

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Южный федеральный университет»

На правах рукописи

Кириченко Евгения Юрьевна

РОЛЬ ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ И БЕЛКОВ-КОННЕКСИНОВ
В НЕЙРО-ГЛИАЛЬНЫХ И НЕЙРО-ГЛИО-ВАСКУЛЯРНЫХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ В ТАЛАМОКОРТИКАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ
МОЗГА КРЫС

Диссертация

на соискание ученой степени доктора биологических наук

06.02.01 – «диагностика болезней и терапия животных, патология,
онкология и морфология животных»

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор, профессор РАО,
декан факультета «Биоинженерия и ветеринарная медицина»
Донского государственного технического университета

А. М. Ермаков

Ставрополь
2020

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Современные представления о структуре щелевых контактов и составляющих их белков-коннексинов в центральной нервной системе	16
1.1.1. Молекулярная структура коннексинов	17
1.1.2. Характеристика и функции основных видов белков-коннексинов, представленных в ЦНС	24
1.2. Морфофункциональная организация коркового уровня тактильного анализатора крыс.....	34
1.3. Морфофункциональная организация таламического уровня тактильного анализатора крыс.....	41
1.4. Заключение	44
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	48
2.1. Материал и методы исследования	48
2.2. Полученные результаты и обсуждение	56
2.2.1. Распределение нейрональных и глиальных антигенов в колонках соматосенсорной коры, вентральных и ретикулярном ядрах таламуса крысы	56
2.2.1.1. Экспрессия нейрональных и глиальных антигенов в баррельной коре головного мозга	56
2.2.1.2. Экспрессия нейрональных и глиальных антигенов в вентрапостеромедиальном, постеромедиальном и ретикулярном ядрах таламуса	80
2.2.2. Распределение коннексинов в соматической коре, в вентральных и ретикулярном ядрах таламуса крыс.....	90
2.2.2.1. Экспрессия коннексина 36 в коре мозга крыс	93
2.2.2.2. Иммуногистохимическое и иммунофлюоресцентное исследование астроглиальных коннексинов 43 и 30 в коре мозга крыс	101
2.2.2.3. Иммуногистохимическое исследование распределения коннексина 36 и коннексина 43 в вентральных и ретикулярном ядрах таламуса мозга крыс.....	111
2.2.3. Ультраструктура нейро-нейрональных и глия-глиальных щелевых контактов в колонках соматической коры и ядрах таламуса крысы	119

2.2.3.1. Ультраструктура нейро-нейрональных щелевых контактов колонок коры и вентральных ядер таламуса	119
2.2.3.2. Ультраструктура астроглиальных щелевых контактов в коре и таламусе крыс	124
2.2.3.3. Особенности локализации коннексина 43, меченного коллоидным золотом, в структурах коры и таламуса крыс	131
2.2.3.4. Иммуноэлектронномикроскопическое исследование распределения коннексина 43, меченного пероксидазой, в структурах коры и таламуса крыс	134
2.2.3.5. Особенности локализации щелевых контактов в нейро-глио-сосудистых комплексах	143
2.2.3.6. Анализ расположения щелевых контактов на серийных ультратонких срезах соматической коры	153
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	160
4. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	172
5. ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ.....	209

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы и степень ее разработанности. Щелевые контакты (ЩК) занимают особое место среди различных типов межклеточных соединений, поскольку обеспечивают единственный путь прямого обмена биологически активными молекулами и продуктами метаболизма между цитоплазмами соседних клеток разных тканей. В центральной нервной системе (ЦНС) млекопитающих все отделы, от глазной сетчатки и обонятельной луковицы до спинного и головного мозга, содержат клетки, соединенные щелевыми контактами (Deans M. R. et al., 2001; Galaretta M., Hestrin S., 2001; Fukuda, T., Kosaka T., 2003; Nagy J. I. et al., 2004; Zang X. L. et al., 2004; Connors B. W., Long M. A., 2004; Gibson J. R. et al., 2005; Fukuda T. et al., 2006 и др.). Щелевой контакт представлен системой плотно упакованных каналов, пронизывающих билипидные слои мембран двух контактирующих клеток. Каждый такой канал состоит из двух состыкованных полуканалов, называемых коннексаонами, при этом субъединицей каждого коннексаона является трансмембранный белок коннексин. К настоящему времени семейство коннексинов насчитывает около 20 видов белков, отличающихся друг от друга по молекулярному весу и по спектру тканевой экспрессии (Belluardo N. et al., 1999; Sohl G., Willecke K. et al., 2002; Willecke K., 2004). Для ЦНС млекопитающих основными коннексинами являются коннексины 43 и 30, входящие в состав щелевых контактов между глиальными клетками, а также коннексин 36, являющийся субъединицей коннексаонов щелевых контактов нейронов (Condorelli D. F. et al., 1998; Condorelli D. F. et al., 2000; Rash J. E. et al., 2001; Nagy J. I., Rash J. E., 2003; Nagy J. I. et al., 2004).

Существование глиа-глиальных и нейро-нейрональных щелевых контактов имеет критическое значение как для развития ЦНС млекопитающих, так и для ее нормального функционирования (Nagy J. I., Rash J. E. 2000; Bennett M. V., Zukin R. S., 2004; Dere E., Zlomuzica A., 2012; Hamdan R. et al., 2013). При этом нейрональные и глиальные щелевые контакты при схожих

морфологических характеристиках имеют различное функциональное назначение. На раннем постнатальном этапе развития ЦНС нейро-нейрональные щелевые контакты наиболее многочисленны. Действуя как электрические синапсы, они способны обеспечивать синхронное вовлечение в активность всех элементов развивающегося коркового модуля (Liu X. B., Jones E. G., 2003). Во взрослом мозге электрические синапсы имеют избирательный характер формирования и соединяют тормозные нейроны одного и того же типа (Fukuda T., Kosaka T., 2003). При этом они вовлечены в процессы электротонической синхронизации ритмических осцилляций больших и малых нейронных ансамблей (Ylinen A. et al., 1995; Draguhn A. et al., 2000; Normuzdi S. G. et al., 2004; Fukuda T. et al., 2006). Благодаря формированию межклеточных глиа-глиальных щелевых контактов, астроглия может приобретать функцию пространственного буфера для регуляции экстраклеточной концентрации калия и других ионов, регулируя внутриклеточный и внеклеточный ионный гомеостаз (Yamamotoi F., Nakomori S., 1990). В этом случае активность глиальных клеток отражает активность нейронных структур через реакции внеклеточного поглощения нейроактивных субстанций, например глутамата и ионов калия. Кроме того, щелевые контакты астроцитов способствуют проведению метаболических субстратов (Tonkin R. S. et al., 2015), регулируют объем сомы клетки астроцита (Scemes E. et al., 1998; Chever O. et al., 2014), распространяют сигналы клеточной гибели (Blanc E. M. et al., 1998) и являются нейропротекторами в случае окислительного стресса (Eugenin E.A. et al., 2012).

Щелевые контакты рассматривают в качестве важного элемента развития различных патологических процессов в ЦНС. Белки коннексины являются потенциальными терапевтическими мишенями при лечении ряда нейродегенеративных заболеваний в ветеринарии. Активно обсуждают возможную роль коннексинов и щелевых контактов в патогенезе фатальных инфекционных прионных болезней ЦНС: скрепи инфекций у овец и коз, губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота, трансмиссивной энцефалопатии норок. Вы-

двинута гипотеза о существовании нового регуляторного пути передачи сигналов, который опосредован экспрессией коннексина 43, а также имеются данные об обеспечении межклеточного переноса патологического белка PrPSc с участием щелевых контактов и полуканалов астроцитов (Geon-Hwi Lee, 2016; Ariazi J. et al., 2017; Hee-Jun Kim et al., 2020). Кроме того, ЩК и полуканалы играют критическую роль при различных паразитарных инфекциях ЦНС позвоночных: токсоплазмозов, шистосомозов, случной болезни непарнокопытных и су-ауру верблюдов, лошадей, ослов, мулов и собак. Обсуждается ключевая роль ЩК и полуканалов в индуцированной паразитами повышенной проницаемости плазматической мембраны, в процессах клеточной дегенерации, а также в необходимом для инвазии паразитов росте концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в организме хозяина (Vega J. L. et al., 2013). Более того, ЩК способствуют обеспечению быстрого внутриклеточного и межклеточного распространения и персистенции в астроцитах вируса чумы собак при демиелинизирующем энцефалите (Wyss-Fluehmann G. et al., 2010). Показано участие нейронейрональных ЩК в распространении вируса псевдобешенства и развитии болезни Ауески у свиней (Kelly M. McCarthy et al., 2009), а также при распространении патологических ритмов мозга при эпилепсии (Mylvaganam S. et al., 2014). Отдельно следует отметить, что альтерации ЩК и коннексинов в настоящее время рассматривают в качестве важного патогенетического механизма образования, злокачественного роста и метастазирования глиальных опухолей головного мозга млекопитающих (Oliveira R. et al., 2005; Taberner A., 2016).

Несмотря на возрастающий интерес к изучению ЩК головного мозга млекопитающих, их распределение и роль в клеточных ансамблях неокортекса и таламуса остаются малоизученными. На настоящий момент нет данных о взаимном расположении химических синапсов и глиальных ЩК внутри корковых и подкорковых таламических модулей, ЩК в составе нейро-глио-сосудистых ансамблей, количественном распределении глиальных и нейронейрональных щелевых контактов и характеристиках экспрессии коннексинов в корковых и подкорковых структурах. Отсутствуют данные о различных типах

электрических синапсов в колонках коры. Вместе с тем исследование особенностей строения ЦК, а также их локализации является фундаментальной задачей, решение которой открывает новое научное направление для изучения регуляции развития различных патологий ЦНС, в том числе прионных заболеваний и нейроканцерогенеза с помощью воздействия на щелевые контакты.

Объект исследования. Объектами исследования являлись корковая и подкорковая области представительства вибриссовой системы в головном мозге крыс. Кортикальный уровень представительства вибрисс представляет собой морфофункциональные группировки нейронов четвертого слоя соматической коры S1 в виде поля баррелей. Таламический уровень представительства вибрисс включает в себя ядра VPL, RTN, PoM, а также VPM, где формируются морфофункциональные клеточные модули – баррелоиды. Отличительными характерными особенностями данных объектов исследования является моносинаптическая связь каждого отдельного барреля на уровне коры S1 и соответствующего ему баррелоида на уровне релейного ядра таламуса.

Предмет исследования – щелевые контакты между нервными и глиальными клетками и составляющие эти контакты белки-коннексины.

Научная гипотеза. Глиа-глиальные и нейро-нейрональные щелевые контакты имеют критическое значение как для развития, так и для нормального функционирования ЦНС млекопитающих. Щелевые контакты участвуют в функционировании нейронов, взаимодействиях нейронов и глиии, а также обеспечивают функционирование комплекса нейрон-глиальная клетка – сосудистый элемент.

Цель исследования – изучение роли щелевых контактов и белков-коннексинов в нейро-нейрональных, нейро-глиальных и нейро-глио-васкулярных взаимодействиях в таламокортикальной системе мозга крыс.

Задачи исследования:

1. Изучить распределение основных нейрональных и глиальных белков в зонах представительства вибрисс мозга крыс: в баррельной коре S1, в вентральных и ретикулярном таламических ядрах.
2. Получить данные о распределении белков щелевых контактов (коннексинов) глиальных и нервных клеток в коре S1 и в таламических ядрах мозга крыс.
3. Провести исследование локализации, ультраструктуры и типов щелевых контактов нервных и глиальных клеток в баррельной коре и таламических ядрах мозга крыс.
4. Ознакомиться с локализацией коннексинов в щелевых контактах, расположенных вокруг химических синапсов и в нейро-глио-сосудистых комплексах на ультраструктурном уровне.

Научная новизна работы. Впервые проведено иммуногистохимическое исследование зон коркового (баррельная кора) и подкоркового (релейные и вентральные ядра таламуса) представительства вибрисс с использованием антител к синаптофизину, миелину, нейрофиламентам, глиальному фибриллярному кислому белку, парвальбумину, соматостатину, которое позволило обнаружить схожую уникальную морфо-структурную организацию исследуемых зон.

Получены оригинальные данные о распределении белков щелевых контактов в нейронах и в глии корковых и подкорковых зон представительства вибрисс. Впервые получены данные о наличии элементарных ансамблей тормозных нейронов, объединенных глиальными и нейрональными щелевыми контактами, которые осуществляют таламокортикальную и кортикоталамическую передачу в мозге.

Впервые продемонстрирована гетерогенность астроцитов по экспрессии белков щелевых контактов коннексина 30 и коннексина 43 в коре и таламусе, а также охарактеризовано их распределение в исследуемых зонах.

Впервые продемонстрировано взаимное пространственное расположение химических синапсов и глиальных щелевых контактов, содержащих коннексин 43, и установлено их участие в регуляции нейрональной активности в составе трехчастного синапса.

Впервые даны подробные ультраструктурные характеристики щелевых контактов, образующих панглиальные сети.

Получены новые оригинальные данные о структуре гемэнцефалического барьера, в состав которого входят щелевые контакты астроглии, содержащие коннексин 43 и коннексин 30.

В процессе исследования были разработаны: оригинальная методика изготовления серийных ультратонких срезов для изучения ультраструктуры нервных и глиальных клеток, а также клеточных компартментов в объеме; собственные протоколы исследования коннексинов и щелевых контактов методами иммуофлюоресцентной конфокальной микроскопии и электронной иммуногистохимии (pre- и post-embedding). Разработанные протоколы позволяют осуществлять визуализацию любых антигенов, специфичных для нервной ткани на светооптическом и ультраструктурном уровнях.

Теоретическая и практическая значимость. На основании полученных результатов сформулирована гипотеза, согласно которой щелевые контакты являются важным морфологическим субстратом для обеспечения локальной и дистантной синхронизации ритмической активности при таламокортикальном проведении, синаптическом проведении, для регуляции нейрональной активности на уровне трехчастного синапса и для обеспечения тканевого и клеточного гомеостаза в корковых и подкорковых клеточных ансамблях.

Данные об ультраструктурных характеристиках щелевых контактов, а также составляющих их различных типах коннексинов и коннексонов в составе нейро-глио-сосудистых комплексов дополняют и расширяют имеющиеся знания об их структуре, функциях и о механизмах регуляции работы ГЭБ.

Полученные результаты и разработанные методы настоящего комплексного морфологического исследования могут быть использованы как студентами, аспирантами-физиологами и ветеринарными врачами, так и морфологами при исследовании структурной организации, цито-, вазо- и синаптоархитектоники головного мозга животных.

Полученные результаты о распределении щелевых контактов и коннексинов имеют прикладное значение в рамках разработки новых терапевтических возможностей лечения для ряда дегенеративных заболеваний ЦНС животных, в том числе прионных болезней. Настоящее морфологическое исследование способствует разработке «дорожной карты» для исследования механизмов блокировки коннексинов или уменьшения коммуникации посредством щелевых контактов в нанотрубочках при развитии ряда нейродегенеративных заболеваний в ветеринарии.

Данные о распределении коннексинов и щелевых контактов в норме могут способствовать пониманию механизмов малигнизации и инвазии клеток астроцитарных опухолей ЦНС, а также разработке различных терапевтических стратегий по управлению коннексинами и щелевыми контактами в опухолях для повышения эффективности противоопухолевой терапии. Кроме того, полученные сведения о гетерогенности астроглии по экспрессии коннексинов вносят новый вклад в существующие представления о биологии глиальных опухолей ЦНС животных.

Методология и методы исследования. Методологической основой проведенных исследований является анализ доступных литературных источников, который создает теоретические предпосылки необходимости изучения структуры и функций щелевых контактов и составляющих их белков-коннексинов в корковых и подкорковых модулях тактильного анализатора крыс с целью выяснения роли щелевых контактов и белков-коннексинов в нейро-нейрональных, нейро-глиальных и нейро-глио-васкулярных взаимодействиях. Результаты исследований получены с использованием гистологических, иммуногистохимических, иммунофлюоресцентных, электронномик-

роскопических, иммуноэлектронномикроскопических и морфометрических методов исследований.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В пределах таламокортикальной системы в гомологичных зонах представительства вибрисс клеточные ансамбли имеют особую схожую структурную организацию. Выявленные схожие специфические тормозные связи парвальбумин-содержащих нейронов в корковых и таламических зонах представительства вибрисс являются «центрами» таламокортикальной и кортико-таламической передачи в мозге.

2. В исследованных зонах коры и таламуса субпопуляции астроцитов отличаются по способности синтезировать разные типы коннексинов, формировать щелевые контакты и участвовать в нейро-глиальных взаимоотношениях.

3. Нейро-нейрональные щелевые контакты коры и таламуса представлены следующими типами: 1) аксо-дендритические, которые могут обеспечивать локальную синхронизацию активности нейронов одного ансамбля на пресинаптическом уровне; 2) дендро-дендритические, объединяющие однотипные нейронные ансамбли для обеспечения локальной подпороговой синхронизации гиперполяризационного ритма; 3) смешанные синапсы, которые могут участвовать в процессах долговременной потенциации и/или синхронизации высокочастотных колебаний, а также обеспечивать пластичность изменениями нейронных цепей.

4. Щелевые контакты, содержащие коннексин 43, являясь компонентом трехчастного синапса и образуя панглиальные сети, играют ведущую роль в нейро-глиальных взаимоотношениях в коре и таламических ядрах мозга.

5. Щелевые контакты, содержащие коннексин 43 и коннексин 30, играют ведущую роль в нейро-глио-васкулярных взаимодействиях в коре и таламических ядрах мозга, входя в состав ГЭБ.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора. Достоверность результатов работы, правомочность основных поло-

жений и выводов обоснованы достаточным числом животных, использованных в экспериментах, детальным изучением литературы по теме исследования, использованием современных морфологических и иммуногистохимических методов исследования на светооптическом и ультраструктурном уровнях с применением сертифицированного модуля интерактивных измерений (LAS Interactive Measurement), лицензионной программы Leica Application Suite 4.3 (Leica, Германия), лицензированной программы Qwin (Leica, Кембридж Англия), глубоким и аргументированным анализом полученных результатов.

Результаты научных исследований вошли в отчеты по гранту РФФИ № 07-04-00424, гранту Минобразования № 2.1.1/1129, грантам РФФИ № 13-04-01012, № 15-04-03035, № 19-015-00325, грантам ЮФУ № 213.01-24/2013-52, № 213.01-07-2014/05ПЧВГ, отчет Госзадания Минобрнауки России № БЧ0110-11/2017-27, отчет гранта Министерства науки и высшего образования РФ № БАЗ 0110/20-5-14АБ.

Основные положения работы представлены и обсуждены на XVI Международной конференции по нейрокибернетике (Ростов-на-Дону, 2012), XXII Съезде физиологического общества им. Павлова (Волгоград, 2013), конференции «Актуальные проблемы современной медицины» (Киев, Украина, 2013), на регулярных международных междисциплинарных конгрессах «Нейронаука для медицины и психологии» (Крым, 2013, 2015, 2020), на IV съезде физиологов СНГ (Сочи – Дагомыс, 2014), 5-м Съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2015), на XXIII Мультидисциплинарной международной конференции нейронаук «Стресс и поведение» (Санкт-Петербург, 2016), на летней школе Brain Facts Summer School, Shanghai, Shanghai Jiao Tong University департамента Life Science (Шанхай, Китай, 2018, 2019), на кафедре Key Laboratory for the Genetics of Development and Neuropsychiatric Disorders (руководитель – профессор Вейдонг Ли), Shanghai Jiao Tong University (Шанхай,

Китай, 2019), на заседании Департамента анатомии и нейробиологии факультета «Life Science» (руководитель – профессор Фукуда Такаичи) университета Кумамото (Япония, 2019), на заседании лаборатории «Молекулярная нейробиология» (руководитель – профессор А. Б. Узденский) (Ростов-на-Дону, 2020), на Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2020).

Результаты проведенных исследований легли в основу специального курса с практическими занятиями для иностранных студентов-магистров «Современные методы исследования: морфология, гистология, иммуногистохимия», а также используются в учебном процессе на кафедре «Физиология человека и животных» при чтении лекционных и практических курсов по направлениям «Нейробиология» и «Физиология высшей нервной деятельности» Академии биологии и биотехнологии ФГАУ ВО «Южный федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, на летней школе Brain Facts Summer School, Shanghai, Shanghai Jiao Tong University департамента Life Science (Шанхай, Китай, 2018-2023).

Планирование исследований, постановка цели и задач проводились совместно с научным консультантом д-ром биол. наук, профессором А. М. Ермаковым, д-ром биол. наук, академиком РАН А. Э. Мационисом, д-ром биол. наук, профессором А. Б. Узденским.

Разработка протоколов для иммуногистохимического, иммунофлюоресцентного и электронноиммуногистохимического исследований проводилась совместно с сотрудниками отделения высокотехнологичных методов диагностики государственного бюджетного учреждения Ростовской области «Патологоанатомическое бюро» д-ром биол. наук, академиком РАН А. Э. Мационисом, канд. биол. наук П. Е. Повилайтите, а также руководителем Департамента анатомии и нейробиологии факультета Life Science университета Кумамото, Япония, профессором Фукуда Такаичи. Процедуры фиксации головного мозга методом транскардиальной перфузии и иммуно-

гистохимические исследования – совместно с сотрудниками Академии биологии и биотехнологии им. Д. И. Ивановского Южного федерального университета д-ром биол. наук, профессором А. Г. Суховым, канд. биол. наук Т. С. Сердюк, аспирантом А. О. Гранкиной (Ситковской), аспирантом С. Ю. Филипповой, Л. А. Беличенко, Г. А. Чурюмовой, М. Ю. Могилевской, а также совместно с аспирантом и сотрудником Ростовского государственного медицинского университета М. А. Акименко; иммунофлюоресцентные исследования в конфокальном двухфотонном микроскопе проводились совместно с сотрудниками Научно-исследовательского технологического Центра нейротехнологий ЮФУ д-ром биол. наук, профессором В. Н. Кироем, канд. биол. наук Л. В. Лысенко, В. Г. Семьиной, электронномикроскопические исследования проводились при участии сотрудников центра коллективного пользования «Современная микроскопия» ЮФУ д-ром биол. наук Г. М. Федоренко, канд. биол. наук А. Г. Федоренко, а также с сотрудниками патологоанатомического отделения государственного бюджетного учреждения Ростовской области «Областная клиническая больница № 2» канд. мед. наук Д. Г. Пасечником, канд. биол. наук А. К. Логвиновым и Е. А. Синельник.

Автор выражает искреннюю благодарность вышеуказанным коллективам и сотрудникам.

Выбор методологии исследования, поиск, анализ и обобщение научной информации, литературных данных, выполнение экспериментов, анализ и интерпретация результатов исследования, подготовка научных публикаций, написание и оформление рукописи осуществлены лично автором. Доля участия соискателя при выполнении диссертации составляет 95 %.

Конкурсная поддержка. Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-00424 (руководитель – профессор А. Г. Сухов), грантом Минобразования № 2.1.1/1129 (руководитель – профессор А. Г. Сухов), грантом РФФИ № 13-04-01012 (руководитель – Е. Ю. Кириченко), грантом РФФИ № 15-04-03035 (руководитель – Е. Ю. Кириченко), грантом РФФИ № 19-015-00325 (руководитель – Е. Ю. Кириченко).

дитель – Е. Ю. Кириченко), внутренним грантом ЮФУ № 213.01-24/2013-52, внутренним грантом ЮФУ № 213.01-07-2014/05ПЧВГ (руководитель – Е. Ю. Кириченко), базовой частью государственного задания Минобрнауки России № БЧ0110-11/2017-27 (руководитель – Е. Ю. Кириченко), грантом Министерства науки и высшего образования РФ № БАЗ 0110/20-5-14АБ (руководитель – профессор А. Б. Узденский).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 54 печатные работы в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 25 статей – в изданиях, включенных ВАК России в перечень изданий, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук, из которых 21 – публикации в изданиях, включенных в базы данных Scopus, Web of Science.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 210 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, включающих в себя материалы и методы исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения и выводов, списка литературы, включающего 338 отечественных и зарубежных источников. Работа иллюстрирована 47 рисунками и тремя таблицами.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о структуре щелевых контактов и составляющих их белков-коннексинов в центральной нервной системе

Щелевые контакты или нексусы (gap junctions, nexus) относятся к проводящему типу межклеточных контактов и обеспечивают непосредственный переход из цитоплазмы одной клетки в цитоплазму другой небольших водорастворимых молекул с молекулярной массой не более 1,5 kDa (неорганические ионы, сахара, аминокислоты, нуклеотиды, витамины и т.д.). Впервые они были упомянуты в работе, посвященной изучению ультраструктуры нейронов нервной цепочки речного рака в 1953 году (Robertson J. D., 1953). Чуть позже эти структуры были описаны как одиночные пятислойные пластинки, тесно связывающие мембраны клеток, и, предположительно, участвующие в электрической проводимости кардиомиоцитов (Sjostrand F.S. et al., 1958). Первые свидетельства существования ЩК в ЦНС млекопитающих относятся к 1960-1970-х годам (Hinrichsen C.F., Larramendi L.M., 1968; Baker R., Llinás R., 1971; Korn H. et al., 1973; Sloper J.J., Powell T.P.S., 1978). После чего последовало интенсивное изучение их функциональной значимости путем двойного электрофизиологического отведения от пар соседних нейронов, инъекций флюоресцентных красителей и последующего изучения их межклеточной миграции, а также ультраструктурного исследования их локализации в различных отделах ЦНС. При электронно-микроскопическом исследовании методом замораживания-скалывания было показано, что ЩК состоят из групп состыкованных полуканалов, называемых коннексаонами (Goodenough D.A. 1975). Пронизывая билипидные слои мембран двух контактирующих клеток, коннексаоны формируют гексагональную пору диаметром 1,5 нм. Коннексаоны соединены так, что смежные мембраны разделены щелью шириной 2-4 нм (отсюда термин «щелевой контакт»). На электроннограммах коннексаоны ЩК можно визуализировать на репликах в виде сотен плотно сгруппированных округлых скрученных розеток, формирующих своеобразные «бляшки» (plaques) (Makowski, L. et al., 1977; Staehelin L.A., Hull

В.Е. 1978.). При этом субъединицей каждого коннексона является трансмембранный белок коннексин (Goodenough D.A. 1974), который традиционно имеет краткое обозначение для животных «Сх», а для человека «СХ». Многочисленные данные последних 20 лет свидетельствуют о том, что все отделы зрелой ЦНС, от глазной сетчатки и обонятельной луковицы до спинного и головного мозга, содержат клетки, соединенные ЩК (Rash J.E. et al, 2001; Nagy J.I. et al., 2004; Connors B.W., Long M.A., 2004 и др.). Такие клетки ЦНС могут быть как глиальными, так и нейрональными. Глиа-глиальные ЩК формируются в основном между отростками астроцитов, реже олигодендроцитов и обеспечивают метаболическое сопряжение клеток (Nagy J., Rash J.E. 2000). ЩК нейронов обеспечивают электротоническую кооперацию клеток и функционируют как электрические синапсы (Zhang X.L. et al., 2004; Gibson J.R. et al., 2005). При этом до настоящего времени не существует четкого морфологического подтверждения существования ЩК между нейронами и глиальными клетками. Параллельно с описанными выше исследованиями проводилось изучение структуры ЩК, их каналов, белков, составляющих эти каналы, цитоплазматических и внеклеточных доменов, а также их деградации для определения возможных механизмов регулирования их функционального состояния и межклеточного проведения.

1.1.1. Молекулярная структура коннексинов

Согласно современной номенклатуре, размещенной в Глобальной поисковой системе полных геномов «Entrez Gene», гены коннексинов разделяются на 5 групп: альфа, бета, гамма, дельта и ипсилон. В каждой группе нумерация новым генам присваивалась по мере их описания (например, *GJA1* является первым описанным коннексином альфа-группы у человека). Название белка, который кодирует этот ген, соответствует его молекулярной массе (например, *GJA1* кодирует коннексин 43 (СХ43)). На сегодняшний день в семействе коннексинов насчитывается около 20 индивидуальных белков, отличающихся друг от друга по молекулярному весу и по спектру тканевой экспрессии

(Willecke K. et al., 2002; Sohl G., Willecke K., 2004). При этом к основным коннексинам, специфичным для ЦНС млекопитающих, относятся коннексин 36, коннексин 45, коннексин 43, коннексин 30, коннексин 26, коннексин 32 и др. (таблица 1).

Таблица 1 – Основные коннексины ЦНС млекопитающих, кодирующие гены и их локализация

Название гена	Тип коннексина	Млекопитающее	Хромосома	Клетки центральной нервной системы
Gjd2 Группа Дельта 2	Коннексин 36, Cx36	Mus musculus (мышь)	Хромосома 2	Нейроны центральной нервной системы
GJA1 Группа Альфа 1	Коннексин 43, CX43	Homo sapiens (человек)	Хромосома 6	Астроциты, глиальные опухоли ЦНС
Gja1 Группа Альфа 1	Коннексин 43, Cx43	Mus musculus (мышь)	Хромосома 10	Астроциты
GJB6 Группа Бета 6	Коннексин 30, CX30	Homo sapiens (человек)	Хромосома 13	Астроциты
Gjb6 Группа Бета 6	Коннексин 30, Cx30,	Mus musculus (мышь)	Хромосома 14	Астроциты
GJB2 Группа Бета 2	Коннексин 26, CX26,	Homo sapiens (человек)	Хромосома 13	Олигодендроциты
GJA10 Группа Альфа 10	Коннексин 62, CX62	Homo sapiens (человек)	Хромосома 6	Горизонтальные клетки сетчатки В-типа
GJB1 Группа Бета 1	Коннексин 32, CX32	Homo sapiens (человек)	Хромосома 10	Миелинизированные Шванновские клетки
GJC2 Группа Гамма 2	Коннексин 47, CX47	Homo sapiens (человек)	Хромосома 1	Олигодендроциты
GJB3 Группа Бета 3	Коннексин 31, CX31	Homo sapiens (человек)	Хромосома 1	Дофамин-ергические нейроны

Первоначальные представления о доменной структуре всех генов, кодирующих коннексины, были довольно простые. Считалось, что они состоят из одного экзона с расположенным на нем 5'-нетранслируемым регионом и второго экзона с основной кодирующей частью и 3'- нетранслируемым концом (Oyamada M. et.al., 2005). Дальнейшее детальное изучение структуры этих генов показало, что их кодирующие участки могут прерываться некодирующими интронами, например, у гена *Gjd2*, кодирующего Cx36 (Cicirata F.

et.al., 2000), *Gjd4*, кодирующего Cx39 (von Maltzahn J. et al., 2004), *Gja10*, кодирующего Cx57 (Hombach S. et.al., 2004). Также последующие молекулярные исследования продемонстрировали существование у одного гена коннексина нескольких сплайс-изоформ транскриптов. К примеру для гена коннексина 32 у крысы и человека было обнаружено два разных сплайс варианта транскриптов (Sohl G. et al., 1996; Neuhaus I.M. et al, 1996), а у коровы и мыши – три (Duga S. et al., 1999; Sohl G. et al., 2001). При этом было показано, что большинство этих изоформ появлялись за счет 5'-регионов и альтернативного использования промоутерных участков; кодирующая же часть гена в мРНК оставалась не измененной. Экспрессия таких изоформ транскриптов является специфичной для различных тканей и органов. Так, в гепатоцитах и секреторных ацинарных клетках поджелудочной железы транскрипция мРНК Cx32 начинается с промотора, лежащего выше первого экзона, а в Шванновских клетках ЦНС - с так называемого нервно-специфического промотора, лежащего между первым и вторым кодирующим экзоном (Oyamada M., et.al. , 2013). Существование таких различных вариантов тканеспецифичных транскриптов у млекопитающих было показано для многих коннексинов (Cx40, Cx43, Cx45, Cx30 и др.), что связывают с особенностями семейства этих генов. Традиционно считается, что экспрессия коннексинов во многом регулируется на уровне транскрипции с вовлечением различных транскрипционных факторов и эпигенетических модификаций, таких как гистонные преобразования или метилирование ДНК. (Bedner P.,et. al., 2012). Однако в литературе также отмечены факторы регуляции экспрессии на трансляционном уровне, например, элементы IRES (internal ribosome entry site-внутренний сайт для входа в рибосому) или uORFs (upstream open reading frames- открытые рамки считывания) в генах коннексина (Oyamada M., et.al., 2013).

Синтез коннексинов является постоянным динамическим процессом, из-за короткого периода полураспада коннексинов и необходимости постоянного их замещения. Подобно другим мембранным белкам, белки-коннексины синтезируются на мембране эндоплазматического ретикулума (ЭР) с после-

дующей олигомеризацией, транспортировкой через аппарат Гольджи, и встраиванием в мембрану клетки (Bennett M.V., Zukin R.S., 2004). Каждая молекула коннексина в виде нестабильного мономера состоит из четырех гидрофобных трансмембранных доменов (M1-4), двух экстраклеточных петель (extra-cellular loop1 (EL1) и extra-cellular loop 2 (EL2)), одной цитоплазматической петли (cytoplasmic loop (CL)) и N- C-свободных концевых доменов молекулы, которые также обозначаются NT и CT (T-tail, хвост) (рисунок 1).

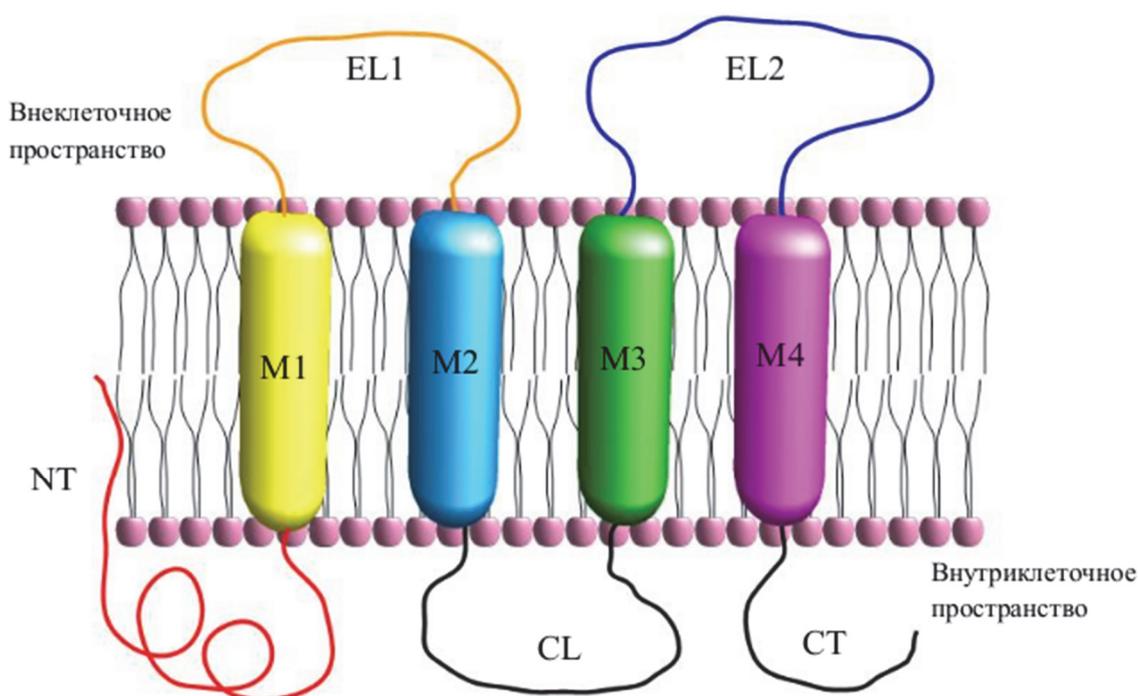


Рисунок 1 – Схематичное изображение доменной структуры молекулы коннексина, встроенной в билипидный слой мембраны. Обозначения: M1-M4 – трансмембранные домены, EL-EL1 – внеклеточные петли, CL- внутриклеточная петля, NT- N (амино) конец молекулы, CT- C (карбоксильный) конец. (Кириченко Е.Ю, 2020)

Олигомеризация или сборка коннексинов в белковые гексамерные комплексы происходит дифференцировано в зависимости от их видов. Исходя из структурной гомологии, коннексины могут быть разделены на две отдельные группы по процессу олигомеризации. *GJB1-GJB7* (так называемые β -коннексины, включая Cx26 и Cx32) следуют более традиционному пути, где полная олигомеризация в гексамерные полуканалы необходима перед транспортировкой из ЭР в аппарат цис-Гольджи (Das S. et al., 2009). Другие кон-

нексины (не- β -коннексины Sx43, Sx40, Sx46) стабилизируются с помощью специфического для коннексина мономера и транспортируются в сеть транс-Гольджи для олигомеризации на поздних стадиях секреторного пути (Maza J. et al., 2005). После олигомеризации коннексины приобретают свою оригинальную структуру в виде комплекса белков коннексонов молекулярной массы около 27 000 Da и доставляются к плазматической мембране для встраивания и сборки в бляшки ЩК (Thévenin A. F. et.al., 2013). Анализ архитектуры полуканала при помощи кристаллографии показал, что коннексоны имеют положительно заряженный цитоплазматический вход, воронку, отрицательно заряженный трансмембранный путь и внеклеточную полость. В воронке отмечено сужение, образованное шестью аминоконцевыми спиралями, выстилающими стенку канала. Такая структура канала определяет ограничение размера проходящей через него молекулы (Maeda S. et al., 2009).

Цитоплазматические и внеклеточные домены молекул коннексина, встроенные в мембрану выполняют различные функции. Цитоплазматические петли молекулы участвуют в обеспечении соединений с коннексинами соседних клеток, в то время как NT и CT концы молекулы ответственны селективность канала для малых молекул.

Длина цитоплазматических петель, так же, как и длина С-доменов варьирует от коннексина к коннексину. Кроме того, на С-конце существуют так называемые сайты фосфорилирования (Hamdan R. et. al., 2013). Фосфорилирование этих С-концевых участков коннексинов посредством киназ является одним из способов посттрансляционного изменения этих белков. Посттрансляционная модификация белков коннексинов регулирует, в свою очередь, многие важные аспекты их жизненного цикла, включая синтез, транспортировку, стробирование каналов и межбелковые взаимодействия (Aasen T. et al., 2018). Современные данные позволяют предположить, что перспективным механизмом влияния на ЩК и полуканалы может быть именно воздействие на определенные киназы, что позволит управлять их продолжительностью жизни, миграцией к мембране, собиранием бляшек полуканалов, формирова-

нием ЩК и проницаемостью поры (Solan J.L., Lampe P.D., 2018). Кроме того, взаимодействие С-конца с целым рядом киназ определяет его взаимодействие с другими белками и модулирует, таким образом, его сигнальную функцию.

Период полураспада коннексинов составляет около 1,5 часов, причем причины такого короткого периода жизни белка до сих пор не объяснены (Gaietta G. et al., 2002). Полуканалы ЩК подвергаются как протеасомной, так и лизосомной деградации с предшествующей интернализацией посредством комбинированного эндо/ экзоцитарного процесса (Koranic J. L. et al., 2015). Этот процесс происходит путем инвагинации бляшек ЩК в цитоплазму клетки, отделения от плазматической мембраны и образования двухмембранного кольцевого соединения или «коннексомы», подвергающегося последующей деградации (Laird D., 2005). При этом одна из контактирующих посредством ЩК клеток является приемником, а другая действует как донор. Ультраструктурные исследования процесса деградации коннексом свидетельствуют о том, что этот процесс, вероятно, происходит посредством лизосом или аутолизосом, поскольку отмечено, что внутри этих органелл пятислойная структура ЩК «размывается» в некоторых местах (Lichtenstein A. et al., 2011). Такие цитоплазматические везикулы, содержащие бляшки ЩК и участвующие в интернализации существуют, по меньшей мере двух видов: большие и медленно разрушающиеся (диаметром порядка 0,5-5 мкм) и более мелкие (диаметром 0,18-0,27 мкм), разрушающиеся в течение нескольких секунд (Falk M. M. et al., 2014). Кроме того, эндоцитозированные коннексины способны подвергаться рециркуляции обратно в плазматическую мембрану или транспортироваться в аппарат Гольджи (Scita G., Di Fiore P.P., 2010).

В процессе олигомеризации коннексоны могут быть гомометрическими, то есть, составленными из коннексинов одного вида, или гетерометрическими, состоящими из коннексинов разных видов (рисунок 2).

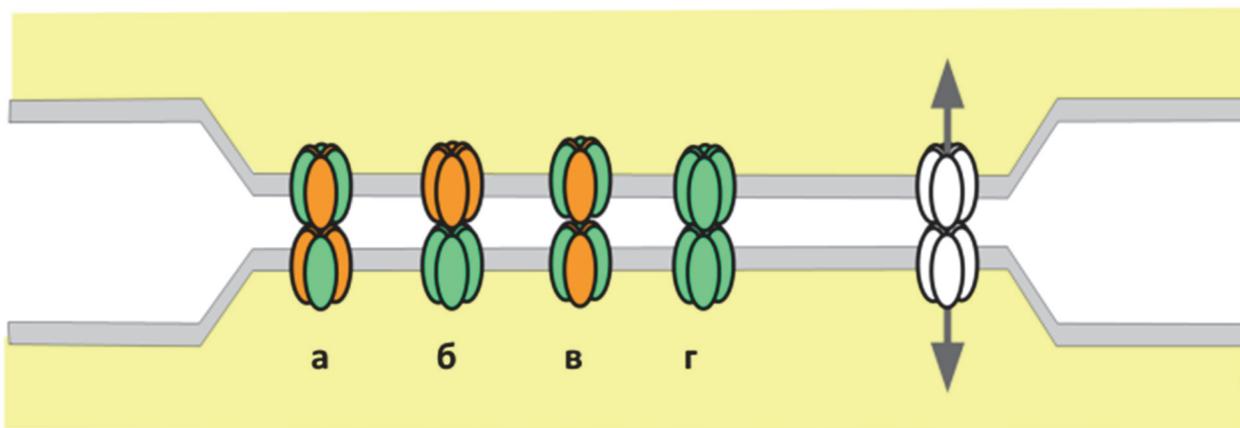


Рисунок 2 – Схематичное изображение щелевого контакта. Агрегация индивидуальных каналов от 10 до несколько тысяч формирует кластер или бляшку щелевых контактов. Расстояние между бляшками порядка 2-3 нм. Каждый коннексон составлен из шести субъединиц коннексина. Типы коннексонов щелевых контактов: а – гетеротипический гетерометрический, б- гомотипический гетерометрический, в-гетеротипический гомометрический, г- гомометрический гомотипический. (Кириченко Е.Ю, 2020)

Соответственно, и составленные полуканалами щелевые контакты могут быть гомотипическими либо гетеротипическими, что зависит от состава коннексонов. Гетеротипические каналы, образованные двумя различными коннексинами, могут обладать функциональными свойствами, отличными от соответствующих гомотипических каналов, включая пропускную способность и селективность пор для химических веществ и ионов (Ayad W.A. et al., 2006). В литературе описаны различные сочетания коннексонов и типы щелевых контактов: гомометрический/гомотипический, гетерометрический/гомотипический, гомометрический/гетеротипический, гетерометрический/гетеротипический.

Тема совместимости коннексонов в составе гетеротипических контактов на настоящий момент не до конца раскрыта. Теоретически при совмещении двух коннексонов можно сформировать около 196 вариантов различных каналов. Однако было установлено, что стыковка двух полуканалов с образованием одного функционального канала щелевого контакта возможна только между совместимыми коннексинами, при этом, основной молекулярный ме-

ханизм этого процесса неясен. Некоторые исследователи полагают, что в основе механизма стыковки полуканалов в единую пору щелевого контакта лежат водородные связи, а нарушение этих связей является причиной каналопатий (Gong X.Q. et al., 2013). Основным же и наиболее важным элементом молекулы коннексина для селективной стыковки и формирования функциональных каналов считают внеклеточный домен E2 (White T.W. et al., 1994). Вместе с тем, стыковка полуканалов конкретной пары коннексонов зависит от предполагаемого числа водородных связей на каждом стыковочном интерфейсе E2 – E2. Такие предположения были основаны на изучении кристаллической структуры канала ЩК продемонстрировавшем в общей сложности около 36-ти водородных связей на шести молекулах E2 – E2 (Suga M. et al., 2009).

