

УДК 576.354.46:578.085.23

Г. Х. Акопян, В. И. Погосян

**Формирование функциональных синаптических связей между нейронами мозжечка, коры головного мозга и красного ядра новорожденной крысы в органотипической культуре нервной ткани**

(Представлено академиком НАН Армении В. В. Фанарджяном 3/XII 1993)

Изучение закономерностей формирования синаптических связей мозга в процессе развития и в зрелом периоде—одна из наиболее актуальных проблем экспериментальной нейрофизиологии. Формирование новых синапсов, в частности, было показано на нейронах красного ядра в результате «спраутинга» кортикорубральных волокон при разрушении мозжечкового входа (<sup>1,2</sup>), перекрестной иннервации сгибателей и разгибателей передней конечности кошки (<sup>3</sup>), выработке двигательного условного рефлекса (<sup>4</sup>). Вместе с тем ряд вопросов, связанных с клеточными и молекулярными механизмами инициации роста волокон и синаптогенеза в красном ядре, остаются не выясненными.

Эффективным подходом к решению указанной проблемы может служить анализ формирования межнейронных связей в тканевых и клеточных культурах мозга. Целью настоящей работы явилось изучение возможности формирования функциональных синаптических связей между эксплантатами мозжечка, коры головного мозга и красного ядра новорожденной крысы при совместном культивировании.

Срезы мозжечка из сенсомоторной области коры головного мозга новорожденной крысы толщиной 400—500 мкм помещали на покрытое коллагеном покровное стекло по обе стороны от красного ядра на расстоянии 1 мм. Красное ядро извлекали из фронтальных срезов среднего мозга, заточенной иглой диаметром 750 мкм, что исключало наличие в эксплантатах нейронов соседних с красным ядром образований. Препараты культивировали методом вращающихся пробирок (<sup>5</sup>). Для проведения электрофизиологических экспериментов зрелые 14—21-дневные культуры помещали в проточную камеру, расположенную на столике инвертированного микроскопа. Внеклеточная регистрация потенциалов действия нейронов и электрическое раздражение осуществляли с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 2 М раствором хлорида натрия сопротивлением 2—5 МОм. Локальные раздражения наносили монополярно катодной электрической стимулирующей импульсами прямоугольного тока силой от 10 до 100 мкА длительностью 0,1—1 мсек. Сразу после проведения электрофизиологических экспериментов культуры фиксировали формалином и импрегнировали серебром по методу Бодяна в модификации Кима (<sup>6</sup>).

После прикрепления препаратов к коллагену, уже в первые сутки культивирования, формировалась зона роста, увеличение которой приво-

дло к распластыванию препаратов. Ко второй неделе культивирования распластывание достигало такой степени, что основные массы эксплантатов перекрывались. В некоторых случаях распластывание тканей мозжечка и коры головного мозга достигало такой степени, что их площадь в несколько раз превышала площадь эксплантируемых срезов, а четкие контуры структуры исчезали. Следует отметить, что распластывание эксплантатов красного ядра происходило в гораздо меньшей степени.

В препаратах, импрегнированных серебром в зоне роста, выявлялись одиночные или собранные в пучки тонкие нервные волокна, соединяющие эксплантаты между собой. В большинстве случаев удавалось проследить ход волокон, соединяющих основные массы эксплантатов. Однако метод серебряной импрегнации не дает возможности установить направленность аксонных связей, так как их концы терялись в более толстой части эксплантатов и были окружены сложными сплетениями волокон.

В центре эксплантатов красного ядра выявлялись группы нейронов с хорошо выраженными дендритами, простирающимися на значительное расстояние от сомы (рис. 1, А, Б). При большем увеличении хорошо видны тела клеток с расположенным в центре округлым ядром и ядрышком (рис. 1, В).

