию различных синаптических структур и глиальных отростков. Так, на основании анализа серии микрофотографий, отдельные образцы которой представлены на рис. 1, можно выявить пять шипиков, разделенных расстояниями, не превышающими 15 нм. Эти шипики образуют синапсы с четырьмя аксонами, между которыми расстояния также не превышают 15 нм. Этот факт не может быть объяснен с классической точки зрения на электрические свойства мембраны аксона, поскольку на таких расстояниях эти отростки должны испытывать взаимные влияния, тогда как пассивные свойства мембраны дендритов не накладывают ограничений на их сближение. Близкое расположение аксонов и дендритных шипиков может быть также важным с позиции гипотезы “spillover” – “избытка” нейротрансмиттера, когда нейротрансмиттер способен диффундировать по межклеточному пространству и активировать соседние синапсы [53]. Анализ серийных срезов на рис. 1 выявляет тесное расположение астроглиальных отростков возле дендритных шипиков и аксонов.

В последние годы активно обсуждается роль в механизмах памяти пресинаптических бутонов, образующих синапсы с двумя и более дендритными шипиками, так называемые multiple-synapse boutons [3, 24, 58, 72]. Логично было ожидать, что при выходе из состояния холодового оцепенения активация синаптической передачи могла бы также сопровождаться образованием множественных синапсов на пресинаптических бутонах. Однако сравнительный анализ трехмерных реконструкций аксонов и дендритных шипиков в состоянии нормотермии и холодового оцепенения сусликов показал, что такие множественные синапсы на аксонах выявляются во всех состояниях гибернирующего животного. Более того, проведенный нами анализ показал, что множественные синапсы могут быть выявлены и на дендритных шипиках (рис. 2).

На рис. 2,а показаны восемь серийных срезов грибовидного шипика и двух контактирующих с