Внеклеточный домен E1, вероятно, не играет роли в стыковочной совместимости. При этом остатки домена E1 после стыковки привлекают всеобщее внимание исследователей, поскольку, предположительно, являются мутационными горячими точками для нескольких связанных с коннексином наследственных заболеваний человека, таких как болезнь Шарко-Мари-Тута (Клеора К.А. et al., 2012), дисплазии, сердечные аритмии, врожденные катаракты, глухота и др. (Scherer S.S., Wrabetz L. 2008; Paznekas W.A. et al., 2009; Beyer E.C. et al., 2013; Bai D., 2014).

1.1.2. Характеристика и функции основных видов белков-коннексинов, представленных в ЦНС

Характеристика экспрессии различных коннексинов в нервной ткани является необходимой предпосылкой для понимания функциональной значимости создаваемых ими полуканалов и щелевых контактов. Для ЦНС млекопитающих характерна клеточная специфичность коннексинов: молекулярный вес этих белков, а также функции и свойства ЩК, которые они образуют, зависят от того, экспрессируются ли они в нервных или глиальных клетках. Ниже мы

рассмотрим характеристики основных типов коннексинов ЦНС, их локализацию и функции для нервных и глиальных клеток.

Коннексины нейронов.

Коннексин 36 (Cx36)

Экспрессия гена Cx36 (как и экспрессия других коннексинов) как правило, определяется исследователями с помощью метода гибридизации *in situ* с РНК-зондами, репортерного гена *lacZ* и анализа синтезируемого белка методами вестерн-блот, иммуногистохимии и электронной иммуногистохимии. Функции коннексина 36 исследуют, в основном, электрофизиологическими методами на нокаутных и трансгенных животных. Щелевые контакты, составленные Cx36, образуются только гомометрическими коннексонами (Teubner V. et al., 2000), при этом формируемая ими пора функционирует с очень низкой проводимостью порядка 10-15 пСм (Srinivas M. et al., 1999). В качестве основной функции щелевых контактов, содержащих коннексин 36, исследователи определяют электрическое сопряжение и синхронизацию межклеточной импульсной активности нейронов.

В раннем постнатальном развитии различные типы уже дифференцированных нейронов соединяются посредством щелевых контактов. Эта связь не только позволяет создать сеть клеток с координированным метаболизмом, но и обеспечивает передачу нервных импульсов в условиях, когда химические синапсы ещё не функционируют. Обнаруженные временные электрические связи между нейронами обеспечиваются по большей части электрическими синапсами, образованными Cx36 (Venance L. et al. 2000). Количество щелевых контактов между нейронами резко сокращается к 18-му дню постнатального развития, в то время как развитие химических синапсов приближается к взрослым показателям (Peinado A.A., 2001). Во взрослом мозге млекопитающих коннексин 36 является нейрональным коннексином, специфичным для ЦК, в основном, между тормозными ГАМК-ергическими нейронами (Condorelli D.F., et al., 2000), реже между возбуждающими (Rash J.E. et al., 2001, Peinado A., 2001). При этом, наибольшее количество таких щелевых

контактов или электрических синапсов имеют избирательный характер формирования и соединяют дендриты ГАМК-ергических нейронов, экспрессирующих кальций-связывающие белки и нейропептиды, например, парвальбумин. Морфологические свидетельства существования таких связей были продемонстрированы в исследованиях в гиппокампе и четвертом слое неокортекса (баррельной коре) (Fukuda T., et al., 2006; Shigematsu N. et al., 2019). Авторы этих работ разработали классификацию парвальбумин-содержащих быстроспайковых нейронов по дистальному и проксимальному расположению щелевых контактов на дендритах этих клеток. Кроме того, такие типы парвальбумин-содержащих нейронов экспрессировали в цитоплазме сомы и проксимальных дендритов везикулярный глутаматный транспортер 2, что указывает на их участие в прямых таламокортикальных проводниках. Существование подобных сетей может свидетельствовать в пользу того факта, что щелевые контакты, содержащие коннексин 36 участвуют в контроле возбуждающих связей, обеспечивают регулирование таламокортикального проведения, опосредуют или модулируют синхронизацию как локальной импульсной активности, так и ритмической активности крупных и малых нейронных ансамблей в гиппокампе и неокортексе при тета-, гамма- и высокочастотных колебаниях (Hormuzdi S.G. et al., 2001; Deans M.R., et al, 2001). Предполагается, что некоторые из этих ритмических колебаний участвуют в процессах восприятия, концентрации внимания и памяти, как на клеточном, так и на системном уровне. Однако такие нейронные сети, объединенные щелевыми контактами, остаются мало исследованными не только для большинства областей мозга, но даже не описаны для всех слоев кортикальной колонки неокортекса, что, безусловно, должно являться целью будущих нейрофизиологических и нейроморфологических исследований.

Коннексин 45 (Cx45)

Следует отметить, что исследования экспрессии коннексина 45 и содержащих этот белок ЩК немногочисленны. Также как и коннексин 36, кон-

нексин 45 относится к группе белков ЩК нейронов ЦНС, поскольку не экспрессируется ни в олигодендроцитах, ни в астроцитах (Maxeiner S. et al., 2003). Высокая экспрессия гена коннексина 45 отмечается уже во время эмбриогенеза и в течение первых двух недель постнатального развития во всех областях мозга. После этого его экспрессия ограничивается таламическими структурами, областью СА3 гиппокампа и мозжечком (Maxeiner S., et al., 2003). Учитывая значительное совпадение уровня экспрессии обоих коннексинов развивающихся нейронов (Cx36 и Cx45) в раннем постнатальном развитии, следует предположить, что в этот период они играют схожую роль и могут способствовать функциональной спецификации определенных подтипов развивающихся нейронов.

Во взрослом мозге коннексин 45 был обнаружен в пирамидных клетках, которые, как известно, формируют электрические связи, однако не экспрессируют Cx36. Такие клетки были идентифицированы в неокортексе, гиппокампе (регионы CA1-CA4) и таламусе (Krüger O. et al. 2000; Maxeiner S., 2003). Кроме того, Cx45 экспрессируется в нейронах обонятельной луковицы (Zhang C., Restrepo D. 2002) и в субпопуляциях нейронов оливоцеребеллярной системы (Van der Giessen R.S., et. al., 2006). По аналогии с Cx36, белок Cx45 образует ЩК с довольно низкой проводимостью, которые чувствительны к изменениям мембранных токов, и закрываются в ответ на гиперполяризацию мембраны (González D., et al., 2007). При этом существования гетеротипических ЩК Cx36/Cx45 до настоящего момента продемонстрировано не было. Среди основных функций ЩК, содержащих Cx45 определяют синхронизацию осцилляторной активности нейронов в диапазонах гамма-частот (Dere E., Zlomuzica A. 2012).

Коннексины глиальных клеток.

Коннексин 43(Cx43)

В развивающемся мозге ЩК, содержащие Cx43 интенсивно связывают эмбриональные клетки-предшественники нейронов (Bruzzone R., Dermietzel R., 2006). Кроме того, коннексин 43 экспрессируется радиальными клетками

глии, по которым мигрируют молодые нейроны из вентрикулярной зоны в слой неокортекса (Cina C. et al., 2007). При этом считается, что этот белок не образует ЩК, а способствует обеспечению адгезии нейронов в процессе миграции (Elias L.A. et al., 2007.). Более того, ключевую и критическую роль в этом процессе играет цитоплазматический С-концевой домен Сх43 (Bruzzone R., Dermietzel R. 2006).

Коннексоны, содержащие Сх43 образуют каналы с умеренной проводимостью, при этом ЩК, состоящие из Сх43, являются низко чувствительными к изменениям трансмембранных токов и закрываются в ответ на деполяризацию мембраны (González D., et al., 2007). Во взрослом мозге Сх43 является основным белком, составляющим ЩК астроцитов (Yamamoto T., et al., 1992), которые распространены повсеместно, включая кору, подкорковые структуры, гиппокамп и другие структуры. Наличие специфических глиаглиальных межклеточных соединений является одним из определяющих факторов, как для развития мозга млекопитающих, так и для его нормального функционирования (Yamamoto T. et.al., 1990; Houades V. et. al., 2006; Takeuchi H, Suzumura A. 2014). Изучение строения межastroцитарных ЩК показало, что они функционально вовлечены в процесс регуляции экстраклеточной концентрации калия и других ионов, обеспечивая внутриклеточный и экстраклеточный ионный гомеостаз (Wallraff A. et al., 2006; Pannasch U., Rouach N. 2013). Предположительно, активность глии косвенным образом, через реакции поглощения внеклеточных ионов, может отражать активность нейронных сетей, способствуя формированию автономных ритмов внутрикорковых и подкорковых ансамблей (Longuemare M.C. et.al., 1999). Более того, astroцитарные ЩК вовлечены в перераспределение ионов K^+ после периодов нейронной активности, в процессы регуляции глутаматного гомеостаза и распространения кальциевых волн на длинные дистанции (Rottingen J., Iversen J.G., 2000).

По современным представлениям, объединенные с помощью ЩК астроциты формируют своеобразный глиальный синцитий (Nagy J.I., Rash J.E., 2003;

Giaume C., Liu X., 2012; Kirichenko E.Y. et al., 2016). Такие функциональные сети могут образовываться только между олигодендроцитами и астроцитами и называются панглиальные сети или gap junction-mediated glial networks. Панглиальные сети ЩК могут быть интегрированы в следующие процессы: развития и функционирования миелина (Tress O. et al., 2012), восстановления потенциала покоя на мембране аксонов путем перераспределения ионов калия (Nualart-Marti A., 2013), осуществления межклеточного обмена и перераспределения нейроактивных субстанций (Pannasch U., Rouach N. 2013). Также с участием астроцитарных ЩК происходит освобождение транмиттеров нейронами и астроцитами (Martin A.O. et. al., 2001). Сеть астроцитов, объединенных ЩК, динамически регулируется посредством фосфорилирования Cx43 протеинкиназами, включая протеинкиназу C и тирозинкиназу (Loo L.W., 1995). Фосфорилирование Cx43 индуцирует расщепление клеток и подавляет межклеточное сообщение посредством ЩК. При дефиците белка Cx43 в астроцитах наблюдается разрушение ЩК, и, как следствие, нарушение распространения кальциевых волн, что напрямую отражается на активности нейронов (Scemes E. et al., 1998).

Cx43 характерный для астроцитов также был обнаружен в большинстве изученных астроцитом человека и в астроглиальном компоненте нейроглиальных опухолей. В то время как в глиомах низких степеней злокачественности более чем 60% случаев, после проведения иммуногистохимии проявлялось интенсивное мембранное окрашивание, в большинстве астроцитом высоких степеней злокачественности отмечено снижение типичной мембранной и цитоплазматической экспрессии этого белка. Иммуноблотинг продемонстрировал наличие нескольких изоформ Cx43 как в контрольных образцах коры, так и в глиомах низких степеней злокачественности. При этом в большинстве злокачественных глиом присутствует только одна единственная изоформа Cx43, соответствующая нефосфорилированной форме. Повышенное, по сравнению с контрольной группой, содержание белка Cx43 было выявлено в реактивных астроцитах перифокальной зоны эпилептического очага, а так-

же в перифокальных зонах глиом низких степеней злокачественности. Возможно, это указывает на существование регуляторного пути с участием Cx43 и астроглиального синцития в регионах, подверженных опухолевому росту. В связи с этим существует предположение о том, что высокая экспрессия генов коннексинов в глиомах низких степеней злокачественности, как и в перитуморальных зонах может способствовать возникновению опухолезависимых эпилептиформных ритмов (Hamdan R. et al., 2013).

Коннексин 30 (Cx30)

Помимо Cx43 к коннексинам астроцитов относятся Cx30 и Cx26 (Koulakoff A. et al., 2008). Уже первыми работами было установлено, что белок Cx30 появляется в мозге в процессе индивидуального развития значительно позже Cx43 (Kunzelmann P., 1999). Проявление первой экспрессии гена Cx30 отмечается в астроцитах серого вещества с различными региональными закономерностями в развивающемся мозге и ближе к взрослому возрасту. При этом отличительной чертой Cx30 является почти полное его отсутствие в белом веществе. Подкорковые структуры мозга содержат большее количество этого белка, по сравнению с неокортексом (Nagy J.I., et al., 1999). Наблюдаемые различия в экспрессии Cx30 вполне могут быть связаны с функционированием нейронных сетей, в работу которых вовлечены те или иные локальные популяции астроцитов, экспрессирующие данный белок. Как показали проведенные нами ранее исследования, в коре мозга и обонятельной луковице основное количество коннексина 30 концентрируется в тонких веточках астроцитов вокруг микрокапилляров и сосудов. При этом в некоторых ЦК, типичных по ультраструктуре, продукты иммуногистохимической реакции с антителами к Cx30 локализованы только в одном из контактирующих отростков. Вероятно, такие ассиметричные контакты вокруг сосудов образованы двумя различными коннексинами астроцитов (Kirichenko E.Y., et al., 2018).

В экспериментах с нейротоксическим воздействием было выявлено сильное и специфичное изменение уровней экспрессии мРНК Cx30 в реак-

тивных астроцитах, находящихся в окружении нейронов, подвергшихся клеточной гибели. Это указывало на прямое или косвенное вовлечение этого типа коннексина в апоптоз нейронов (Nagy J., Rash J.E. 2000; Koulakoff A., et al., 2008). Также было показано, что мутации в генах, кодирующих Cx30, могут вызывать сенсорную потерю слуха и различные кожные заболевания (Hamdan R., et al., 2013). Мыши с дефицитом Cx30 проявляли патологию внутреннего уха, связанную с увеличением апоптоза клеток кохлеарного сенсорного эпителия, что приводило к отсутствию эндокохлеарного потенциала и прогрессированию потери слуха (Teubner B., et al. 2003).

Коннексин 26 (Cx26)

Cx26 является третьим (наравне с Cx30 и Cx43) представителем коннексинов глиальных клеток. В раннем нейрогенезе ген Cx26 экспрессируется в ЦНС в клетках лептоменингеальной оболочки, а также в астроцитах и нейронах развивающегося головного и спинного мозга (Nagy J., Rash J.E. 2000). И не смотря на то, что было высказано предположение о существовании ЩК, содержащих Cx26, связывающих нейроны и астроциты, морфологических подтверждений этому найдено не было (Filippov M.A., et al., 2003; Rash J.E., et al., 2007). По современным представлениям, Cx26 входит в состав гетеротипических ЩК между астроцитами и олигодендроцитами, поскольку часто отмечается его ко-локализация с коннексином 43, коннексином 30 и коннексином 32 (Nagy J., Rash J.E. 2000). Существование таких контактов свидетельствует о гетерогенности глиальных клеток по экспрессии коннексинов, о более сложном уровне состыковки коннексонов из гетеротипических комбинаций коннексина, нацеленной на взаимодействие нейронов и панглиальных сетей.

Врожденные мутации в гене GJB2 коннексина 26 являются основой калечащих синдромов нейросенсорной тугоухости, потери слуха и гиперкератоза с аутосомно-рецессивным (DFNB1) и аутосомно-доминантным типами наследования (DFNA3) (Richard G., et al., 1998; Heathcote K. Et al., 2000). Эти мутации описаны как миссенс мутации, которые приводят к неконсерватив-

ной аминокислотной замене, нарушению функции внеклеточной петли EL1 молекулы коннексина 26 и не способности белка образовывать коннексоны и ЩК. Более того, в литературе все чаще встречаются случаи сочетания описанного синдрома с пороком развития Дэнди Уокера (Todt I., et al., 2009), в связи, с чем очевидно, что роль гена *GJB2* немаловажна и в других, подобных этому пороку врожденных заболеваниях известной и неизвестной этиологии.

Коннексин 32 (Cx32)

Ген белка Cx32 экспрессируется в Шванновских клетках (леммоцитах), располагающихся вдоль аксонов периферических нервных волокон. Cx32 связывает тело клетки Шванна с миелиновой оболочкой и играет критическую роль в процессе миелинизации. Кроме того, Cx32 обнаруживается в олигодендроцитах и участвует в функциональных процессах, связанных с этими клетками (Scherer S.S., et al., 1995; Scherer S.S., et al., 1998). ЩК олигодендроцитов, содержащие белок Cx32, в основном составлены из гетеротипических коннексонов и выявляются между двумя олигодендроцитами, между олигодендроцитом и астроцитом, а также между последовательными слоями миелина (Nagy J., Rash J.E. 2000). Одним из наиболее известных заболеваний, связанных с мутацией в гене Cx32, является болезнь Шарко-Мари-Тута или наследственная моторно-сенсорная нейропатия (Клеора К.А. et al., 2012), проявляющаяся гиперплазией Шванновских клеток и миелинопатией: сегментарной демиелинизацией или ремиелинизацией. Одним из перспективных направлений терапии данного наследственного заболевания может являться доставка вектора с «правильным» геном *GJB1* для последующего встраивания в геном клеток млекопитающих.

Иннексины и паннексины

Коннексины являются не единственными каналобразующими белками ЩК. Существует, например, семейство белков, называемых иннексины (коннексины беспозвоночных). Гены иннексинов кодируют белки в ЩК *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, а также видов *Mollusca*, *Annelida* и *Platyhelminthes* (Phelan P., Starich T.A. 2001). При этом белки иннексины обра-

зуют функциональные ЩК (Landesman Y., et al., 1999). Белки паннексины (Panx1, Panx2 и Panx3) были открыты Ю. В. Панчиным в эмбрионе актинии *Nematostella vectensis* (Panchin Y., et al., 2000). Эти белки были признаны гомологичными белкам ЩК беспозвоночных (Bruzzone R., et al., 2003; Baranova A., et al., 2004). Молекулы иннексинов имеют мало сходства с коннексинами, за исключением двух консервативных остатков цистеина в их внеклеточных петлях. Однако, некоторые субъединицы коннексина и паннексина удивительно похожи (Hua V.B., et al., 2003). Функция паннексинов в ЦНС млекопитающих на настоящий момент остается неясной. Известно, что существует четкая экспрессия мРНК *Panx1* и *Panx2* в определенных нейронах, включая пирамидные клетки и интернейроны гиппокампа (Bruzzone R., et al., 2003). Однако на настоящий момент сложно ответить на вопрос существуют ли электрические синапсы нейронов позвоночных, составленные из паннексинов. На настоящий момент известно, что паннексины играют важную биологическую роль в качестве составляющих полуканалов, способствующих высвобождению АТФ, модулируя межклеточную передачу кальциевых волн (Scemes E., et al., 2007).

Подводя итоги этого раздела обзора литературы, следует заключить, что интерес к изучению структуры, функций, жизненного цикла ЩК и составляющих их белков в клетках живых организмов в норме и при развитии патологий постоянно растет в течение последних 50 лет. Количество исследований, посвященных коннекسينам, продолжает увеличиваться и в настоящее время. Актуальность исследований коннексинов в ЦНС обуславливается представлением о том, что объединенные ЩК клетки могут быть морфологической основой существующих регуляторных механизмов в мозге млекопитающих, обеспечивая функционирование неокортекса, гиппокампа, таламических ядер и других структур мозга. В этой связи в следующих разделах будет приведен анализ современных данных о строении корковых и подкорковых структур мозга - зон проекции вибрисс, где формируются цитоархитектонические группировки, состоящие из нейронных ансамблей.

1.2. Морфофункциональная организация коркового уровня тактильного анализатора крыс

Наличие колончатой организации областей коры известно достаточно давно, начиная с работ Лоренто де Но в 1938 году (de No R.L., Graham H.T., 1938). Однако сама колонка, как функциональная единица коры, была впервые описана Маунткаслем в соматической коре кошки в 1957 г. как группа вертикально расположенных по отношению к поверхности коры нейронов с их отростками. Причем связи между нейронами колонки по вертикали определялись как более мощные, а в горизонтальном направлении как более слабые (Mountcastle V.B., 1957). Еще в те годы им было высказано предположение, что корковая колонка вовлекается в процессы обработки и распределения информации. Позже организация S1 в виде колонок была обнаружена у 7 видов грызунов и у сумчатых (Weller W.L., Johnson J.I., 1975; Woolsey T.A., 1978). Помимо соматической коры, колонки были выявлены также в моторной, зрительной, ассоциативной коре и в других участках первичных проекционных зон. (Woolsey T.A., Van Der Loos H., 1970; Hubel D.H., 1977).

В настоящее время установлено, что в ходе эволюции млекопитающих наблюдается сохранение колончатой организации сенсорных зон коры. Структуру колонок можно наблюдать у каждого животного, в зависимости от того, какой рецепторный аппарат у него развит. У утконоса, например можно наблюдать колончатую организацию в коре как представительство периферийных электрорецепторов. Колончатую организацию соматической коры можно наблюдать как у грызунов, так и у насекомоядных - кротов, у которых развит тактильный анализатор. У плотоядных животных и приматов колончатую организацию имеет зрительная кора - это окуляр-доминантные колонки, колонки ориентации и колонки цветного зрения. (Hubel D.H. 1977; Lubke J., Feldmeyer D., 2007).

Традиционно при исследовании головного мозга мышей и крыс большое внимание привлекало развитие таламокортикальных и кортикоталами-

ческих связей на примере вибриссовой системы у грызунов. На каждом уровне следования сигнала от вибрисс к коре нервные клетки ЦНС формируют citoархитектонические группы - баррелеты в первичном тригеминальном ядре ствола мозга (PrV), баррелоиды в вентробазальном таламическом ядре (VPM) и баррели в первичной соматосенсорной коре (S1). Кортикальный уровень представительства вибрисс был открыт в процессе изучения морфологических особенностей колончатой организации соматической коры S1 грызунов. Именно тогда были обнаружены группировки клеток в форме бочонков или «баррелей», в дальнейшем эти поля сгруппированных нейронов были названы баррельной корой. Это открытие было сделано в 1970 Вулси и Ван дер Лузом в соматической коре мышей, а позже рядом авторов, в том числе и отечественных, баррельная кора была выявлена и у крыс (Woolsey T.A., Van der Loos H., 1970; Коган А.Б., Сухов А.Г., 1977; Woolsey N.A., Welker C., 1985). Баррельная кора является очень удобной моделью для исследования различных процессов, в том числе процессов развития мозга. Это привлекало многих исследователей к изучению данного объекта, в том числе, с использованием электрофизиологических, морфологических и иммуногистохимических методов (Сухов А.Г., 1992; Feldmeyer D. et al., 2002).

Группировки нейронов в виде баррелей являются частным случаем общего принципа колончатой организации коры мозга. Было показано, что каждая вибрисса имеет представительство в коре в виде отдельного барреля, причем каждому баррелю на уровне релейного ядра таламуса соответствует еще одна группировка таламокортикальных клеток - баррелоидов. При стимуляции соответствующей вибриссы можно наблюдать ответы в соответствующем баррелоиде и барреле, более того, при прямой электрической стимуляции соответствующего бочонка можно наблюдать антидромные фокальные ответы в соответствующем баррелоиде. В опытах с разрушением таламических афферентов было показано, что они направляются от вентрального

релейного ядра таламуса, прежде всего в 4 слой коры, по пути образуя проекции в 6 и 5 слои коры, а также поступают в меньшей степени в супрагранулярные 2, 3 слои коры. Таким образом, таламические афференты, поступая в кору в основном на уровне четвертого слоя, формируют конечную проекцию вибрисс в баррельную кору (Сухов А.Г., 1992, Сухов А.Г. и соавт., 2007; Кириченко Е.Ю., 2009).

На горизонтальных срезах коры, сделанных с помощью вибратома, бочонки хорошо визуализируются на глубине 400-600 микрон и имеют округлый вид, диаметр каждого бочонка составляет 100-300 мкм (рисунок 3). На фронтальных срезах баррельная кора имеет вид чередующихся колонок с большей или меньшей плотностью клеток (рисунок 4).

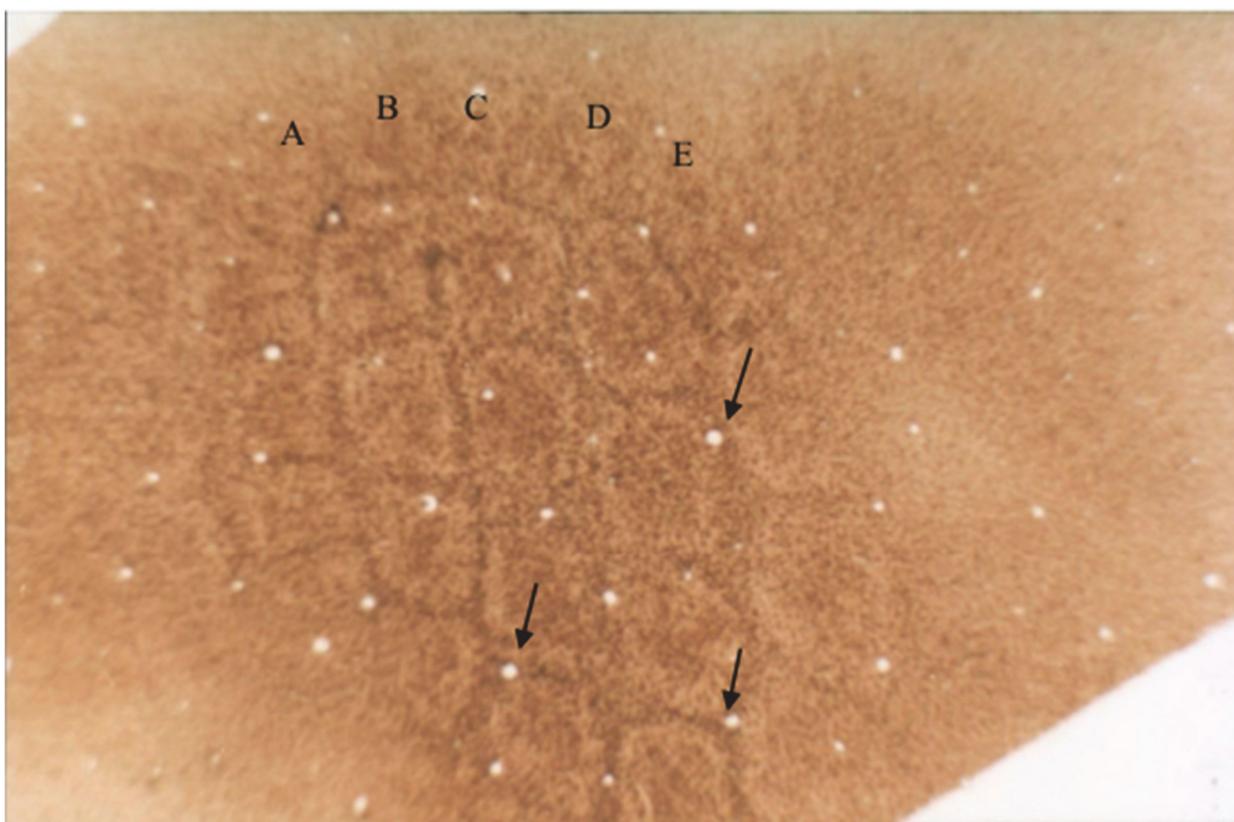


Рисунок 3 – Баррельная кора на тангенциальном срезе, толщиной 100 мкм. Буквами латинского алфавита обозначены ряды бочонков, стрелками – поперечно срезанные сосуды. Ув. 100. (Кириченко Е.Ю. с соавт., 2014)

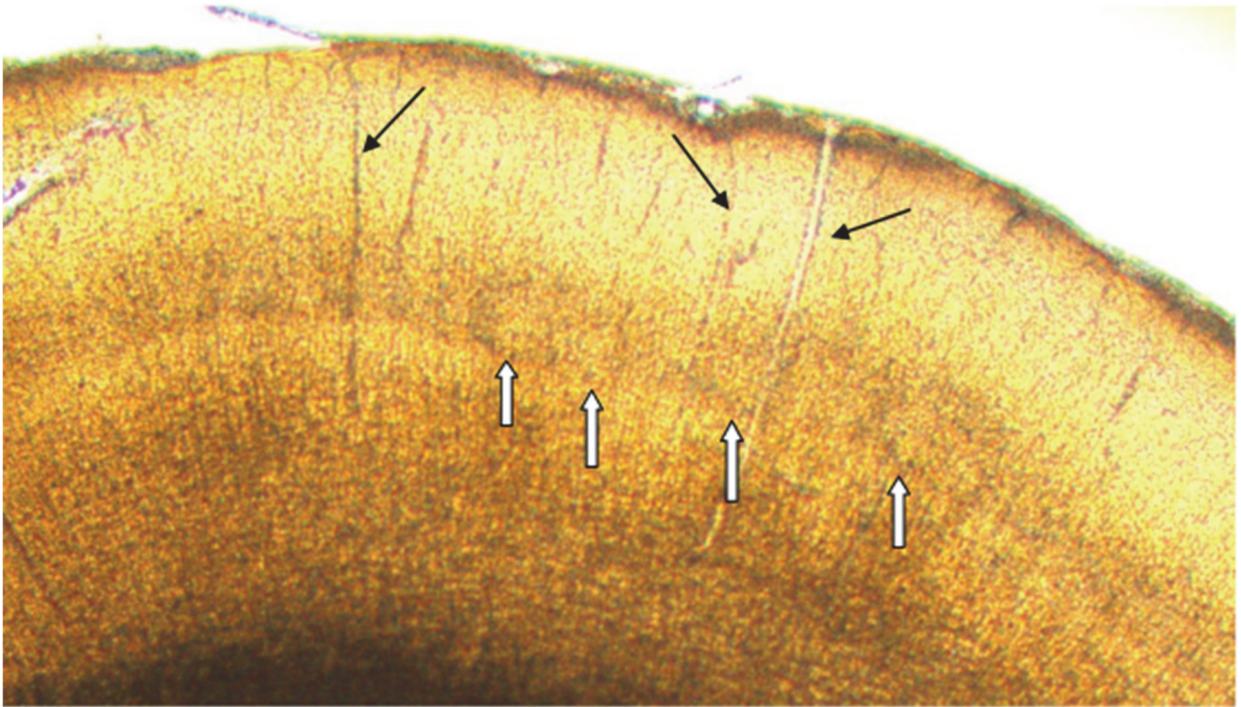


Рисунок 4 – Фронтальный срез, толщиной 100 мкм коры головного мозга с рассеченными вдоль радиальными сосудами (черные стрелки), белые стрелки – баррели IV слоя. Ув. 200. (Кириченко Е.Ю. с соавт., 2014)

При большем увеличении наблюдается неравномерная оптическая плотность среза из-за чередования более темных участков (стенка бочонка) и светлых участков (полость бочонка). Помимо стенки и полости хорошо различимо межбочонковое пространство или септы.

Ряды бочонков обозначают в соответствии с обозначением вибрисс животного буквами латинского алфавита (А, В, С, D,Е). В каждом ряду располагается от 5 до 9 бочонков, что соответствует количеству вибрисс, которые обозначаются цифрами (1, 2, 3, 4, 5 и так далее). Каждый бочонок, который является частью кортикальной колонки, содержит 10 000- 20 000 нейронов (Лапенко Т.К., Подладчикова Л.Н., 1983; Keller A., Carlson G.C., 1999). Эти пирамидные нейроны колонки являются основными возбуждающими нейронами и составляют 80-85% от всей нейрональной популяции, образующей в основном локальные корково-корковые проекции. Дендриты нейронов стенок бочонков ветвятся и направляются в полость бочонка навстречу таламокортикальным афферентам, где образуют синапсы, как на внутренней сто-

роне стенок бочонков, так и на внешней. В полости барреля располагаются таламокортикальные афференты от специфических ядер таламуса, которые поставляют сенсорную информацию в кору (зона ветвления 400-600 мкм), а в стенках и в септах барреля расположены ассоциативные внутрикорковые афференты, отвечающие за переработку первичного возбуждения. Третий вид афферентов – от неспецифического таламуса, проецируются в первый слой, а также в пятый - шестой слои коры. (Коган А.Б., Сухов А.Г., 1977). В четвертом слое соматической коры сосредоточено основное количество специфических таламокортикальных афферентов, причем они поступают также и в третий и в пятый слои, но в гораздо меньшем количестве. Если рассматривать афференты на уровне баррелоида, то здесь можно наблюдать поступление в него аксонов нейронных элементов продолговатого мозга, а от него, соответственно, идут специфические связи к разным слоям коры, причем нейроны меньшего размера проецируются в верхние слои, а нейроны большего - в нижние (Коган А.Б., Сухов А.Г., 1977).

Информация о качестве и/или количестве тактильных стимулов из колонки передается при помощи эфферентных волокон к различным цитоархитектоническим группам как неокортекса, так и подкорковых структур. Были обнаружены выходы из поля бочонков к перигранулярной полоске, к дисгранулярной и агранулярной зонам коры – части соматической коры, а также в зону SII, моторную кору, контралатеральную область проекции вибрисс. Кроме того, обнаружены связи с подкорковыми структурами: выходы к продолговатому, спинному мозгу, к верхним буграм четверохолмия, вентробазальному комплексу таламуса и к неспецифическим ядрам, тригеминальным ядрам, к красному ядру, базальным ядрам (Wise S.P., Jones E.G., 1977; Wise S.P., Jones E.G., 1978; Naus C.C., et al., 1985; Alloway K.D. et al., 1999).

В таламус обратные связи из колонки приходят в релейное ядро в соответствующий баррелоид или арку баррелоидов - образования, имеющие один порядковый номер в разных рядах (Hoogland P.V. et al., 1988). При этом различные обратные связи к подкорковым структурам классифицируют в зави-

симости от функций и участия в анализе тактильного стимула. Эфференты к таламическим релейным ядрам рассматриваются многими авторами, как «петли обратной связи, предназначенной для регуляции, избирательной фильтрации восходящего афферентного потока на уровне релейных структур» (Серков Ф.Н., Казаков В.Н., 1980; Сухов А.Г., 1992). Так как в верхних буграх четверохолмия было обнаружено совмещение зрительных и тактильных рецептивных полей, то проекции к верхним буграм четверохолмия несут функциональное назначение сопоставления тактильной информации от вибрисс и зрительной информации об объектах перед вибриссами (Лиманский Ю.П., 1976; Леонтович Т.А., 1978). Нисходящие связи от неокортекса к неспецифическим ядрам таламуса, ретикулярной формации среднего мозга, стриатуму несут функцию избирательной преднастройки, придания топической и модальной специализации деятельности этих неспецифических структур (Дуринаян Р.А., 1975; Толкунов Б.Ф., 1978; Кратин Ю.Г., Сотниченко Т.С. 1987).

Связи колонок соматической коры крыс на уровне IV слоя изучались при помощи введения в кору микродоз раствора пероксидазы хрена или примулина. Раствор вводился в отдельные бочонки соматической коры. При введении раствора в бочонок С3 меченые путем ретроградного аксонного транспорта нейроны располагались в соседних колонках в радиусе до 500 мкм от места инъекции. На уровне V слоя соматической коры число таких нейронов составляло 80%, на уровне II- III слоя- 20%. На уровне IV слоя меченые клетки в соседних колонках не выявлялись, что свидетельствует об отсутствии связей между нейронами бочонков IV слоя соседних колонок и об их функциональной обособленности (Лапенко Т.К., Подладчикова Л.Н., 1983).

Структурные особенности нейронов и их отростков в баррельной коре крыс также изучались при помощи метода серебрения по Гольджи (Woolsey et. al, 1975; Сухов А.Г., Лапенко Т.К., 1978). В работе Лапенко и Сухова исследованы различные типы нейронов, локализованных в стенках, полости и септах бочонков в IV слое соматической коры крыс. Для нейронов IV слоя

было характерно локальное ветвление дендритов, в пределах одного бочонка, нейроны этого типа составляли 85% от общего числа клеток, дендриты 15% нейронов были направлены за пределы бочонка. При этом дендриты стенок нейронов бочонка имели ассиметричный характер ветвления, направленный в полость бочонка навстречу таламокортикальным афферентам. Также было обнаружено, что внутрикорковые ассоциативные афференты, располагаются между бочонками и оканчиваются на телах стенок бочонка и их проксимальных дендритах, а специфические афференты контактируют с дендритами этих же нейронов, но только с теми, которые направлены в полость бочонка (Дуринян Р.А., 1975; Кратин Ю.Г., Сотниченко Т.С., 1987). Именно эти переплетения дендритов нейронов стенок бочонков, по-нашему мнению, и образуют множественные синаптические контакты, в том числе и электрические дендро-дендритические синаптические контакты, участвующие в локальной синхронизации ритмической активности нейронов колонки.

Проведенный анализ данных литературы показывает, что имеются достаточно обоснованные предпосылки для предположения о внутриколончатом формировании фокальной веретенообразной активности, индивидуальной для отдельных идентифицированных колонок соматической коры крыс. Морфофункциональной основой индивидуального ритмогенеза в колонке является локальный, ограниченный диаметром бочонков характер ветвления дендритов звездчатых тормозных нейронов IV слоя с наличием у них дендро-дендритических щелевых контактов, или электрических синапсов. Наличие электротонической связи между нейронами бочонка позволяет предполагать участие щелевых контактов в синхронизации ритмической активности нейронов этих цитоархитектонических группировок.

В то же время, несмотря на возрастающий интерес к изучению ЦК головного мозга млекопитающих, их распределение и роль в клеточных ансамблях таламических ядер мозга остаются не изученными. При этом в таламическом ядре VPM, подобно 4-му слою неокортекса, формируется второй уровень представительства вибрисс в головном мозге грызунов (Леонтович Т.А.,

1978; Серков Ф.Н., Казаков В.М., 1980; Henderson T.A., Jacquin M.F., 1992; Bosman L.W.J. et al., 2011; Feldmeyer D., 2012; Feldmeyer D. et al., 2013).

1.3. Морфофункциональная организация таламического уровня тактильного анализатора крыс

Таламус является коллектором различных видов чувствительности и главным звеном передачи различной информации в кору от подкорковых структур. В самом общем плане ядра таламуса можно разделить на три категории: специфические, неспецифические, ассоциативные (Дуринян Р.А., 1975; Леонтович Т.А., 1978; Серков Ф.Н., Казаков В.Н., 1980). Несмотря на то, что картина организации внешних таламических связей является достаточно известной (Сухов А.Г. 1992; Brecht M., Sakmann B., 2002), морфологические особенности, в том числе и синаптоархитектоника, ядер таламуса является малоизученным вопросом. Таламический уровень обработки тактильной информации располагается в вентробазальном комплексе или в вентральном ядре таламуса. Вентральное ядро таламуса является основным источником поступления специфической информации в соматическую кору и реципрочно связано с ней двусторонними топическими организованными связями, как на уровне таламуса, так и коры. Афферентные входы вентробазального комплекса включают в себя лемнисковые, спиноталамические, ретикулоталамические, тектоталамические, корковоталамические, стриатоталамические, а также проекции из ретикулярного ядра таламуса и гипоталамуса (Scheibel M.E., 1966). При этом лемнисковые афференты представлены в виде густых компактных ветвлений, формирующих упорядоченные концентрические слои. Каждый лемнисковый афферент может контактировать с 9-10 клетками вентробазального комплекса. Баррелоиды были впервые описаны Г. Ван дер Лузом в вентральном ядре таламуса мыши. Каждый баррелоид по Ван дер Лузу состоит из относительно бедной клетками центральной части и окружающих ее стенок, образованных плотно размещенными телами нейронов. Баррелоиды располагаются рядами, подобно рядам соответствующих виб-

рисс. Однако, Т. Woolsey было отмечено, что оптимальная плоскость среза должна быть наклонена не латерально, как у Г. Ван дер Луза, а медиально на 30° для возможности выявления всего поля баррелоидов в таламусе мыши. Позже баррелоиды были выявлены при помощи сукцинатдегидрогеназы, а также с помощью ретроградного аксонного транспорта пероксидазы хрена (Ivy J.O., Killaskey H.P., 1981). При этом каждый баррелоид представлял собой не округлое образование, а объединение клеток в виде изогнутых цилиндров 100-200 мкм в поперечном сечении и 500-800 мкм в длину (Saporta S., Kruger L., 1979).

В исследованиях профессора А.Г. Сухова в вентральном ядре была выявлена сформированная вытянутая на 750-1200 мкм колонка меченых релейных клеток, связанных с одним локальным микро участком в соматической коре (Сухов А.Г., 1992). Эти исследования проводились путем реконструкции расположения меченых нейронов специфического ядра таламуса после введения микродоз примулина в определенный бочонок в коре. Что касается таламокортикальных связей, по данным S. Wise и E. Jones (1978), часть таламокортикальных клеток дает связи в IV, VI, а также в I слою соматической коры. Предполагается, что клетки роstralной и центральной части таламической колонки дают окончания своих аксонов в пределах соответствующего бочонка в коре. Клетки каудальной части таламической колонки имеют более диффузное расположение в ядре и могут быть ответственны за окружающее торможение в коре (Wise S.P., Jones E.G, 1978).

В работе Бережной Л.А. (2013) исследование ядер таламуса человека показало, что вентральное ядро таламуса, по своему морфологическому строению, отличается от всех остальных ядер таламуса и напоминает корковое строение, но с отсутствием деления на слои. Также автор отмечает наличие первичных клеточных модулей в этом ядре: группировок мелких, средних и крупных клеток с переплетающимися, и, вероятно, контактирующими дендритами. Учитывая схожее строение двух зон представительства вибрисс (коркового и таламического), а также факт проекции одиночных колонок коры и

их нейронов к соответствующим баррелоидам таламуса, можно предположить существование аналогичных дендро-дендритных нейронных сетей, связанных щелевыми контактами, как в коре, так и в таламусе. По аналогии с баррелями коры, наличие электротонической связи между релейными клетками таламических баррелоидов предполагает участие электрических синапсов в локальной синхронизации ритмической активности внутри таламической колонки для модуляции сенсорной информации с вибрисс животного. Так, по мнению Бережной Л.А. можно предположить, что информация, поступившая на один из нейронов модуля таламуса способна распространиться на все или большую часть нейронов этого модуля через дендро-дендритные контакты (Бережная Л.А., 2013). С другой стороны, образование межклеточных глия-глиальных щелевых контактов может также обеспечивать модуляцию нейрональной активности релейных нейронов баррелоида вентрального ядра. Однако, вопрос существования как нейрональных сетей, объединенных электрическими синапсами, так и панглиальных сетей, объединённых щелевыми контактами в вентральном ядре таламуса остается открытым.

Точные функции ретикулярного ядра таламуса до сих пор не определены. Существует мнение о модулирующей роли нейронов этого ядра (Леонтович Т.А., 1978), о регулирующей информативной роли между таламусом и корой головного мозга (Lam Y. W., Sherman S.M., 2011; McAlonan K., Brown V.J., 2002). Также существует гипотеза о ключевой роли ретикулярного ядра таламуса в генезе таламических веретен (Shosaku A. et al., 1979). Коллатерали пейсмекерных ГАМК-ергических нейронов ретикулярного ядра таламуса являются единственным внешним источником торможения для всех ядер таламуса, в том числе для ядер VPM и PoM (Pinault D. et al., 1972; Ohara P.T. et al., 1983; Cox S.L. et al., 1997; Brecht M., Sakmann B., 2002; Huusko N., Pitkänen A., 2014). При этом, ретикулярное ядро, также как ядро VPM, имеет топическую организацию и зону представительства вибрисс. (Shosaku A. et al., 1984; Guillery R.W., Harting J.K., 2003; Pinault D., 2004). Изучение щелевых контактов ограничивается исследованиями в ретикулярном ядре таламуса (Long

М.А. et al., 2004; Haas J.S. et al., 2011; Chausson P. et al., 2013), а также единичными исследованиями, описывающими ЩК между нейронами релейных ядер, в основном в ядре VPM (Lee S.C. et al., 2010; Griemsmann S. et al., 2015). Но в этих работах не проводилось исследование локализации ЩК нейронов и глиальных клеток, а также не обсуждается их роль в формировании функциональных сетей и ансамблей. Таким образом, участие ЩК в процессах обработке информации в таламических структурах остается неизученной. Между тем известно, что наибольшее количество нейрональных ЩК или электрических синапсов имеют избирательный характер формирования и соединяют тормозные ГАМК-ергические интернейроны одного и того же типа (Sloper J.J., 1972; Sloper J.J., Powell T.P.S., 1978; Galaretta M., Hestrin S.A., 1999, 2002; Fukuda T., Kosaka T., 2003).