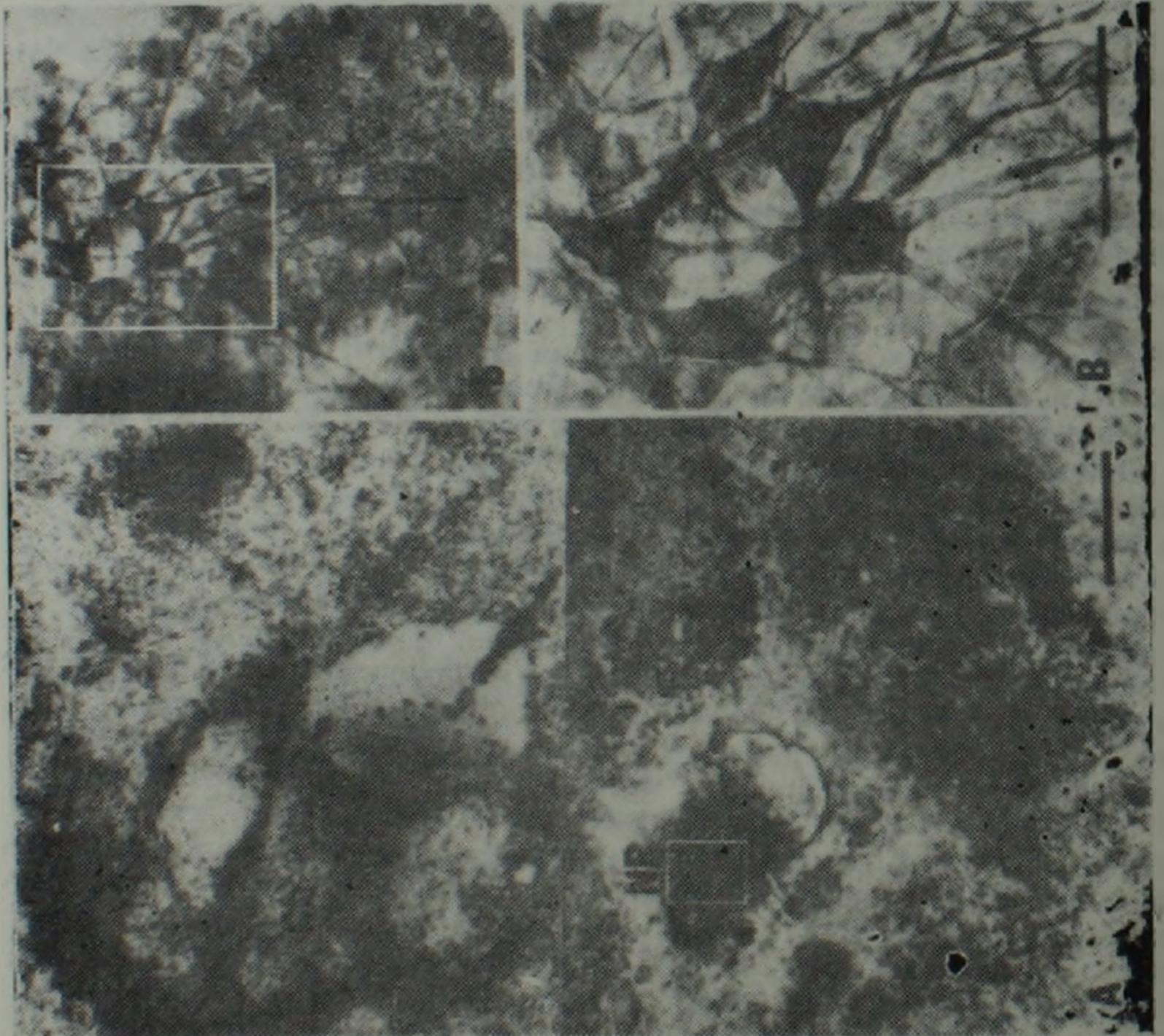


Рис. 1. Микрофотография совместно культивируемых срезов мозжечка (Сb), коры головного мозга (Сх) и эксплантатов красного ядра (NR) поворожденной крысы, импрегнированных серебром. А—общий вид препарата, калибровка 500 мкм; Б, В—нейроны красного ядра, выявленные в области эксплантата, выделенного рамкой на А, 17 дней культивирования, калибровка 50 мкм.