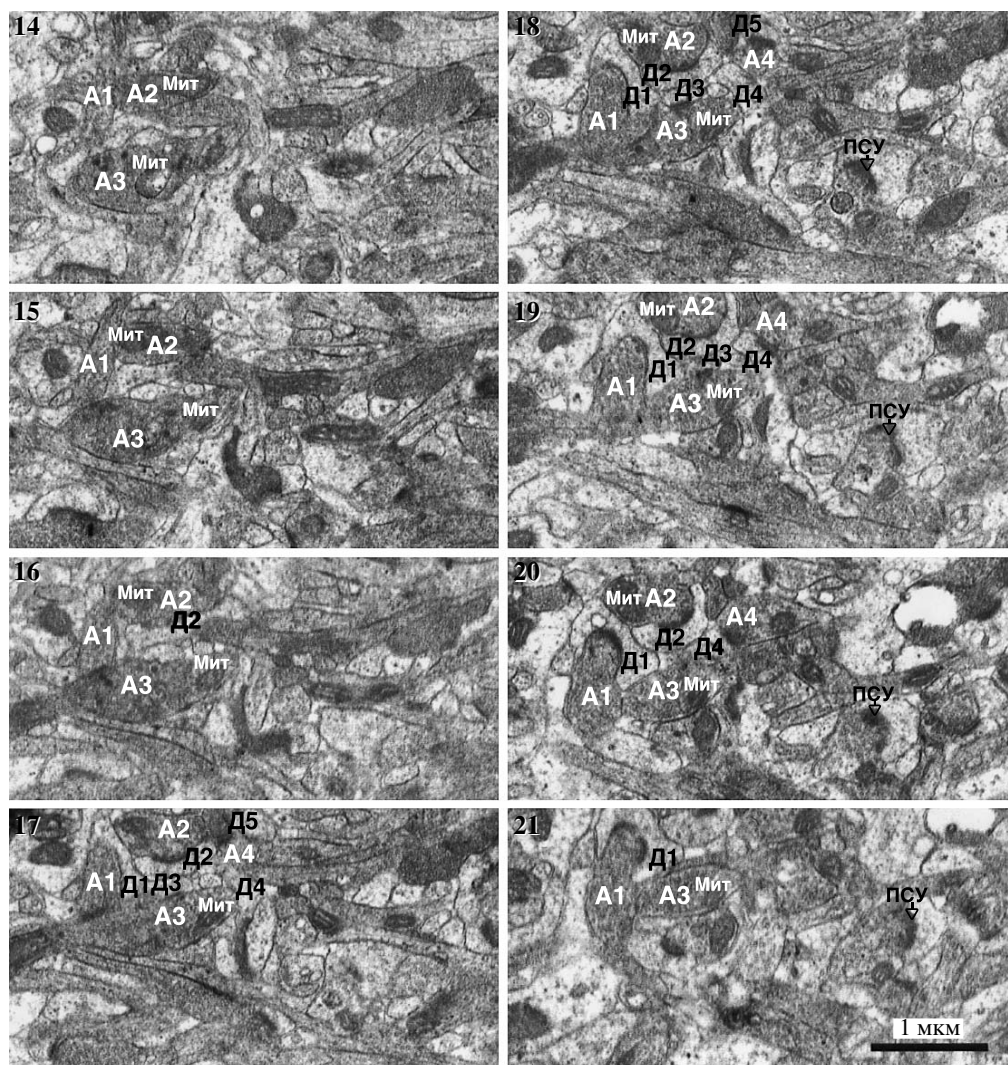


Рис. 1. 8 серийных срезов после “выравнивания”, показывающих ультраструктуру нейропиля поля CA1 гиппокампа суслика через 2.5 ч после начала пробуждения из состояния холодового оцепенения. Детально метод описан в работах [19, 51]. A1, A2, A3, A4 – пресинаптические бутоны четырех независимых аксонов; D1, D2, D3, D4, D5 – дендритные шипики; Мит – митохондрии; ПСУ – постсинаптические уплотнения; цифры показывают последовательность микрофотографий данной серии. Шкала = 1 мкм.

ними аксонов. Трехмерные реконструкции этих двух аксонов и контактирующих с ними дендритных шипиков показаны на рис. 2, б. Видно, что аксон 1 образует синапсы с тремя дендритными шипиками, из которых два грибовидные и один тонкий. Аксон 2 образует два синапса: с грибовидным и тонким шипиками. Трехмерная организация всех этих шипиков отдельно показана на рис. 2, в. На рис. 2, г показано, что пресинаптические бутоны содержат популяции отдельных митохондрий. Известно [58], что в пресинаптических бутонах митохондрии могут и отсутствовать. На рис. 2, д показана трехмерная организация трех типов ПСУ: перфорированное, сегментированное и пятнистое. На рис. 2, е представлена стереопара грибовидного шипика, образующего два синапса с двумя аксонами.

Представленные результаты прямо говорят о том, что как дендритный шипик, так и аксон способны образовывать более чем один синапс [2, 3]. Другими словами, представления о том, что один шипик – один синапс сменяются новой парадигмой о присутствии на шипике нескольких синапсов.

Основные два компонента нервной системы – нейроны и глия – взаимодействуют посредством целевых контактов, так называемых электрических синапсов, и других механизмов, включенных в контроль поведения, памяти и забывания, включая и процессы мышления. В этой связи нейроинформатика представляет ряд современных информационных технологий для исследования различных уровней работы нервной системы. В нее включается комплекс компьютерных программ