1.4. Заключение

Таким образом, проведенный анализ литературы показал, что на настоящий момент среди существующих индивидуальных белков коннексинов, специфичными и наиболее важными для ЦНС являются коннексин 36, коннексин 45, коннексин 43, коннексин 30, коннексин 26 и коннексин 32. Для многих коннексинов, в том числе для коннексинов ЦНС, характерно наличие сплайс-изоформ транскриптов, экспрессия которых является специфичной для различных тканей и органов. Экспрессия коннексинов может регулироваться как на транскрипционном, так и на трансляционном уровнях и является постоянным активным динамическим процессом клетки из-за короткого периода жизни, как самого белка, так и ЩК. При этом причины короткого периода полураспада как коннексинов так и ЩК внутри клетки до сих пор не известны. Вновь синтезированная молекула каждого коннексина имеет характерную известную структуру с внутриклеточными, внеклеточными и мембранными доменами, каждый из которых выполняет свои специфические функции. По пути миграции к биологической мембране коннексины претерпевают олигомеризацию или сборку молекул в гексагональную структуру -

коннексон. При состыковке коннексонов могут образовываться различные типы щелевых контактов, в том числе в ЦНС. Однако механизм и принцип совместимости этих полуканалов до конца не изучен. Деграция коннексинов в составе ЩК происходит с помощью эндо/ экзоцитарного процесса с образованием коннексосом и последующим разрушением этих структур в лизосомах или аутолизосомах.

Проанализированные работы по изучению ЩК ЦНС условно можно условно разделить на два основных направления: изучение нейронейрональных ЩК, составленных из коннексина 36 и/или коннексина 45 и изучение глия-глиальных ЩК, содержащие основные коннексины глии (коннексин 43, коннексин 30, коннексин 32, коннексин 26 и др.).

Большинство авторов существование ЩК между нервными клетками связывают с обеспечением процессов синхронизации, как локальной импульсной активности, так и ритмической активности целых групп нейронов определенного типа развивающегося и взрослого мозга, объединенных этими контактами. Ансамбли тормозных нейронов, объединенных ЩК или электрическими синапсами, были обнаружены в неокортексе и гиппокампе, однако остаются не изученными во многих других областях мозга, в том числе, в ядрах таламуса. При этом подобные сети нейронов могут играть важную роль в формировании и консолидации памяти, обработке пространственно-временной, сенсорной, внутриорганной информации, механизмах восприятия, концентрации внимания и других когнитивных процессах. Глиаглиальные ЩК и коннексины еще при развитии мозга способствуют адгезии во время миграции нейронов по тяжам радиальной глии. Во взрослом мозге такие контакты способствуют образованию панглиальных сетей, выполняющих ряд важных функций, например, контроль концентраций внеклеточных ионов и нейротрансмиттеров, а также осуществление метаболических процессов, обеспечивая внутриклеточный и внеклеточный гомеостаз. Кроме того, обеспечивая распространение кальциевых и калиевых волн, ЩК и полу-

каналы напрямую способны контролировать активность, как отдельных нейронов, так и нейронных сетей.

ЩК и коннексины являются актуальным объектом в плане исследования патогенеза различных патологий, в том числе ЦНС. Существуют врожденные мутации генов коннексинов, приводящие к наследственным заболеваниям - потери слуха, кожным заболеваниям, нейропатиям, ассоциированным с демиелинизацией, ремиелинизацией и дисплазией клеток и др. Дальнейший анализ особенностей молекулярной структуры, физиологических и поведенческих функций ЩК и коннексинов может способствовать развитию таргетной терапии коннексин - ассоциированных заболеваний, в том числе с помощью генной инженерии. Разработанное специфическое терапевтическое средство должно быть направлено на исправление поврежденных генов коннексинов, а также на стимуляцию восстановления новых белков и ЩК, обеспечивая персонализированное направленное лечение наследственных заболеваний человека и животных.

Как отмечалось выше, активно обсуждается возможная роль коннексинов и щелевых контактов в патогенезе фатальных инфекционных прионных болезней ЦНС: скрепи инфекций у овец и коз, губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота, трансмиссивной энцефалопатии норок. Кроме того, ЩК и полуканалы играют критическую роль при различных паразитарных инфекциях ЦНС позвоночных: токсоплазмозов, шистосомозов, случной болезни непарнокопытных и су-ауру верблюдов, лошадей, ослов, мулов и собак. ЩК и полуканалы могут играть ключевую роль в индуцированной паразитами повышенной проницаемости плазматической мембраны, в процессах клеточной дегенерации, а также в необходимом для инвазии паразитов росте концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в организме хозяина. Более того, ЩК способствуют обеспечению быстрого внутриклеточного и межклеточного распространения и персистенции в астроцитах вируса чумы собак при демиелинизирующем энцефалите, участие нейро-нейрональных ЩК в распространении

вируса псевдобешенства и развитии болезни Ауески у свиней, а также при распространении патологических ритмов мозга при эпилепсии.

Отдельно следует отметить важное значение исследований экспрессии коннексинов и формирования ЩК в контексте нейроканцерогенеза, однако, это направление находится в самом начале своего развития. Уже первые работы в этой области позволяют говорить о формировании нового взгляда на индивидуальную предрасположенность к опухолям головного мозга, а также о перспективе новых возможностей в диагностике и лечении неоплазм ЦНС. Различные сплайс-изоформы коннексинов, потенциальные регуляторные участки их генов и транскриптов, домены молекулы коннексина, управление функциональным состоянием ЩК могут послужить инструментами для поиска и создания новых терапевтических стратегий, основанных на регуляции экспрессии коннексинов и активности щелевых контактов и полуканалов в опухолях головного мозга человека.

Проведенный анализ литературы показал, что несмотря на возрастающий интерес к изучению ЩК и коннексинов головного мозга млекопитающих, их распределение и роль в клеточных ансамблях корковых зон и таламических ядер мозга остаются малоизученными. Не проводилось исследование взаимной локализации ЩК и химических синапсов, ко-локализации астроглиальных коннексинов, не изучены ЩК и коннексины в составе гематоэнцефалического барьера. Также не известна роль ЩК в формировании функциональных сетей и ансамблей клеток в корковых и таламических зонах представительства вибрисс, а их участие в процессах обработке информации в таламических структурах остается неясной.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал и методы исследования

Работа была выполнена на базе Лаборатории функциональной геномики и морфологии Академии биологии и биотехнологии им. И.Д. Ивановского Южного федерального университета, а также на базе кафедры «Биология и общая патология» факультета «Биоинженерия и ветеринарная медицина» Донского государственного технического университета в период с 2005 по 2020 гг. Исследование было проведено на лабораторных крысах линии Вистар. В экспериментах использовано 74 лабораторные крысы (самцы), весом 150–200 грамм (таблица 2). Животных содержали в стандартных условиях вивария на сбалансированном питании при свободном доступе к корму и воде. Содержание животных и экспериментальные исследования осуществлялись в соответствии с протоколом, утвержденным Комиссией по биоэтике Южного федерального университета 18 апреля 2012 года.

Таблица 2 – Объем исследованного материала

Методы исследования	Количество использованных животных	Количество полученных вибротомных срезов мозга	Количество стекол с парафиновыми срезами мозга	Количество ультратонких срезов
Иммуногистохимия	30	–	120	–
Иммунофлюоресценция и конфокальная микроскопия	9	27	–	–
Электронная микроскопия	25	100	–	400
Электронная иммуногистохимия	10	30	–	120

В работе использовалось комплексное исследование морфологических закономерностей и особенностей строения щелевых контактов клеток и со-

ставляющих их белков коннексинов в зонах формирования корковых и подкорковых нейронных ансамблей вибриссовой системы крыс. Работа проводилась с использованием современных методов исследования и их сочетания: гистологических, иммуногистохимических, иммунофлюоресцентной конфокальной микроскопии, электронномикроскопических на одиночных и серийных ультратонких срезах, иммуноэлектронномикроскопических и морфометрических.

Фиксация ткани головного мозга крыс.

Фиксация головного мозга животных осуществлялась путем транскардиальной перфузии. После взвешивания животных анестезировали путем введения нембутала в дозе 60 мг/кг и укрепляли на перфузионном столе посредством клейкой ленты. После внутривенного введения 0,1 мл гепарина производилась операция по вскрытию грудной клетки, срезались нижние части правого и левого желудочков, освобождая их просвет. В аорту через левый желудочек вводилась и фиксировалась канюля, соединенная с перфузионной системой Perfusion Two (Leica, Германия), оснащенной автоматическим насосом. Перфузию проводили вначале доведенным до 37⁰С раствором фосфатного буфера, рН 7,4 (Sigma-Aldrich, США), а затем охлажденным фиксирующим раствором. В зависимости от последующего метода исследования использовались три варианта фиксирующих растворов: 1) 10% формальдегид (Sigma, США) на фосфатном буфере (рН 7,4) для иммуногистохимического исследования; 2) 4% параформальдегид (Sigma, EMS, США) на фосфатном буфере (рН 7,4) для иммунофлюоресцентного, электронномикроскопического и иммуноэлектронномикроскопического исследований. Скорость перфузии соответствовала средней скорости движения крови по сосудам, общий объем перфузионных жидкостей в среднем составлял 500 мл. После окончания перфузии животное оставлялось в покое на 2 часа при комнатной температуре, затем головной мозг извлекался и помещался в соответствующий фиксирую-

ший раствор (10% формальдегид, 2,5% глутаровый альдегид, 4% параформальдегид) для дофиксации на ночь при температуре 4° С.

Изготовление вибротомных и микротомных срезов для гистологического и иммуногистохимического исследований.

В головном мозге крыс объектами исследования являлись области коркового (баррельная кора S1) и таламического (ядер VPM, VPL, RT) представительства вибрисс. После постфиксации из головного мозга выделялась секция по координатам: первый разрез - 0,2 мм растрально от брегмы, второй разрез - 6,04 мм каудально от брегмы, при этом, латерально мозг не пересекался. Иссеченный фрагмент мозга приклеивался каудальной стороной среза вниз к столику вибратома VT 1000E (Leica, Германия). Далее изготавливались фронтальные срезы толщиной 100 мкм, каждый из которых помещался в каплю фосфатного буфера в чашке Петри и просматривался под стереотаксической лупой. Как только на фронтальных срезах в соответствии с атласом идентифицировались исследуемые объекты (баррельная кора, ядра таламуса), резка прекращалась. Для изготовления тангенциальных срезов баррельной коры к столику вибратома приклеивали область соматической коры, предварительно выровненной при помощи небольшого гнета. Далее изготавливали тангенциальные срезы толщиной 100 мкм до тех пор, пока не обнаруживали поле баррелей на глубине 400 мкм от поверхности мозга. В дальнейшем головной мозг животных обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафиновый блок. С парафиновых блоков изготавливали парафиновые срезы толщиной 4 мкм на микротоме HM 340E Thermo Scientific (Microm, Германия). Часть срезов окрашивали гематоксилином и эозином, другие срезы использовали для проведения иммуногистохимического исследования.

Иммуногистохимические методы исследования

Иммуногистохимию проводили в автоматическом роботизированном аппарате для постановки иммуногистохимических реакций Autostainer Plus (Дако, Германия) по следующему протоколу: блокирование эндогенной пероксидазной активности, обработка первичными антителами (15-30 минут, в соответствии с инструкцией к антителам), обработка вторичными антителами (30 минут), обработка субстрат-хромогеном (8 минут), окраска ядер гематоксилином Майера (5 минут). В промежутках срезы промывались промывочным буфером трис-HCl, содержащим Triton-X, что снижает фоновое окрашивание и способствует проникновению растворов в ткань. В качестве первичных антител использовались моноклональные и поликлональные мышиные и кроличьи антитела (табл. 3). Выявление иммунных комплексов проводилось с использованием системы визуализации EnVision/HRP + Peroxidase (Дако, Дания). При каждой постановке реакции проводился отрицательный контроль, во время которого вместо первичных антител на срезы наносился буфер. Светооптическое исследование проводилось при помощи микроскопа DM 2500 (Leica, Германия) со встроенной камерой DFC 495 (Leica, Германия).

Метод флуоресцентной конфокальной микроскопии.

Часть срезов головного мозга крыс были использованы для иммунофлуоресцентного исследования с помощью конфокального микроскопа. В качестве фиксатора этих тканей использовался 4% параформальдегид. Для иммунофлуоресцентного исследования из ткани головного мозга крыс изготавливались вибратомные срезы толщиной 40 мкм. Далее срезы были разделены на группы для инкубации в смеси первичных антител (табл. 3) с добавлением 0,1% азида натрия в двух вариантах:

1 – мышинные моноклокальные антитела к глиальному фибриллярному белку и кроличьи поликлональные антитела к коннексину 43;

2 – мышинные антитела к глиальному фибриллярному белку и кроличьи антитела к коннексину 30 в течение 7 суток при температуре 20°C.

Таблица 3 – Первичные антитела для иммуногистохимического исследования

Антиген	Клональность	Разведение	Производитель
Neurofilament, мышинное – маркер промежуточных филаментов нервных клеток	клон F11	1:100	Dako, Дания
Synaptophysin, мышинное - маркер синаптических везикул	клон SY38	5:100	Dako, Дания
Myelin Basic Protein, кроличье – маркер основного белка миелина	поликлональное	rtu	Dako, Дания
Glial fibrillar Acidic Protein, кроличье-маркер глиофибрилл глиальных клеток	поликлональное	1:500	Dako, Дания
Glial fibrillar Acid Protein, мышинное-маркер глиофибрилл глиальных клеток	клон 6F2	2:100	Dako, Дания
Anti-Parvalbumin, мышинное - маркер к кальций связывающему белку парвальбумину	клон PARV-19	1:2000	Sigma-Aldrich, США
Anti-Somatostatin Receptor Type2, кроличье – маркер к пептидному гормону соматостатину	поликлональное	1:200	Sigma-Aldrich, США
Anti-Connexin 36, кроличье - маркер коннексина 36 щелевых контактов нейронов	поликлональный	1:50	Invitrogen, США
Anti-Connexin 43, кроличье - маркер коннексина 43 щелевых контактов астроцитов	поликлональное	1:100	Spring Bioscience, США
Anti-Connexin 30, кроличье - маркер коннексина 30 щелевых контактов астроцитов	поликлональное	1:200	Spring Bioscience, США

Затем срезы промывали в фосфатном буфере и инкубировали в течение суток при температуре 20°C в смеси с присутствием вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой: козы антитела anti-Rabbit CF488A, в разведении 1: 200 (Sigma-Aldrich, США) и козы антитела anti-mouse CF555, в разведении 1: 200 (Sigma-Aldrich, США). После инкубации срезы промывали в фосфатном буфере, монтировали на стекла в среде, препятствующей выцветанию флуоресцентных сигналов Fluorescence Mounting Medium (Dako, Дания), накрывали покровным стеклом и исследовали с использованием лазерного сканирующего двухфотонного микроскопа (Zeiss LSM880, Германия).

Электронная микроскопия.

Для стандартного электронномикроскопического исследования головной мозг животных фиксировался методом перфузии, описанным выше. Из секции головного мозга крыс изготавливались фронтальные вибратомные срезы толщиной 60 микрон, отбирались срезы, содержащие колонки соматической коры и исследуемые ядра таламуса. После промывки в фосфатном буфере (не менее 15 минут) срезы головного мозга крыс дополнительно постфиксировались в 1% растворе OsO₄ на фосфатном буфере в течение 1,5 часов. Далее все образцы тканей обезвоживались в спиртах восходящей концентрации и абсолютном этаноле, обрабатывались в трех сменах пропилен оксида и заключались в эпоксидную смолу на основе Эпон-812. Срезы головного мозга крыс помещались в каплю смолы между двумя предметными стеклами с нанесенным водорастворимым антиадгезивом Liquid Release Agent (EMS, США). Полимеризация тканей головного мозга проводилась при 70⁰ в течение ночи. Из полученных после полимеризации срезов головного мозга крыс лезвием под стереотаксической лупой иссекались фрагменты исследуемых колонок коры и ядер таламуса и приполимеризовывались к заранее изготовленному блоку из эпоксидной смолы. Одиночные и серийные (до 20 срезов в одной ленте) ультратонкие срезы толщиной 70 нм изготавливались с помощью ультрамикротомы EM UC 7 (Leica, Германия) и алмазного ножа ultra 45°

(Diatome, Швейцария), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривались под электронными микроскопами Jeol 1011 (Jem, Япония) и Tecnai G2 Spirit BioTWIN (FEI, Голландия) с ускоряющим напряжением 80-100 кВ.

Электронная иммуногистохимия.

Электронная иммуногистохимия проводилась на срезах головного мозга крыс по собственным разработанным протоколам pre-embedding и post-embedding. Метод pre-embedding (перед заливкой) основан на том, что инкубация срезов с первичными и вторичными антителами, а также выявление иммунных комплексов проходит до проводки и заливки срезов в эпоксидную смолу для электронной микроскопии. Перфузия животных производилась с использованием 4% параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) в качестве фиксирующего раствора. 60 мкм вибраторные срезы помещались поочередно в растворы 6%, 15% и 30% сахарозы для криопротекции. Демаскировка антигенной активности осуществлялась путем мгновенного замораживания срезов над парами жидкого азота и последующего размораживания в фосфатном буфере. Далее срезы инкубировались в первичных антителах к глиальному фибриллярному кислому белку, парвальбумину, коннексину 36, коннексину 43, коннексину 30 в соответствующих разведениях (таблица 3) с добавлением 0,1 % азида натрия для предотвращения бактериального роста. Инкубация производилась в течение 4 суток при температуре 20°C. После промывки в фосфатном буфере срезы инкубировались во вторичных антителах RTU EnVision Flex/HRP anti-mouse, anti-rabbit (Dako, Дания) в течение суток при температуре 20°C. Выявление иммунных комплексов проводилось с использованием системы визуализации EnVision HRP + Peroxidase (Dako, Дания). Далее обработка ткани проводилась стандартными для электронномикроскопического исследования методами, описанными в разделе «иммуногистохимические методы исследования».

Метод post-embedding (после заливки) основан на том, что инкубация срезов с первичными и вторичными антителами, а также выявление иммунных комплексов осуществляется после проводки и заливки срезов в эпоксид-

ную смолу для электронной микроскопии. Для осуществления электронной иммуногистохимии по протоколу post-embedding приготовленные обычным путем ультратонкие срезы монтировались на никелевые сетки 300 меш (EMS, США) для увеличения степени адгезии. Далее сетка со срезом с помощью пинцета последовательно перемещалась из одной капли необходимого раствора в другую, объемом 25 мкл. Демаскировка антигенной активности осуществлялась раствором 1% метапериодата натрия в течение 7 минут. После серии промываний в растворе натрий-фосфатного буфера с добавлением бычьего сывороточного альбумина Aurion BSA-C (Aurion, США) сетки инкубировались в блокирующем растворе Blocking Solution for goat gold conjugates (Aurion, США) 60 минут, а затем в растворе первичных антител к коннексину 43 (таблица 3) в течение суток при 4⁰ С. Инкубация во вторичных антителах, конъюгированных с коллоидным золотом размером 10 нм (Goat-anti-rabbit, IgG, 10 nm, Aurion, США) проводилась в течение 2 часов в разведении 1:20. Далее сетки помещались в каплю 2% глутарового альдегида на фосфатном буфере, подсушивались, контрастировались и просматривались под электронным микроскопом.

Морфометрические методы исследования.

Морфометрический анализ структур и продуктов реакции на светооптическом уровне проводили при помощи модуля интерактивных измерений (LAS Interactive Measurement) лицензионной программы Leica Application Suite 4.3 (Leica, Германия). Для морфометрического анализа исследуемых ультраструктур с помощью цифровой камеры Erlangshen ES500W (Gatan, США, Канада) производился ввод и анализ изображений в графическом формате .tif - оптимально для идентификации и измерения ультраструктуры синапсов. Морфометрия проводилась с использованием лицензированных программ Qwin (Leica, Кембридж Англия). Запись электроннограмм производилась с увеличением $\times 40\ 000$. Результаты получены в абсолютных единицах измерения – микронах и нанометрах. Цифровая камера оснащена программным обеспечением Digital Micrograph (Gatan, США), которая позволяла осуществить коррекцию изображения методами цифровой фильтрации.

2.2. Полученные результаты и обсуждение

2.2.1. Распределение нейрональных и глиальных антигенов

в колонках соматосенсорной коры, вентральных и ретикулярном ядрах таламуса крысы

2.2.1.1. Экспрессия нейрональных и глиальных антигенов

в баррельной коре головного мозга

По материалам этого раздела была опубликована статья “Distribution of neuronal and glial antigens in somatosensory cortex columns in the rat brain (an immunohistochemical study)” в журнале «Neuroscience and Behavioral Physiology», Т. 45, №3, в 2015 году авторами Kirichenko E.Y., Grankina A.O., Logvinov A.K., Povilaitite P.E., а также статья «Structural organization of the barrel cortex in rats (an immunohistochemical study)» в журнале «Neuroscience and Behavioral Physiology», Т. 41, № 1, в 2011 году авторами Logvinov A.K., Kirichenko E.Y., Sukhov A.G., Povilaitite P.E.

Развивая тему кандидатской диссертации «Структурно-функциональное исследование механизмов организации веретенообразной активности нейронов бочонка соматической коры крысы» (Кириченко Е.Ю., 2009) в данном разделе мы представляем результаты иммуногистохимического исследования особенностей пространственного распределения в бочонках S1 коры нейрональных белков (синаптофизина и нейрофиламентов), антигенов глиальных клеток (глиального фибриллярного кислого белка и основного белка миелина) и обсуждаем их возможную роль в структурной организации баррельной коры. Отдельно нами была выделена задача послойного морфометрического исследования иммуномеченных парвальбумин - содержащих (PV⁺) нейронов в баррельной коре. Понимание структурно-функциональной организации и морфологических характеристик парвальбумин-содержащих, ГАМК-ергических быстроспайковых нейронов корковых колонок способствует пониманию их роли в процессах торможения, синхронизации и регуляции ритмогенеза как коры, так и подкорковых структур (Tonini N. et al., 2001; Galarreta M., Hestrin S., 2002; Lubke J., Feldmeyer D., 2007).

Полученные в данном разделе данные об иммуноморфологической архитектонике исследуемых областей коры и таламуса необходимы для понимания морфофункциональной роли расположенных в них щелевых контактов.

При окраске гематоксилином и эозином на срезах в зоне баррельной коры определяются небольшие группировки или цепочки крупных ядер нейронов, цитоплазма нервных клеток в этой окраске сливается с нейропилем и не видна. Возможно, в связи с этим увидеть характерную отчетливую ячеистую структуру на тонких фронтальных, также как и на тангенциальных срезах (толщина 4 микрона) не удастся (рисунок 5).

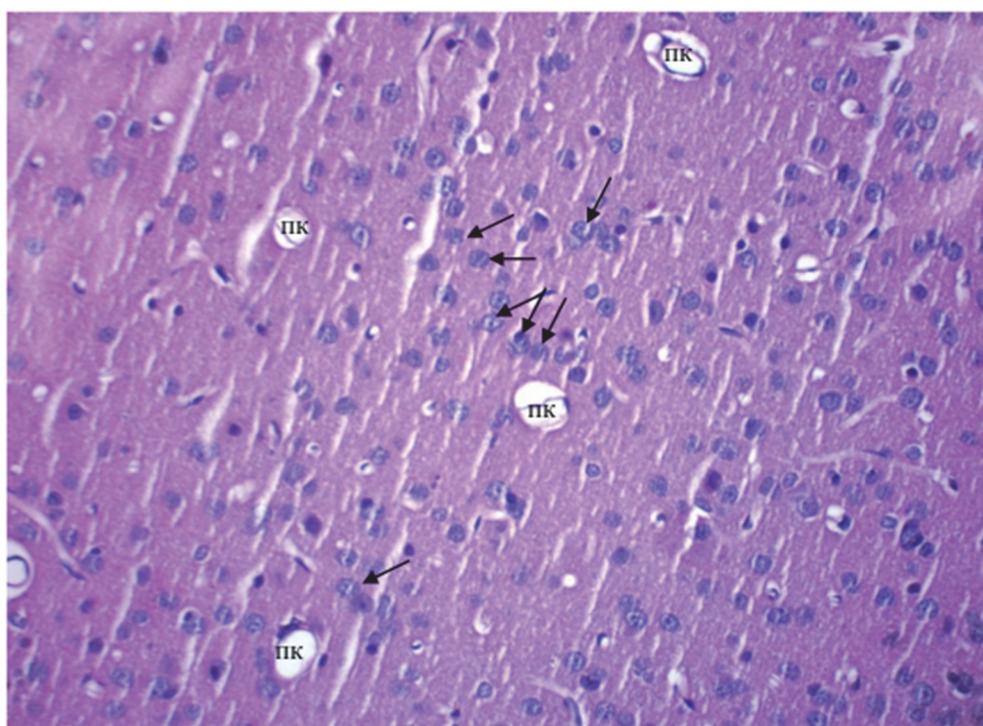


Рисунок 5 – Цепочки ядер нейронов в гистологическом препарате баррельной коры мозга крыс, окраска гематоксилином и эозином. Стрелками указаны цепочки и группы нейронов, пк – просветы капилляров. Ув. 200

Также причиной может быть более плотное расположение нервных клеток по глубине, чем в поперечном сечении коры. Группы и цепочки ядер нервных клеток разделены широкими эозинофильными полями нейропиля, хорошо видны просветы капилляров мозга, вокруг некоторых имеется про-

светление – астроцитарные периваскулярные муфты. На большем увеличении кроме нейронов с крупными округлыми ядрами, нежным мелкодисперсным хроматином и одним-двумя заметными ядрышками, определяются мелкие глиальные клетки с овальным ядром и плотным хроматином – олигодендроциты, а также капилляры, срезанные как поперек просвета, так и вдоль (рисунок б).

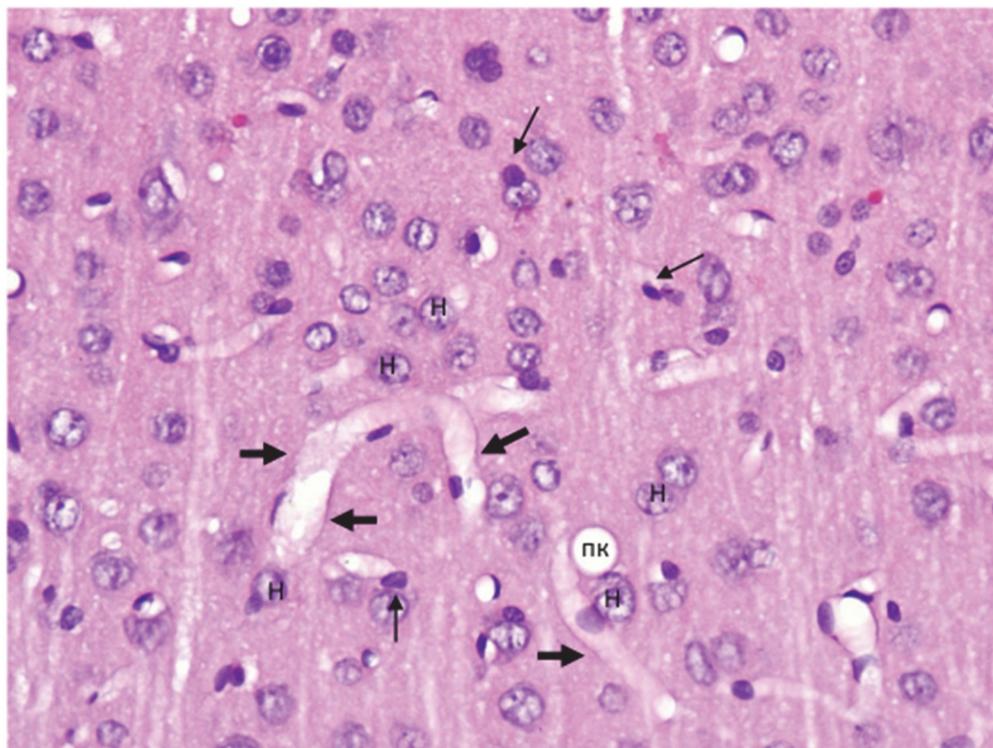


Рисунок б – Нервные и глиальные клетки баррельной коры крысы. Окраска гематоксилином и эозином. Толстыми стрелками указан срезанный вдоль сосуд, пк – просвет капилляра, Н- нейроны, тонкие стрелки – клетки глии. Ув. 400

С целью дальнейшего изучения строения баррельной коры мы провели на серийных срезах иммуногистохимические реакции для выявления и характеристики экспрессии основных, антигенов, характерных для нервной ткани. Использовались первичные антитела против синаптофизина, нейрофиламентов, глиального фибриллярного кислого белка, основного белка миелина, парвальбумина. Баррельную кору для получения серийных срезов предварительно идентифицировали при помощи исследования толстых срезов, полу-

ченных на вибраторе. Количество изготовленных тонких срезов для иммуногистохимического исследования ограничивали, чтобы не превысить 20-30 микрон по общей толщине, что гарантирует нахождение в пределах баррельной коры. В отличие от обычных гистологических методов, результат иммуногистохимической реакции уже на малом увеличении X100 визуализируется достаточно отчетливо. Прослеживается более интенсивное окрашивание нейропиля в зоне стенок баррелей и светлая центральная часть каждого бочонка. Интенсивность окрашивания, то есть количество продукта реакции - выпавшего хромогена, в данном случае напрямую отражает количественное распределение антигенных детерминант в разных участках среза.

Распределение синаптофизина в баррельной коре

Изучение распределения синаптофизина на тангенциальных срезах показало значительно более интенсивную экспрессию этого белка в стенках баррелей, что позволяет после проведения иммуногистохимической реакции идентифицировать характерное сетчатое строение баррельной коры даже на срезах, толщина которых не превышает 4 микрона (рисунок 7). Поскольку в данном случае использовали моноклональные антитела против синаптофизина – белка, содержащегося в синаптических везикулах химических синапсов, можно сделать вывод, что количество химических синапсов и/или содержание в них синаптических везикул значительно больше в стенках баррелей, чем в их центральной части. За счет различной интенсивности окрашивания картина сходна с таковой на толстых 100-микронных срезах, изготовленных на вибраторе. При больших увеличениях обращают внимание группы и цепочки ядер нервных клеток, которые располагаются вблизи от зон интенсивного выпадения продукта реакции, то есть, в участках с высоким содержанием белка синаптофизина (рисунок 7Б,В). Вокруг некоторых нервных клеток скопление гранул хромогена образует подобие ярко окрашенного ободка, по-видимому, в этих участках имеются скопления химических синапсов с большим числом синаптических везикул (рисунок 7В).

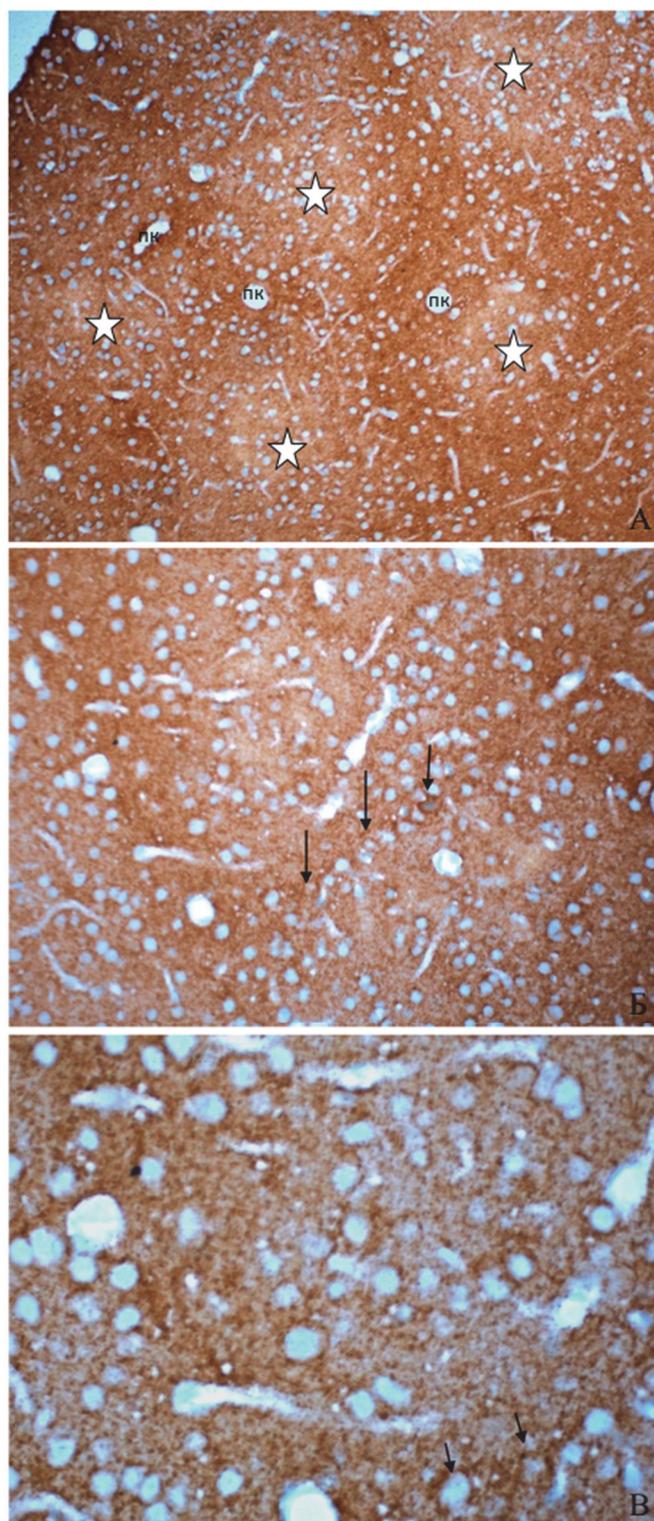


Рисунок 7 – А – Баррельная кора на тонких срезах, толщиной 4 мкм, выявленная с помощью антитела к синаптофизину (тангенциальные срезы). Б – Фрагменты двух баррелей, четко визуализируется граница септы барреля (стрелки), содержащая более интенсивное количество продуктов реакции. В – Скопления гранул хромогена вокруг ядер нервных клеток (стрелки). Условные обозначения: пк – просветы капилляров, звездочками обозначены менее интенсивно окрашенные полости бочонков. А-Ув. 100., Б – Ув. 400. Ув. 1000

При изучении фронтальных срезов с использованием антител к белку синаптофизину было установлено, что этот антиген распределен в соматической коре по вертикали равномерно. Эти результаты показывают, что распределение химических синапсов в различных слоях по глубине колонки равномерно, за исключением молекулярного, I слоя, где экспрессия этого белка выражена значительно сильнее, а границы колонки с использованием антител к синаптофизину можно определить только на тангенциальных срезах коры (рисунок 8).

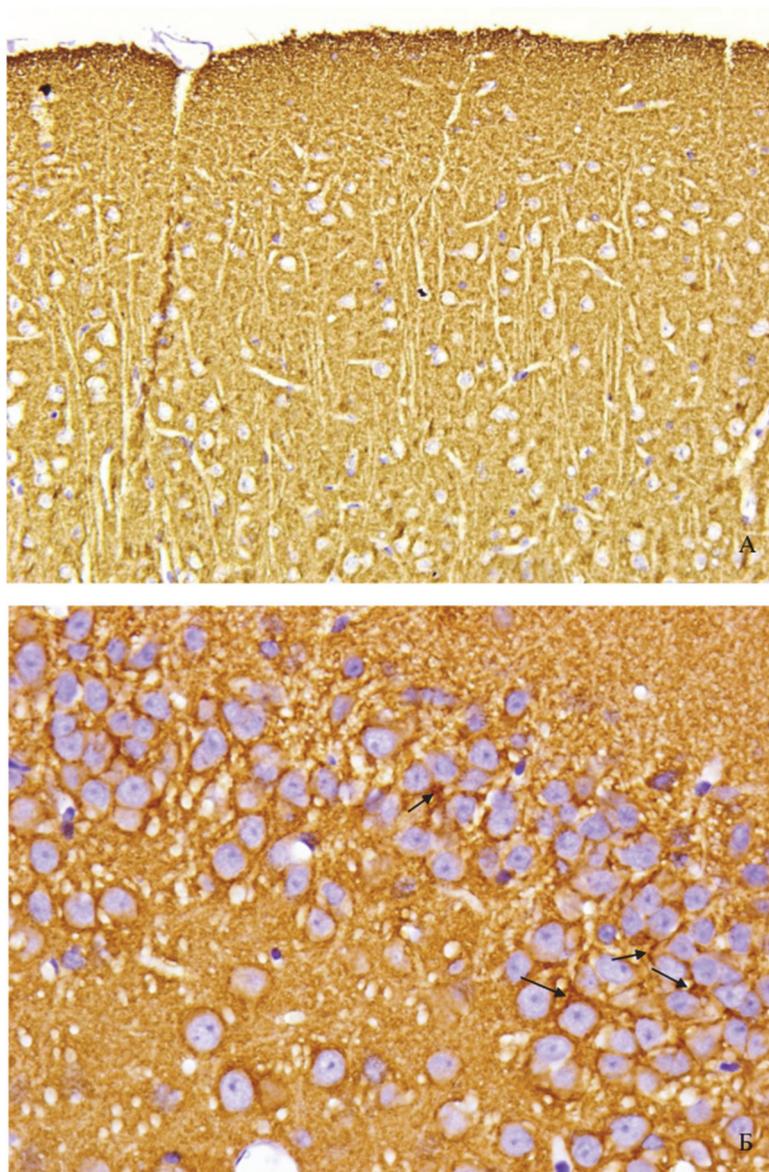


Рисунок 8 – Экспрессия синаптофизина на фронтальном срезе соматической коры. Стрелками указана повышенная экспрессия синаптофизина между группировками клеток. А-Ув. 200, Б-Ув. 400

Согласно литературным данным, I, молекулярный слой коры представляется уникальным по структурно-функциональной организации нейропиля, который состоит из тонких горизонтальных ветвлений апикальных дендритов пирамидных клеток. Этот слой формируется на самых ранних этапах развития коры и тесно связан с неспецифической афферентацией, возникающей еще до этапа прорастания в кору специфических таламокортикальных афферентов, участвует в нейрогенезе других слоев коры (Хожай Л.И., Отеллин В.А., 1999; Rakic P., 2003). Характерной особенностью данного слоя также является сплетение ингибирующих аксонов от звездчатых клеток всех слоев коры (Shlosberg D. et. al., 2003).

Белок синаптофизин был первоначально выделен из пресинаптических везикул химический синапсов мозга крыс и является кислым гомо-олигомерным интегральным мембранным гликопротеином, вес мономера которого составляет 38 kDa (Wiedenmann B., Franke W.W., 1985). Этот везикулярный белок состоит из четырех трансмембранных сегментов, и, по-видимому, принимает участие в процессе освобождения медиатора посредством экзоцитоза, то есть на этапе слияния мембраны синаптической везикулы с пресинаптической мембраной активной зоны химических синапсов. Было показано, что синаптофизин способен формировать каналы в искусственных липидных мембранах, поэтому считается, что он участвует в образовании временной поры между секреторной везикулой и плазматической мембраной. Кроме того, вероятно, синаптофизин выполняет определенную роль на этапе рециклизации везикулы посредством эндоцитоза (Зефиоров А.Л., 2000). Таким образом, синаптофизин является специфическим компонентом синаптических везикул аксонных терминалей практически всех нейронов и не обнаруживается в других клетках.

Полученные результаты проведенного иммуногистохимического исследования показали, что наибольшее количество синаптофизина, а, следовательно, химических синапсов, расположено в стенках баррелей, а также в молекулярном слое коры.

Распределение нейрофиламентов в баррельной коре.

Нейрофиламенты относятся к семейству промежуточных филаментов и являются структурным элементом цитоскелета нервных клеток, они взаимосвязаны с актином, микротрубочками и другими промежуточными филаментами. Нейрофиламенты состоят из триплетов - трех различных, но родственных белковых субъединиц с различным молекулярным весом: L (low - 70 kDa), M (middle - 150-160 kDa), H (high - 200 kDa). Каждая белковая субъединица имеет собственную антигенную специфичность и является продуктом отдельного гена. При формировании нервной ткани в эмбриогенезе наблюдается коэкспрессия белков нейрофиламентов L и M типов, активация белка H типа строго ограничена постнатальным периодом. Белки M и H типа неспособны к самосборке и формируют ко-полимеры, или триплеты нейрофиламентов, с белком L-типа (Schlaepfer W.W., 1987; Herrmann H., Aebi U., 2000). В своих исследованиях мы использовали антитела, которые специфично связываются с L-типом белка триплетов нейрофиламентов, который содержится в нервных клетках и их отростках как эмбриональной, так и зрелой нервной ткани. При этом, по данным литературы, нейрофиламенты могут быть вовлечены в процессы трансформации кратковременной памяти в долговременную внутри корковых модулей, таких как бочонки (Huang W., et. al., 2013).

Изучение серийных тангенциальных срезов баррельной коры после проведения иммуногистохимической реакции с моноклональными антителами к нейрофиламентам показало, что характерный ячеистый рисунок выявляется слабее, в отличие от реакции на синаптофизин. Однако, в некоторых случаях нами были четко идентифицированы стенки и средняя часть отдельных баррелей (рисунок 9). На больших увеличениях в нейропиле той области серийных срезов, которая соответствует расположению бочонков, находятся отдельные скопления ярко окрашенных срезанных поперек крупных нервных клеток и их отростков – аксонов, дендритов с высоким уровнем экспрессии нейрофиламентов. Зоны нейропиля, имеющие большую плотность, на большом увеличении выглядят как стенки отдельных

бочонков (рисунок 10). В других участках баррельной коры на большом увеличении нейропиль имеет более высокую плотность, но не за счет скоплений нейронов, а за счет большего количества срезанных вдоль и поперек тонких отростков нервных клеток – мелких аксонов и дендритов, экспрессирующих белки нейрофиламентов (рисунок 11).