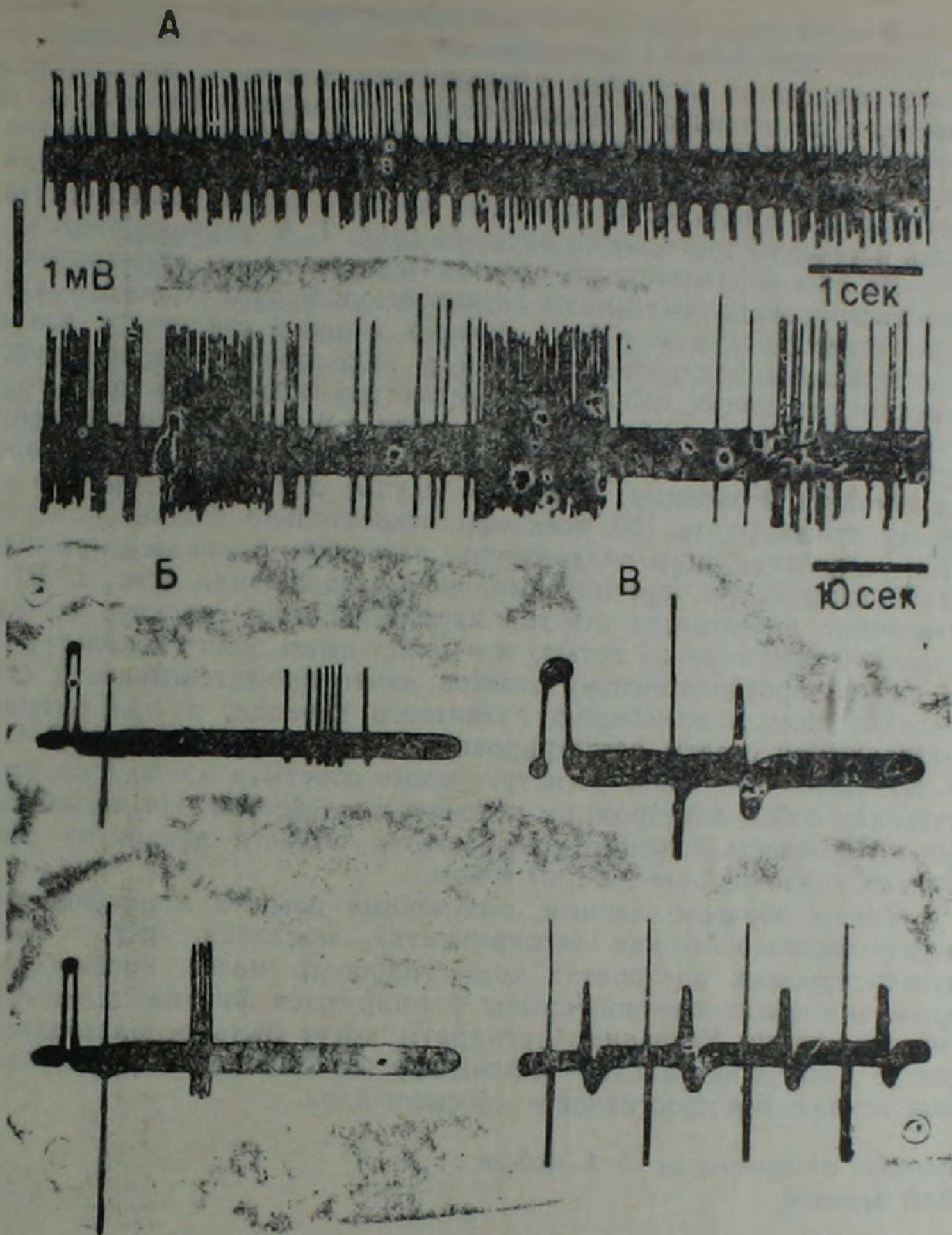


Рис. 2. Потенциалы действия культивируемых нейронов. А, верхняя запись—спонтанная активность нейронов мозжечка, 21 день культивирования; нижняя запись—активность нейронов красного ядра сразу после введения регистрирующего электрода, 17 дней культивирования. Б—вызванная активность нейронов красного ядра в ответ на раздражение различной силы эксплантата коры мозга. Экстрапозиция 7 ответов, верхняя запись—10 мкА, нижняя—50 мкА. Расстояние между электродами 1200 мкм, 21 день культивирования. В—коротколатентный ответ нейронов красного ядра при раздражении эксплантата мозжечка; верхняя запись—экстрапозиция 7 ответов, нижняя—ответы на ритмическое раздражение. Расстояние между электродами 600 мкм, 17 дней культивирования. Калибровка на Б и В 1 мВ, 5 мсек.

Во всех случаях регистрации вызванной внеклеточной электрической активности регистрирующий электрод располагался в области красного ядра, а раздражающий—в области эксплантатов мозжечка или коры головного мозга, соответственно. При введении микроэлек-

трода в область красного ядра регистрировалась электрическая активность, связанная с механическим раздражением нейронов, которая после фиксации электрода уменьшалась и носила нерегулярный характер с периодически возникающими разрядами (рис. 2, А, нижняя запись). Подобная активность нейронов красного ядра заметно отличалась от спонтанной активности нейронов мозжечка, которая была регулярной, имела более высокую частоту разрядов и регистрировалась в течение длительного времени (рис. 2, А, верхняя запись).