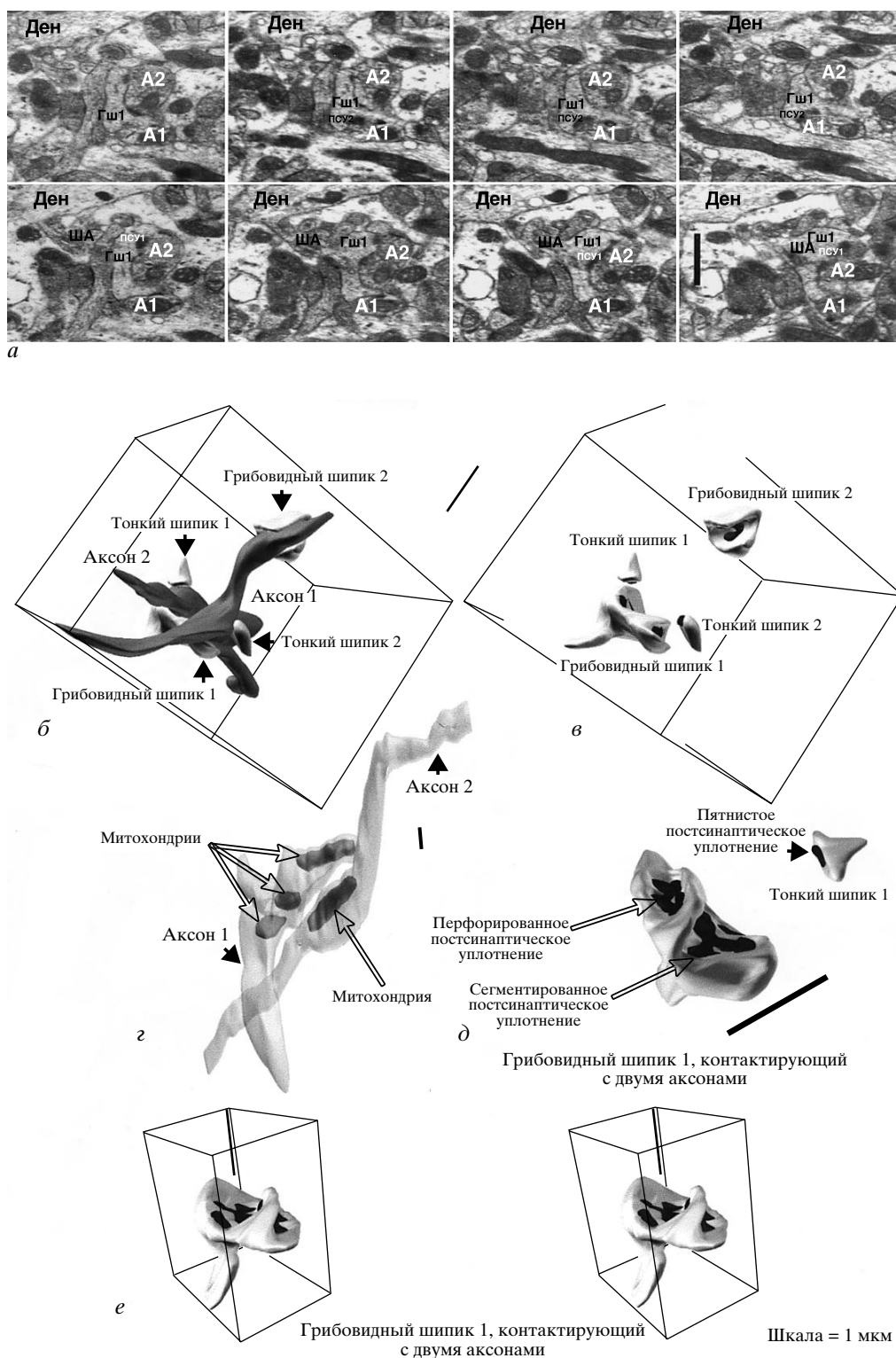


Рис. 2. Трехмерная реконструкция грибовидного шипика в поле CA1 гиппокампа суслика. Шипик образует одновременно синапсы с двумя аксонами. Каждый из аксонов также образует множественные синапсы с дендритными шипиками. а – 8 микрофотографий из серии, состоящей из 74 срезов, которые были использованы для трехмерной реконструкции, А1, А2 – аксоны; Ден – дендрит, на котором локализован грибовидный шипик (Гш1) с перфорированным и сегментированным постсинаптическими уплотнениями (соответственно ПСУ1 и ПСУ2); ША – шипиковый аппарат; б – трехмерная реконструкция аксонов и дендритных шипиков; в – трехмерная реконструкция дендритных шипиков, образующих синапсы с двумя аксонами; г – трехмерная реконструкция аксонов и митохондрий; д – трехмерная реконструкция трех типов постсинаптических уплотнений; е – стереопара грибовидного шипика с постсинаптическими уплотнениями. Шкала = 1 мкм.