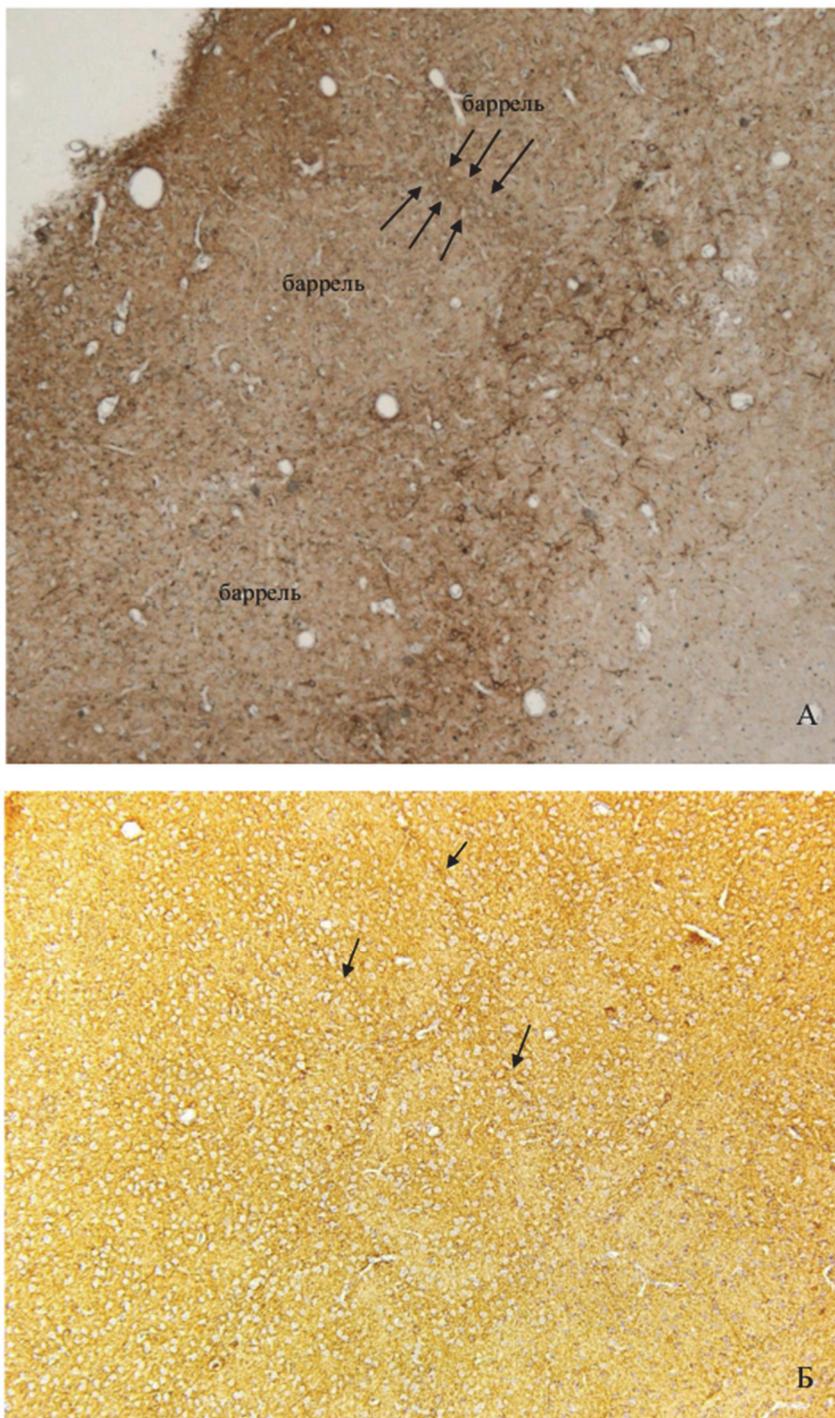


Рисунок 9 – Иммуногистохимическая реакция с первичными антителами к нейрофиламентам на тангенциальном срезе с наличием баррельного поля. Стрелками обозначена граница между двумя баррелями. Ув. А-50, Б-100

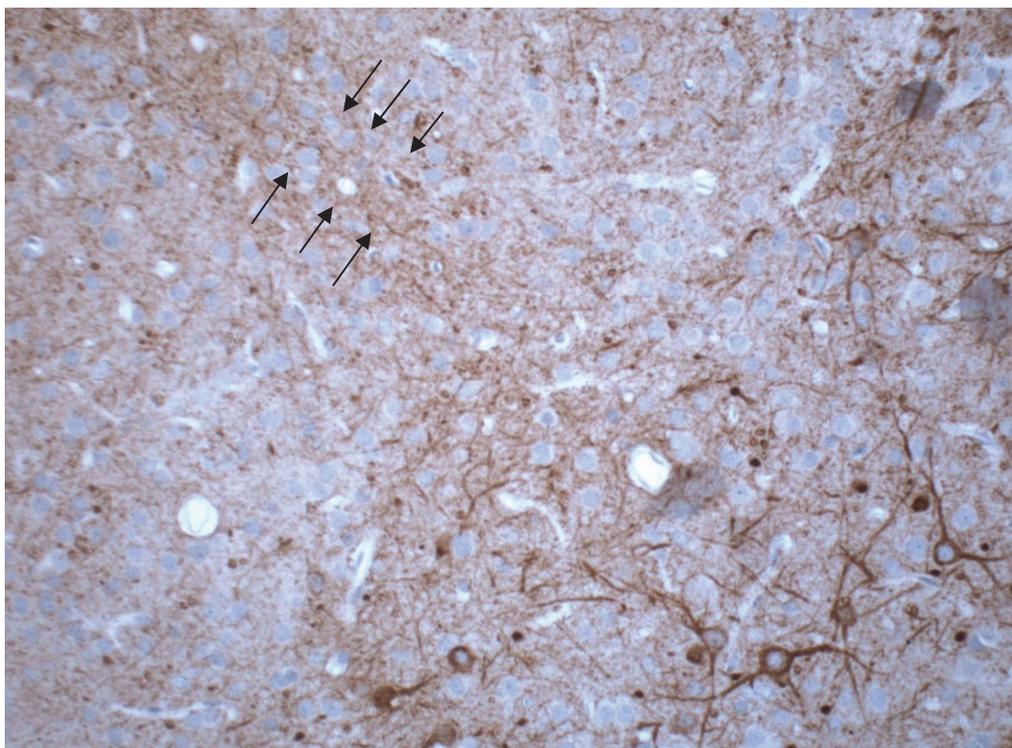


Рисунок 10 – Интенсивная экспрессия нейрофиламентов в нейроне, на границе двух баррелей, а также в крупных нейронах и их отростках, расположенных в пределах баррельной коры. Ув. 400

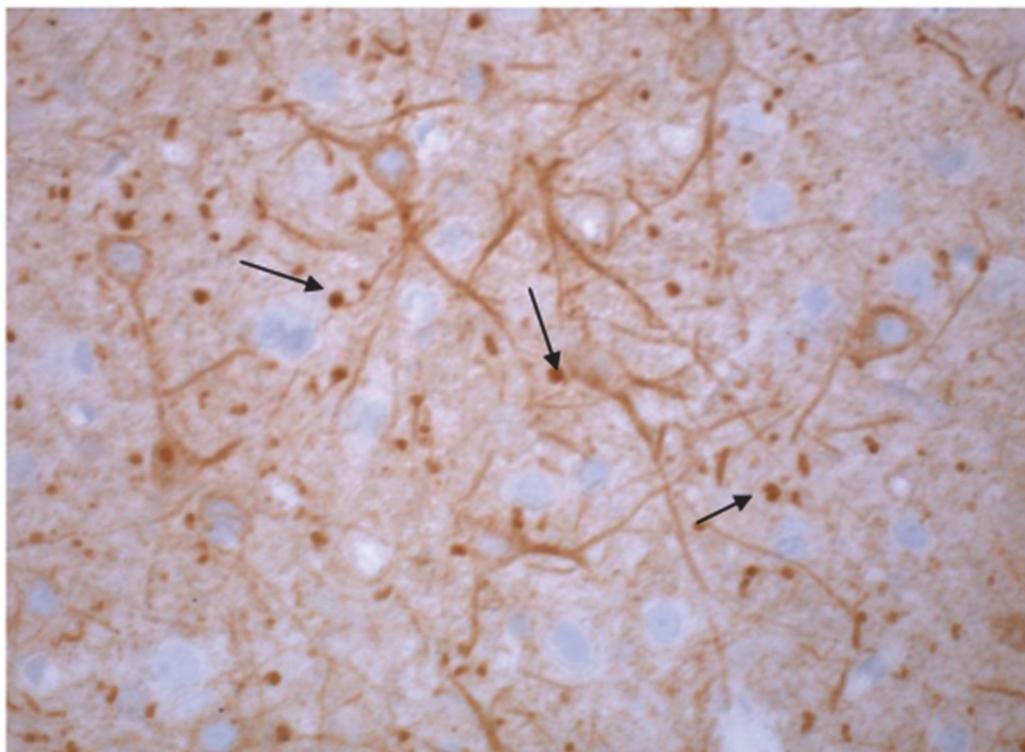


Рисунок 11 – Многочисленные пересечения между отростками нейронов в баррельной коре, крупные дендриты и аксоны, срезанные поперек (стрелки). Ув. 1000

Описанный результат исследования экспрессии нейрофиламентов позволяет предположить, что крупные отростки нервных клеток, расположенных в пределах отдельных баррелей, в основном направлены по глубине колонок – вверх или вниз, и мы можем наблюдать их преимущественно в поперечном сечении. Вместе с тем в зоне расположения баррельной коры, в основном по периферии, имеются скопления крупных нейронов, протяженные аксоны и дендриты которых интенсивно окрашены, то есть, экспрессируют белки нейрофиламентов. У большинства нервных клеток не менее двух разветвленных отростков. Эти нейроны нередко расположены близко, иногда даже контактируют друг с другом, их отростки находятся в плоскости среза и пересекаются в нескольких местах (рисунок 11). При подсчете отдельно поперечно срезанных и продольно срезанных отростков было обнаружено, что поперечно срезанных отростков численно в два раза больше чем продольно срезанных, что может говорить о преимущественно вертикальном расположении отростков в соматической коре S1 крыс.

В пределах фронтального среза, согласно нашим результатам, полученным при изучении особенностей расположения структур, экспрессирующих нейрофиламенты, значительная часть нейронов, расположенных в неокортексе, имеет крупные отростки, направленные по продольной оси колонок. Было выявлено некоторое колебание оптической плотности от слоя к слою за счет количества структур, содержащих данный антиген. Отмечена неравномерность экспрессии на уровне IV и I слоев коры, где имеется значительно большее количество переплетающихся мелких отростков, чем в остальных. На уровне IV, внутреннего зернистого слоя наблюдаются группировки вертикально ориентированных пучков нейрофиламентов в тяжи, проходящие, преимущественно, через септу и стенку баррелей, за счет чего выявляется ячеистый рисунок баррельной коры и определяются границы колонок на тонких (4 мкм) фронтальных срезах (рисунок 12 А, Б).

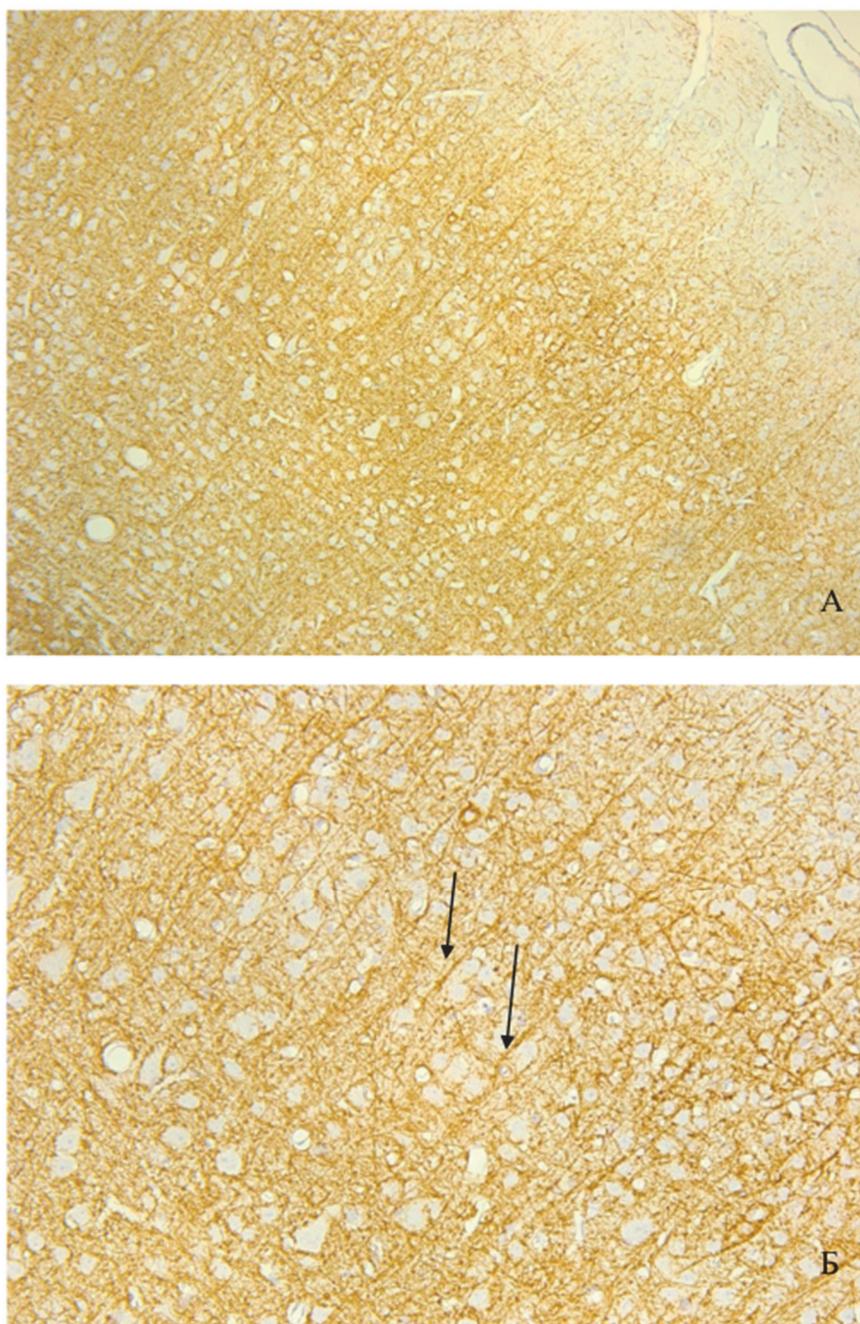


Рисунок 12 – Экспрессия нейрофиламентов в соматосенсорной коре S1 на фронтальных срезах. А – на уровне IV слоя коры видны границы колонок. Б- увеличенный фрагмент рисунка 10А, «пучки» нейрофиламентов, локализованные в стенках баррелей (стрелки). Ув. А-100, Б-400

Эти изменения уровня экспрессии отражают не столько количество нервных клеток, сколько их отростков – аксонов и дендритов, в которых содержатся антигены нейрофиламентов. При большем увеличении отмечено, что на фронтальных срезах поперечно срезанных отростков, содержащих нейрофиламенты, практически не наблюдается (рисунок 13).

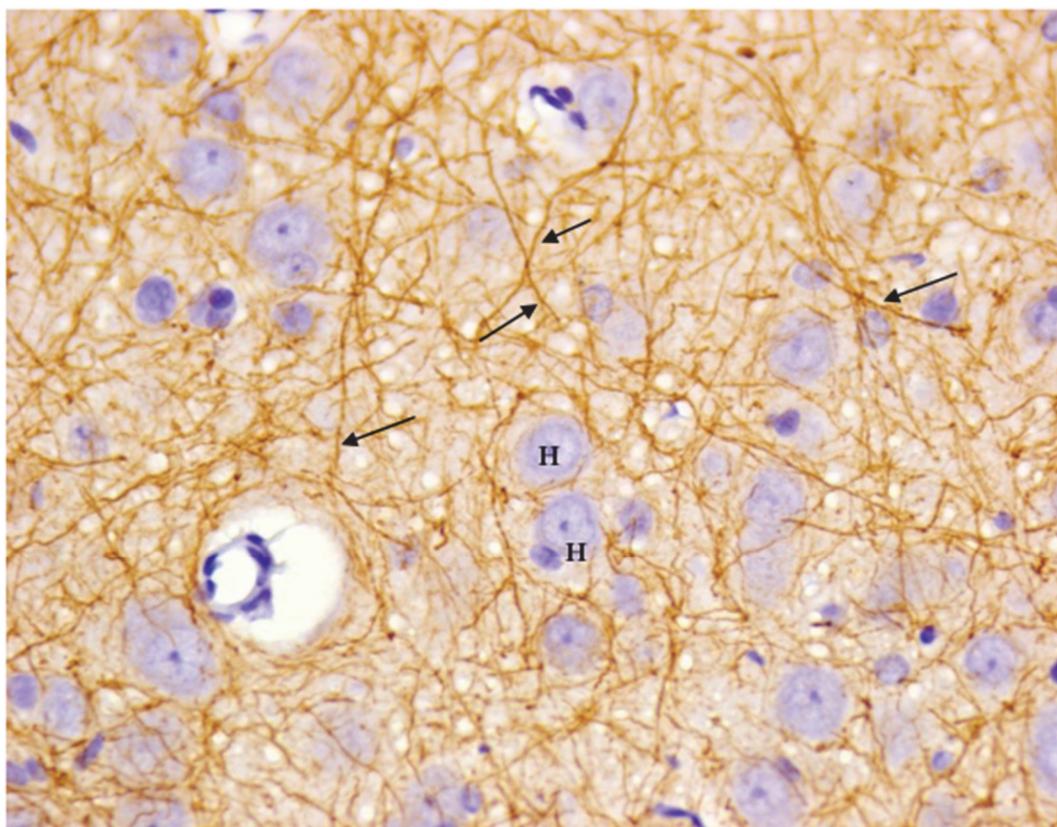


Рисунок 13 – Экспрессия нейрофиламентов в соматосенсорной коре S1. Условные обозначения: ПР-продукты реакции, стрелками указаны отростки нейрофиламентов. Ув. 1000

Распределение глиального фибриллярного кислого белка в баррельной коре

Глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ) представляет собой интрацитоплазматический фибриллярный протеин (50kDa), являющийся частью цитоскелета астроцитов и наиболее специфичным маркером для этих клеток. Центральный домен молекулы ГФКБ имеет значительную степень гомологичности с другими промежуточными филаментами (Rutka J.T. et al., 1997). Функционально ГФКБ играет роль в подвижности астроцитов и сохранении формы и структурной целостности их отростков (Eng L.F. et al., 2000). Антитела против ГФКБ высокоспецифично связываются с астроцитами и их отростками.

Полученные результаты показали, что распределение ГФКБ тангенциальных срезов баррельной коры не гомогенно. В центральной части каждого барреля располагается скопление нескольких астроцитов и их отростков (рисунок 14 А).

На фронтальных срезах реакция на GFAP выявила повышенное (по сравнению с другими слоями) количество астроглиальных элементов в молекулярном, наружном зернистом и пирамидном слоях, а также умеренное скопление глиальных клеток во внутреннем зернистом (IV), ганглионарном и полиморфном слоях.

Иммуногистохимическое исследование позволяет четко визуализировать нейро-глио-сосудистые ансамбли в коре головного мозга на светооптическом уровне благодаря специфической экспрессии GFAP в клетках астроглии. Как правило, в поле зрения выявляется 2-3 крупных астроцита с ветвящимися отростками, а также многочисленные веточки тонких отростков астроцитов, срезанные вдоль и поперек. Тела астроцитов могут располагаться как в непосредственной близости к сосудам, так и на некотором отдалении по отношению к капилляру. Отдельные астроциты нередко контактируют с несколькими капиллярами, при этом один и тот же сосуд может быть окружен отростками разных астроцитов (рисунок 14Б). Кроме отчетливо выявляемых окрашенных периваскулярных муфт из сосудистых ножек астроцитов, видны также тонкие астроцитарные отростки вокруг нейронов и в нейропиле (рисунок 14В). Более подробное строение гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) на уровне микрокапилляра после применения иммуногистохимии с антителом к GFAP было выявлено при электронно-микроскопическом исследовании (см. описание в главе ниже).

Выявленные в нашем исследовании особенности расположения глиальных клеток в баррельной коре свидетельствуют об особом значении астроглии для обеспечения структурно-функциональной организации колонок. Глиальные клетки в колонках традиционно рассматриваются лишь в качестве элементов, поддерживающих структурную, трофическую и метаболическую функции нейронов. Однако исследования последних десятилетий показали, что роль нейроглиальных взаимоотношений, как и роль нейроглии в целом, недооценены. Было продемонстрировано участие глии в миграции развивающихся нейронов не только в эмбриогенезе, но и в процессе пластических перестроек нейронных сетей, а также в регуляции работы глутамат-эргических синапсов (Rakic P., 2003).

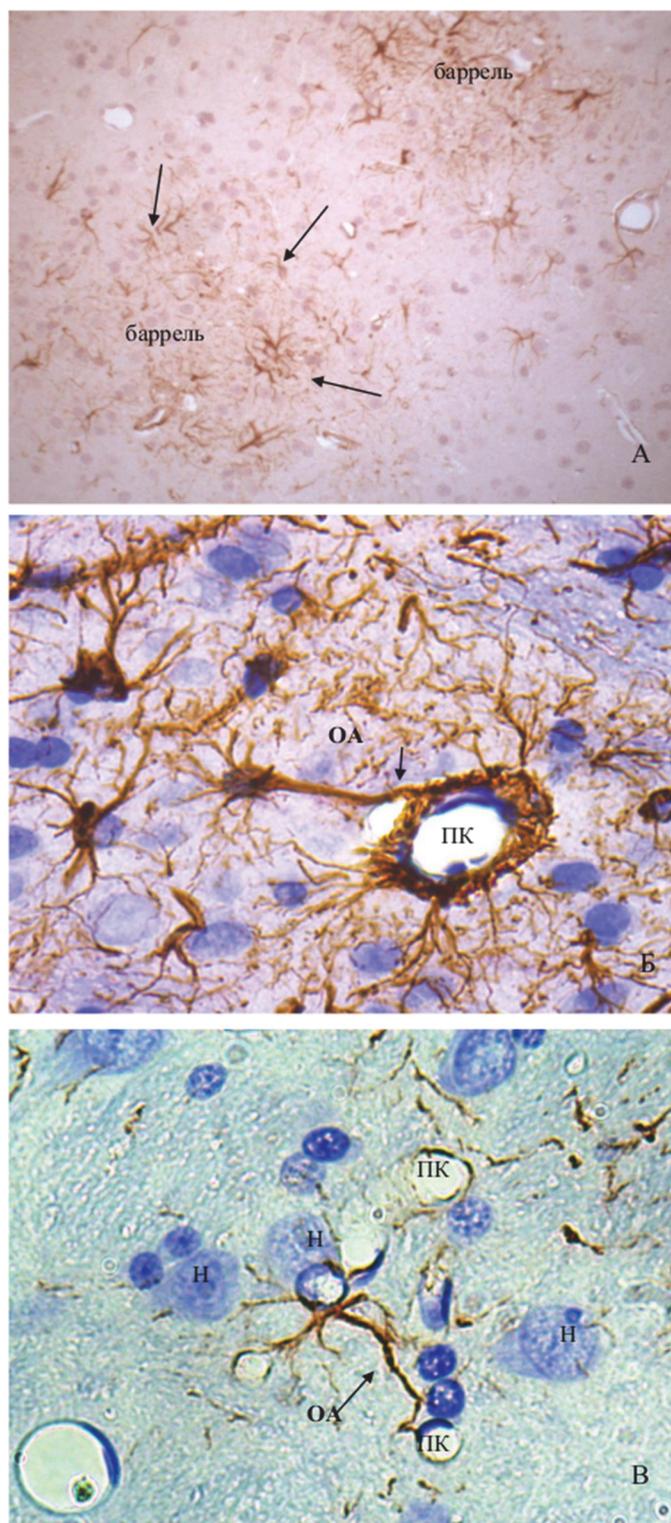


Рисунок 14 – Иммуногистохимическая реакция с первичными антителами к глияльному фибриллярному кислому белку в соматической коре S1. А – локализация групп позитивно окрашенных астроцитов в центре баррелей (стрелки). Б – капилляр, окруженный сосудистыми отростками астроцитов-ГЭБ. В – нейро-глио-сосудистый комплекс: контакт астроцита с капилляром с одной стороны и контакт этого же астроцита с несколькими нейронами. Условные обозначения: ОА – отросток астроцита, окружающий капилляр, ПК-просвет капилляра, Н-нейрон. А – Ув. 200, Б – Ув. 400, В – Ув. 400

Так, астроциты могут усилить нейротрансмиссию путем выделения собственного глутамата или ослабить передачу путем поглощения нейротрансмиттера или выброса связующих его белков. С помощью собственных сигнальных молекул астроциты увеличивают, или же уменьшают выброс нейромедиатора при последующих активациях синапса (Fields R.D., Burnstock G., 2006).

Благодаря формированию межклеточных щелевых контактов, астроглия может приобретать функцию пространственного буфера для регуляции экстраклеточной концентрации K^+ , Ca^{2+} и других ионов, регулируя внутриклеточный и экстраклеточный ионный гомеостаз (Giaume C., et. al., 2009; Pannasch U., et. al., 2012; Kozoriz M. G., et. al., 2006; Wallraff A., et. al., 2006). При этом активность глии косвенным образом, через реакции поглощения внеклеточных ионов, отражает активность нейронных структур.

Следует отметить, что по нашим данным, I, молекулярный слой колонки представляется уникальной зоной, поскольку в нем практически отсутствуют тела нейронов, отростки нервных клеток изменяют свое направление и диаметр, кроме того, в этом слое наблюдаются скопления астроглиальных элементов. Есть основания полагать, что клетки астроглии, расположенные в пределах этого слоя, принимают участие в процессах интеграции входной информации от кортикальных и таламических структур, а также организуют поверхностную глиальную пограничную мембрану, обеспечивающую поддержание целостности ликворэнцефалического барьера (Сухорукова Е.Г., 2010). Кроме того, по данным исследований глиальных опухолей головного мозга, из субпиальных астроцитов I слоя происходит образование некоторых типов поверхностно расположенных глиальных опухолей, таких как плеоморфная ксантоастроцитомы (Keres J.J., et.al., 1989).

Распределение основного белка миелина в баррельной коре

Основной белок миелина продуцируется олигодендроцитами и содержится в миелине, специализированной многослойной мембране, окружающей миелинизированные нервные волокна, как в центральной, так и в перифериче-

ской нервной системе. В центральной нервной системе основным белком миелина составляет 30% от всех белков миелина, и из него состоит наиболее плотная часть миелиновой оболочки (Kies M.W., 1982; Hardy R.J. et al., 1996).

Изучение распространения миелинизированных отростков в колонках соматосенсорной коры на фронтальных срезах с использованием антитела к основному белку миелина показало, что наибольшее количество миелинизированных отростков локализуется в V-VI слоях, единичные тяжи достигают IV слоя, наименьшее количество миелинизированных аксонов наблюдается в I-III слоях (рисунок 15А). При этом, на фронтальных срезах (как в продольном и, в меньшем количестве, поперечном сечении) визуализируются миелинизированные мелкие и крупные аксоны.

Изучение экспрессии основного белка миелина показало, что на тангенциальных срезах баррельной коры этот антиген распределен равномерно. На больших увеличениях визуализируются многочисленные окрашенные миелинизированные мелкие аксоны, срезы в продольном и поперечном направлении (рисунок 15Б). В целом распределение миелинизированных нервных волокон, по-видимому, относительно равномерно как в стенках, так и в центральной части бочонков.

Распределение парвальбумин-содержащих нейронов в баррельной коре.

По материалам этого раздела была опубликована статья «Structural Characteristics and Spatial Organization of Parvalbumin-Containing Neurons in Somatosensory Zone SI of the Cerebral Cortex in Rats» в журнале «Neuroscience and Behavioral Physiology», Т. 46, в 2016 году авторами Sukhov A. G., Kirichenko E. Yu., Belichenko L. A.

Исследование структурно-функциональной организации и морфологических характеристик парвальбумин-содержащих, предположительно, ГАМК-ергических быстроспайковых, нейронов корковых колонок способствует пониманию их роли в процессах торможения, синхронизации и регуляции ритмогенеза как коры, так и подкорковых структур.

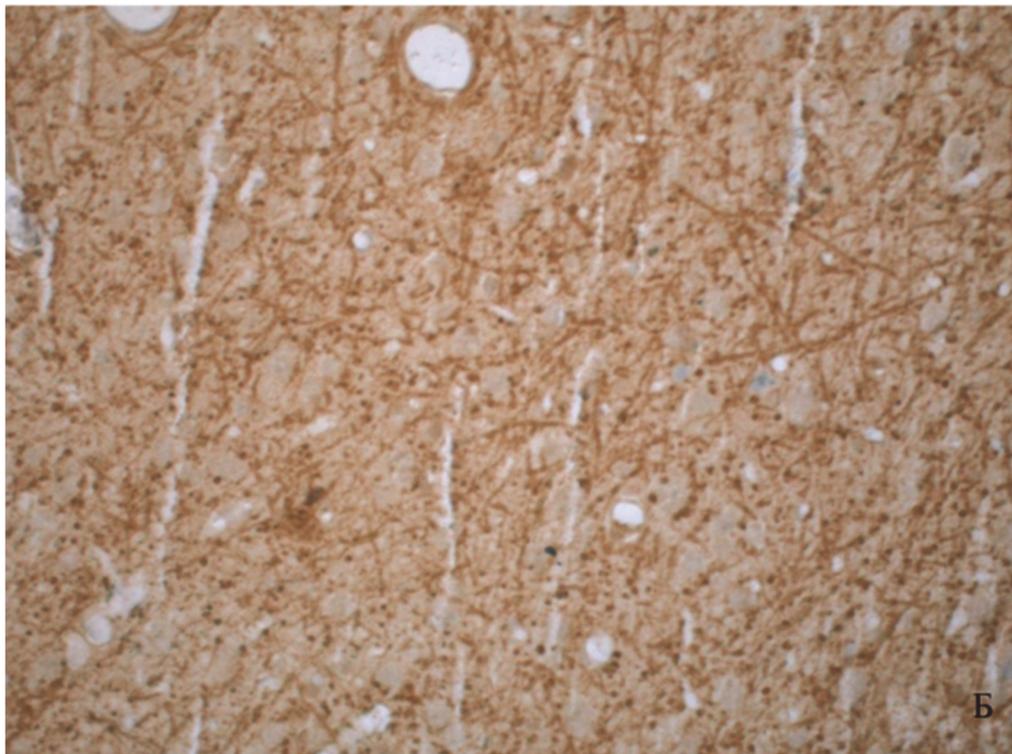
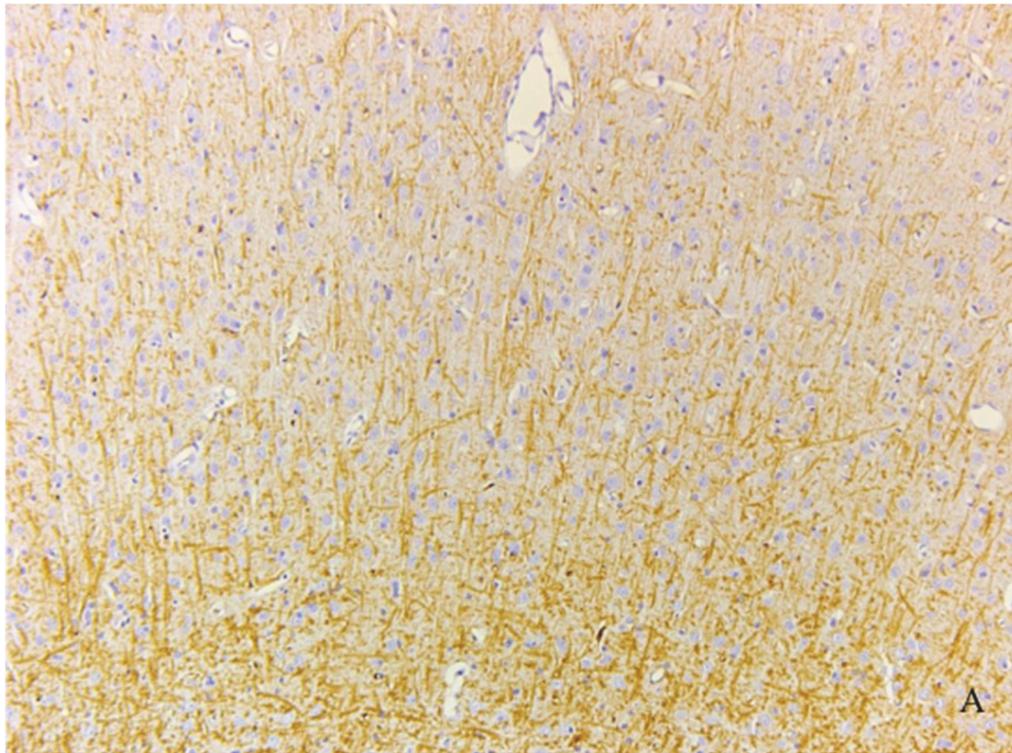


Рисунок 15 – Иммуногистохимическая реакция с первичными антителами к основному белку миелина в соматической коре S1. А – радиальное расположение миелинизированных отростков на фронтальных срезах. Б – Диффузная экспрессия основного белка миелина во вдоль и поперек расположенных отростках на тангенциальных срезах в области баррельной коры. А – Ув. 100, Б – Ув. 200

Иммуногистохимическое исследование парвальбумин-содержащих нейронов выполнено нами как на фронтальных вибротомных 60 микронных, так и на тонких 4 мкм срезах соматической коры. Как показало проведенное светооптическое исследование, практически во всех слоях соматической коры визуализируется множество интенсивно окрашенных клеток с разнонаправленными отростками, экспрессирующими антиген парвальбумин (PV+ нейроны). Была выявлена локализация продуктов реакции в цитоплазме, в ядре, а также в аксонах и дендритах исследуемых нейронов. Четвертый слой коры определяется в виде зоны с более плотным содержанием парвальбумина, что более заметно на толстых 60 мкм срезах (рисунок 16А, 16В). На больших увеличениях отмечено, что подобный эффект обеспечивается за счет скопления в области формирования баррелей тел PV+ нейронов и окрашенного нейропиля в результате многочисленного пересечения отростков этих клеток (рисунок 16Г, 16Д). Вокруг отрицательных к парвальбумину клеток наблюдается образование темного ободка – результат формирования дендро-соматических и аксо-соматических синаптических контактов между отростками PV+ клеток и телами других нейронов.

При подробном изучении, как на тонких, так и на толстых срезах отмечена неоднородность морфологических характеристик тел PV+ нейронов, а также характера их ветвления (рисунок 16 Е,Ж,З). Проведенное морфологическое и морфометрическое исследования показали, что по форме PV+ клетки в различных слоях коры могут быть разделены на вытянутые, округлые и треугольные, а по характеру ветвления отростков на звездчатые, униполярные, биполярные и многополярные со свободно ветвящимися дендритами (рисунок 16Б). Для первого слоя коры в основном характерны клетки, площадь которых не превышает 60 мкм². Второй слой коры имеет более широкий разброс площадей тел PV+ нейронов по сравнению с первым слоем, однако, доминирующая масса клеток представлена диапазоном площадей от 60-90 мкм². Как в третьем, так и в четвертом слое коры представлены различные по морфологии PV+ нейроны площадью от 60 до 180 мкм².

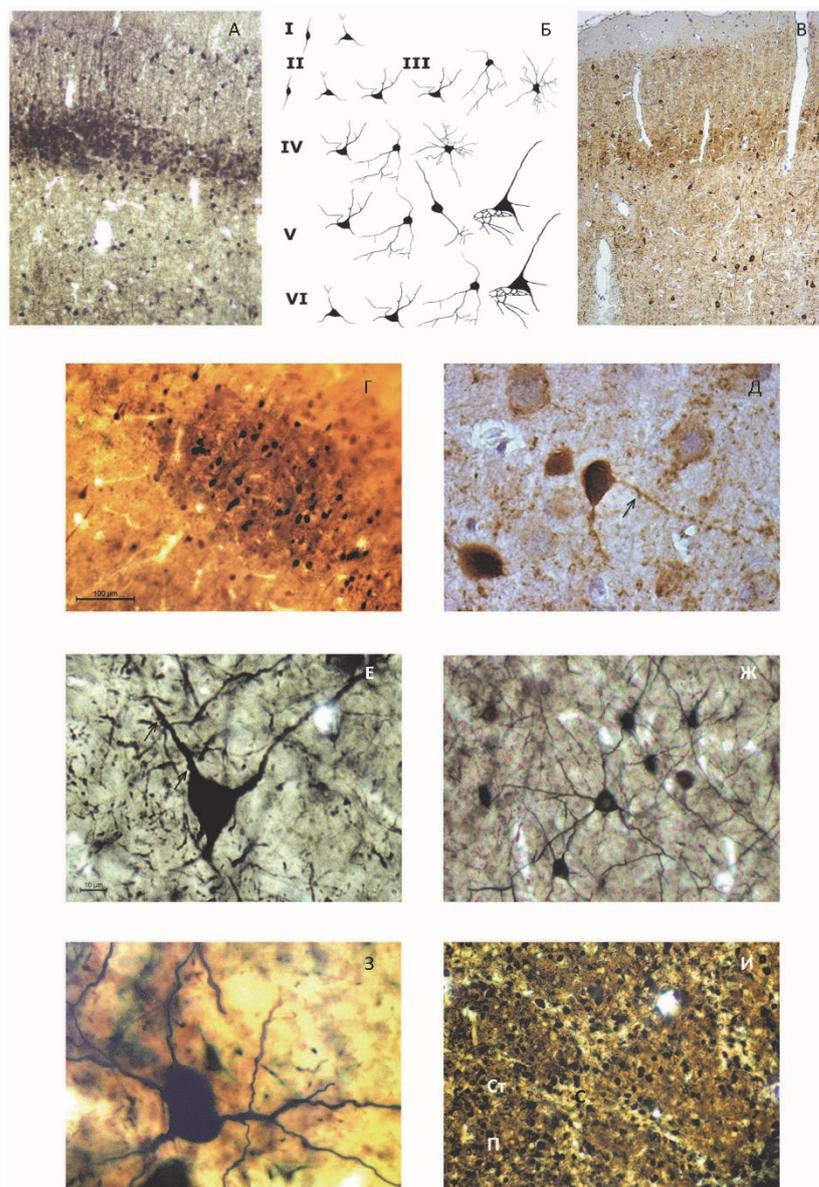


Рисунок 16 – Послойное распределение и морфологические характеристики парвальбумин-содержащих нейронов соматической коры крыс. А - Распределение иммунопозитивных PV⁺ нейронов на фронтальном 60 мкм эпоновом срезе соматической коры. Четвертый слой коры визуализируется в виде темной плотной линии. Б - Различные морфологические формы тормозных PV⁺ нейронов сосредоточенные в I-VI слоях соматической коры, полученные путем зарисовки с оригинальных фотографий соматической коры после проведения иммуногистохимической реакции. В - Распределение иммунопозитивных PV⁺ нейронов на фронтальном 4 мкм срезе соматической коры. Г - Локализация PV⁺ нейронов внутри одного барреля размером 300 мкм² четвертого слоя на фронтальном 60 мкм срезе коры. Д - Биполярный нейрон с экспрессией парвальбумина на 4 мкм срезе соматической коры. Стрелками обозначены сформированные шипики дендритов. Е - Тело PV⁺ нейрона треугольной формы V слоя соматической коры крыс. Стрелками обозначены сформированные шипики дендритов. Ж - «Классический» звездчатый PV⁺ нейрон четвертого слоя соматической коры крыс. З - Два контактирующих крупных PV⁺ нейрона с округлыми телами и со свободно ветвящимися отростками соматической коры крыс. И - Распределение PV⁺ нейронов в баррельной коры на тангенциальном 60 мкм срезе. Условные обозначения: С – септа барреля, Ст – стенка барреля, П – внутренняя часть барреля. А – Ув. 100, В – Ув. 100, Г - Ув. 400, Д – Ув. 1000, Е – Ув. Ув. 1000, Ж - Ув. 1000, З – Ув. 1000, И – Ув. 200.

В пятом и шестом слоях находится наибольший разброс площадей: половина PV⁺ нейронов этих слоев представлена крупными телами от 150-360 мкм², при этом, другая часть клеток имеет более мелкие размеры от 30-120 мкм². В целом, послойное исследование площади PV⁺ нейронов демонстрирует тенденцию увеличения размеров клеток по направлению к нижним слоям коры.

На настоящий момент существует несколько классификаций ГАМК-ергических интернейронов ЦНС. Они могут быть дифференцированы по функциональным электрофизиологическим характеристикам, по типу формирования синаптических контактов с телами и отростками контактирующих клеток, по времени и месту происхождения из ганглионарного бугорка, по типу прорастания аксона интернейрона и др. (DeFelipe J., et. al., 2013). Наиболее общепринятыми являются классификации тормозных интернейронов по экспрессии молекулярных маркеров, таких как соматостатин, холицистокинин, нейропептид Y и по экспрессии Ca²⁺ связывающих протеинов, среди которых кальбиндин, кальретинин, парвальбумин (Druga R., 2009; Suzuki N., Bekkers J.M., 2010). Нейроны, содержащие парвальбумин, по существующим данным, представлены двумя основными морфологическими группами: аксо-аксональные или «люстры» (axo-axonal, chandelier cells), осуществляющие пресинаптическое торможение на начальном сегменте пирамидных клеток, и мультиполярные корзинчатые (basket cells), формирующие синаптические контакты на проксимальной части дендрита (Hu H. et al., 2014).

Однако проведенное иммуногистохимическое исследование с использованием антитела к парвальбумину показало большее разнообразие форм тел PV⁺ нейронов и характера их ветвления, что может быть основанием для выделения дополнительных подтипов этих нейронов в зависимости от их морфологических характеристик. В тоже время результаты проведенного нами морфометрического исследования показали, что по площади тел PV⁺ нейронов можно разделить на группы мелких (до 60 мкм²), средних (до 150 мкм²) и

крупных (до 360 мкм²) клеток. Неоднородность выявленных морфологических признаков может быть связана с различным функциональным назначением PV⁺ интернейронов, а также с дифференциальной экспрессией генов между дорзальной и медиальной частями ганглионарного бугорка, из которых в процессе онтогенеза происходят различные субпопуляции исследуемых нейронов (Wonders C.P. et al., 2008). Выявленное в настоящей работе разнообразие интернейронов может быть необходимо для выполнения PV⁺ нейронами таких функций как регуляция нормальной активности нейронов, генерация осцилляторной активности нейронных сетей, буферизация кальция, регуляция синаптической пластичности, обеспечение нейропротекторной функции, а также обеспечение баланса между возбуждением и торможением в соматической коре. Однако, не смотря на то, что по морфологическим характеристикам PV⁺ нейроны разделяются достаточно четко, дальнейшее исследование дифференциальной экспрессии генов в них, по нашему мнению, будет способствовать созданию геномного классификатора, существенно дополняющего и уточняющего морфо-функциональную классификацию интернейронов.

При количественном послойном подсчете PV⁺ нейронов на фронтальных срезах толщиной 60 мкм на площади 10 000 мкм² в каждом слое коры было показано, что среди всех подсчитанных 360 иммунопозитивных клеток, 47,1% располагались в четвертом слое. В других слоях коры было получено следующее процентное соотношение: II слой-8,3%, III слой - 10,9%, V слой – 17,1%, VI слой - 14 %. Наименьшее количество PV⁺ нейронов соответствовало первому молекулярному слою коры – 2,6% от всех учтенных PV⁺ нейронов. При этом стоит отметить, что литературные сведения о наличии или отсутствии PV⁺ нейронов в I слое коры довольно противоречивы (Hu H., et al., 2014, Inan M., et. al., 2013). Согласно результатам проведенной нами морфометрии, PV⁺ нейроны I молекулярного слоя по своим размерам сопоставимы с PV⁺ нейронами наружного зернистого (II) слоя и при подсчете могут быть ошибочно к нему отнесены. В целом, послойное количество PV⁺

нейронов по нашим данным имеет слабо выраженную тенденцию к увеличению от супрагранулярных II-III к инфрагранулярным V-VI слоям.

При количественном подсчете PV⁺ нейронов на тангенциальных срезах толщиной 60 мкм на площади 519710,3 мкм² было показано, что среди всех подсчитанных в баррельной зоне PV⁺ нейронов (748 клеток) наибольшее количество PV⁺ нейронов содержится в септах баррелей - 43%, в стенках баррелей содержится 26%, во внутренней части барреля 31% (рисунок 16И). При этом, по нашим подсчетам PV⁺ нейроны наиболее плотно друг к другу расположены в стенке барреля ($12,3 \pm 7,8$ клеток на 10000 мкм²) по сравнению с внутренней частью барреля ($5 \pm 2,2$ клетки на 10000 мкм²) и септой ($4,2 \pm 1,7$ клетки на 10000 мкм²) благодаря чему можно четко выявить контуры баррелей IV слоя.