Из 32-х исследованных электрически активных препаратов в семи зарегистрирована вызванная активность нейронов красного ядра. Такое соотношение может быть связано, с одной стороны, с возможным отсутствием синаптических связей в ряде препаратов, с другой, — со сложностью поиска нейронов эксплантатов мозжечка и коры головного мозга, образующих синаптические связи с регистрируемыми нейронами красного ядра. Получено два типа ответов: с длинными и короткими латентными периодами. В первом случае латентные периоды ответов могли превосходить 100 мсек при относительно слабом раздражении. При увеличении силы раздражения латентные периоды уменьшались и стабилизировались при максимальном раздражении (рис. 2, Б). Такое изменение латентности ответов характерно для структур со сложной разветвленной нервной сетью, что может иметь место в культуре ткани. В случае коротколатентных ответов изменение интенсивности стимулов не приводило к изменению латентного периода, а при ритмическом раздражении ответы регистрировались при частоте более 50 Гц (рис. 2, В). Вероятнее всего, регистрируемые ответы в данном случае представляли собой антидромные потенциалы действия. Не исключена также возможность прямого раздражения области дендритов регистрируемых нейронов затекающим током.

Таким образом, данные, полученные нами в морфологических и электрофизиологических экспериментах, показали, что в совместно культивируемых препаратах коры головного мозга, красного ядра и мозжечка новорожденной крысы формируются функциональные синаптические связи. Указанные препараты могут быть использованы в качестве экспериментальной модели изучения клеточных и молекулярных механизмов пластичности красного ядра.

Институт физиологии им. Л. А. Орбели  
НАН Армении

#### Գ. Խ. ՇԱԿՈՐՅԱՆ, Վ. Զ. ՊՈՂՈՍՅԱՆ

Նորածին առնետների հյուսվածքի օրգանատիպիկ կուլտուրայում ուղեղիկի, գլխուղեղի կեղևի և կարմիր կորիզի նեյրոնների միջև ֆունկցիոնալ սինապտիկ կապերի ձևավորումը

Ձևարանական և էլեկտրաֆիզիոլոգիական մեթոդների օգնությամբ հետազոտվել են ուղեղիկի, գլխուղեղի կեղևի և կարմիր կորիզի նեյրոնների միջև սինապտիկ կապերի ձևավորումը նորածին առնետների ներվային հյուսվածքի օրգանատիպիկ կուլտուրայում: Արժաթով իմպրեզնացված պատրաստուկներում կարմիր կորիզի էքսպլանտանտների կենտրոնում հայտնաբերվել են նեյրոններ լավ արտահայտված դենդրիտներով: Աճման տարածքում էքսպլանտանտների միջև հայտնաբերվել են աքսոնների հյուսքերով և առանձին ներվաթելերով կազմավորված կապեր: Ուղեղիկի և գլխուղեղի կեղևի էքսպլանտանտների էլեկտրական գրգռումը հրահրում է կարճատև և երկարատև

գաղտնի շրջան ունեցող գործողութիւնն պոտենցիալներ, որը վկայում է ներ-  
վային հյուսվածքի օրգանատիպիկ կոլտուրայով նշված կառուցների միջև  
ծագած ֆունկցիոնալ սինապտիկ կապերի մասին:

#### Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Վ Ա Ն Ո Ւ Ք Յ ՈՒ Ն

- <sup>1</sup> В. В. Фанарджян, Дж. Саркисян, Физiol. журн. СССР, т. 73, с. 163—172 (1987). <sup>2</sup> N. Tsukahara, H. Hultborn, F. Murakami, J. Neurophysiol, v. 38, p. 1359—1372 (1975). <sup>3</sup> N. Tsukahara, V. Fujito, V. Oda, Exsp. Brain. Res., v. 45, p. 1—12 (1982). <sup>4</sup> V. Oda, M. Ito, H. Kishida, J. Physiol (Paris), v. 83, p. 207—216. (1988—89). <sup>5</sup> И. В. Викторов, В. Е. Шунгская, в кн.: Руководство по культивированию нервной ткани, Наука, М., с. 21—24, 1988. <sup>6</sup> S. U. Kim, Ztschr. Zellforsch, Bd. 107, s. 454—465 (1970).