для проведения количественного стереологического анализа синаптических структур и их реконструкции. К сожалению, количественный анализ и моделирование различных субклеточных структур на основе одиночных срезов приводят к недоразумениям, поскольку допускают грубую ошибку [14]. В работах [14, 19, 28, 61–63, 73] подробно обосновывается значение как непредвзятого количественного стереологического анализа, так и необходимость 3D-реконструкций. В последние годы разработаны относительно простые и всем доступные программы для 3D-реконструкций на базе IBM PC, позволяющие создавать не только объемные модели, но и одновременно оценивать их количественные параметры, например площадь поверхности исследуемых структур и их объем [19].

Получение серийных изображений с одной и той же идентифицированной области гиппокампа – это только один из промежуточных этапов получения трехмерных реконструкций. Следующим этапом является выстраивание (alignment) изображений. Для выравнивания электронно-микроскопических изображений, снятых с одной и той же области дендрита на разных срезах, использовалась компьютерная программа “Alignment”; для генерации 3D-изображений в формате wrl/vrml строились контуры каждой структуры в программе “Tracer” [19], которые далее трансформировались в raw-формат и в коммерческой программе “3D View Actify” собирались в общую модель, пример которой дан на рис. 2.

Нами также разработан собственный пакет программ как для выравнивания и построения сглаженных 3D-объектов, так и для количественного анализа исследуемых структур и расстояний между ними. Этот пакет программ относительно прост в использовании и адаптирован к IBM PC, начиная с Pentium 2 и выше. Данный пакет обладает более широкими возможностями по сравнению с ранее используемыми программами для 3D-реконструкций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важную роль в работе мозга играет химический синапс, включающий пресинаптический бутон с нейротрансммитерами и постсинаптическую часть, представленную дендритным шипиком. В гиппокампе самыми крупными шипиками являются грибовидные, которые содержат свободные полирибосомы, вероятно, обеспечивающие обновление синапсов. Существенно, что тонкие шипики способны к ретракции с переходом в пеньковые шипики и далее в ствольные 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.

Парадигма: “один шипик – один синапс” в настоящее время, благодаря использованию серийных ультратонких срезов и трехмерных реконструкций, сменяется альтернативой присутствия на одном грибовидном шипике нескольких синапсов. Примеры контактов нескольких (до 5) пресинаптических бутонов мшистых волокон нами также обнаружены и на “колючих шишках” дендритов пирамидных нейронов из полей CA2-CA3-CA4 гиппокампа [2]. 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 популяции грибовидных шипиков, тогда как число грибовидных шипиков в поле CA1 гиппокампа крысы и суслика обычно составляет около 12–14% от всей популяции синапсов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 02-04-48890, 02-04-48877, 03-04-48747) и The Leverhulme Trust grant (F00269G).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Виноградова О.С.* Нейронаука конца второго тысячелетия: смена парадигм // Журн. высш. нерв. деят. 2000. Т. 50. № 5. С. 743–774.
2. *Попов В.И., Медведев Н.И., Патрушев И.В., Рогачевский В.В., Краев И.В., Клименко О.А., Игнатъев Д.А., Хуцян С.С., Stewart M.G.* Количественный стереологический анализ и 3D реконструкции аксо-дендритных синапсов гиппокампа крысы и суслика в зависимости от эффективности синаптической передачи // Колосовские чтения, IV Межд. конф. РАН по функциональной нейроморфологии. Санкт-Петербург, 2002. С. 230–231.
3. *Попов В.И., Медведев Н.И., Рогачевский В.В., Игнатъев Д.А., Стюарт М.Г., Фесенко Е.Е.* Трехмерная организация синапсов и астроглии в гиппокампе крыс и сусликов: новые структурно-функциональные парадигмы работы синапса // Биофизика. 2003. Т. 48. № 2. С. 289–308.
4. *Anderson J.C., Martin K.A.* Does bouton morphology optimize axon length? // Nature Neurosci. 2001. V. 4. № 12. P. 1166–1167.
5. *Bailey C.H., Giustetto M., Huang Y.Y., Hawkins R.D., Kandel E.R.* Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing Hebbian plasticity and memory? // Nature Rev. Neurosci. 2000. V. 1. № 1. P. 11–20.
6. *Bailey C.H., Kandel E.R.* Structural changes accompanying memory storage // Ann. Rev. Physiol. 1993. V. 55. P. 397–426.
7. *Baloyannis S.J., Costa V., Deretzi G.* Intraventricular administration of substance P induces unattached Purkinje