Преобладание количества PV⁺ нейронов в области стенок баррелей может быть связано с направлением хода дендритов PV⁺ нейронов во внутреннюю часть барреля с формированием дендро-дендритных щелевых контактов, что, предположительно, может являться морфологической основой индивидуального локального пейсмекерного ритмогенеза в баррелях и колонках коры SI (Fukuda T., et.al., 2006). Показано, что возрастание гиперполяризации мембраны приводит к активации на мембранах тел и аксонов PV⁺ нейронов потенциалзависимых калиевых H-каналов, продуцирующих волны эндогенной пейсмекерной активности и демонстрирующих высокую пороговую активацию и дезактивацию (Stuart G. J., Sakmann B., 1994; Golding N. L., Spruston N., 1998; Martina M., et al., 2000; Vervaeke K., 2012). Щелевые контакты, объединяющие сети тормозных PV⁺ нейронов, способствуют облегчению синхронизации осцилляторной активности пейсмекерных калиевых каналов и проведению сигнала с минимальной синаптической задержкой. (Кириченко Е.Ю., с соавт. 2012).

Таким образом, проведенное иммуногистохимическое исследование соматической коры головного мозга крыс позволило установить некоторые закономерности распределения нейрональных и глиальных белков, как на

фронтальных срезах, так и на тангенциальных, в области формирования баррелей четвертого слоя коры. Бочонки баррельной коры визуализируются на толстых, даже неокрашенных тангенциальных и фронтальных вибротомных срезах. При этом на тонких 4 мкм срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, характерных ячеистый рисунок в виде цитоархитектонических группировок не выявляется. Это может быть связано с особенностями стандартной гистологической окраски, при которой цитоплазма сливается с нейропилем, а также с большим расположением клеток по глубине толстого среза, по сравнению с количеством этих клеток на тонком поперечном срезе. В тоже время, проведенное иммуногистохимическое исследование баррельной коры позволяет идентифицировать негетерогенное распределение нейроглиальных элементов. Благодаря исследованию распределения синаптофизина, нейрофиламентов, а также глиального фибриллярного кислого белка баррельная кора выявляется как на тонких 4 мкм тангенциальных срезах (с помощью антител к Syn, NF, GFAP), так и на фронтальных срезах (с помощью антител к NF). Распределение этих белков привязано к цитоархитектонике баррельной коры: большая часть химических синапсов, равно как и крупных отростков нейронов сосредоточена в стенках и септах баррелей, в то время как группировки астроцитов расположены в их полостях. По нашему мнению, более мелкие отростки нейронов направлены в полость баррелей, где переплетаясь, формируют умеренное количество химических синапсов в близком контакте с астроглиальными элементами.

Результаты проведенного нами исследования PV⁺ нейронов в баррельной коре свидетельствуют о наличии элементарного ансамбля тормозных нейронов в этих структурах. Это определяет функциональную роль PV⁺ нейронов в организации внутриколончатой ритмической активности коры мозга. Нами было выявлено значительное разнообразие по форме, размеру и ветвлению PV⁺ нейронов во всех слоях соматической коры, как на фронтальных, так и на тангенциальных срезах толщиной 60 мкм и 4 мкм, что представляет большой интерес для понимания роли разноразмерных нейро-

нов в структурно-функциональной организации колонок каждого слоя SI. Установлено, что наибольшее количество PV+ нейронов (47,1 %) располагается в четвертом слое, в зоне формирования баррелей коры. В исследованиях на тангенциальных срезах нами было показано, что наибольшее количество PV+ нейронов располагается в септах баррелей (43%), при этом наиболее плотно они расположены в стенках барреля, благодаря чему можно четко выявить контуры баррелей IV слоя. Преобладание количества PV+ нейронов в септах баррелей может быть связано с направлением хода дендритов PV+ нейронов во внутренней части бочонка и возможным формированием дендро-дендритных щелевых контактов (электрических синапсов), что, в свою очередь, наравне в глиальными щелевыми контактами астроцитов, может являться морфологической основой индивидуального локального пейсмекерного ритмогенеза и регуляции функционального состояния корковых колонок.

Следующим этапом нашей работы являлось изучение морфологических характеристик и распределения белков нейронов и глиии на уровне таламического представительства вибрисс в головном мозге крыс.

2.2.1.2. Экспрессия нейрональных и глиальных антигенов в вентрапостеромедиальном, постеромедиальном и ретикулярном ядрах таламуса

По материалам этого раздела была опубликована статья «Characteristics of the structural organization of the ventral posteromedial and posterolateral nuclei and the reticular nucleus of the thalamus in rats (an immunohistochemical study)» в журнале «Neuroscience and Behavioral Physiology», Т. 47, № 6, в 2017 году авторами Kirichenko E.Y., Akimenko M.A., Logvinov A.K., Matsionis A.E., Povilaitite P.E.

Таламус и его проекции в кору имеют определяющее значение для формирования вибриссковой зоны в мозге млекопитающих, играют ключевую роль в процессах обработки сенсорной, в том числе тактильной информации и формирования поведенческих реакций (Ji X.Y., et. al., 2015). В частности,

вентропостеромедиальное (VPM) и постеромедиальное (PoM) ядра таламуса имеют непосредственное отношение к сложной многомерной конфигурации таламо-кортикальной системы вибрисс (Bosman L.W.J., 2011, Ситникова Е.Ю., 2014). Именно через эти ядра проходят два параллельных восходящих пути - лемнисковый и паралемнисковый, передающих тактильные импульсы от механорецепторов вибрисс к двум разным группам нейронов-мишеней в проекционном представительстве неокортекса (Feldmeyer D., 2012). При этом VPM ядро таламуса, подобно 4-му слою неокортекса, характеризуется наличием citoархитектонических группировок «баррелоидов», являющихся вторым уровнем представительства вибрисс в головном мозге грызунов (Леонтович Т.А., 1978; Серков Ф.Н., Казаков В.Н., 1980; Henderson T.A., Jacquin M.F., 1995; Сухов А.Г., 1992). Нейроны каждого баррелоида имеют проекции к соответствующей баррельной колонке сенсорной зоны неокортекса в слои 4, 6А, 3 и 5В (Oberlaender M. et al., 2011, 2012). Коллатерали нейронов PoM ядра направляются в сенсорную и ассоциативную области проекции вибрисс, в слои 1, 5А и в 4й, где оканчиваются на нейронах септ баррелей. (Ohno S. et al., 2012). Таким образом, VPM и PoM ядра таламуса представляют собой структуры, через которые проходят два разных по обработке сенсорной информации пути, интегрирующиеся в пределах одной баррельной колонки неокортекса (Yang J.W. et al., 2009; Feldmeyer D. et al., 2012). В обработке сенсорной информации и формировании поведенческих реакций большое значение имеют внутриталамические проекции, которые образуют несколько петель отрицательной обратной связи, оказывающих модулирующие влияния на поток информации, проходящей по всем описанным выше восходящим трактам (Cox C.L. et al., 1997; Brecht M., Sakmann B., 2002a,b; Ahissar E., Kleinfeld D., 2003; Pinault D., 2004; Huusko N., Pitkänen A., 2014). Например, давно известно, что коллатерали пейсмекерных ГАМК-ергических нейронов ретикулярного ядра RTN таламуса являются единственным внешним источником торможения для всех ядер таламуса, в том числе для ядер VPM и PoM (Ohara P.T. et al., 1983). При этом ретикулярное ядро, также как

ядро VPM, имеет топическую организацию и зону представительства вибрисс (Shosaku A. et al., 1984; Guillery R.W., Harting J.K., 2003; Pinault D., 2004). Морфологические особенности, в том числе и синаптоархитектоника, этих ядер является малоизученным вопросом, кроме того, до сих пор не проводилось сравнительное морфологическое исследование коркового и таламического представительства вибрисс. В связи с этим, нами было произведен сравнительный анализ экспрессии нейро-глиальных белков в ядрах таламуса, было выполнено иммуногистохимическое исследование нейрональных (к синаптофизину, нейрофиламентам, парвальбумину, соматостатину) и глиальных протеинов (к глиальному фибриллярному кислому белку, основному белку миелина) в VPM, VPL и RT ядрах таламуса.

Структура баррелоидов таламуса на вибротомных срезах без применения иммуногистохимии.

Одной из задач исследования являлась разработка методики идентификации баррелоидов на вибротомных фронтальных срезах таламуса, что, в отличие от выявления баррелей коры, является отдельной задачей с учетом необходимости подбора оптимального угла резки для изготовления срезов (рисунок 17А).

В проведенных ранее исследованиях мозга взрослых крыс было показано, что для наилучшей визуализации баррелоидов необходимо устанавливать наклонные по отношению к горизонтальной поверхности углы резки (Haidarliu S, Ahissar E., 2001). Существует несколько вариантов изготовления срезов на вибротоме: под углом 40° против часовой стрелки для визуализации отдельных дуг баррелоидов, под углом 30° по часовой стрелке для выявления отдельных рядов баррелоидов. В настоящей работе четкое баррелоидное поле VPM ядра таламуса на вибротомных срезах нам удалось выявить при отклонении режущего лезвия от горизонтальной плоскости на 45° во время резки. На фронтальных неокрашенных вибротомных 100 мкм срезах, баррелоиды визуализируются на уровне VPM ядра в виде компактных ячеистых структур, расположенных в несколько рядов (рисунок 17 Б).

Стенки (септы) баррелоидов более темные по сравнению с оптически светлой центральной частью за счет более высокой плотности расположения нейронов и их отростков именно в стенках баррелоидов. В этой связи ячеистая структура баррелоидного поля выявляется за счет толщины вибраторных срезов и, как правило (также как и баррели коры), не определяется на тонких 4 мкм срезах в стандартных морфологических окрасках.

Распределение синаптофизина, нейрофиламентов, глиального фибриллярного кислого белка, основного белка миелина, парвабумина и соматостатина в вентропостеромедиальном, постеромедиальном и ретикулярном ядрах таламуса.

При иммуногистохимическом исследовании экспрессии основного белка миелина и нейрофиламентов на парафиновых срезах установлено, что миелинизированные и немиелинизированные отростки нейронов имеют горизонтально ориентированное параллельное расположение в ядрах VPM, VPL и формируют крупные пучки, которые расположены между баррелоидами в VPM ядре. Наибольшая интенсивность экспрессии основного белка миелина и нейрофиламентов обнаружена в RT ядре. Чередование пучков миелинизированных и немиелинизированных нервных отростков обеспечивает этой структуре характерное сетчатое строение (рисунок 18А, 18Б). Таким образом, экспрессия основного белка миелина позволяет определить границы VPM, VPL и RT ядер на тонких 4 мкм срезах. Схожая картина была ранее нами описана в баррельной коре при исследовании экспрессии белков нейрофиламентов: на уровне IV слоя наблюдалась группировка пучков NF в тяжи, проходящие, преимущественно через септу и стенку баррелей (см. главу 2.2.1.1).

В исследуемых ядрах таламуса была отмечена умеренная равномерная экспрессия синаптофизина в нейронах и в нейропиле с усилением интенсивности экспрессии в области VPL ядра на границе с RTN ядром. Сетчатая структура баррелоидов в VPM при этом не выявляется.

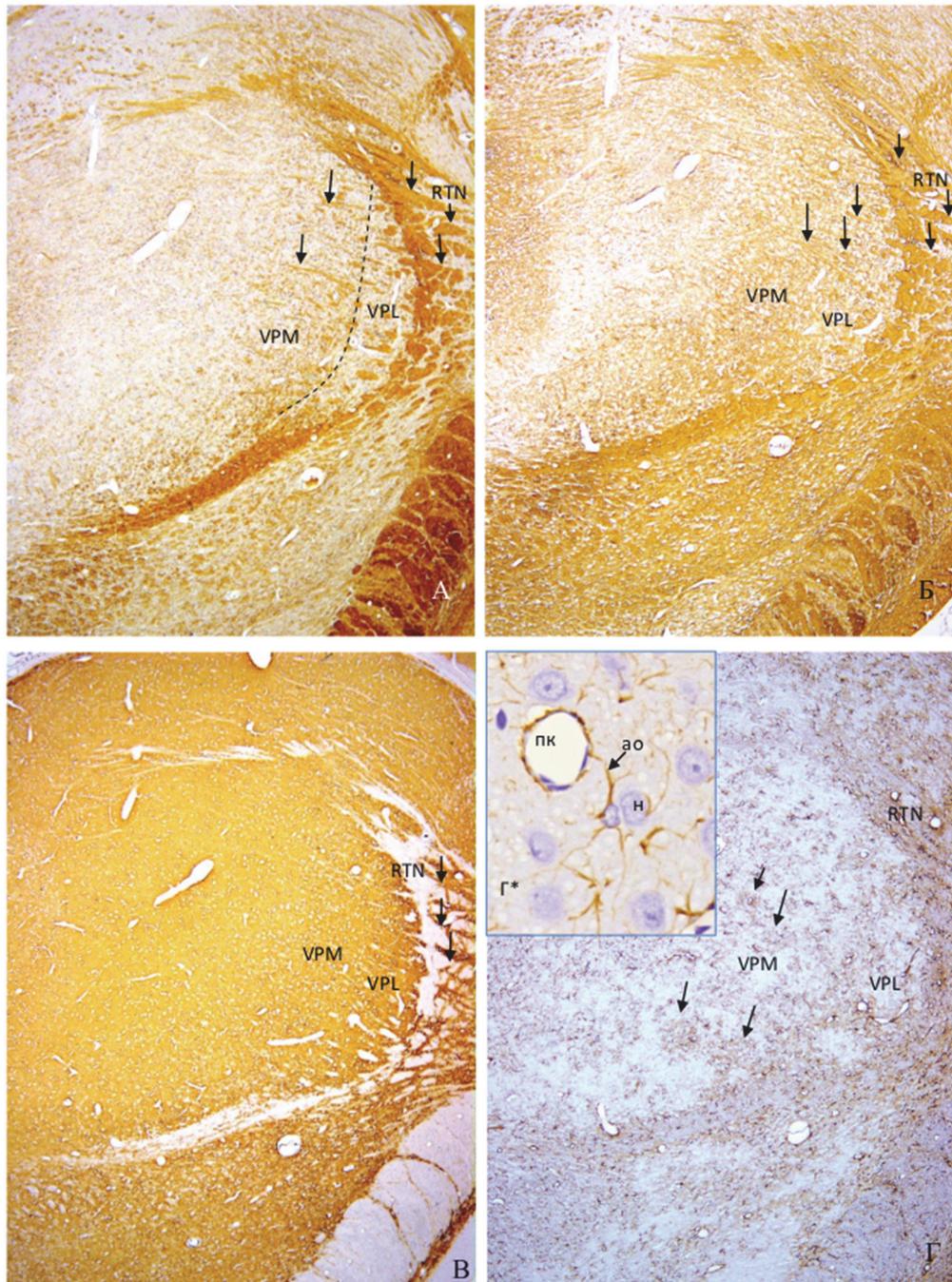


Рисунок 18 – Экспрессия основного белка миелина, NF, Syn и GFAP в VPM, VPL и RT ядрах таламуса. А- Экспрессия основного белка миелина в VPL, VPM, RT ядрах таламуса. Стрелками обозначены пучки миелинизированных отростков, которые расположены между баррелоидами в VPM ядре, а также крупные миелинизированные отростки в RT ядре. Пунктирной линией обозначена граница между зонами VPL и VPM. Б - Экспрессия белка нейрофиламентов в VPL, VPM, RT ядрах таламуса. Стрелками обозначены горизонтально ориентированные нейрофиламенты, расположенные в зонах VPM, VPL, RT. В- Экспрессия синаптофизина в VPL, VPM, RT ядрах таламуса. Стрелками обозначено отсутствие экспрессии в ядре RT в тех местах, где была показана выраженная экспрессия белка нейрофиламентов и основного белка миелина. Г- Экспрессия глиального фибриллярного кислого белка в VPL, VPM, RT ядрах таламуса. Стрелками обозначены группировки астроцитов в области VPM ядра. Г*- Нейро-глио-сосудистый комплекс, локализованный в VPM ядре таламуса. Условные обозначения: оа- отросток астроцита, н-нейрон, пк-просвет капилляра. А- Ув. 40, Б - Ув. 40, В - Ув. 40, Г - Ув. 40, Г*- Ув. x 1000.

Зона RT ядра таламуса при отмеченной ранее позитивной реакции на нейрофиламенты и основным белком миелина была отрицательной к белку си-наптофизин (рисунок. 18В). Иммуногистохимическое исследование распре-деления глиального фибриллярного кислого белка в области ядер VPL и VPM выявило наличие группировок астроглиальных элементов в зонах про-екции вибрисс (рисунок 18Г). При большем увеличении отчетливо визуали-зируются нейро-глио-сосудистые комплексы – окрашенные периваскулярные муфты из сосудистых ножек астроцитов вокруг капилляров, а также контак-ты нейронов с астроцитами, являющиеся морфологической основой ГЭБ (ри-сунок 18Г*). Картина сгруппированных астроцитов в центральной части каждого баррелоида VPM ядра аналогична реакции на GFAP в баррелях коры. Схожее расположение астроглиальных элементов во втором (баррелоиды та-ламуса) и в третьем (баррели коры) уровнях организации тактильного анали-затора может свидетельствовать об особом значении астроцитов для их мо-дульной структуры. Это предположение не лишено оснований, поскольку в доступной литературе встречается достаточное количество данных о регуля-ции нейрональной активности посредством астроглиальных щелевых контак-тов вокруг аксо-шипииковых химических синапсов через реакцию абсорбции внеклеточных ионов (Genoud C., et.al., 2015).

Согласно имеющимся морфологическим данным, основная клеточная масса ядра VPM представлена нейронами с длинным аксоном и слаборазви-тыми дендритами (так называемые, релейные клетки). При этом в доступной литературе отсутствуют сведения о наличии в баррелоидах таламуса мелких короткоаксонных интернейронов, имеющих, предположительно, тормозную функцию. Между тем, проведенное нами исследование вентральных ядер та-ламуса выявило в таких клетках и в их отростках экспрессию кальций - свя-зывающего белка парвальбумина (PV) и гормон-подавляющего нейропептида соматостатина (Som), являющихся специфическими маркерами тормозных интернейронов.

Наиболее выраженная экспрессия PV и Som наблюдается в RT ядре и в зоне VPM. При этом повышенный уровень экспрессии PV четко отличает на срезе RT ядро от всех остальных структур (рисунок 19 А). При большем увеличении в зоне RT ядра продукты реакции локализованы в цитоплазме, в ядре, а также в аксонах и дендритах парвальбумин-содержащих ГАМК-ергических нейронов, формирующих цепочки и группы (рисунок 19 Б).

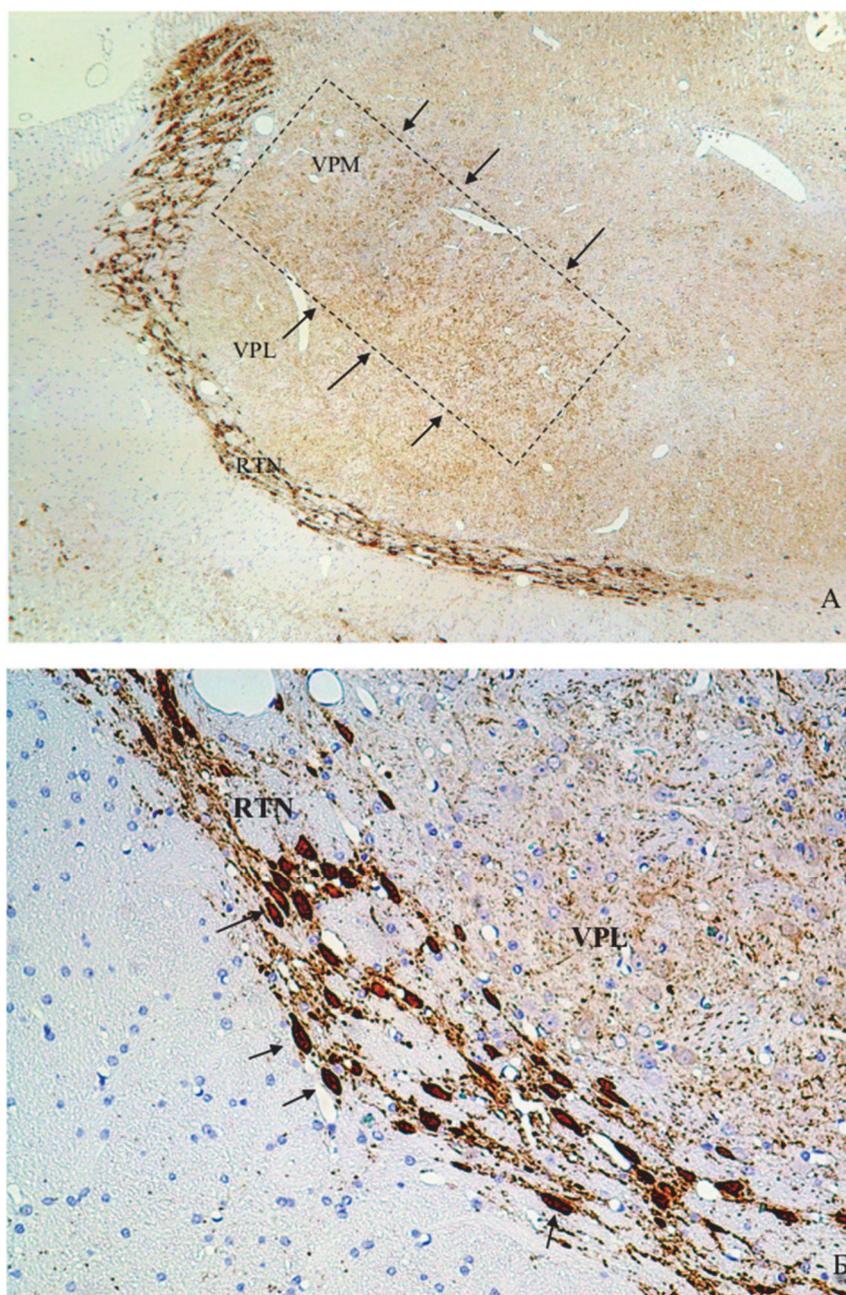


Рисунок 19 – Экспрессия парвальбумина в VPM, VPL и RT ядрах таламуса. А – Экспрессия PV выявляет четкие границы ядра RT, а также контуры баррелоидов таламуса ядра VPM. Пунктирной линией обозначено баррелоидное поле, стрелками обозначено отсутствие экспрессии между баррелоидами. Б – PV⁺-содержащие нейроны RT ядра (стрелки) таламуса и умеренная PV⁺ реакция нейрона VPL ядра. А- Ув. 40, Б- Ув. 200

В зоне VPL реакция на PV существенно ослабевает, однако, при большем увеличении в нейропиле наблюдается обилие окрашенных PV⁺ отростков, срезанных вдоль и поперек между негативно окрашенными телами нервных клеток. Очевидно, что эта зона характеризуется присутствием исключительно PV⁺ проекций и отсутствием самих PV⁺ нейронов. По сравнению с VPL зоной, в VPM ядре была отмечена отчетливая положительная реакция не только в отростках, но и в соме клеток. При этом расположение парвальбумин-положительных структур позволяет выявить в этой зоне баррелоиды таламуса на тонких 4 мкм срезах. По литературным данным, выявленные в зоне VPM клетки, экспрессирующие парвальбумин, являются «центрами» таламо-кортикальных проекций исключительно в средние слои коры (Jones E. G., 1998).

При анализе срезов, окрашенных на соматостатин, отдельные клеточные элементы на малом увеличении не визуализируются, в отличие от парвальбумина. Отмечены горизонтально ориентированные Som⁺ коллатерали, направленные от RT ядра через зоны VPM и VPL (рисунок 20 А). Однако на больших увеличениях выявляются небольшие по размеру отдельные тела и отростки тормозных Som⁺ интернейронов (рисунок 20 Б). В целом, положительная реакция на Som свидетельствует о наличии этого нейропептида в миелинизированных и немиелинизированных отростках, направленных в горизонтальном направлении и проходящих в септах отдельных баррелоидов.

Таким образом, анализ полученных результатов о локализации нейроглиальных антигенов в вентральных и ретикулярном ядрах таламуса позволяет сделать выводы о том, что миелинизированные и немиелинизированные отростки нейронов в VPM и VPL ядрах таламуса имеют горизонтально ориентированное параллельное расположение, их наибольшее скопление располагается в RT ядре. Судя по экспрессии нейроглиальных антигенов, баррелоиды таламуса имеют схожее с баррелями строение: между отдельными баррелоидами, расположены крупные пучки нейрональных отростков, содержащих нейрофиламенты, также в таламических зонах проекции вибрисс име-

ются скопления астроглиальных элементов и нейро-глио-сосудистые комплексы. Наличие в VPM и VPL ядрах кальций - связывающего белка PV и гормон-подавляющего нейропептида Som свидетельствует о присутствии специфических тормозных связей в этих ядрах, являющихся «центрами» таламокортикальной передачи в четвертый слой коры мозга.

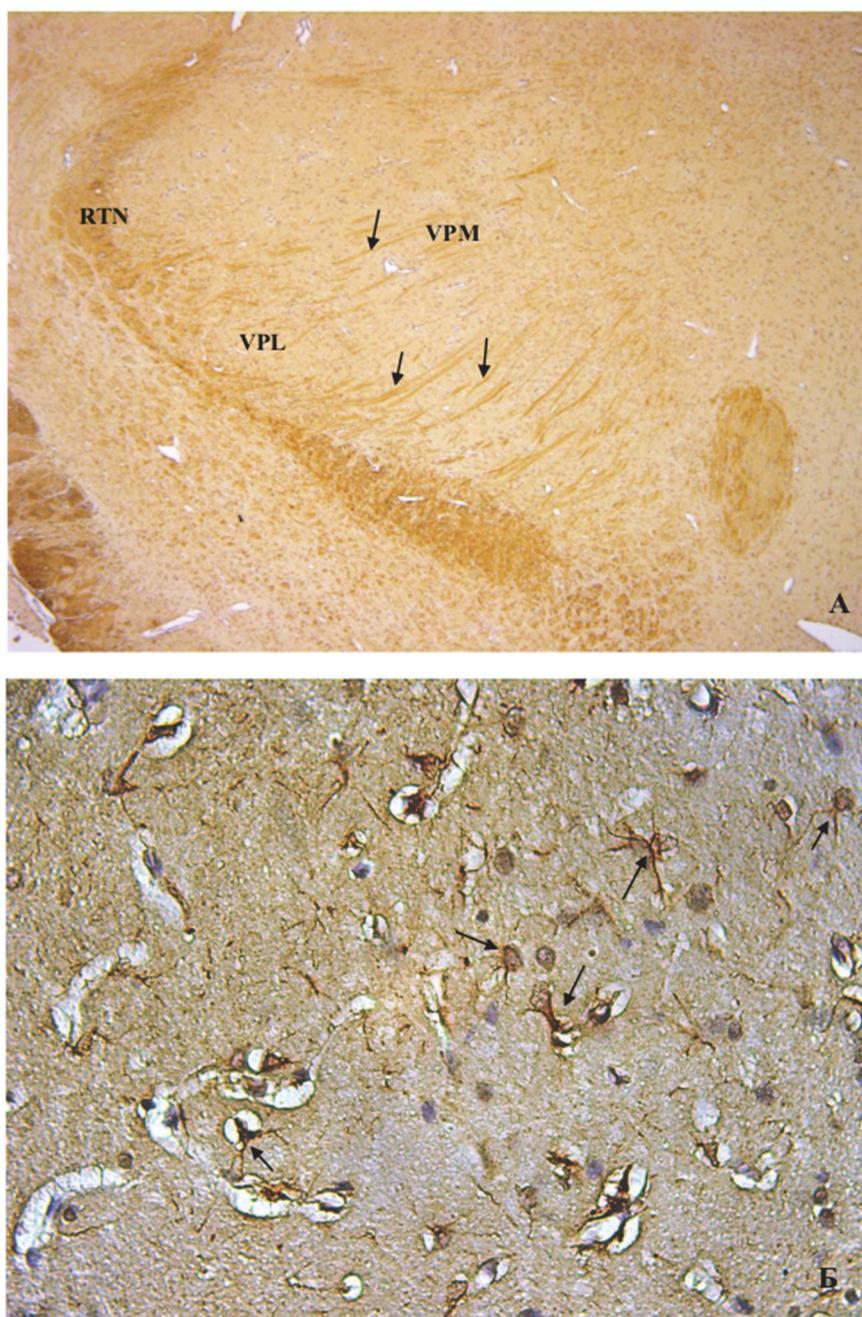


Рисунок. 20 - Экспрессия соматостатина в VPM, VPL и RTN ядрах таламуса. А – горизонтально направленные коллатерали (стрелки) содержащие соматостатин, направленные от RTN через зоны VPM и VPL. Б – Som+ нейроны (стрелки) области VPL/VPM ядер таламуса. А- Ув. 40, Б – Ув. 400

Проанализировав описанное выше морфологические и иммуногистохимические особенности строения коркового и подкоркового представительства вибрисс, на следующем этапе нашей работы было выполнено исследование белков щелевых контактов с целью выявления их возможной коэкспрессии с основными белками нейронов и глии, для понимания морфофункциональной роли ЩК в этих структурах.

2.2.2. Распределение коннексинов в соматической коре, в вентральных и ретикулярном ядрах таламуса крыс

Наличие в колонке соматической коры множества нейронов различного типа (малых и больших пирамидных, звездчатых, вставочных, биполярных и мультиполярных), а также корково-корковых и кортикофугальных проекций, способствует формированию большого количества синаптических контактов внутри нее. Благодаря такой совокупности клеток, клеточных проекций и специализированных контактов – синапсов, колонка способна анализировать и перераспределять поток информации на различные корковые выходы и обеспечивать дальнейшее поступление информации к соответствующим анализирующим структурам (Horton J.C., Adams D.L., 2005; Lubke J., Feldmeyer D., 2007; DeFelipe J., et. al., 2013). Как показал проведенный анализ литературы, многочисленные данные в области электрофизиологии, морфологии, молекулярной биологии указывают на важную функцию щелевых контактов астроглии и щелевых контактов нейронов (электрических синапсов) как для развивающегося, так и для зрелого неокортекса. ЩК являются важнейшей формой межклеточной коммуникации между нейронами и клетками глии, облегчая процесс перераспределения ионов, и, очевидно, играют существенную роль в образовании нейронных ансамблей, в том числе во взаимодействии между нейронами радиальных колонок коры и ядер таламуса. В этой главе будут описаны результаты проведенного иммуногистохимического исследования локализации белков, образующих щелевые контакты в изучен-

ных модулях соматической коры крыс S1 и в таламических ядрах головного мозга крыс на светооптическом уровне.

Антитела к коннексинам относятся к категории «только для использования в научных целях/only research use», то есть не являются диагностическими в отличие от прочих использованных в работе антител. Нами подбирались несколько вариантов разведения, способов демаскировки антигенной активности, а также различная длительность инкубации срезов в антителах. Соответственно, было определено три варианта рабочей концентрации: 1:100, 1:150, 1:200, а также несколько способов демаскировки антигенной активности: с использованием высокого pH (pH 9), с использованием низкого pH (pH 6), ферментативный способ, а также вариант без демаскировки антигенной активности. Кроме того, нами было выведено несколько вариантов времени инкубации срезов в растворе антител: от 20 минут до 2 часов. После проведения серии иммуногистохимических окрашиваний было показано, что высокоцитратная (pH 9) наравне с энзимной обработкой ткани при использовании антител к коннексинам обеспечивает сильное фоновое окрашивание и зачастую негативную реакцию на данные антигены. Применение буфера с pH 6 дает специфическую реакцию на тестируемых образцах положительного контроля, в то время как на образцах ткани отрицательного контроля (для anti-Cx36-фрагменты печени крысы, для anti-Cx43-отсутствие инкубации с первичными антителами) реакция остается негативной. Таким образом, для антител anti-Connexin 36, anti-Connexin 43 и anti-Connexin 30 (Invitrogen, USA) оптимальными рабочими концентрациями могут являться разведения 1:150, а также 1:200, а оптимальное время инкубации для парафиновых срезов составляет 1 час при комнатной температуре во влажной камере.

Важным моментом иммуногистохимического исследования является возможная перекрестная реактивность поликлональных антител с эпитопами клеточных белков, не являющихся целью исследования. Карола Мэйер (2002) в своей работе подняла вопрос о специфичности кроличьих поликлональных антител к нейрональному коннексину (Meier C., et.al., 2002). После проведе-

ния серий реакции, авторы получили неспецифичное ядерное окрашивание в коре, также положительную реакцию на нейронах ЦНС животных с удаленным геном к исследуемому белку, что может быть результатом того, что антитела к Cx36 также распознают белки, отличные от Cx36 в этих тканях. Таким образом, постановка положительных контролей и их анализа, в случае изучения коннексинов на светооптическом уровне, является необходимым компонентом исследования. Рассматривая подробнее результаты наших исследований экспрессии коннексина 36 и коннексина 43 в контрольных образцах следует отметить, что они совпадают с имеющимися данными по изучению этих белков (Yamamoto T., et al., 1990; Nagy J.I., 1997; Liu X.-B., Belluardo N., et. al., 2000; Jones E.G., 2003; Fukuda T. Kosaka T., 2006, и др.).

Для тестирования антитела Cx36 в качестве положительного контроля использовали фрагменты поджелудочной железы человека, полученные при плановой аутопсии. После проведения иммуногистохимического исследования была показана интенсивная мембранная реакция β -клеток островков Лангерганса (рисунок 21А), что по данным литературы, соответствует формированию щелевых контактов, обеспечивающих правильное развитие, дифференциацию и кластеризацию β -клеток в островки, а также синхронизацию Ca^{2+} осцилляторной активности и секрецию инсулина внутри одного островка (Ravier M. A. et. al., 2005; Serre-Beinier V. et. al. 2009). После проведения контрольной иммуногистохимической реакции с антителом к Cx43 была выявлена иммунолокализация этого белка в кластерах вставочных дисков кардиомиоцитов (рисунок 21Б). Сходные результаты получены в работах других авторов, где были использованы методы флюоресцентной микроскопии и электронной иммуногистохимии (Yamamoto T., et. al., 1990; Nagy J.I., 1997 и др.). Существование щелевых контактов между клетками кардиомиоцитов способствует немедленному межклеточному проведению, обеспечивая быстрое сокращение клеток миокарда.

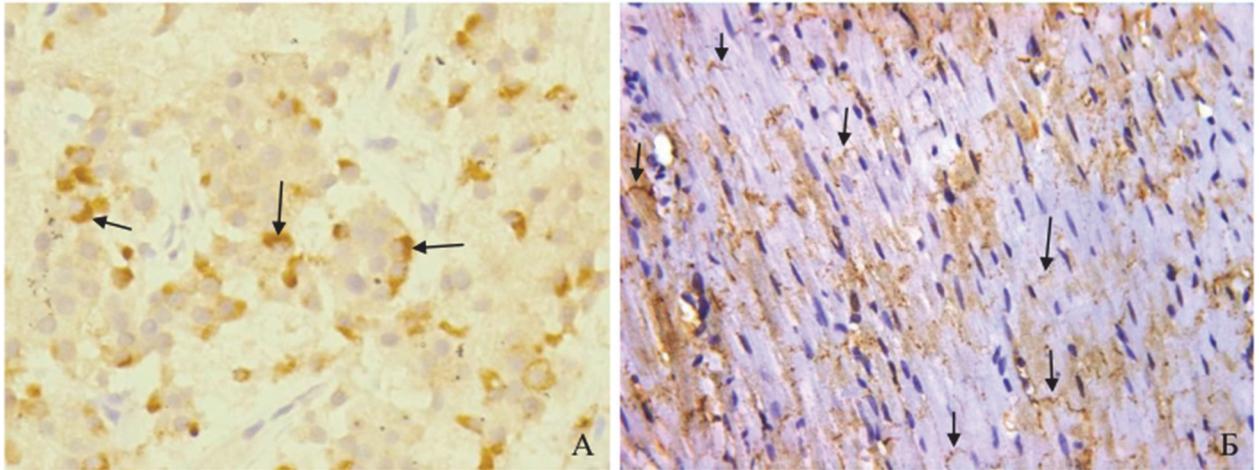


Рисунок 21 – Положительный контроль для антител против коннексина 36 и коннексина 43. А-иммуногистохимическая реакция с антителом anti-connexin-36 (Invitrogen, USA) в образцах поджелудочной железы человека. Стрелками обозначена экспрессия коннексина по периферии β -клеток островков Лангерганса (положительный контроль для anti-Cx36). Б – иммуногистохимическая реакция с антителом anti-connexin-43 (Invitrogen, USA) в образцах миокарда крысы. Стрелками обозначена положительная реакция на вставочных дисках между кардиомиоцитами, соответствующая щелевым контактам (положительный контроль для anti-Cx43). А- Ув. 400, Б – Ув. 200

2.2.2.1. Экспрессия коннексина 36 в коре мозга крыс

При анализе результатов проведенных иммуногистохимических реакций с антителом к Cx36 на фронтальных парафиновых срезах соматической коры наблюдается положительная мембранная и цитоплазматическая экспрессия данного антигена в нейронах и их отростках в областях наружного зернистого (II), пирамидного (III), внутреннего зернистого (IV), ганглионарного (V) и полиморфного (VI) слоев (рисунок 22А). Следует отметить локализацию этого протеина на восходящих аксонах нейронов всех слоев соматической коры, особенно выраженную на восходящих проекциях нейронов внутреннего зернистого (IV) и ганглионарного (V) слоев (рисунок 22 Б). В апикальном молекулярном (I) слое тела Cx36+ клеток практически отсутствуют, однако на больших увеличениях в нейропиле этого слоя визуализируются скопления многочисленных ярко окрашенных срезанных мелких отростков-аксонов и дендритов с высоким уровнем содержания коннексина-36,

длина которых варьирует в среднем от 8 до 32 мкм (рисунок 22В). Во втором слое мембранная и цитоплазматическая Сх36+ реакция наблюдается у большинства мелких округлых зернистых клеток. В третьем слое коры положительная реакция исследуемого белка наблюдается в нейронах, морфология которых соответствует малым пирамидным клеткам, формирующим восходящие Сх36+ коллатерали во второй и первый слои, длиной 13-24 мкм. Как в четвертом, так и в пятом слоях мембранная и цитоплазматическая Сх36+ реакция наблюдается как в мелких округлых, так и в крупных треугольных клетках. При большем увеличении обращает на себя внимание ярко окрашенный ободок крупных пирамидных клеток и восходящие коллатерали к супрагранулярным слоям коры, длина которых колеблется от 100 до 260 мкм. В шестом слое визуализируется наименее выраженная бледная реакция на коннексин 36 на нейронах, их отростках и в нейропиле.

При исследовании локализации Сх36 на тонких парафиновых тангенциальных срезах баррельной коры характерного рисунка в виде бочонков выявлено не было, как это наблюдалось при изучении распределения нейрофиламентов и синаптофизина. Отмечается выраженная положительная цитоплазматическая реакция некоторых клеток и их отростков, бледная мембранная реакция в виде ободка вокруг тел других нейронов, пунктирное окрашивание нейропиля, а также экспрессия этого белка на поперечно срезанных, радиально направленных (к поверхности коры) коллатералиях. При этом тангенциально расположенных, вдоль срезанных Сх36+ отростков практически не формируется. Помимо позитивно окрашенных нейронов на больших увеличениях отмечаются мелкие ядра эндотелиоцитов капилляров и глиоцитов, миелинизированные аксонные коллатерали – отрицательные к коннексину-36 (рисунок 22Г).

Планируя исследование экспрессии белков коннексинов на светооптическом уровне, мы учитывали, что полученные результаты продемонстрируют не столько локализацию щелевых контактов между клетками и отростками коры, сколько количество синтезируемого клетками белка.

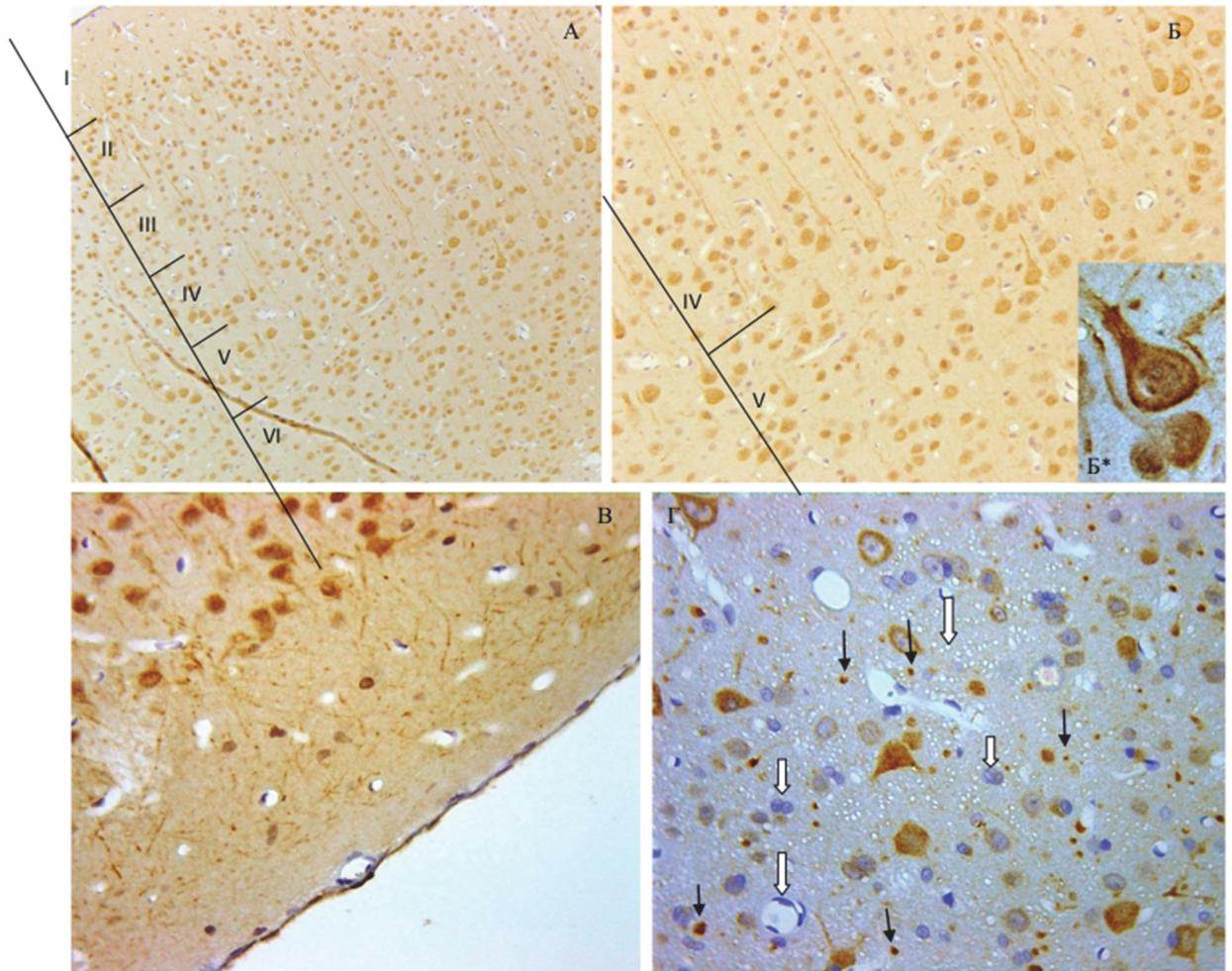


Рисунок 22 – Иммуногистохимическое исследование соматической коры с использованием антител к коннексину 36. А – цитоплазматическая Sx36+ реакция на клетках I–VI слоев коры. Б – цитоплазматическая и мембранная Sx36+ реакция на нейронах IV-V слоев коры. Б* – локализация коннексина 36 на уровне одной пирамидной клетки IV слоя коры. В – Sx36+ отростки молекулярного слоя коры. Г – тангенциальный срез IV слоя коры после проведения иммуногистохимии с антителами к Sx36. Условные обозначения: черные стрелки - поперечно срезанные Sx36+ коллатерали, белые стрелки- отрицательная реакция на изучаемый антиген вокруг ядер глиоцитов, эндотелиоцитов, миелинизированных отростков. А-Ув. 100,Б – Ув. 200, Б*- Ув. 1000, В - Ув. 400, Г – Ув. 400

Во всех слоях коры наблюдалось довольно равномерное распределение клеток Сх36+ с умеренным окрашиванием. Полученные результаты свидетельствуют о том, что значительное количество клеток коры взрослого мозга, идентифицированное при помощи иммуногистохимии, потенциально готово формировать электрические синапсы. На уровне каждой клетки реакция выглядела однородной, плотной цитоплазматической, распространяющейся на проксимальные отростки клетки. Необходимость синтеза большого количества белка Сх36 в клетке объясняют тем, что формирование функционально активного щелевого контакта для клетки является достаточно динамическим процессом, связанным со скоростью оборота белка и периодом его полураспада не более 1,5 часов, причем причины такого короткого периода жизни белка до сих пор не объяснены (Gaietta G. et al, 2002). Посттрансляционные процессы, в случае коннексинов, включают в себя фосфорилирование (Nagy J.I. et al., 1997), встраивание в мембрану и сборка в активные коннексоны (Zidell R.H., Loch-Carusio R., 1990). Это, вероятно, также способствует наблюдаемому в наших исследованиях накоплению белка коннексина 36 в цитоплазме.