- cell dendritic spines in rats // *Int. J. Neurosci.* 1992. V. 62. № 3–4. P. 251–262.
8. *Beaulieu C., Colonnier M.* A laminar analysis of the number of round-asymmetrical and flat-symmetrical synapses on spines, dendritic trunks, and cell bodies in area 17 of the cat // *J. Comp. Neurol.* 1985. V. 231. № 2. P. 180–189.
 9. *Beckman A.L., Lladó-Eckman C., Stanton T.L., Adler M.W.* Differential effect of environmental temperature on morphine physical dependence and abstinence // *Life Sci.* 1982. V. 30. № 12. P. 1013–1020.
 10. *Bliss T.V., Lomo T.* Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path // *J. Physiol.* 1973. V. 232. № 2. P. 331–356.
 11. *Boyer C., Schikorski T., Stevens C.F.* Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain // *J. Neurosci.* 1998. V. 18. № 14. P. 5294–5300.
 12. *Chan-Palay V.* A new synaptic specialization: filamentous braids // *Brain Res.* 1974. V. 79. № 2. P. 280–284.
 13. *Chicurel M.E., Harris K.M.* Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus // *J. Comp. Neurol.* 1992. V. 325. № 2. P. 69–82.
 14. *Coggeshall R.E., Lekan H.A.* Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review // *J. Comp. Neurol.* 1996. V. 364. № 1. P. 6–15.
 15. *Dailey M.E., Smith S.J.* The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices // *J. Neurosci.* 1996. V. 16. № 9. P. 2983–2994.
 16. *Engert F., Bonhoeffer T.* Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity // *Nature.* 1999. V. 399. № 6731. P. 66–70.
 17. *Fiala J.C., Allwardt B., Harris K.M.* Dendritic spines do not split during hippocampal LTP or maturation // *Nature Neurosci.* 2002. V. 5. № 4. P. 297–298.
 18. *Fiala J.C., Feinberg M., Popov V., Harris K.M.* Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1 // *J. Neurosci.* 1998. V. 18. № 21. P. 8900–8911.
 19. *Fiala J.C., Harris K.M.* Extending unbiased stereology of brain ultrastructure to three-dimensional volumes // *J. Am. Med. Inform. Assoc.* 2001. V. 8. № 1. P. 1–16.
 20. *Fifkova E.* Actin in the nervous system // *Brain Res.* 1985. V. 356. № 2. P. 187–215.
 21. *Fischer M., Kaech S., Knutti D., Matus A.* Rapid actin-based plasticity in dendritic spines // *Neuron.* 1998. V. 20. № 5. P. 847–854.
 22. *Foster M.* A Textbook of Physiology. N.Y.: The Mac-Millan Co, 1897. P. 929.
 23. *Geinisman Y.* Perforated axospinous synapses with multiple, completely partitioned transmission zones: probable structural intermediates in synaptic plasticity // *Hippocampus.* 1993. V. 3. № 4. P. 417–433.
 24. *Geinisman Y., Berry R.W., Disterhoft J.F., Power J.M., Van der Zee E.A.* Associative learning elicits the formation of multiple-synapse boutons // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 15. P. 5568–5573.