Точечная или пунктирная экспрессия, отмеченная нами при больших увеличениях в нейропиле всех корковых слоев, демонстрирует, по-видимому, образование щелевых контактов между отростками нейронов. Аналогичная нашим результатам картина «гранулярной реакции» в нейропиле была получена Belluardo с соавт. (2000) при исследовании локализации Сх36 в коре головного мозга взрослых крыс методом темного поля и флюоресценции (Belluardo N., 2000). Автор также связывает экспрессию Сх36 в виде округлой или вытянутой точки 0,5-3 мкм с образованием электрических синапсов. При этом подтверждением этого предположения может являться только выявленная характерная ультраструктура контакта (Rash J.E. et. al., 2001; Fukuda T., Kosaka T., 2003), поскольку изучение распределения коннексинов на светооптическом уровне имеет свои ограничения, одним из которых является предел разрешения световой микроскопии.

Работы по исследованию локализации белка коннексина 36 в коре взрослых животных при помощи иммуногистохимии ограничиваются всего несколькими публикациями, в то время как основная масса исследований направлена на изучение экспрессии этого коннексина на ранних этапах постнатального развития. В основном подобные работы проводят с использованием методов гибридизации *in situ* (Belluardo N. et al., 1999, 2000; Cicirata F. et al., 2000), нодерн блот (Söhl G. et al. 1998) или ПЦР в реальном времени (Srinivas M. et al., 1999; Gulisano M, et al., 2000; Venance L. et al. 2000). Пристальное внимание к раннему постнатальному периоду привлекает резкое повышение экспрессии коннексина 36 в ЦНС млекопитающих в первые две недели развития мозга после рождения. Было показано, что это сопряжено с повышенным количеством электрических синапсов, объединяющих различные типы уже дифференцированных нейронов. Эта связь не только позволяет создать сеть клеток с координированным метаболизмом, но и обеспечивает передачу нервных импульсов в условиях, когда химические синапсы ещё не функционируют. Присутствие повышенного количества межнейронных щелевых контактов или электрических синапсов также необходимо для обеспечения синхронного вовлечения в активность всех элементов развивающихся корковых модулей, таких как бочонки баррельной коры. Иммуногистохимические исследования распределения коннексина 36 на фронтальных срезах коры головного мозга в раннем постнатальном периоде продемонстрировали возможность выявления рисунка баррельной коры у крысят с 9 по 12 день жизни. При этом такая характерная реакция полностью исчезала после 25 дня жизни животного, когда у млекопитающего уже полностью сформирована таламокортикальная, в том числе вибриссовая система (Liu X.B., Jones E.G., 2003).

Наряду с исследованием экспрессии коннексина 36 в ЦНС самого по себе, большое внимание уделяется его ко-экспрессии с кальций-связывающим внутриклеточным протеином парвальбумином. Распределение этого белка в коре и таламусе было подробно проанализировано нами в

предыдущей главе. Как свидетельствуют данные большинства работ, в неокортексе и гиппокампе взрослого мозга дендро-дендритические электрические синапсы в основном формируются между тормозными интернейронами (Sloper J.J., 1972; Sloper J.J., Powell T.P.S., 1978; Galaretta M., Hestrin S., 2001). Парные записи электрической клеточной активности нейронов неокортекса крыс показали, что быстроспайковые (Fast Spiking) интернейроны, содержащие парвальбумин, часто связаны друг с другом электрическими связями (Gibson J.R. et. al., 1999; Galaretta M., Hestrin S., 2002). При этом профессором Фукудой с соавт. были описаны дендро - дендритические щелевые контакты между парвальбумин - иммуномеченными интернейронами соматосенсорной коры крыс (Fukuda T., Kosaka T., 2003). Эти данные указывают на то, что наибольшее количество нейрональных щелевых контактов или электрических синапсов неокортекса имеют избирательный характер формирования и соединяют тормозные интернейроны одного и того же типа.

В нашем исследовании мы провели сравнительный анализ тонких 4 мкм парафиновых срезов коры после иммуногистохимической реакции с антителами к парвальбумину и коннексину 36. По нашим данным, в отличие от равномерного распределения белка Cx36 в клетках слоев коры, экспрессия парвальбумина имеет иной характер и позволяет разделить PV+ нейроны на две группы: темные клетки с выраженным, интенсивным цитоплазматическим окрашиванием и бледные клетки с умеренным цитоплазматическим окрашиванием. Проанализировав форму, размеры и расположение менее интенсивно окрашенных PV+нейронов и нейронов, содержащих Cx36, можно предположить ко-локализацию этих белков в одних и тех же клетках. Например, умеренная экспрессия парвальбумина, также как и коннексина 36 наблюдается в мелких округлых клетках верхних слоев, а также в крупных треугольных клетках IV-V слоев коры. При этом темные PV+ клетки с высоким уровнем экспрессии также содержат умеренное количество коннексина (рисунок 23).

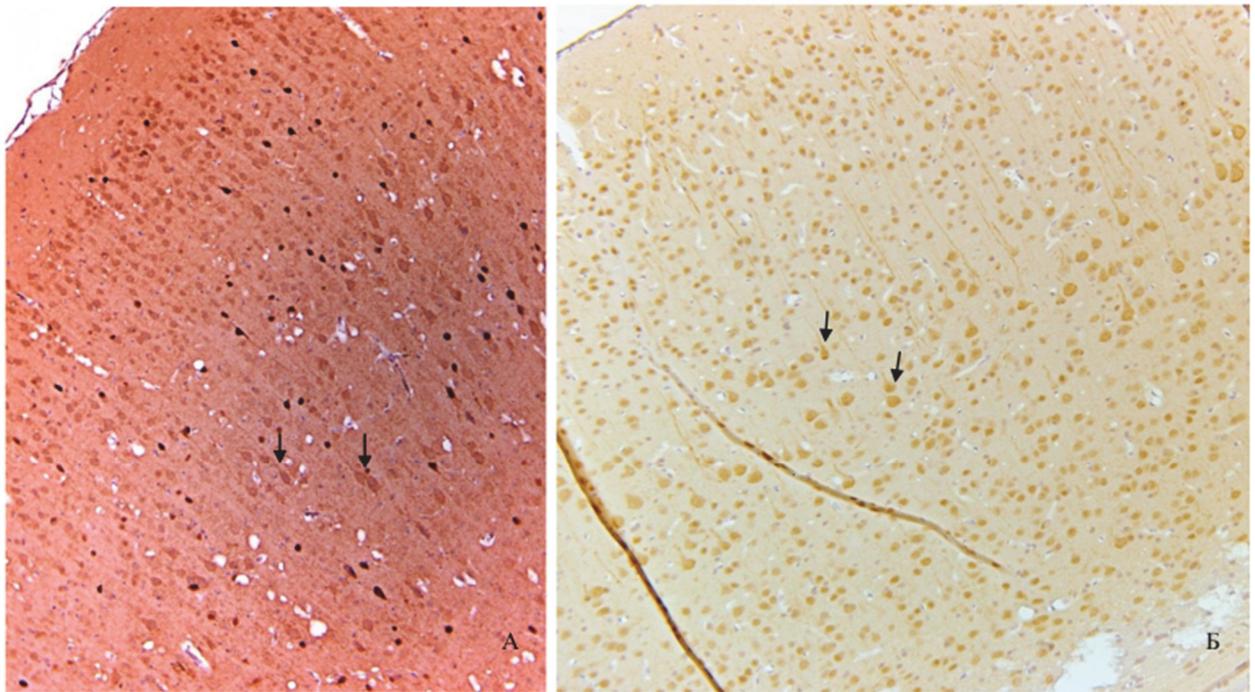


Рисунок 23 – Иммуногистохимическое исследование соматической коры с использованием антител к парвальбумину (А) и к коннексину 36 (Б). Стрелками обозначены примеры крупных клеток IV–V слоев, в которых наблюдается ко-экспрессия парвальбумина и коннексина 36. А, Б – 100

В статье японских исследователей Ма с соавт. (2011) Сх36-экспрессирующие нейроны, также как и в нашем исследовании были выявлены во всех слоях коры взрослых крыс. При этом авторами был сделан вывод о том, что все подтипы ГАМК-ергических интернейронов в неокортексе могут образовывать щелевые контакты и содержат Сх36. К такому заключению привело выявление коэкспрессии Сх36 и маркеров ГАМК-ергических нейронов: парвальбумина, соматостатина, кальретинина, вазоактивного полипептида, холецистокинина. Такая коэкспрессия была выражена больше в нижних (4, 5 и 6) слоях по сравнению с верхними слоями (Ма Y. et. al., 2011). В другой доступной литературе сообщается, что в зрелом мозге пирамидные клетки не образуют электрические синапсы (Galarreta M., Hestrin S.; 1999; Gibson J.R. et.al., 1999). Однако по данным литературы, электротоническая связь была продемонстрирована между зрелыми пирамидными нейронами CA1 области гиппокампа (Andrew R.D. et.al., 1982). Кроме того, при иммуногистохи-

мическом исследовании положительная реакция на Сх36 была выявлена на пирамидных нейронах пятого слоя зрелого мозга крыс в работе Прист с соавт. (Priest A. et.al., 2001). Нами было также обнаружена цитоплазматическая экспрессия Сх36 в пирамидных клетках пятого слоя, при этом характеристики экспрессии Сх36 и парвальбумина на этих клетках отличаются – содержание коннексина умеренное и равномерное во всех положительно окрашенных клетках, а парвальбумин в некоторых клетках содержится в значительно большем количестве. Вероятно, часть клеток пятого слоя коры, которые экспрессируют коннексин 36 и формируют электрические синапсы, содержат другой, добавочный нейропептид.

Это предположение складывается в результате анализа достаточного количества работ, демонстрирующих, что электрические синапсы, как правило, соединяют клетки, содержащие одинаковое добавочное нейроактивное соединение (Priest A. et.al., 2001; Fukuda T., Kosaka T., 2003 и др.).

Таким образом, полученные нами результаты продемонстрировали значительное количество клеток, синтезирующих Сх36 и потенциально способных формировать электрические синапсы во всех слоях коры. Реакция на Сх36 выглядит как цитоплазматическое окрашивание большинства клеток и их отростков, мембранное окрашивание в виде ободка вокруг тел других нейронов, пунктирное окрашивание нейропиля, а также поперечно срезанных, радиально направленных коллатералей. Также нами отмечена колокализация добавочного нейропептида парвальбумина и коннексина 36 в одних и тех же клетках. Эти данные свидетельствуют о сохранении электротонического проведения между нейронами коры взрослого мозга и указывают на потенциальную роль электрических синапсов в осуществлении механизма нейрональной коммуникации и торможения. Наши результаты подтверждают устоявшуюся в доступной литературе гипотезу о существовании обширного анатомического субстрата для электрической связи парвальбумин-содержащих нейронов в соматосенсорной коре взрослой крысы.

Благодаря синхронизации, в том числе за счет электрических синапсов, содержащих Cx36, могут обеспечиваться такие функциональные процессы как кодирование информации в кортикальных сетях (Gray С.М., 1999) и регулирование циклов сна-бодрствования (Steriade М., 1997). Поскольку щелевые контакты могут играть важную роль, как в развитии корковых модулей, так и в динамической регуляции нейронных сетей зрелого мозга, аномальная электрическая активность, опосредованная этими контактами, может быть связана с определенными патологическими состояниями, такими как эпилептиформная активность (Carlen P.L. et al., 2000).

2.2.2.2. Иммуногистохимическое и иммунофлюоресцентное исследование астроглиальных коннексинов 43 и 30 в коре мозга крыс

Иммуногистохимическое исследование с антителами против Cx43 в соматической коре показало, что распределение этого белка по слоям имеет следующие особенности: наиболее отчетливая, но умеренная экспрессия выявлена в IV и V слоях баррельной коры в виде окрашенных перинейрональных скоплений хромогена в виде ободков. Также частично окрашены и отростки некоторых крупных клеток ганглионарного пятого слоя. Наиболее выраженная отчетливая экспрессия имеется вокруг капилляров в астроцитарных сосудистых муфтах. При большем увеличении очевидно, что отдельные гранулы хромогена в нейропиле локализованы как вокруг нейронов, так и в некотором отдалении, а также вокруг микрокапилляров (рисунок 24).

Отчетливая положительная экспрессия Cx43 также выявлена в нейропиле первого слоя в виде многочисленных мелкогранулярных отложений на протяжении всего I слоя, а также в пиальной оболочке в виде более крупных и отчетливых скоплений гранул хромогена (рисунок 25). По-видимому, эта реакция ассоциирована со щелевыми контактами крупных астроцитов первого слоя коры и пиальной оболочки.

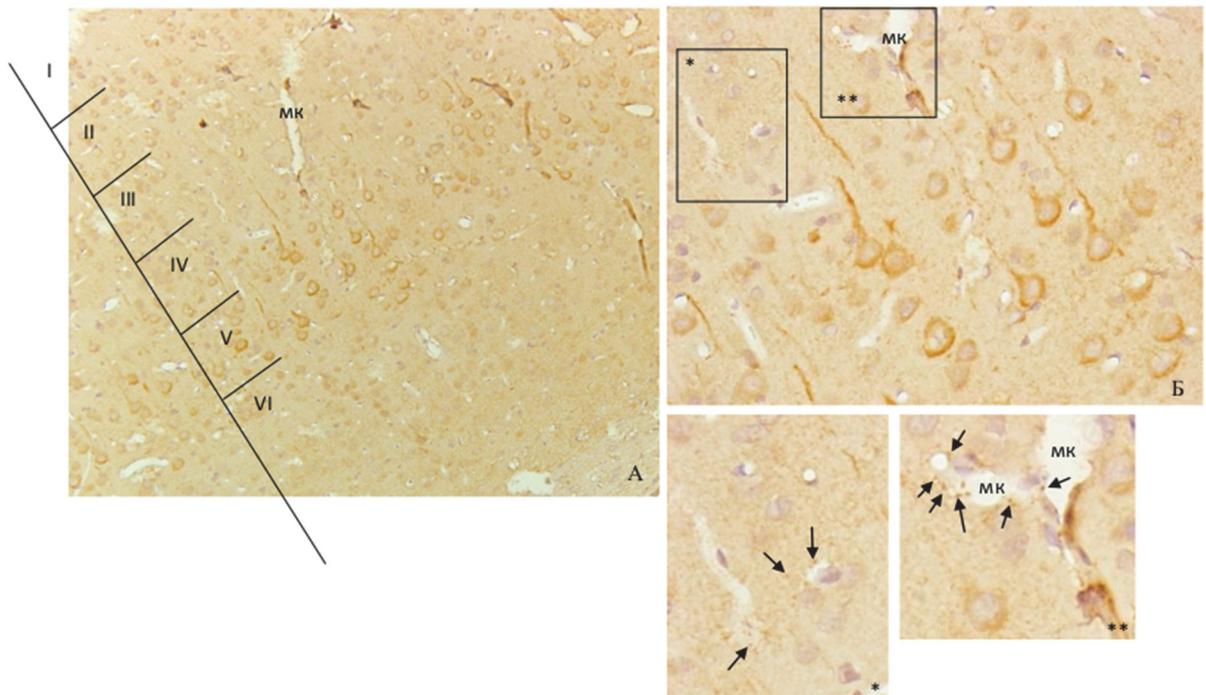


Рисунок 24 – Иммуногистохимическое исследование соматической коры с использованием антител к коннексину 43. А- Послойное распределение Sx43+ клеток в коре. Б – увеличенное фото окрашенных Sx43+ клеток четвертого и пятого слоев коры. * – увеличенный фрагмент нейрофила коры, демонстрирующий при больших увеличениях мелкие гранулы хромогена (черные стрелки) вокруг клеток, предположительно астроцитов. ** – увеличенный фрагмент нейрофила коры, демонстрирующий локализацию более крупных гранул (черные стрелки) вокруг микрокапилляров. Условные обозначения: МК-микрокапилляр. Увеличение А – Ув. 100, Б – Ув.400, * – Ув. 1000, ** – Ув. 1000

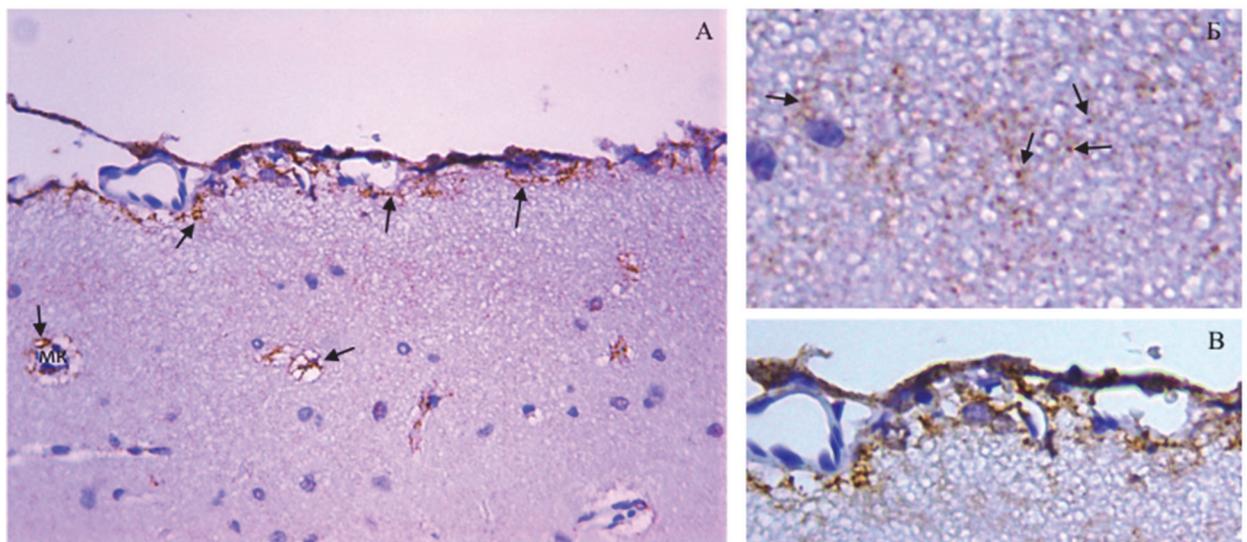


Рисунок 25 – Распределение коннексина 43 в первом слое соматической коры. А – положительная Sx43 реакция в пиальной оболочке, вокруг периваскулярных астроцитарных муфт, отдельных астроцитов (обозначено черными стрелками). Б- мелкогранулярная Sx43+ реакция в нейрофиле первого слоя, цитоплазматическая реакция отдельных микроглиоцитов (стрелки). В - более выраженная Sx43+ в пиальной оболочке, за счет скопления крупных гранул хромогена. Условные обозначения: МК-микрокапилляр. А-Ув. 400, Б- Ув. 1000, В- Ув.1000

Результаты выполненного в конфокальном микроскопе иммунофлюоресцентного исследования показали сходные результаты. Исследование проводилось с использованием тройного мечения для уточнения локализации Cx43. При этом ядра клеток были окрашены DAPI (синий сигнал), астроциты и их отростки выявлялись с помощью ГФАБ (красный сигнал), а белок Cx43 детектировался с помощью FITS (зеленый сигнал).

Отчетливая экспрессия Cx43 наблюдается на отростках астроцитов пинальной оболочки (рисунок 26А). Мембранная реакция к Cx43 в виде слабо окрашенных ободков выявляется на клетках и восходящих коллатералях IV и V слоев коры, при этом сами клетки не дают реакцию на ГФАБ. В нейропиле всех слоев коры имеется диффузная экспрессия, которая наиболее выражена в IV и в VI слоях. В данном случае анализ исключительно экспрессии Cx43 позволяет идентифицировать баррели четвертого слоя в виде округлых структур (рисунок 26Б).

Положительные сигналы к Cx43 преимущественно располагаются на отростках астроцитов, содержащих ГФКБ. Подробное изучение срезов коры при большем увеличении показало, что флюоресцентные метки этого белка можно обнаружить в нейропиле во всех слоях. Положительная реакция на Cx43 выглядит как гранулярная или зернистая в виде отдельных точек в нейропиле, или локализована вокруг клеток и сосудов. Во всех участках, где наблюдается локальное усиление сигнала, при большем увеличении выявляется более плотное расположение гранул Cx43 вокруг продольно и поперечно срезанных микрокапилляров на сосудистых отростках астроцитов. Эти сигналы вокруг перикапиллярных астроцитарных муфт имели крупные размеры и были более заметны по сравнению с мелкими гранулами в нейропиле (рисунок 27А). Также скопления сигналов к Cx43 ассоциированы с астроцитами и их отростками, расположенными вне микрокапиллярного русла коры (рисунок 27Б). Таким образом, выявлена отчетливая взаимосвязь размера меток Cx43 и их локализации, что отражает размеры и локализацию ШЦК.

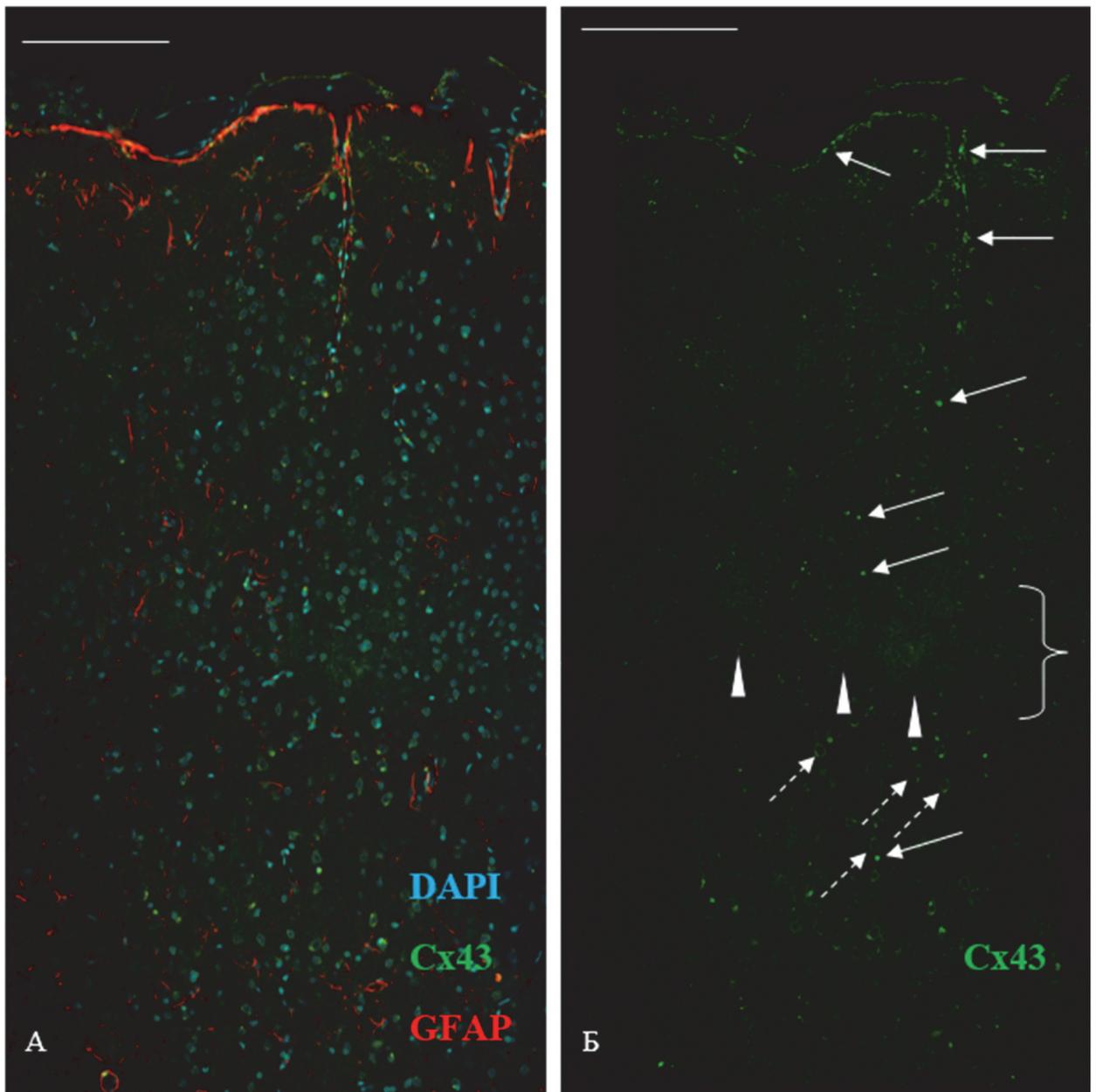


Рисунок 26 – Иммунофлюоресцентное исследование фронтального среза коры головного мозга с применением антител к коннексину 43 и ГФАБ. Ядра подкрашены Дами. А – общий вид локализации Cx43 и ГФАБ, Б – сигналы только белка коннексина 43. Белыми сплошными стрелками обозначены положительные Cx43 сигналы в виде единичных точек в нейроне коры, пиальной оболочке и вокруг микрокапилляров, белая пунктирная стрелка - мембранная реакция Cx43 вокруг крупных клеток V слоя коры, треугольная белая стрелка - реакция Cx43, выявляющая баррели IV-го слоя. Масштабный отрезок соответствует 200 мкм.

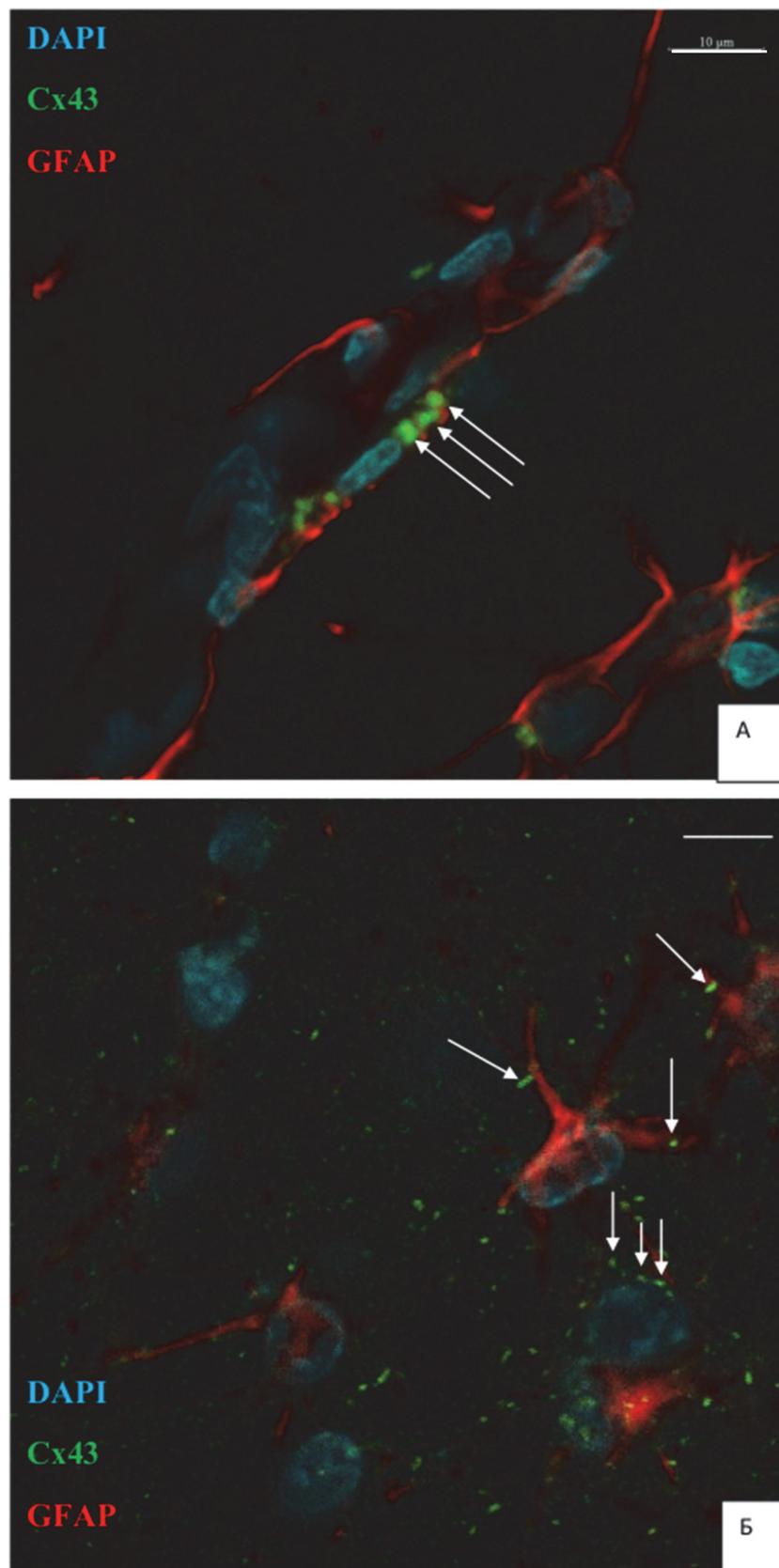


Рисунок 27 – Локализация гранул коннексина 43 в соматосенсорной коре. А- Локализация крупных гранул коннексина 43 вокруг микрокапилляров (белые стрелки). Б- локализация гранул коннексина 43 в нейрониле, на мембранах и отростках астроцитов. Масштабный отрезок соответствует 10μм.

Обсуждая полученные результаты следует еще раз отметить, что в классическом представлении коннексин 43 является белком щелевых контактов астроцитов (Rash J. E. et. al., 2001; Nagy J.I. et. al., 2003; Yamamoto T. et. al., 1990). Однако некоторые авторы продемонстрировали ко-экспрессию коннексина 43 и нейрональных антигенов (нейрональный ядерный антиген, парвальбумин), предполагая, что данный коннексин может экспрессироваться и в небольшом количестве нейронов, в том числе тормозных интернейронах (Priest A. et.al., 2001; Dermietzel R. et al., 1989; Micevych P. E., Abelson, L. 1991). По нашим данным, экспрессия коннексина 43 выглядит в виде мелкозернистого окрашивания нейропиля по всем слоям коры, при этом более яркое окрашивание отмечено в пиальной оболочке и в баррелях IV слоя. При малых увеличениях создается впечатление локализации некой Cx43+ оболочки вокруг корковых нейронов V слоя, однако, при больших увеличениях, заметна мембранная реакция самих нейронов и их отростков. Наши результаты аналогичны наблюдениям Прист с соавт., исследования которой показали, что у взрослых крыс Cx43 иммунопозитивные клетки локализуются во всех слоях соматической коры, при этом, более высокие уровни этого белка демонстрировали тела пирамидных клеток слоя Va и не пирамидные клетки инфрагранулярных слоев коры (Priest A. et.al., 2001). Слабоокрашенные мелкие клетки автор, при этом, отнесла к клеткам астроглии. Более того, другие авторы, изучая экспрессию мРНК коннексина 43 в мозге взрослых крыс методами гибридизации *in situ*, продемонстрировали, что кДНК встречается в различных популяциях нейронов, включая клетки Пуркинье мозжечка, нейроны гиппокампа, гранулярные клетки зубчатой извилины и нейроны ядер заднего мозга, а также пирамидные клетки IV-V слоев неокортекса (Simbürger E. et.al., 1997). Экспрессия мРНК также, как обнаружение самого белка коннексина 43 в неокортикальных пирамидных клетках IV и V слоев является довольно неожиданным результатом, поскольку все же общепринятым считается положение о том, что специфические субпопуляции нейронов

экспрессируют только коннексин 36 во взрослом мозге (Galaretta T., Hestrin S., 2002; Fukuda T., Kosaka T., 2003).

По данным Elias с соавт. (2007) и других авторов, в процессе развития неокортекса радиальная глия, располагающаяся в желудочковой зоне и дающая проекции к поверхности коры (в пиальную оболочку), выполняет две функции: дает начало стволовым клеткам - предшественникам нейронов, и формирует направляющие коллатерали для миграции нейронов к своему месту назначения в коре, где они приобретают вид пирамидных клеток в зрелом мозге (Noctor S. C. et al., 2001; Elias L. A. B. et al. 2007). В дальнейшем, объединение мигрирующих по тяжам радиальной глиии нейронов может составлять основу структурных корковых модулей в коре взрослых животных, например, баррельную кору. Поскольку клетки-предшественники нейронов и глиии экспрессируют оба типа коннексина (Cx36, Cx43), очевидно, некоторые группы нейронов коры зрелого мозга (например, нейроны V и IV слоев коры) сохраняют эту способность, что показано, в том числе, в наших исследованиях. Полученные нами результаты позволяют выдвинуть предположение о том, что повышенное содержание белка Cx43 в клетках IV и V слоев связано с формированием нейро-глиальных щелевых контактов на соме нейронов в этих слоях. К настоящему моменту, возможность формирования таких контактов была продемонстрирована только в клеточных культурах (Froes M. M., et al., 1999), и не подтверждена *in vivo* (Rash J.I. et al., 2000).

Иммунофлюоресцентное исследование с антителами к коннексину 43 в настоящей работе выявило четкий рисунок баррелей на уровне четвертого слоя коры. По видимому в этой зоне астроциты формируют объединенные посредством щелевых контактов (ЩК) ансамбли, четко соответствующие границам барреля и работающие изолированно внутри каждого модуля. Эти результаты могут свидетельствовать о том, что астроциты способны образовывать тесную функциональную связь с нейрональными сетями, такими как нейронные ансамбли баррельной коры. Внутри этих комплексов с помощью регуляции метаболической активности осуществляется координация и кон-

троль функционирования нейронных сетей, а также происходит физическая сегрегация функциональных нейрональных компартментов. Существование таких комплексов предполагается для элементарных вычислительных модулей коры головного мозга млекопитающих – кортикальных колонок (Houades V. et al. 2008, Eilam R., et al., 2016).

В пределах описанных выше структур также осуществляется управляемая астроцитами регуляция местного кровотока в ответ на нейрональную активность (Blinder P. P. et al., 2013). Известно, что астроциты, формируют периастроцитарные муфты, являющиеся компонентом ГЭБ (Николлс Дж. с соавт., 2003). Вполне возможно, что астроциты, объединённые посредством щелевых контактов, содержащих коннексин 43, в единую панглиальную сеть, могут выступать в качестве основного посредника между нейронами и сосудистым руслом, в комплексе образуя нейро-глио-сосудистые ансамбли. Подробное обсуждение возможности существования подобных комплексов и их функциональной роли в организации кортикальных колонок будет рассмотрена ниже.

Нами уже отмечалась ранее уникальность первого молекулярного слоя, в состав которого также входит пиальная оболочка коры. Этот слой, при отсутствии тел нейронов, демонстрировал повышенное содержание синаптофизина в его апикальной части и скопление астроглиальных элементов для обеспечения поверхностной глиальной пограничной мембраны. Сосредоточение крупных Sx43+ гранул в пиальной оболочке может свидетельствовать об активном участии щелевых контактов, создающих панглиальный синцитий и принимающих участие в обеспечении реализации барьерной функции астроцитов.

Таким образом, проведенное нами исследование локализации коннексина 43 свидетельствуют о высоком потенциале исследований в области взаимного влияния астроглии и нейронов взрослого мозга. Мембранная локализация Sx43 была выражена на тех же нейронах IV и V слоев коры, в которых была выявлено повышенное цитоплазматическое содержание белка коннек-

сина 36. По нашим наблюдениям, в отличие от локализации других нейроглиальных антигенов, характерных для нервной ткани (синаптофизин, глиальный фибриллярный кислый белок, основной белок миелина, нейрофиламенты), экспрессия коннексинов (в частности, коннексина 43) в коре головного мозга, как правило, менее выраженная, при больших увеличениях выглядит как «точечная» или «зернистая», что, по-видимому, ассоциировано с количеством щелевых контактов и полуканалов. Дальнейшее электронно-микроскопическое исследование после проведения иммуногистохимии будет способствовать определению связи локализации белка на светооптическом уровне и образования глиальных или нейрональных щелевых контактов.

К настоящему времени существует достаточное количество исследований в пользу гетерогенности астроглии. К примеру, популяции астроцитов отличаются по способности поддерживать рост аксонов и образование синапсов (Morel L. et al., 2017). Кроме того, среди астроцитов выделяются субпопуляции, различающиеся по особенностям метаболизма нейромедиаторов и других сигнальных молекул (Höft S., et al., 2014; Zhou M., 2001). Изучение гетерогенности астроглии способствует изменению представлений о нейроглиальных отношениях, а также формирует новый взгляд на различные патологии ЦНС, в которых астроглия принимает непосредственное участие. Одним из факторов, обеспечивающих гетерогенность астроглии, может быть дифференцированная экспрессия белков коннексинов, образующих щелевые контакты.

В настоящей работе с помощью метода флюоресценции с тройной меткой проведено исследование уровня экспрессии и локализации в структурах коры еще одного коннексина астроглии – коннексина 30. Полученные результаты показали, что уровень экспрессии коннексина 30 ниже, чем Cx43, но при этом в отличие от Cx43 его распределение отчетливо гетерогенное. Наиболее выраженная положительная реакция на этот белок была выявлена в IV, а также VI слое коры, при этом в целом реакция в нейропиле на исследованный белок менее выражена, чем на коннексин 43 (рисунок 28А).

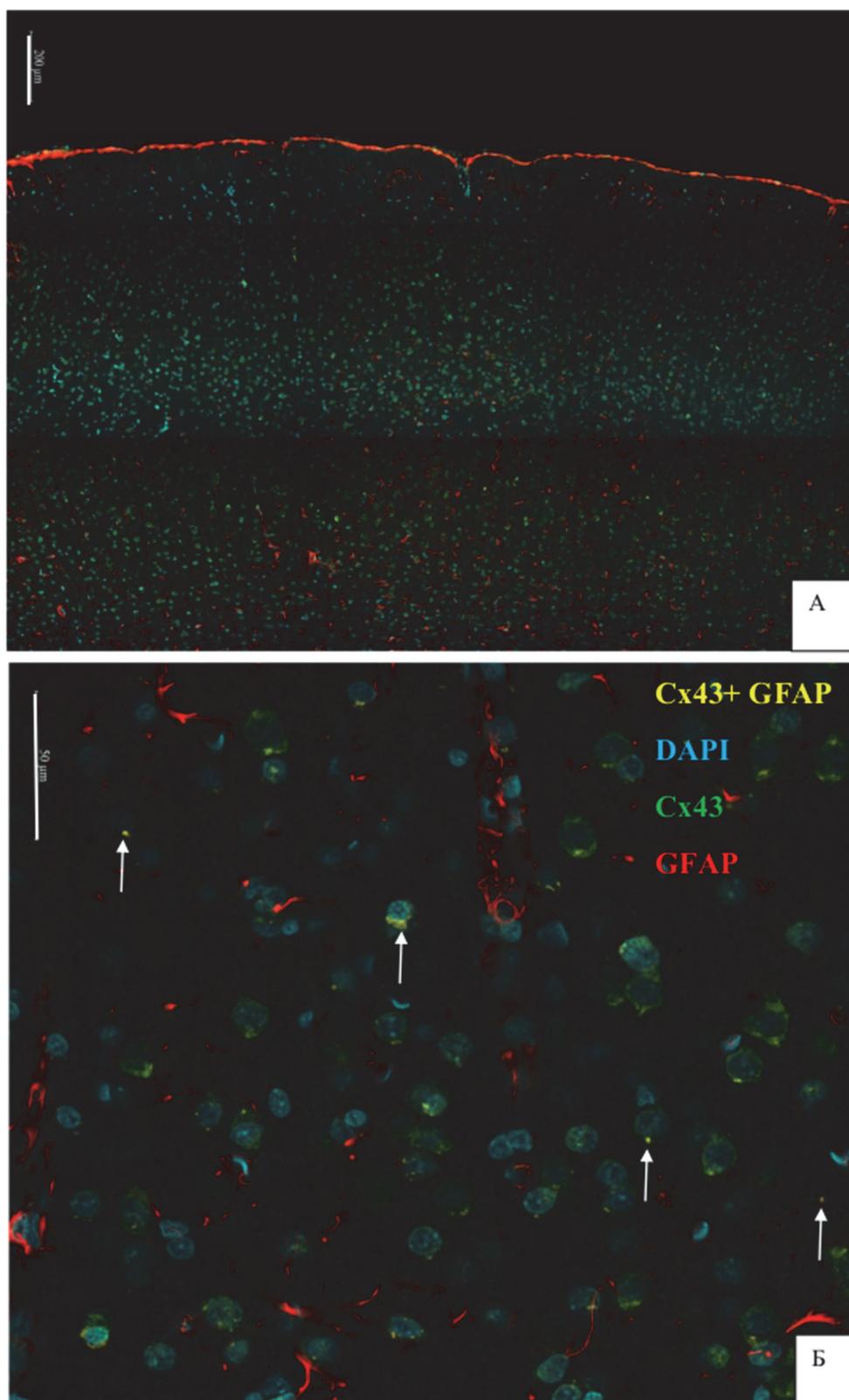


Рисунок 28 – Иммунофлюоресцентное исследование фронтального среза коры головного мозга с применением антител к коннексину 30 и ГФАБ. А – Общий вид распределения белка коннексин 30 в соматосенсорной коре крыс. Б- Диффузная цитоплазматическая и мембранная реакция коннексина вокруг отдельных клеток, а также в виде точечных сигналов коэкспрессии коннексина 30 и ГФАБ (белые стрелки). Масштабный отрезок А - 200μм, Б- 50 μм.

При большем увеличении отчетливо визуализируется преобладающее расположение Сх30 в астроцитарных оболочках вокруг отдельных клеток коры в виде точечных мембранных отложений. При этом создается впечатление ко-экспрессии ГФАБ и коннексина 30, что кардинально отличается от результата, полученного при исследовании локализации Сх43. Также положительная мелкозернистая реакция на исследуемый белок отмечена в цитоплазме отдельных клеток и в виде ободка по плазматической мембране (рисунок 28Б). В этих клетках не выявлена отчетливая экспрессия ГФАБ, что свидетельствует в пользу их нейрональной принадлежности. Также, в отличие от Сх43, не обнаружены крупные скопления Сх30 в микроциркуляторном русле исследованных структур.