 25. *Geinisman Y., de Toledo-Morrell L., Morrell F.* Induction of long-term potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities // *Brain Res.* 1991. V. 566. № 1–2. P. 77–88.
 26. *Gordon R.Y., Bocharova L.S., Kruman I.I., Popov V.I., Kazantsev A.P., Khutzhian S.S., Karnaukhov V.N.* Acridine orange as an indicator of the cytoplasmic ribosome state // *Cytometry.* 1997. V. 29. № 3. C. 215–221.
 27. *Harris K.M.* Calcium from internal stores modifies dendritic spine shape // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 22. P. 12213–12215.
 28. *Harris K.M.* Structure, development, and plasticity of dendritic spines // *Curr. Opin. Neurobiol.* 1999. V. 9. № 3. P. 343–448.
 29. *Harris K.M., Jensen F.E., Tsao B.* Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation // *J. Neurosci.* 1992. V. 12. № 7. P. 2685–2705.
 30. *Harris K.M., Kater S.B.* Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function // *Ann. Rev. Neurosci.* 1994. V. 17. P. 341–371.
 31. *Harris K.M., Stevens J.K.* Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics // *J. Neurosci.* 1988. V. 8. № 12. P. 4455–4469.
 32. *Heller H.C.* Hibernation: neural aspects // *Ann. Rev. Physiol.* 1979. V. 41. P. 305–321.
 33. *Hering H., Sheng M.* Dendritic spines: structure, dynamics and regulation // *Nature Rev. Neurosci.* 2001. V. 2. № 12. P. 880–888.
 34. *Horner C.H.* Plasticity of the dendritic spine // *Prog. Neurobiol.* 1993. V. 41. № 3. P. 281–321.
 35. *Jones E.G., Powell T.P.* Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex // *J. Cell Sci.* 1969. V. 5. № 2. P. 509–529.
 36. *Kaech S., Parmar H., Roelandse M., Bornmann C., Matus A.* Cytoskeletal microdifferentiation: a mechanism for organizing morphological plasticity in dendrites // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 13. P. 7086–7092.
 37. *Kennedy M.B.* The postsynaptic density at glutamatergic synapses // *Trends Neurosci.* 1997. V. 20. № 6. P. 264–268.
 38. *Kirov S.A., Harris K.M.* Dendrites are more spiny on mature hippocampal neurons when synapses are inactivated // *Nat. Neurosci.* 1999. V. 2. № 10. P. 878–883.
 39. *Krucker T., Siggins G.R., Halpain S.* Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 12. P. 6856–6861.
 40. *Lyman C.P., Willis J.S., Malan A., Wang L.C.H.* Hibernation and Torpor in Mammals and Birds. N. Y.: Acad. Press, 1982.
 41. *Maletic-Savatic M., Malinow R., Svoboda K.* Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity // *Science.* 1999. V. 283. № 5409. P. 1923–1927.
 42. *Marrs G.S., Green S.H., Dailey M.E.* Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites // *Nat. Neurosci.* 2001. V. 4. № 10. P. 1006–1013.

43. Mihailovic L., Petrovic-Minic B., Protic S., Divac I. Effects of hibernation on learning and retention // *Nature*. 1968. V. 218. № 137. P. 191–192.
44. Murray J.A.H., Bradley H., Craigie W.A., Onion C.T. *A New English Dictionary on Historical Principles*. Oxford: Clarendon Press, 1919.
45. Ostroff L., Fiala J., Allwardt B., Harris K. Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices // *Neuron*. 2002. V. 35. № 3. P. 535.
46. Peters A., Jones E.G. (eds). *Cerebellar Cortex. Volume 1: Cellular Components of the cerebral cortex*. N.Y.: Plenum Press, 1984.
47. Peters A., Kaiserman-Abramof I.R. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines // *Am. J. Anat.* 1970. V. 127. № 4. P. 321–355.
48. Peters A., Palay S.L. The morphology of synapses // *J. Neurocytol.* 1996. V. 25. № 12. P. 687–700.
49. Popov V.I., Bocharova L.S. Hibernation-induced structural changes in synaptic contacts between mossy fibers and hippocampal pyramidal neurons // *Neuroscience*. 1992. V. 48. № 1. P. 53–60.
50. Popov V.I., Bocharova L.S., Bragin A.G. Repeated changes of dendritic morphology in the hippocampus of ground squirrels in the course of hibernation // *Neuroscience*. 1992. V. 48. № 1. P. 45–51.
51. Popov V.I., Ignat'ev D.A., Lindemann B. Ultrastructure of taste receptor cells in active and hibernating ground squirrels // *J. Electron Microsc.* (Tokyo). 1999. V. 48. № 6. P. 957–969.
52. Ramon-y-Cajal S. *Histology of Nervous System of Man and Vertebrates* (English translation by N. Swanson and L.W. Swanson). Oxford: Oxford Univ. Press, 1995.
53. Rusakov D.A., Kullmann D.M. Geometric and viscous components of the tortuosity of the extracellular space in the brain // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. № 15. P. 8975–8980.
54. Sandi C., Davies H.A., Cordero M.I., Rodrigues J.J., Popov V.I., Stewart M.G. Rapid reversal of stress induced loss of synapses in CA3 of rat hippocampus following water maize training // *Eur. J. Neurosci.* 2003. V. 17. P. 1–10.
55. Segal M. Rapid plasticity of dendritic spine: hints to possible functions? // *Prog. Neurobiol.* 2001 V. 63. № 1. P. 61–70.
56. Segal M., Andersen P. Dendritic spines shaped by synaptic activity // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000. V. 10. № 5. P. 582–586.
57. Sheng M. Molecular organization of the postsynaptic specialization // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 13. P. 7058–7061.
58. Shepherd G.M., Harris K.M. Three-dimensional structure and composition of CA3-CA1 axons in rat hippocampal slices: implications for presynaptic connectivity and compartmentalization // *J. Neurosci.* 1998. V. 18. № 20. P. 8300–8310.
59. Shtark M.B. *The Brain of Hibernators*. Novosibirsk: Nauka, 1970. NASA Tech. Trans. TTF-619 (1972)
60. Smith S.J. Neuronal cytomechanics: the actin-based motility of growth cones // *Science*. 1988. V. 242. № 4879. P. 708–715.
61. Sorra K.E., Fiala J.C., Harris K.M. Critical assessment of the involvement of perforations, spinules, and spine branching in hippocampal synapse formation // *J. Comp. Neurol.* 1998. V. 398. № 2. P. 225–240.
62. Sorra K.E., Harris K.M. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines // *Hippocampus*. 2000. V. 10. № 5. P. 501–511.
63. Sorra K.E., Harris K.M. Stability in synapse number and size at 2 hr after long-term potentiation in hippocampal area CA1 // *J. Neurosci.* 1998. V. 18. № 2. P. 658–671.
64. Sotelo C. Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice // *J. Exp. Biol.* 1990. V. 153. P. 225–249.
65. Spacek J., Harris K.M. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. № 1. P. 190–203.
66. Spacek J., Harris K.M. Three-dimensional organization of cell adhesion junctions at synapses and dendritic spines in area CA1 of the rat hippocampus // *J. Comp. Neurol.* 1998. V. 393. № 1. P. 58–68.
67. Spacek J., Hartmann M. Three-dimensional analysis of dendritic spines. I. Quantitative observations related to dendritic spine and synaptic morphology in cerebral and cerebellar cortices // *Anat. Embryol. (Berl)*. 1983. V. 167. № 2. P. 289–310.
68. Star E.N., Kwiatkowski D.J., Murthy V.N. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity // *Nat. Neurosci.* 2002. V. 5. № 3. P. 239–246.
69. Steward O., Schuman E.M. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites // *Ann. Rev. Neurosci.* 2001. V. 24. P. 299–325.
70. Svoboda K., Tank D.W., Denk W. Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts // *Science*. 1996. V. 272. № 5262. P. 716–719.
71. Tanzi E. I fatti e le induzioni nell'odierna istologia del sistema nervoso // *Riv. Sper. Freniatr.* 1893. V. 19. P. 419–472.
72. Toni N., Buchs P.A., Nikonenko I., Bron C.R., Muller D. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite // *Nature*. 1999. V. 402. № 6760. P. 421–425.
73. West M.J. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias // *Trends Neurosci.* 1999. V. 22. № 2. P. 51–61.
74. Woolley C.S., McEwen B.S. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat // *J. Neurosci.* 1992. V. 12. № 7. P. 2549–2554.
75. Yankova M., Hart S.A., Woolley C.S. Estrogen increases synaptic connectivity between single presynaptic inputs and multiple postsynaptic CA1 pyramidal cells: a serial electron-microscopic study // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. № 6. P. 3525–3530.
76. Yuste R., Bonhoeffer T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity // *Ann. Rev. Neurosci.* 2001. V. 24. P. 1071–1089.
77. Ziv N.E., Smith S.J. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation // *Neuron*. 1996. V. 17. № 1. P. 91–102.