Таким образом, в настоящей работе установлена гетерогенность экспрессии астроглиальных коннексинов (Сх43, Сх30) в коре головного мозга крыс, как по локализации, так и по интенсивности. По нашим данным, распределение коннексинов Сх43 и Сх30 в норме в мозге имеет существенные отличия, однако причины различной способности субпопуляций астроцитов синтезировать разные типы коннексинов не были исследованы и функциональное значение этого феномена неизвестно. Остается открытым вопрос о способности Сх30 формировать ЩК, исследованию этой проблемы посвящены наши ультраструктурные исследования.

2.2.2.3. Иммуногистохимическое исследование распределения коннексина 36 и коннексина 43 в вентральных и ретикулярном ядрах таламуса мозга крыс

Иммуногистохимическое исследование Сх36 и Сх43 в ядрах таламуса проводилось на тонких парафиновых срезах, полученных с участка таламуса, содержащего ядра VPM, VPL и RT по аналогии с исследованием экспрессии ГФАБ, нейрофиламентов, синаптофизина, основного белка миелина, парвальбумина, соматостатина.

Полученные при иммуногистохимическом исследовании результаты показали, что экспрессия обоих коннексинов – нейронального (Cx36) и глиального (Cx43) наиболее выражена именно в таламусе по сравнению с другими основными структурами мозга, располагающимися в плоскости среза – корой, гиппокампом, гипоталамусом, другими ядрами таламуса (рисунок 29А, рисунок 29В).

Исследование распределения белка нейрональных щелевых контактов (Cx36) выявило наличие цепочек и групп позитивно окрашенных нервных клеток в областях VPM и VPL, при этом, каких-либо отличий в интенсивности окрашивания между этими зонами не наблюдается (рисунок 29А). При этом в RT ядре таламуса реакция на коннексин 36 практически отсутствует. Полученные результаты показали, что экспрессия коннексина 36 в ядрах VPM/VPL наблюдается в тех же участках, что и экспрессия парвальбумина, продемонстрированная нами в предыдущей главе 2.2.1.2. При большем увеличении отмечена яркая, преимущественно цитоплазматическая экспрессия Cx36 в нейронах, а также позитивная реакция на срезанных вдоль и поперек немногочисленных отростках клеток (рисунок 29Б). В нейропиле также отмечено наличие слабоокрашенных ободков вокруг тел клеток и некоторых отростков (рисунок 29Б*).

Исследование белков щелевых контактов астроглии (Cx43) выявило в большей степени диффузное окрашивание нейропиля в (VPL, VPM и в RT ядре) (рисунок 29В). При больших увеличениях окрашивание мелкозернистое, в виде многочисленных точек. Судя по размерам гранул хромогена, в нейропиле ядер таламуса щелевые контакты астроцитов имеют в этой зоне большие размеры, чем в неокортексе (рисунок 29Г).

Помимо этого, наблюдается мембранная экспрессия коннексина 43 в некоторых клетках и их отростках, по аналогии с окрашиванием клеток IV и V слоев коры. Также на больших увеличениях выявлены клетки с отрицательной реакцией к этому коннексину. Следует отметить, что позитивная мембранная реакция на телах клеток наблюдалась нами только в VPL, VPM зонах таламуса, в ядре RT положительная реакция наблюдалась только в виде пунктирного окрашивания нейропиля (рисунок 29Г).

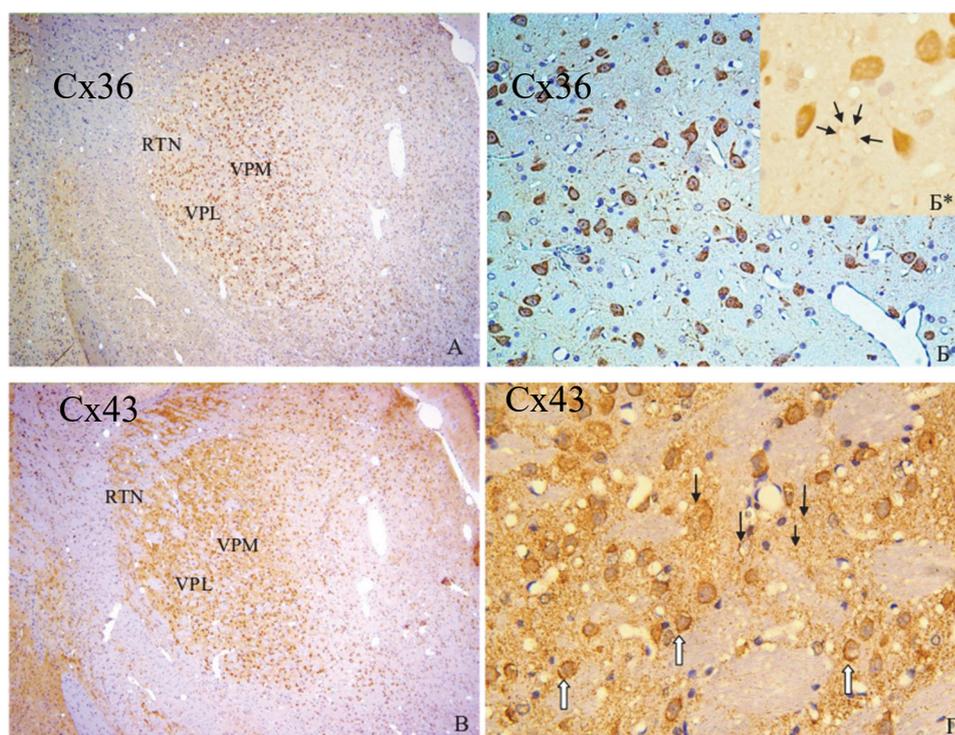


Рисунок 29 – А – Экспрессия Sx36, выявляющая ядра VPM, VPL таламуса, отсутствие экспрессии в RTN ядре. Б - Цитоплазматическая экспрессия Sx36 нейронов VPM ядра таламуса. В- Экспрессия Sx43, выявляющая ядра VPM, VPL, RT ядра таламуса. Г – точечная экспрессия Sx43 в нейропиле (тонкие стрелки) и мембранная (толстые стрелки) на нейронах в области VPM ядра таламуса. А - Ув. 40, Б – Ув. 200, В – Ув. 40, Г – Ув. 400.

Иммунофлюоресцентный анализ (тройная метка) позволил выявить особенности локализации Sx43 вокруг микрокапилляров. Исследуемый белок локализовался в виде крупных ярких положительных сигналов вокруг всех продольно и поперечно срезанных сосудов. Отмечена его ко-экспрессия с ГФАБ на ветвящихся отростках астроцитов, которые входят в ГЭБ (рисунок 30А). При подробном анализе одного из крупных поперечно срезанных сосудов методом конфокальной микроскопии было выявлено, что периваскулярную астроцитарную оболочку составляют отростки нескольких астроцитов, расположенных с разных сторон от капилляра. При этом, положительные сигналы в виде крупных и мелких Sx43 гранул были локализованы как на дистальных, так и на проксимальных отростках, а также на телах этих астроцитов (рисунок 30 Б, В, Г, Д). В целом цепочки положительных сигналов Sx43 различного диаметра были выявлены по всей окружности астроцитарных периваскулярных муфт.

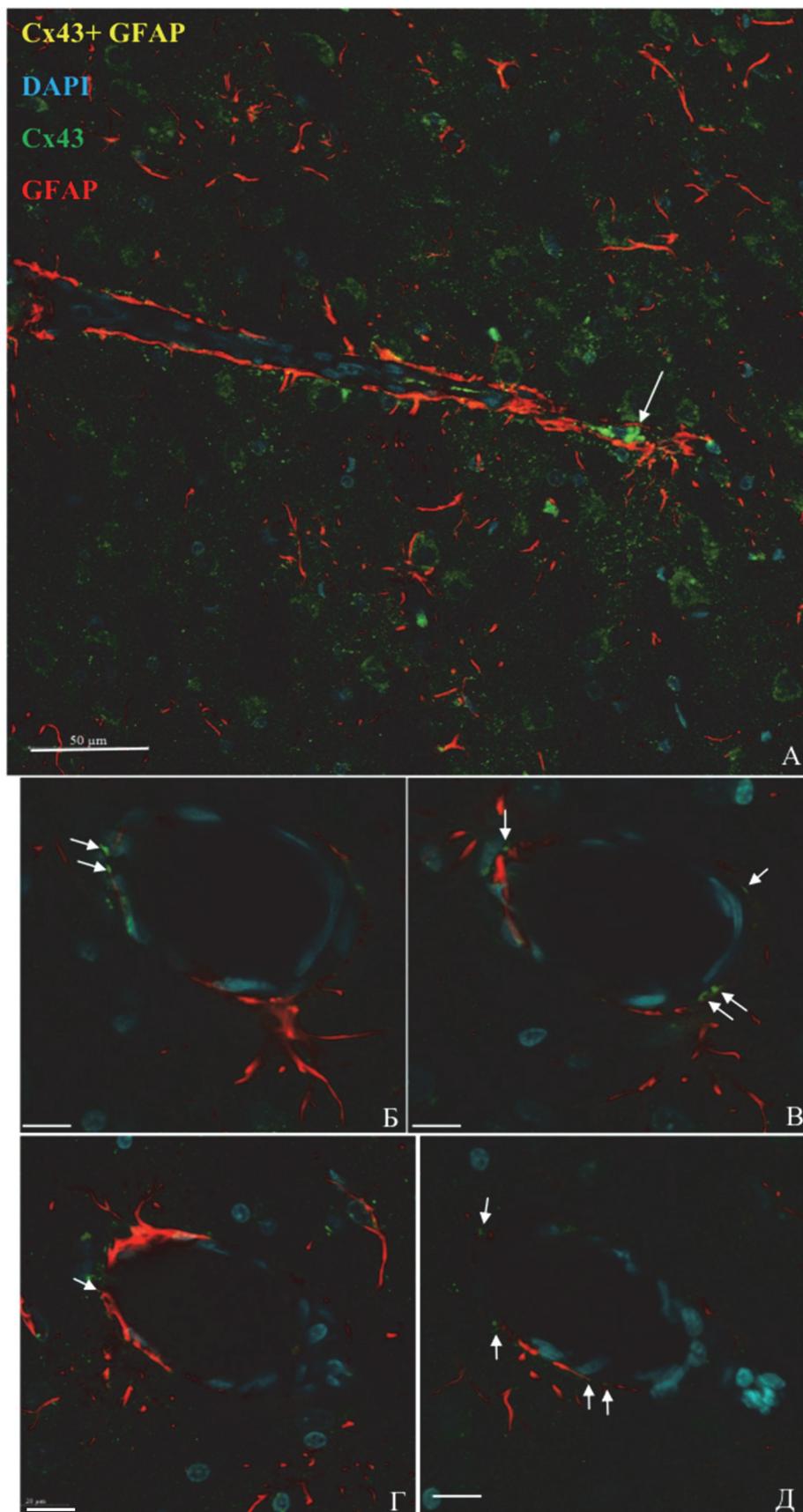


Рисунок 30 – Иммунофлуоресцентное исследование Cx43 в микрокапиллярах ядер таламуса. А – Срезанный вдоль сосуд, оплетенный астроцитами, содержащими ГФАБ с локализацией крупных гранул коннексина 43 (белая стрелка) на их отростках. Б – поперечно срезанный сосуд. Локализация крупных гранул Cx43 на дистальных отростках астроцитов, В – локализация крупных гранул Cx43 вблизи тел астроцитов, Г – локализация мелких гранул Cx43 на проксимальных отростках астроцитов, Д – локализация мелких гранул Cx43 в виде цепочек на тонких отростках астроцитов вокруг микрокапилляров. Масштабный отрезок А- 50 μм, Б, В, Г, Д – 20 μм

Исследования ЦК в таламусе ограничиваются работами, выполненными на ретикулярном ядре таламуса (Chausson P. et al., 2013), а также единичными исследованиями, описывающими ЦК между нейронами релейных ядер, в основном в ядре VPM (Lee S.C. et al., 2010; Griemsmann S. et al., 2015). Но в этих работах не проводилось исследование локализации ЦК нейронов и глиальных клеток, а также не обсуждается их роль в формировании функциональных сетей и ансамблей и участие в процессах обработке информации в таламических структурах.

Исследования распределения транскрипта коннексина 36 продемонстрировало его наличие в ядрах MD, VL, Vm, VP, Po, а также его отсутствие в RT ядре таламуса (Belluardo N. et al., 2000). В нашей работе в ядре RTN мы также выявили отрицательную реакцию с антителами к Cx36, но положительную реакцию с антителами к Cx43 в нейропиле этого ядра. Поскольку ядро RNT в виде полукруглого образования занимает стратегическое положение между неокортексом и таламусом и контролирует корково-корковые и кортико-таламические проекции, межклеточная синаптическая коммуникация внутри этой структуры способствует ее функциям (Steriade M., 2001; Csillik B. et al., 2005). RNT участвует практически во всех функциональных модальностях: слуховых, вкусовых, соматосенсорных, зрительных, висцеральных, двигательных и т.д. Учитывая полученные нами данные относительно распределения коннексинов в этом ядре, синаптическая передача в RTN ядре обеспечивается без участия щелевых контактов, содержащих коннексин 36 (электрических синапсов), но с участием панглиального синцития, образованного щелевыми контактами, содержащими коннексин 43. В то же время известно, что ядро RTN состоит из ГАМК-ергических парвальбумин содержащих нейронов, что было продемонстрировано, в том числе, в наших исследованиях. Учитывая тот факт, что наибольшее количество нейрональных ЦК или электрических синапсов имеют избирательный характер формирования и соединяют тормозные ГАМК-ергические парвальбумин-содержащие интернейроны (Sloper J.J., 1972; Sloper J.J., Powell T.P.S., 1978;

Galaretta T., Hestrin S., 1999, 2002; Fukuda T., Kosaka T., 2003), следует предположить, что подобные нейрональные сети в ядре RTN слабо выражены.

По нашим данным ядра VPM и VPL содержат повышенное количество белков коннексинов (Cx36, Cx43), что может свидетельствовать о формировании плотной сети как глиальных, так и нейрональных щелевых контактов в исследуемых ядрах, способствующих обработке внешних сенсорных сигналов в подкорковых структурах и их передачи в корковые модули. В тоже время, также как и в четвертом и пятом слоях коры, нами была отмечена корреляция экспрессии парвальбумина и белков щелевых контактов коннексинов (Cx36 и Cx43) в области ядер VPL/VPM таламуса. Эти данные свидетельствуют о возможном образовании сети тормозных интернейронов, объединенных электрическими синапсами как в корковых зонах представительства вибрисс (баррельная кора), о чем мы писали ранее, так и в таламических зонах представительства вибрисс (VPM, VPL ядра). Существование подобной сети может являться морфологической основой индивидуального локального пейсмекерного ритмогенеза как в баррелях и колонках коры SI, так и в баррелоидах VPM ядра таламуса. При этом существующие электрофизиологические результаты предполагают существование нескольких типов тормозных путей через щелевые контакты, которые регулируют активность внутри или между модулями таламуса (Lee, et al., 2014). Функции щелевых контактов нейронов таламуса могут состоять в синхронизации подпороговой (доспайковой) активности, а также в синхронизации спайковой активности таламических нейронов, в то время как щелевые контакты астроглии могут обеспечивать функционирование гематоэнцефалического барьера, а также модуляцию нейрональной активности путем поглощения и перераспределения ионов и отдельных молекул.

Тема нейро-глиальных взаимодействий является одной из самых актуальных и интересных в нейронауке, поскольку изменяет представление о классических доктринах в физиологии нервной системы. Согласно классической парадигме, структурно-функциональной единицей мозга является

нейрон. В соответствии с этой концепцией, синапс, обеспечивающий функции мозга, представляется как двухчастная система, состоящая из пре- и постсинаптической мембран (Экклз Д., 1966). Однако еще более десяти лет назад морфологами было отмечено, что формирование всех без исключения синаптических комплексов происходит в окружении глиальных оболочек из астроцитов.

В этой связи современными учеными была предложена концепция «трехчастного синапса, tripartite synapse», согласно которой отростки астроцитов неслучайно сближаются с химическими синапсами, а в состав синапса входят не только пре- и постсинаптические компоненты, но и окружающие их астроцитарные отростки (Araque A., et. al., 1999; Perea G. et. al., 2009). При этом в предложенной концепции отсутствуют сведения о щелевых контактах и полуканалах астроцитов, которые также могут входить в состав трехчастного синапса (рисунок 31).

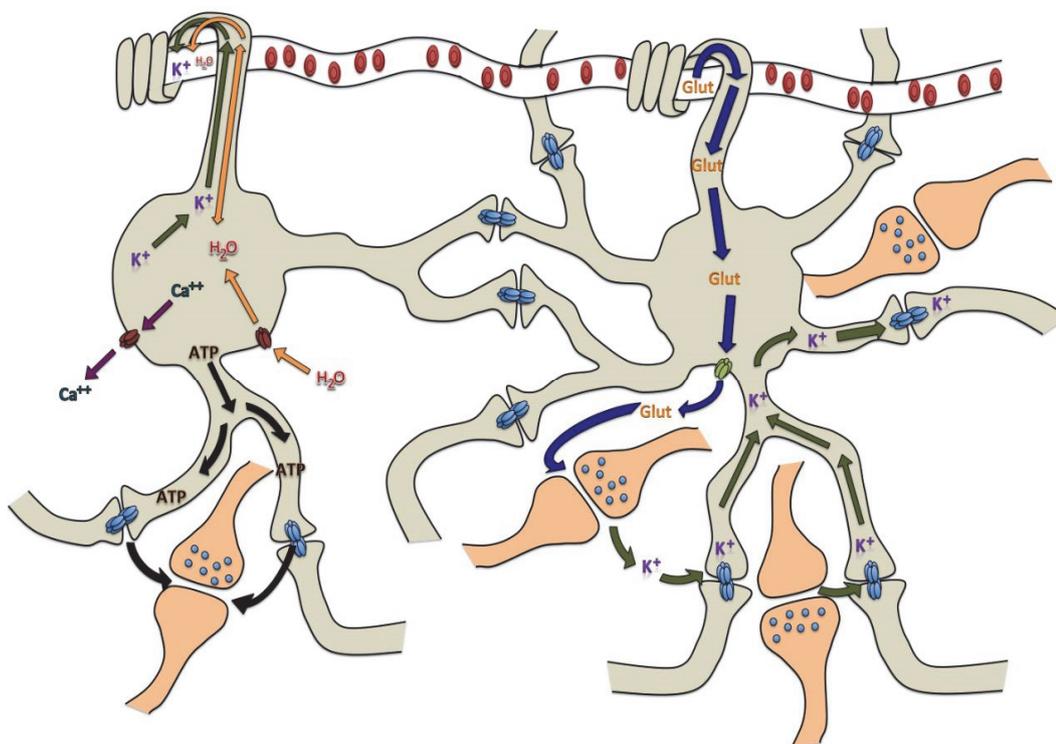


Рисунок 31 – Формирование астроцитарных ТЩК, участвующих в процессах ионного обмена, синаптического проведения химическими синапсами и нейро-глио-васкулярных взаимоотношениях. (Кириченко Е.Ю., Могилевская М.Ю., 2013)

Внутри таких структур щелевые контакты и полуканалы могут способствовать выполнению астроцитами таких функций как контроль экстраклеточного гомеостаза (Orkand R. K., et al., 1966; Wallraff A. et al., 2006), модуляция нейрональной активности (Allen N. J., Barres B. A. 2005; Araque A., et. al., 1999; Benarroch E.E., 2005; Perea G. et. al., 2009; Schipke C. G., Kettenmann H., 2004), обеспечение синаптической пластичности (Wang D. D., Bordey A., 2008), обеспечение дифференциации шипиков нейронных дендритов (Nishida H., Okabe S., 2007), а также контроль проницаемости в нейро-глио-сосудистом ансамбле (Tam S.J., Watts R.J.; Wang D. D., Bordey A., 2008).

Представление о нейро-глио-сосудистом ансамбле (НГСА) мозга с акцентом на актуальность проблемы взаимоотношений внутри комплекса нейрон - глиальная клетка - сосудистый элемент сформулировано в ряде публикаций относительно недавно (Николлс Дж. с соавт. 2003; Giaume C. et.al., 2010; Meshulam L. et.al., 2012).

Нами установлено, что, по меньшей мере, два белка – Сх30 и Сх43 - образуют многочисленные нексусы между сосудистыми ножками астроцитов вокруг сосудов, следовательно, нарушение экспрессии этих коннексинов должно драматически отразиться и на функционировании ГЭБ. Вопрос о том, какие именно изменения происходят и как это отражается на работе мозга пока остаётся открытым.

Таким образом, в проведенном исследовании было показано, что распределение Сх36 и Сх43 имеет существенные отличия, при этом экспрессия наиболее выражена в VPM, VPL и RT ядрах таламуса по сравнению с другими основными структурами мозга, располагающимися в плоскости среза – корой, гиппокампом, гипоталамусом, другими ядрами таламуса. По нашим данным, экспрессия коннексинов в ядрах VPM/VPL наблюдается в тех же участках, что и экспрессия парвальбумина, что может свидетельствовать о формировании плотной сети как глиальных, так и нейрональных щелевых контактов в исследуемых ядрах, способствующих обработке внешних сенсорных сигналов в подкорковых структурах и их передаче в корковые моду-

ли. В ядре RT коннексин 36 отсутствует, при этом, коннексин 43 демонстрирует характерную «зернистую» экспрессию в нейропиле. Учитывая полученные нами данные, синаптическая передача в RTN ядре обеспечивается без участия щелевых контактов, содержащих коннексин 36 (электрических синапсов), но с участием панглиального синцития, образованного щелевыми контактами, содержащими коннексин 43. Отдельно была отмечена локализация Sx43 в виде крупных и мелких гранул на дистальных и проксимальных отростках и телах астроцитов, локализованных вокруг микрокапилляров и входящих в ГЭБ. Судя по этим данным, астроглиальные щелевые контакты входят в состав периваскулярных астроцитарных муфт и участвуют в осуществлении функций ГЭБ.

Полученные на светооптическом уровне результаты о наличии и распределении коннексинов в коре и таламусе требуют выяснения, что же на самом деле выявляют эти антитела: локализацию белка в цитоплазме, полуканалы или щелевые контакты. В связи с этим, мы провели электронномикроскопическое и иммуноэлектронномикроскопическое исследование с использованием специфических антител к коннексинам, результаты этих исследований будут описаны в следующей главе.

2.2.3. Ультраструктура нейро-нейрональных и глия-глиальных щелевых контактов в колонках соматической коры, в вентральных и ретикулярном ядрах таламуса

2.2.3.1. Ультраструктура нейро-нейрональных щелевых контактов колонок коры и вентральных ядер таламуса

По материалам этого раздела была опубликована статья «Щелевые контакты нейронов в корковых колонках и в вентральных ядрах таламуса» в журнале «Цитология», Т. 59, №10, в 2017 году авторами Кириченко Е. Ю., Логвинов А.К., Филиппова С. Ю.

В отличие от глиальных ЩК, электрические синапсы (или ЩК нейронов) рассматриваются как структуры, обеспечивающие электротонический этап синхронизации локального эндогенного ритмогенеза в условиях отсутствия импульсной активности в элементарных нейронных корковых и подкорковых ансамблях (Deans M.R. et al., 2001; Galaretta T., Hestrin S., 2002; Landisman, C. E. et al., 2002; Fukuda T., Kosaka T., 2003; Connors B. W., Long M. A., 2004; Gibson J. R. et al., 2005; Кириченко Е. Ю. 2009; Logvinov A.K., 2009, 2011). Между тем, функциональные корковые колонки и вентральные таламические ядра таламуса (VPM, RTN, Pom и VPL) играют ключевую роль в процессах обработки сенсорной, в том числе тактильной информации и формирования поведенческих реакций (Серков Ф.Н., Казаков В.Н., 1980; Сухов А.Г., 1992; Kivrak, B. G., Erzurumlu, R. S., 2013). В этой связи исследование деталей строения и локализации нейро-нейрональных ЩК в этих областях имеет большое теоретическое и практическое значение.

В группу электрических синапсов нами отнесены ЩК, расположенные на отростках, имеющих явные ультраструктурные признаки принадлежности к нейронам: наличие синаптических везикул, дендротрубочек, дендрофиламентов, а также активных зон химических синапсов с постсинаптическим уплотнением. На относительно небольших увеличениях электрические синапсы определяются как уплотненные ровные участки на мембранах отростков нервных клеток. При больших увеличениях такие нейрональные контакты обладают характерной для типичного ЩК семислойной структурой: две контактирующие трехслойные мембраны, между которыми располагается узкая щель шириной около 3 нм.

Выявленные электрические синапсы были представлены следующими типами: аксо-дендритические, дендро-дендритические, а также «смешанные» синапсы. В ряде случаев нами обнаруживались несколько рядом расположенных электрических синапсов в одном поле зрения, которые были локализованы на соседних аксонах, содержащих синаптические везикулы. На приведенной электроннограмме отчетливо визуализируется характерная зона нексуса ЩК, расположенная в одной плоскости среза с активной зоной химического синапса, сформированного этим же аксоном (рисунок 32 А). По-

мимо контактов с короткими зонами нексуса также визуализировались протяженные электрические синапсы, расположенные между аксонами и, предположительно дендритами (рисунок 32 Б, Б*). При этом зона такого длинного контакта иногда может выходить из плоскости среза - вероятно, эти контакты изогнуты в объеме.

В таламических ядрах нами нередко выявлялись два и более параллельно расположенных ЩК на отростках со светлой цитоплазмой, содержащей единичные органеллы (предположительно дендрите), расположенном между двумя аксонами. Такие контакты имеют небольшую перфорацию и преломления, однако их нексусы располагаются в плоскости среза. При этом отмечено, что расстояние между двумя электрическими синапсами относительно небольшое (около 85 нм), что может обеспечивать быструю межклеточную передачу (рисунок 32 Г). В некоторых случаях, электрический синапс был локализован между двумя дендритами, которые формируют одновременно аксо-дендритические химические синапсы. В случаях дендро-дендритических электрических синапсов на цитоплазматической стороне мембран, формирующих ЩК, имеются небольшие скопления хлопьевидного электронно-плотного материала, «опушающего» контактирующие мембраны (рисунок 32 В, В*). В области формирования баррелей коры нами обнаружены единичные «смешанные» синапсы, которые представлены близко расположенными на одном дендрите дендро-дендритическим ЩК и симметричным аксо-дендритическим химическим синапсом (рисунок 32 Д, Д*).

Для подсчета общего числа щелевых контактов коры и таламических ядер, а также соотношения количества глия-глиальных и нейронейрональных ЩК, нами было проведено морфометрическое исследование. В ходе морфометрии в коре и таламусе на срезах была проанализирована площадь 1000 мкм². Для морфометрического исследования ЩК коры нами была выбрана область четвертого слоя, наиболее насыщенная исследуемым типом межклеточных контактов, что было показано нами в предыдущих исследованиях (Logvinov A.K. et al., 2009). При подсчете учитывались только ЩК, в которых четко визуализировались все 7 слоев при больших увеличениях.

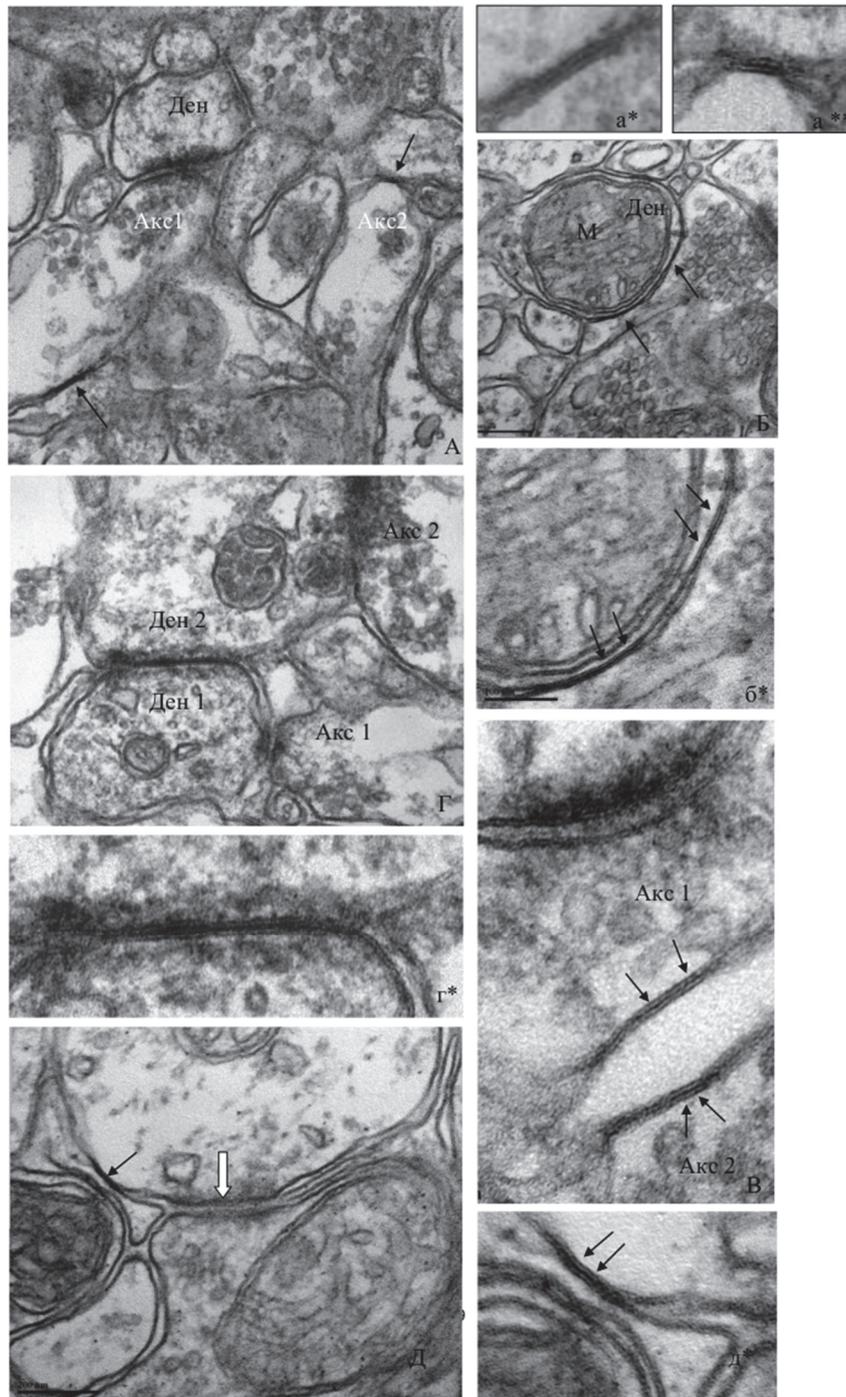


Рисунок 32 - Ультраструктура щелевых контактов на отростках нейронов коры и таламуса крысы.
 А – два щелевых контакта, локализованных на аксонах в одном поле зрения. а* – увеличенный фрагмент а, демонстрирующий ультраструктуру щелевого контакта на аксоне, формирующем на противоположном конце аксо-дендритический синапс. б* – аксо-дендритический щелевой контакт с небольшой зоной некуса. Условные обозначения: Акс – аксон, Ден – дендрит, стрелкой обозначена зона щелевого контакта, звездочкой обозначена активная зона химического синапса. Увеличение А х 50 000, а* х 250 000, б* х 250 000. Б – щелевой контакт с протяженной активной зоной, между аксоном и дендритом. б* – увеличенный фрагмент рисунка Б, демонстрирующий места попадания щелевого контакта в плоскость среза и близость синаптических везикул к зоне некуса. Условные обозначения: Акс – аксон, Ден – дендрит, М – митохондрия, стрелками обозначена зона щелевого контакта в плоскости среза, СВ – синаптические везикулы, звездочкой обозначена активная зона химического синапса. Увеличение Б х 200 000, б* х 300 000. В – Дендро-дендритический щелевой контакт. в* – увеличенный фрагмент рисунка В, демонстрирующий зону некуса в плоскости среза с развитым опушающим хлопьевидным материалом вокруг контактирующих мембран. Условные обозначения: Акс – аксон, Ден – дендрит, звездочкой обозначена активная зона химического синапса. Увеличение В х 80 000, в* х 300 000. Г – Два ЩК на двух аксонах, между которых, предположительно, расположен дендрит. Условные обозначения: Акс – аксон, стрелками обозначена зона щелевого контакта в плоскости среза, звездочкой обозначена активная зона химического синапса. Увеличение х 200 000. Д – «Смешанный» электрический и химический синапс Д* – увеличенный фрагмент рисунка Д, демонстрирующий ультраструктуру щелевого контакта на дендрите. Условные обозначения: Акс – аксон, Ден – дендрит, М – митохондрия, стрелками обозначена зона щелевого контакта в плоскости среза, звездочкой обозначена активная зона химического синапса. Увеличение Д х 250 000, Д* х 400 000

В результате последовательного просмотра полей зрения в четвертом слое было обнаружено 11 нейро-нейрональных и 19 глия-глиальных ЩК из общего числа 30 обнаруженных ЩК. В исследуемых ядрах таламуса количество нейро-нейрональных ЩК оказалось значительно меньше. Так, в ретикулярном ядре (RTN) из 30 обнаруженных ЩК, 29 являлись глия-глиальными, и 1 - нейро-нейрональным. В вентропостеромедиальном (VPM) ядре из 41 ЩК, 37 являлись глия-глиальными и 4 нейро-нейрональными. В прилежащем к VPM ядру вентропостеролатеральном ядре (VPL) было обнаружено 48 ЩК, из которых 44 ЩК являлись глия-глиальными, а 4 ЩК являлись нейро-нейрональными. В постеромедиальном (Pom) ядре из 30 обнаруженных ЩК, 28 ЩК были представлены глия-глиальными и 2 нейро-нейрональными ЩК.

Таким образом, проведенное морфометрическое исследование выявило большее количество нейрональных ЩК в коре по сравнению с таламическими ядрами. Кроме того, по нашим данным наибольшее количество электрических синапсов среди исследуемых ядер в таламусе локализовано в области формирования баррелоидов - в VPM ядре. Согласно литературным данным, в модульных группировках коры (баррели) и таламуса (баррелоиды) наблюдается ассиметричный характер ветвления дендритов и их ориентация в полость баррелей и баррелоидов (Сухов А.Г., 1992). Эта морфологическая особенность может определять более высокую степень синхронизации осцилляторной активности внутри отдельных подкорковых модулей, что соответствует данным известных электрофизиологических исследований (Lübke, J., Feldmeyer, D., 2007). Структурно-функциональная особенность баррелей и баррелоидов также способствует формированию электрических дендро-дендритических связей между нейронами одного модуля для обеспечения локальной подпороговой синхронизации активности нейронов в пределах одного подкоркового модуля, более поздние этапы синхронизации при этом обеспечиваются химическими синапсами. По литературным данным многие пары тормозных быстроспайковых нейронов соединены одновременно и электрическими дендро-дендритными синапсами и ГАМК-ергическими тор-

мыми химическими синапсами, образуя сеть в коре и гиппокампе, активность которой и обеспечивает синхронизацию подпорогового гиперполяризационного ритма отдельных модулей в этих структурах (Fukuda T., Kosaka T., 2003, 2006). При этом ведущая роль в функционировании этой сети отводится электрическим синапсам, содержащим коннексин 36 (Deans, M. R., et al., 2001).

Смешанные синапсы, обнаруженные в нашем исследовании, представляют собой близко локализованные на мембране одного дендрита денродендритический ЩК и симметричный аксо-дендритический химический синапс. Смешанные синапсы в неокортексе впервые описал Слорпер (Sloper J.J., 1972) однако до сих пор мало известно о той роли, которую они играют в нервной системе позвоночных. На основе результатов модельных исследований у низших позвоночных предполагается, что электротонический компонент в смешанных синапсах у млекопитающих может быть связан с долговременной потенциацией (Kosaka T. et al., 2005; Hamzei-Sichani F. et al., 2012) и/или синхронизацией высокочастотных колебаний (Traub R.D. et al., 2010).

По другим литературным данным, именно такие сложные межклеточные коммуникативные структуры, как смешанные синапсы, обеспечивают пластические изменения в нейрональных цепях (Pereda, A. E., 2014).

2.2.3.2. Ультраструктура астроглиальных щелевых контактов в коре и таламусе крыс

По материалам этого раздела была опубликована статья «Ultrastructural study of glial gap junctions in the thalamic nuclei of rat» в журнале «Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology», Т.10, № 3, в 2016 году авторами Kirichenko, E.Y., Churyumova, G.A., Logvinov, A.K.

Электронномикроскопическое исследование как колонок коры, так и ядер таламуса показало, что большинство идентифицированных ЩК сформированы отростками, имеющими ультраструктуру астроглиальных – это отростки с электроннопрозрачной аксоплазмой, практически не содержащие

органелл. В редких случаях ЩК обнаруживались между отростками с ультраструктурой аксонов, дендритов и шипиков, соответственно, содержащими нейрофиламенты, синаптические пузырьки, шипиковый аппарат, митохондрии и другие органеллы. Идентификация ЩК на ультратонких срезах являлась отдельной задачей, поскольку зоны этих контактов часто не попадают в плоскость среза и в этой связи могли быть четко идентифицированы только при наклоне образца на $\pm 15^\circ$ с помощью гониометра. Кроме того, плотный контакт двух мембран можно ошибочно принять за ЩК, поэтому все идентифицированные ЩК дополнительно просматривали при больших увеличениях для подтверждения наличия характерных ультраструктурных признаков, на которых остановимся подробнее.

Как отмечалось выше, ЩК имеют специфическую ультраструктуру: две контактирующие плазматические мембраны, формирующие узкую, прямую зону – нексус (рисунок 33А). При больших увеличениях между контактирующими мембранами визуализируется электроннопрозрачная щель шириной 2-3 нм, прерываемая поперечными мостиками и кластерами осмиофильного материала – результат состыковки коннексонов. Таким образом, при стандартном электронномикроскопическом исследовании ЩК имеет семислойную структуру. С цитоплазматической стороны мембраны просматриваются внутриклеточные домены молекул коннексина в виде хлопьевидного материала (рисунок 33Б). При электронномикроскопическом исследовании во всех ядрах (РОМ, RTN, VPM) обнаруживается сходная картина: глиальные клетки, окружая гигантские таламо-кортикальные аксоны, формируют от одного до нескольких щелевых контактов с различных сторон аксона (рисунок 34). Аксоны также идентифицировали благодаря наличию синаптических везикул, а отростки астроцитов - по разветвленной форме, электроннопрозрачной, практически лишенной органелл по сравнению с отростками нейронов, аксоплазме (рисунок 34 а, б).

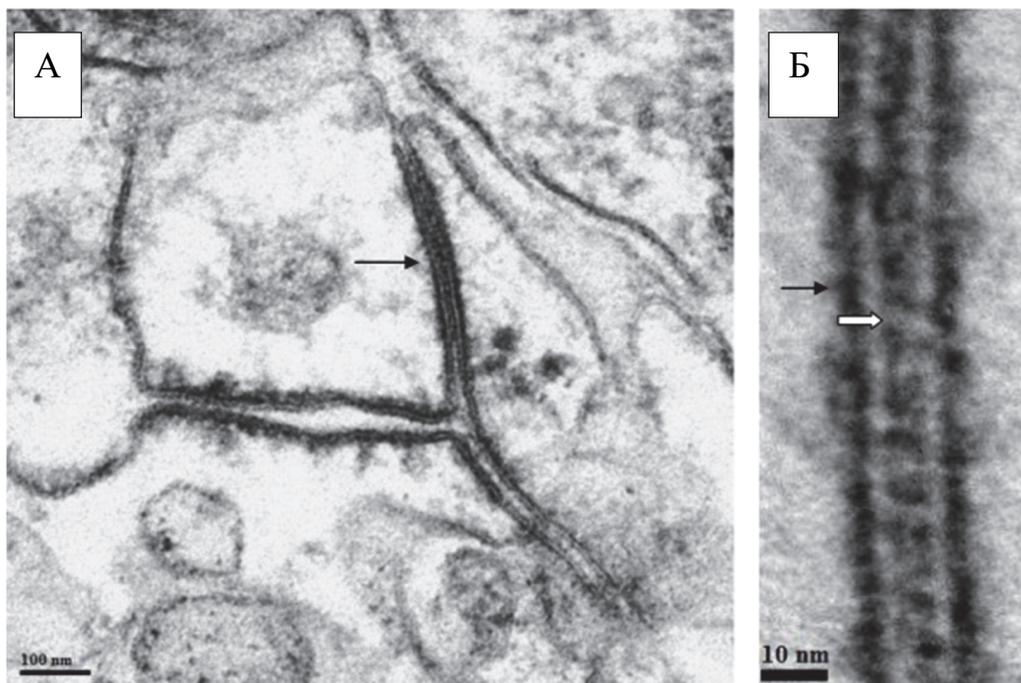


Рисунок 33 – Типичная ультраструктура ЩК. А – ЩК между двумя отростками. Б – Ультраструктура ЩК при большом увеличении. Условные обозначения: черная стрелка – ЩК и внутриклеточные петли коннексина, белые стрелки – коннексоны, черными стрелками. А-Ув. 60 000, Б – Ув. 400 000

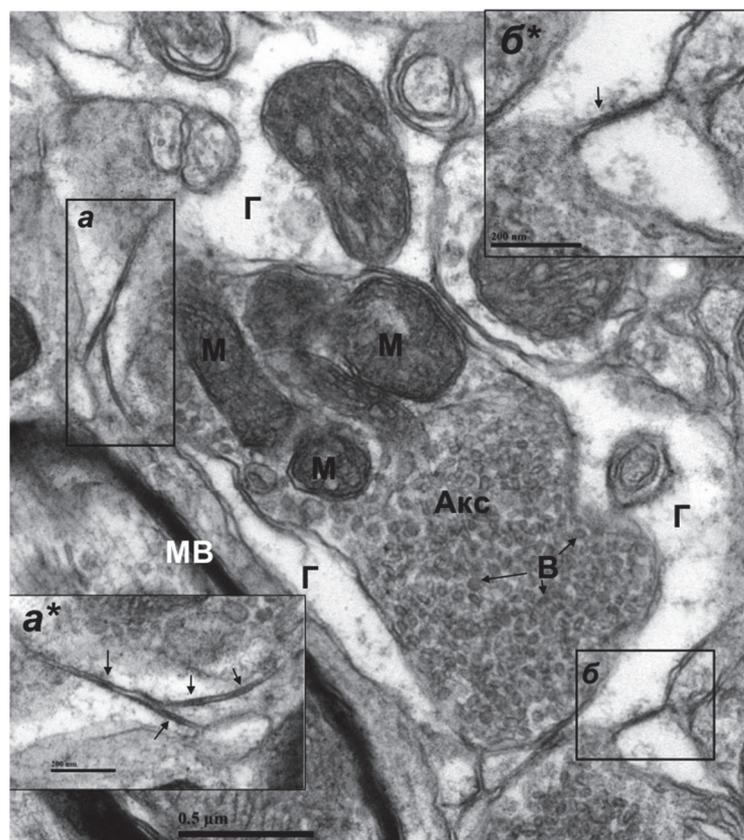


Рисунок 34 – Крупный аксон ядра VRM, окруженный несколькими отростками глиальных клеток и одиночными и множественными ЩК с противоположных полюсов. Условные обозначения: а, б- зоны формирования ЩК, а* – увеличенный участок области а, стрелками обозначены ЩК. б* – увеличенный участок области б, стрелками обозначен ЩК. Акс-аксон, В-везикулы (обозначены стрелками), М-митохондрия, МВ – миелинизированное волокно, Г-глиальная клетка. Увеличение общей микрофотографии - 80 000. а* – 200 000, б* – 200 000

Все обнаруженные нами глиальные ЩК формировались в основном между отростками в нейропиле, однако встречались также ЩК как в непосредственной близости от сомы нейронов и глиоцитов, так и на соме глиальных клеток, что было отмечено нами в колонках коры и в ядрах VPM и POM (рисунок 35А, рисунок 35Б). Глиоциты идентифицировали по характерной ультраструктуре, отсутствию химических синапсов на мембране, по наличию глиофибрилл - элементов цитоскелета глиальных клеток.

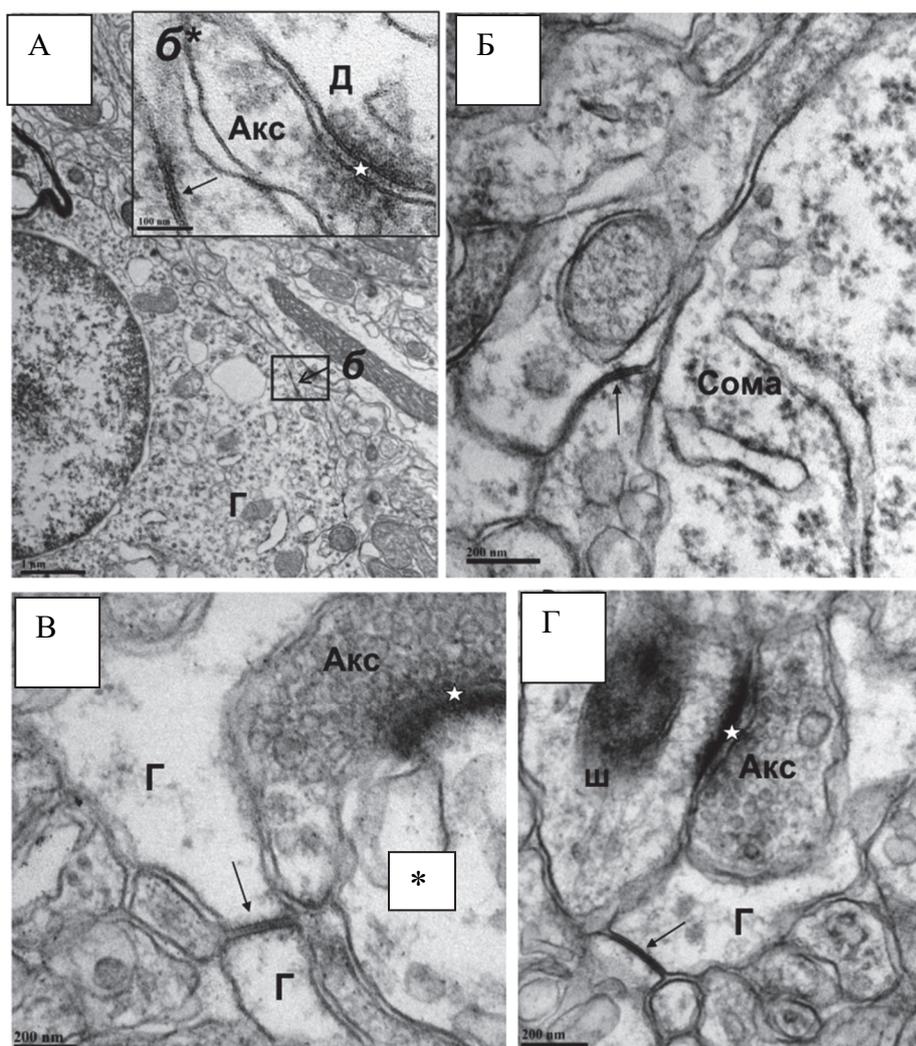


Рисунок 35 – ЩК в VPM и PO ядрах таламуса. А- локализация щелевого контакта на соме глиоцита. б*- увеличенный участок фрагмента б, демонстрирующий, что локализованный на соме ЩК располагается с пресинаптической стороны аксо-дендритического химического синапса. Б - ЩК между отростками, прилегающими к соме клетки. В – ЩК на отростке, контактирующем с пресинаптическим аксоном. Г - ЩК между пре- и постсинаптической мембранами аксо-шипового синапса. Условные обозначения: Акс-аксон, Д- дендрит, ш-шипик, сома- сома клетки, Г-глиальная клетка, звездочкой обозначена активная зона химических синапсов, черной стрелкой обозначены ЩК. А- Ув. 30 000, б*- Ув 120 000, В-Ув. 60 000, Г- Ув. 200 000, Д-Ув. 150000

Следует отметить, что как в коре, так и в таламусе практически все идентифицированные в нейропиле ЩК локализованы в непосредственной близости от активной зоны аксо-шипиковых химических синапсов. При этом особенности взаимного расположения ЩК и химических синапсов позволяют отчетливо выделить несколько вариантов. Первый вариант включает глиальные ЩК, локализованные рядом с пресинаптической частью химических синапсов, то есть, ближе к аксону, содержащему синаптические везикулы. Второй вариант включает ЩК, локализованные со стороны постсинаптической части химических синапсов - вокруг срезанных вдоль и поперек дендритов или шипиков. Чаще всего ЩК расположены на относительно небольшом расстоянии от синаптической щели химического синапса (рисунок 35В, рисунок 35Г). ЩК и активные зоны химического синапса могут располагаться как под углом по отношению друг к другу, так и параллельно или перпендикулярно.

Помимо вышеописанных одиночных ЩК, в таламических ядрах нами были обнаружены серии близкорасположенных межглиальных ЩК, причем преимущественно в VPM и в прилегающем к нему ядре VPL. Такие ЩК имеют характерную локализацию и строение: это несколько соседствующих бляшек, расположенных под углом друг к другу (от 30° до 140°), которые соединяют не два, а три отростка. В месте перегиба контакты прерываются, при этом, их бляшки находятся в плоскости среза (рисунок 36А). Кроме того, некоторые глиальные отростки формируют несколько ЩК (чаще два) вокруг аксо-шипиковых химических синапсов на небольшом расстоянии, соединяя три отростка (рисунок 36Б). При этом если зоны всех ЩК также находятся в плоскости среза, то синаптическая щель химического синапса, наоборот, в плоскость среза, как правило, не попадает. Нередко можно наблюдать два и более ЩК в одном поле зрения на большом увеличении, как показано на рисунке 36В. В данном случае представлено сразу четыре ЩК, три из которых находятся в плоскости среза (рисунок 36В). Бляшки двух отдельных рядом локализованных ЩК могут располагаться как перпендикулярно, так и параллельно друг другу (рисунок 36Б, рисунок 36Г).

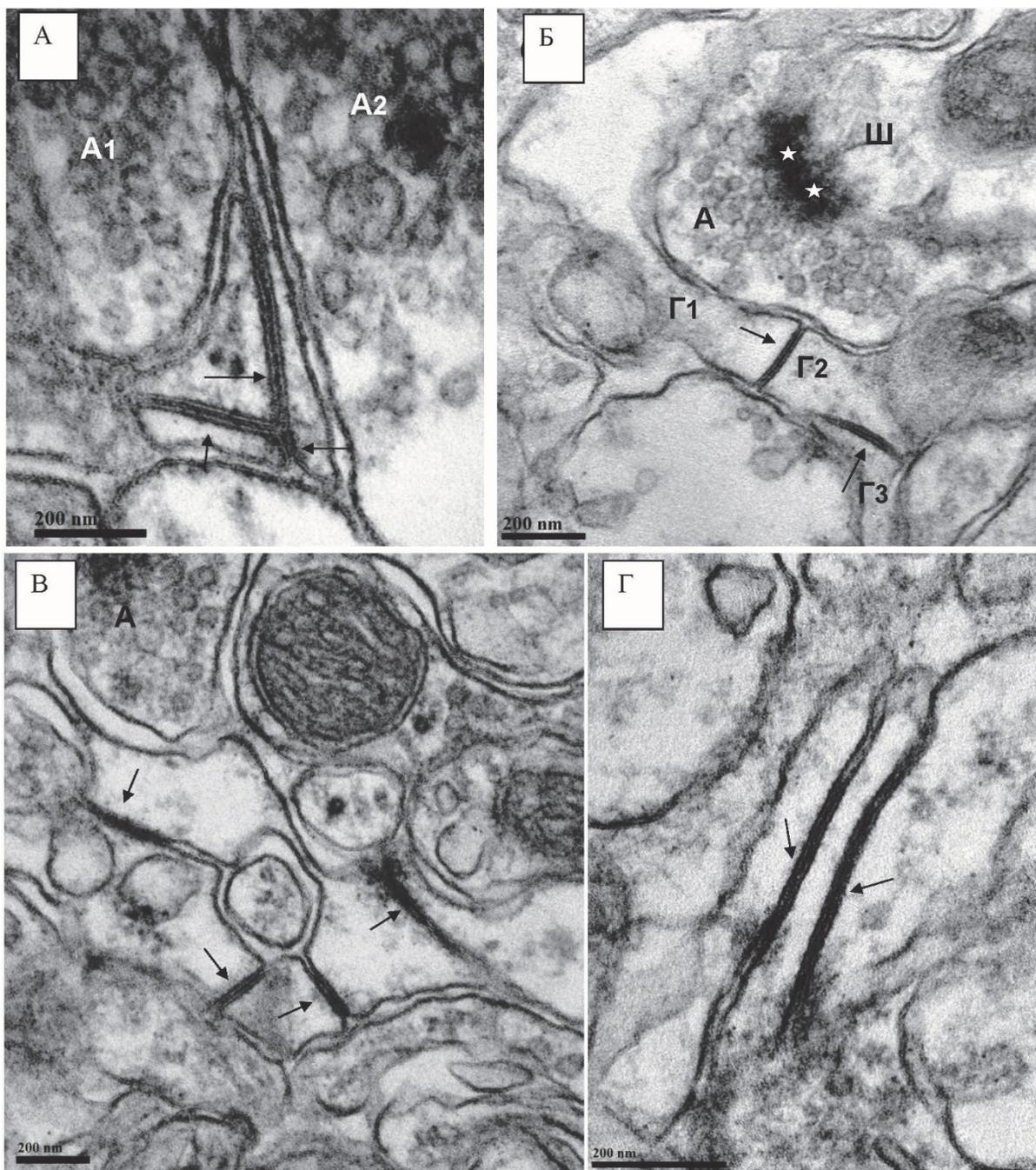


Рисунок 36 – Сети ЩК в VPM ядрах таламуса. А- раздвоенный ЩК (зоны контактов обозначены стрелками), соединяющий три отростка вокруг нескольких аксонов (А1, А2). Б – два ЩК вокруг аксо-шипового синапса, соединяющие глиальные отростки (Г1, Г2, Г3). В – четыре ЩК, соединяющие четыре глиальных отростка в непосредственной близости от аксона. Г – два параллельных ЩК с удлиненными активными зонами. Ширина среднего отростка между ЩК составляет около 50 нм. Условные обозначения: А-аксон, Ш-шипик, Г-глиальная клетка, звездочкой обозначены активные зоны химического синапса, стрелкой обозначены ЩК. А - Ув. 120000, Б – Ув. 60 000, В – Ув. 200 000, Г – Ув. 200 000.

К особенностям ядер таламуса можно отнести наличие ЦК с длинными протяженными бляшками, соединяющими крупные глиальные отростки, в том числе вокруг аксо-шипиковых химических синапсов (рисунок 37А, рисунок 37Б). Удлиненные ЦК имеют свои ультраструктурные особенности: контакт незначительно изгибается, часть его зоны иногда находится не в плоскости среза (рисунок 37 Б).

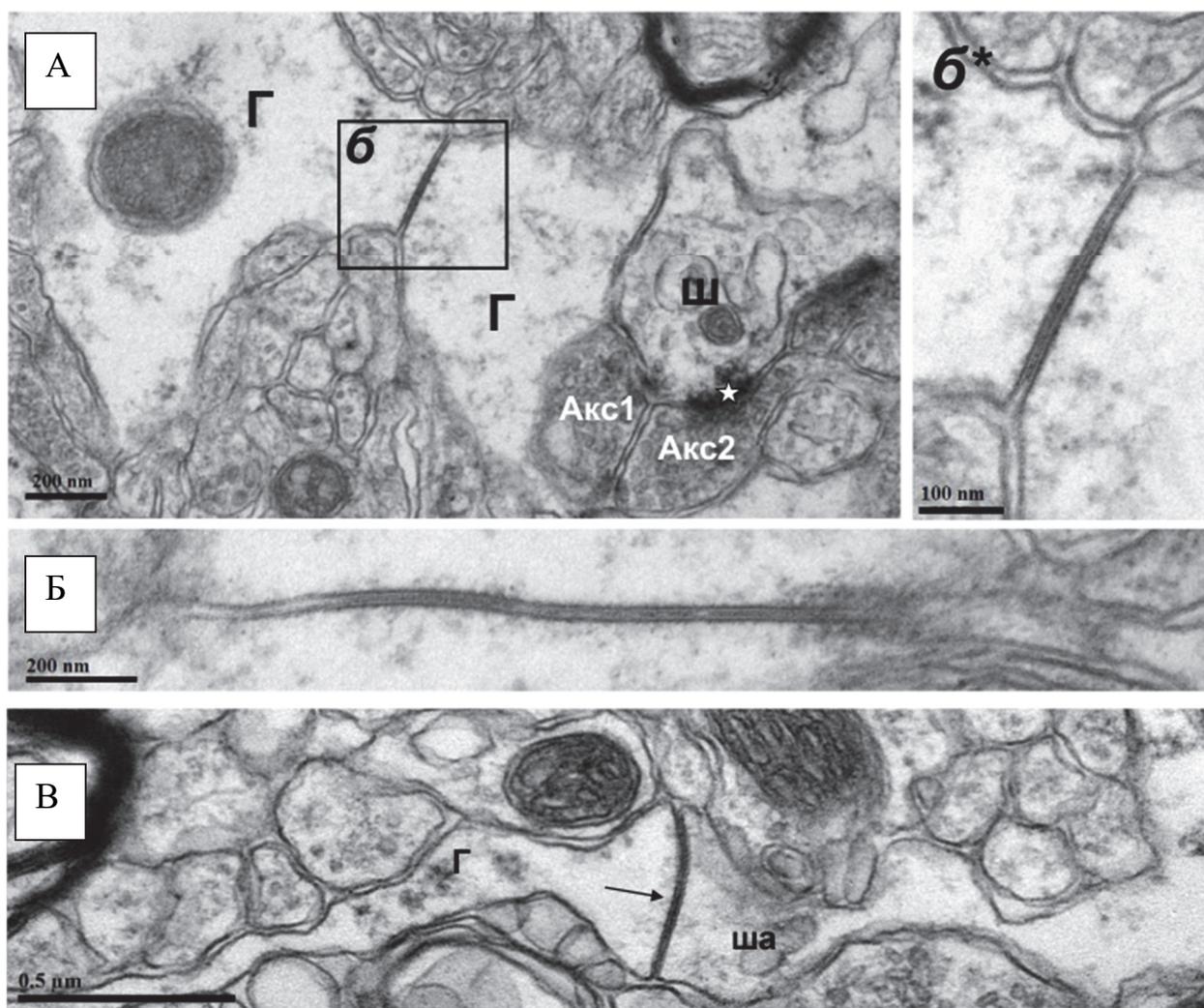


Рисунок 37 – ЦК между крупными отростками. А - ЦК, соединяющий крупные глиальные отростки. б*- увеличенный участок области Б. В - удлиненный и слабо изогнутый ЦК. Г - ЦК между отростком глии и предположительно, шипиком – в этом отростке имеются фрагменты, напоминающие шипиковый аппарат. Условные обозначения: Г- глиальная клетка, ш- шипик, Акс- аксон, ша- шипиковый аппарат.

А- Ув. 26 500, б*- Ув. 60 000, Б- Ув. 60 000, В- Ув. 100 000

Следует отметить, что не все отростки, соединенные ЩК, имеют однозначные ультраструктурные признаки отростков глиальных клеток. В отдельных случаях один из отростков определялся как глиальный, а второй по наличию элементов шипикового аппарата, представленного системой цистерн и единичных пузырьков, скорее можно было отнести к нейрональному (рисунок 37В). В этом случае для точной идентификации типа ЩК требуется иммуноэлектронномикроскопическое исследование с применением антител против астроглиального коннексина 43. Результаты этих исследований будут описаны в дальнейших разделах настоящей главы.

2.2.3.3. Особенности локализации коннексина 43, меченного коллоидным золотом в структурах коры и таламуса крыс

Имуноэлектронномикроскопическое исследование локализации коннексина 43 проведено двумя методами: методом Post-embedding с использованием коллоидного золота в качестве метки для визуализации и пероксидазным. Для Post-embedding приготовленные обычным путем ультратонкие срезы монтировались на никелевые сетки, которые далее последовательно переносили из одной капли инкубирующего раствора в другую срезом вниз при помощи пинцета. Также как и для светооптической иммуногистохимии, процесс электронной иммуногистохимии состоял из этапов демаскировки антигенной активности, промывки, блокировки неспецифического связывания вторичных антител, инкубации в первичных и вторичных антителах. В качестве первичного использовалось такое же антитело к коннексину 43, с которым проводили иммуногистохимическую реакцию на светооптическом уровне. Используемые вторичные антитела были специфически связаны с частицами коллоидного золота, размером 10 нм, которое выступало в качестве метки исследуемого белка при электронномикроскопическом исследовании.

Проведение иммуногистохимии методом Post-embedding в коре и таламусе показало, что частицы коллоидного золота локализуются не только в щелевых контактах, но и на мембранах отростков, не имеющих ультраструктурных признаков ЩК. По нашему мнению, это свидетельствует о наличии в

непосредственной близости не попавших в плоскость среза щелевых контактов. Второй вероятной причиной преципитации золотой метки на мембранах может быть наличие в этом месте полуканалов, содержащих данный коннексин, которые не выявляются при визуальном электронномикроскопическом исследовании и требуют применения иммуногистохимии (рисунок 38).

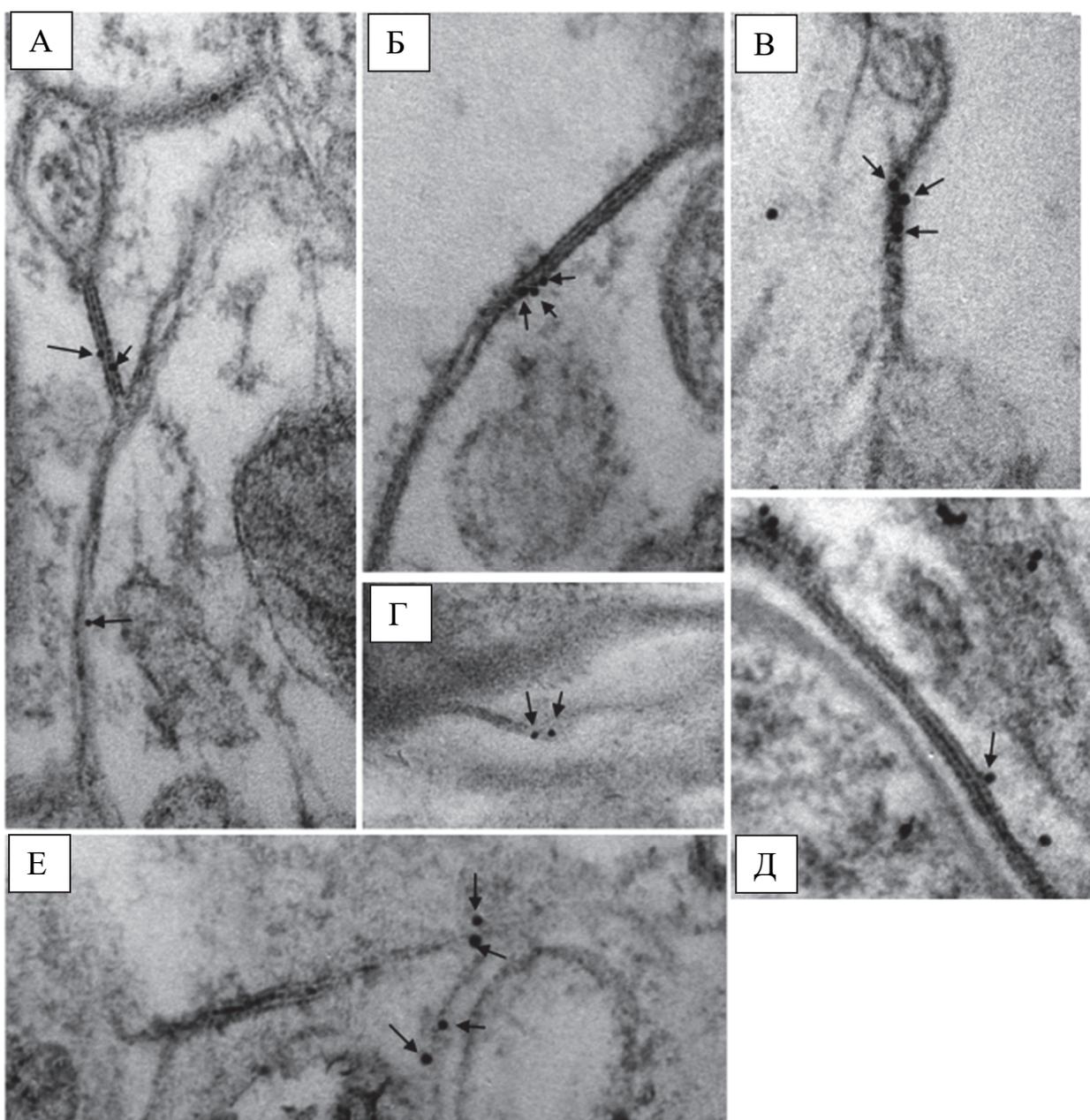


Рисунок 38 – А, Б, В, Г, Д, Е – Электронная иммуногистохимия с использованием антитела к коннексину 43 и меткой коллоидным золотом в ядрах таламуса. Частицы коллоидного золота (стрелки) локализованы в щелевых контактах, а также на мембранах без признаков щелевых контактов. Увеличение всех электроннограмм 300 000.

Количество меток в щелевых контактах колебалось от 2-х до 4-х, они в основном располагаются на внутриклеточной стороне контакта. Отдельные частицы золота выявляются внутри отростка без связи с самим контактом, что, по нашему мнению, может быть обусловлено миграцией белка коннексина к мембране. Некоторые метки были локализованы в отростке, биполярно формирующем щелевые контакты, в которых отсутствовали частицы золота (рисунок 39).

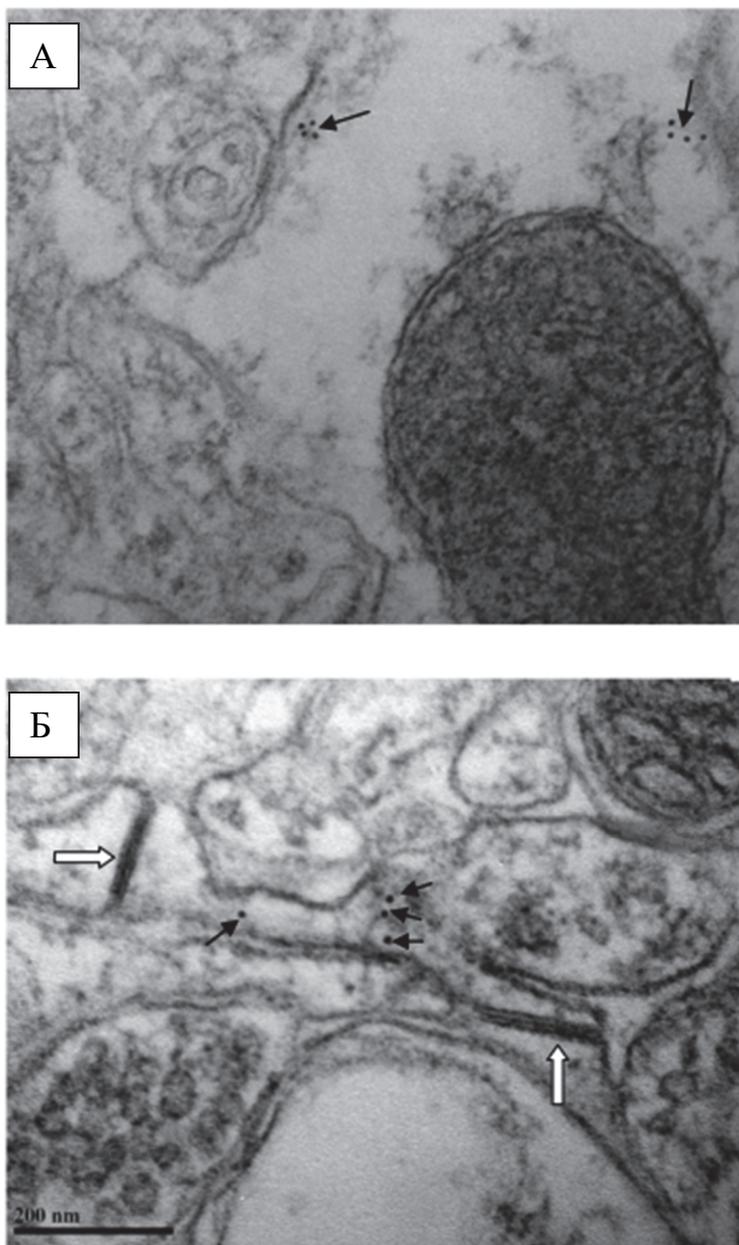


Рисунок 39 – Электронная иммуногистохимия с использованием антитела к коннексину 43 в отростках глиальных клеток. А – группы частиц коллоидного золота (стрелки) в отростках глиальных клеток. Б - локализация частиц коллоидного золота (стрелки) в отростке астроцита, формирующего два щелевых контакта (белые стрелки).
А - Ув. 200 000, Б - Ув. 200 000

В целом, проведенное исследование свидетельствует об эффективности используемого метода в контексте изучения точного расположения белков-коннексинов на мембранах и во внутриклеточных структурах.

Не менее информативным на наш взгляд в контексте иммуногистохимического исследования астроглиального коннексина на ультраструктурном уровне оказался метод pre-embedding (перед заливкой). Результаты этих исследований будут изложены далее.

2.2.3.4. Иммуноэлектронномикроскопическое исследование распределения коннексина 43, меченного пероксидазой в структурах коры и таламуса крыс

Метод pre-embedding (перед заливкой) основан на том, что инкубация срезов с первичными и вторичными антителами, а также выявление иммунных комплексов проходит до проводки и заливки срезов в эпоксидную смолу для электронной микроскопии. После проведения транскардиальной перфузии изготавливали 60 мкм срезы, содержащие исследуемые структуры (соматосенсорная кора S1 и ядра таламуса). В качестве демаскировки антигенной активности использовали мгновенную заморозку срезов над парами жидкого азота и оттаивание в фосфатном буфере при комнатной температуре. Далее срезы инкубировали в первичных (против коннексина 43) и вторичных антителах, выявление иммунных комплексов проводили с использованием системы визуализации Dako EnVision System + Peroxidase (DAB). После постановки иммуногистохимических реакций срезы обрабатывались стандартными для электронномикроскопического исследования методами, описанными в главе Материалы и методы исследования.

При иммуноэлектронномикроскопическом исследовании с использованием пероксидазного метода выявлены многочисленные ЩК, содержащие продукт реакции в нексусах. Положительная реакция также имеется в отростках астроцитов, между которыми сформирован контакт. При использовании этого метода ЩК легко идентифицировать, даже если сама зона контакта не попала в плоскость среза. В ЩК наибольшее количество электронноплотного продукта реакции расположено с цитоплазматической стороны контактирую-

щих мембран. Некоторое количество плотного материала также выпадает и в щели контакта, что не позволяет отчетливо визуализировать поперечные тяжи и саму электроннопрозрачную щель даже при больших увеличениях. Однако, поскольку сами «опушенные» контактирующие мембраны продуктов реакции не содержат, наблюдается контрастное чередование электронноплотных и прозрачных слоев. Благодаря этому достаточно отчетливо выявляется характерная структура ЩК даже после проведения иммуногистохимии. При этом структура ЩК из 7-слойной (без применения иммуногистохимии) выглядит 5-слойной. В таламических ядрах нами было отмечено, что ЩК, содержащие коннексин 43 имеют различную протяженность. Кроме того, в таламических ядрах обнаружены небольшие рядом расположенные ЩК, бляшки которых формируют как бы изгиб и поворот на другой глиальный отросток (рисунок 40).

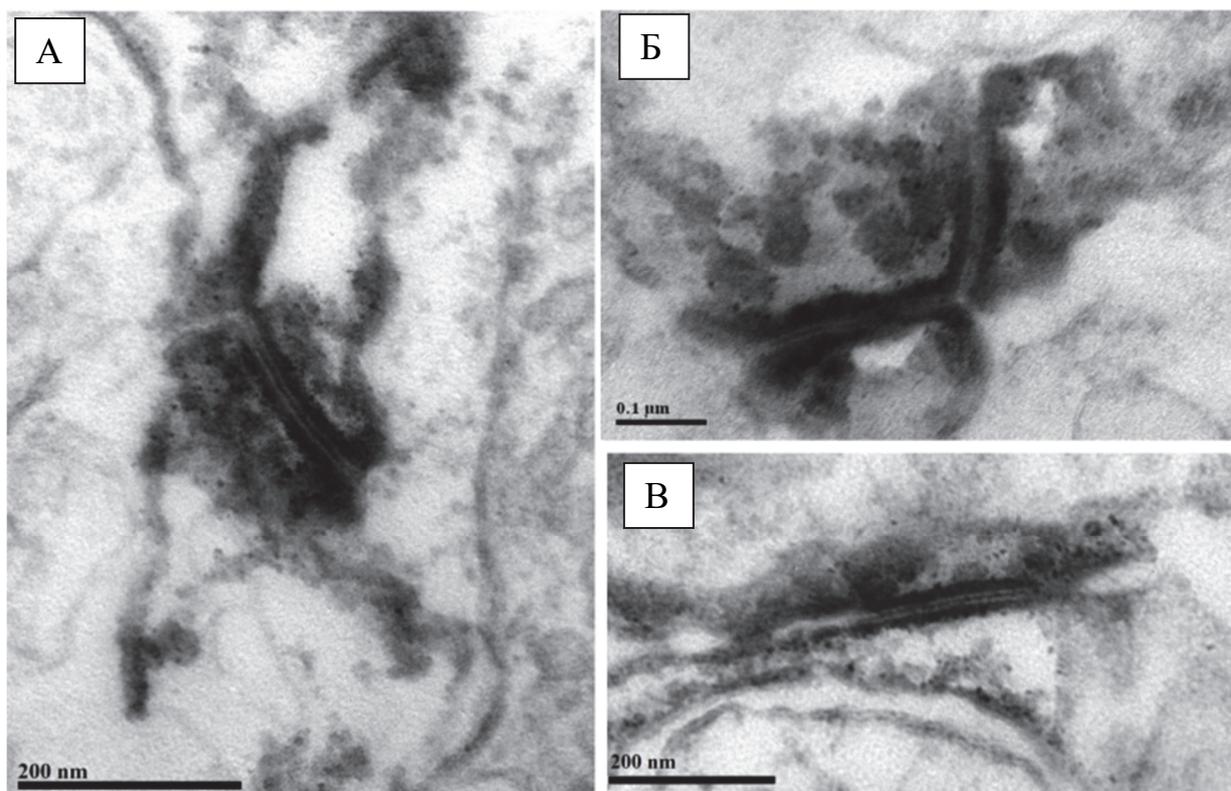


Рисунок 40 – Ультраструктура ЩК после проведения иммуногистохимии с антителами к коннексину 43 и DAB реакции. Электронноплотный продукт реакции локализован вокруг активных зон контакта и в контактирующих отростках. А – одиночный ЩК. Б – двойной ЩК. В- одиночный ЩК. А- Ув. 250 000, Б- Ув. 200 000, В – Ув. 200 000

Обнаруженные астроглиальные (коннексин 43+) ЩК расположены как стороны аксонов, которые идентифицировали по наличию округлых синаптических везикул, так и со стороны постсинаптической части химического синапса - шипиков или дендритов (рисунок 41).

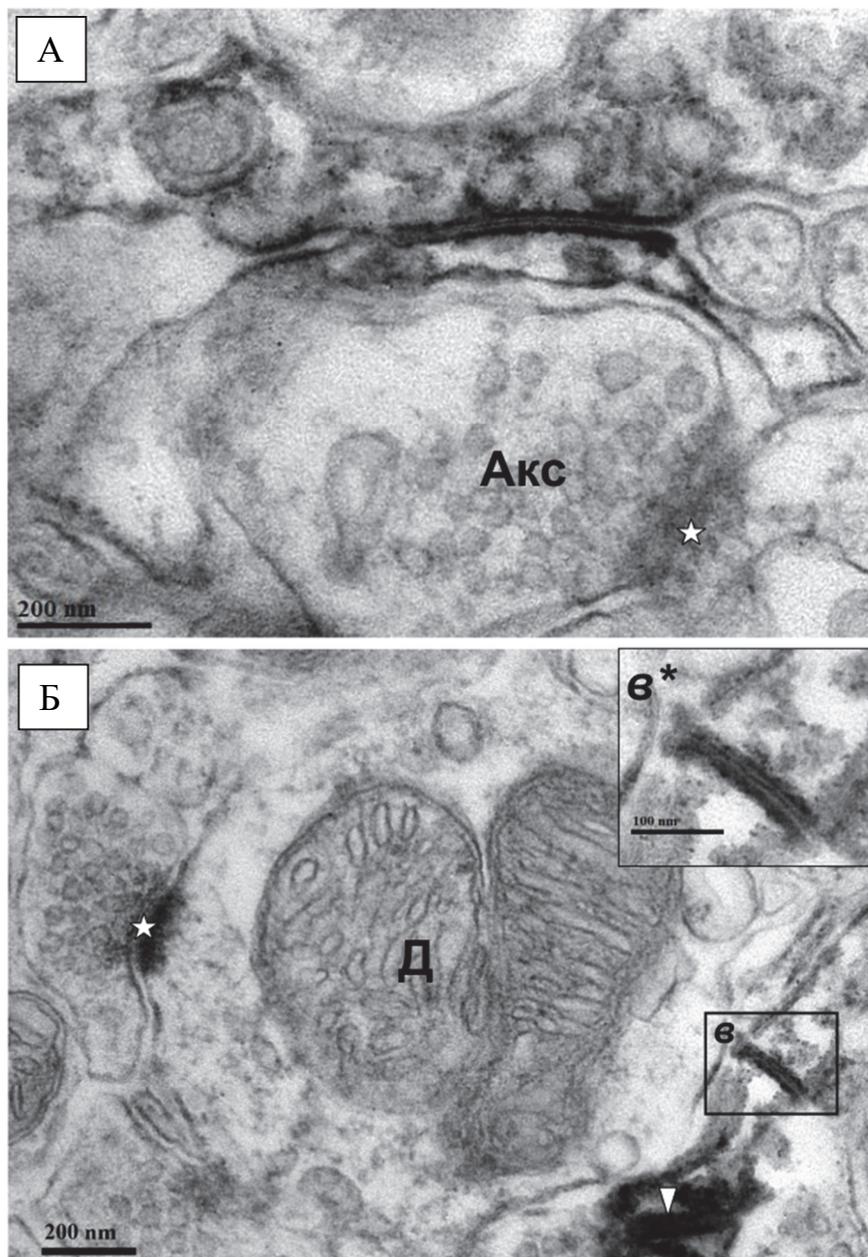


Рисунок 41 - Астроглиальные ЩК, содержащие коннексин 43 вокруг химических синапсов. А - ЩК со стороны пресинаптической части (аксона) химического синапса. Б - два ЩК со стороны дендрита, один из которых располагается вне плоскости среза. в* - увеличенный участок фрагмента в. Условные обозначения: Акс-аксон, Д- дендрит, звездочкой обозначены активные зоны химических синапсов, белой стрелкой обозначен ЩК вне плоскости среза. А – Ув. 200 000, Б – Ув. 120 000, в* - Ув. 200 000.

Нередко в одном поле зрения располагались два ЩК с обеих сторон от аксо-дендритического или аксо-шипикового синапса - со стороны аксона и со стороны дендрита или шипика. Такая картина была наиболее характерной для ядра VPM таламуса (рисунок 42А). Кроме того, во всех исследуемых ядрах нами выявлены ЩК вокруг перфорированных ассиметричных химических синапсов с несколькими активными зонами. Последние, как известно, вовлечены в процессы синаптической пластичности и долговременной потенциации (рисунок 42А,Б). Необходимо отметить, что ультраструктурное исследование образцов, полученных как с использованием иммуногистохимии, также как и без применения этого метода, позволяет не только выявить ЩК, но и установить особенности пространственного расположения отростков астроцитов вокруг химических синапсов. В большинстве случаев отростки астроглии плотно примыкают к аксо-шипиковому синапсу, окружая аксоны, шипики и активные зоны химических синапсов, создавая подобие некой изолирующей оболочки или псевдокапсулы вокруг химического контакта.

Таким образом, весьма удачным для визуализации астроглиальных ЩК, содержащих коннексин 43 является использование протокола иммуномечения pre-embedding с системой детекции Dako EnVision System + Peroxidase (DAB). В ряде работ авторы отмечают, что после применения 3,3'-диаминобензидина невозможно визуализировать типичную ультраструктуру ЩК при высоком разрешении, поскольку DAB нарушает структуру контактирующих мембран (Genoud C., et. al., 2015). Проведенное нами ультраструктурное исследование таламических ядер показало, что особых трудностей в идентификации характерной структуры астроглиальных ЩК после иммуногистохимии не возникает. Следует учитывать, что ЩК после проведенной иммуногистохимической реакции имеют 5-слойную структуру, которая является за счет отсутствия хромогена на контактирующих мембранах. Межмембранное пространство шириной 2-4 нм также содержит некоторое количество продукта реакции, однако основная его часть локализована с цитоплазматической стороны мембран, что соответствует расположению основной массы антигенов коннексина 43 (Yamamoto T. et al., 1990).

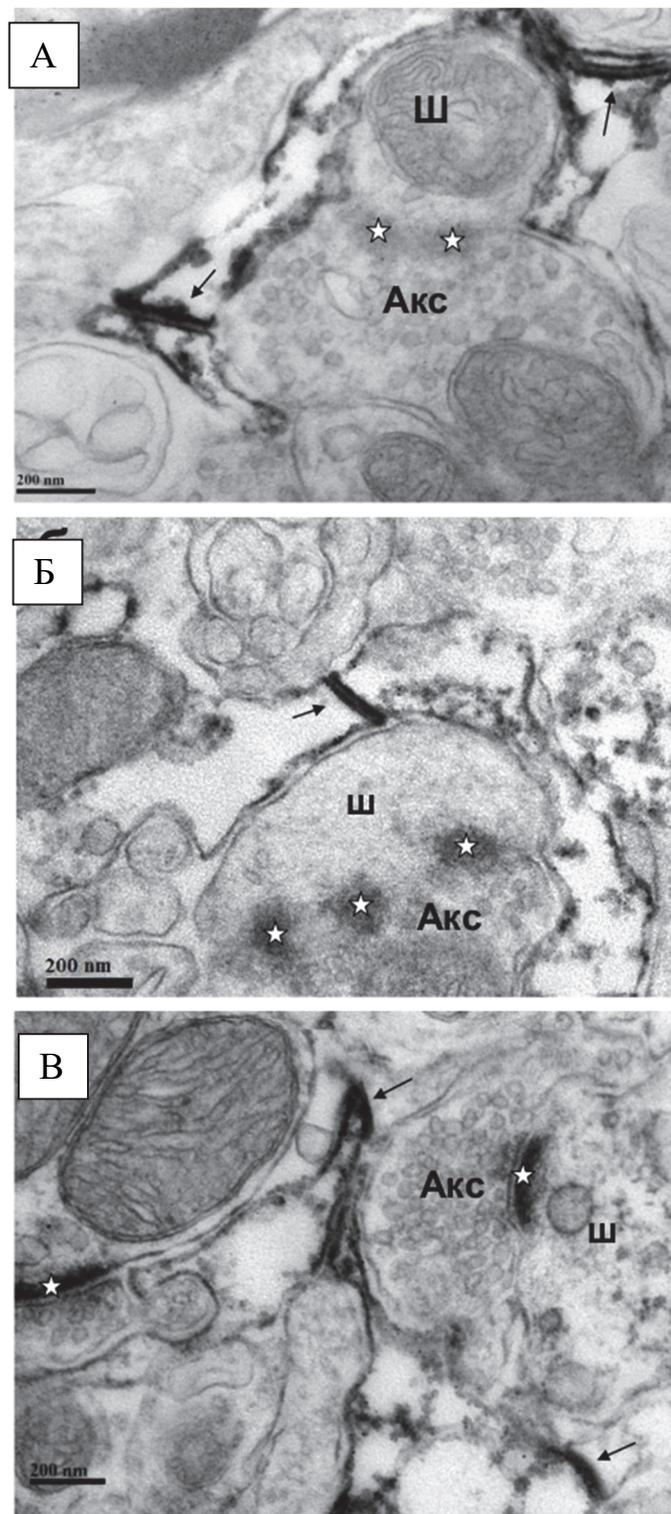


Рисунок 42 – Астроглиальные отростки и их ЩК вокруг аксо-шипиковых химических синапсов. А, Б- псевдо-оболочка из астроглиальных отростков и двойных (А), а также одиночных (Б) ЩК вокруг перфорированных синапсов. В - два ЩК вне плоскости среза между двумя аксо-шипиковыми синапсами. Условные обозначения: Акс-аксон, ш-шипик, звездочками обозначены активные зоны химических синапсов, стрелками обозначены ЩК.

А – Ув. 80 000, Б – Ув. 150 00, В – Ув. 120 000

Помимо самой зоны ЩК, продукты реакции также обнаружены в цитоплазме самих отростков астроцитов, что может отражать миграцию коннексина 43 к мембране посредством, например, промежуточных транспортеров. Необходимость постоянного синтеза, транспортировки и встраивания в мембрану коннексинов продиктована коротким (около 2 часов) периодом жизни этого белка в составе ЩК и полуканалов (Laird D. W. 2005).

Настоящее электронномикроскопическое исследование выявило многочисленные одиночные и близко расположенные ЩК между отростками глиальных клеток в ядрах POM, RTN, а также в зоне формирования барреллоидов - в VPM ядре таламуса. Установлено, что ЩК различной длины и конфигурации могут быть сформированы как крупными, так и мелкими по площади глиальными отростками. Эти данные свидетельствуют в пользу гипотезы о гетерогенности как глиальных клеток, так и ЩК, образующихся между ними (Theis M., Giaume C., 2012.). В ядрах таламуса такая разнородность может быть связана с тем, что в этих структурах преобладают различные по функциям и морфологии нейрональные терминали. Так, ранние электронномикроскопические исследования таламуса продемонстрировали существование как небольших, так и гигантских терминалей-аксонов, способных объединять около 20 химических синапсов. При этом показано, что инкапсуляция гигантских терминалей в глиальные оболочки происходит без исключения. (Hoogland P.V., et.al., 1991). По нашим данным глиальные клетки, окружающие такие большие по площади таламо-кортикальные аксоны с противоположных сторон формируют от одного до нескольких щелевых контактов. Такая система формирования астроглиальной оболочки с локализацией ЩК, обеспечивая свободный межклеточный обмен и динамическое равновесие ионов, в таламических структурах способствует моносинаптической передаче сигнала от подкоркового представительства вибрисс к корковому и обратно.

В проведенных нами ранее ультраструктурных исследованиях, как на одиночных, так и на серийных ультратонких срезах было показано, что в

баррельной коре крыс ЩК формируются в микроокружении асимметричных химических синапсов, находятся в тесной связи и даже контактируют с ними. В пользу скооперированной деятельности этих двух контактов свидетельствовало то, что среднее расстояние между одним и другим ЩК, как и расстояние между одним и другим химическим синапсом было в два-три раза больше, чем расстояние между ЩК и химическим синапсом (Kirichenko E. Yu. et al., 2013). Настоящие исследования, расширяют представления о локализации ЩК в мозге и демонстрируют близкую пространственную локализацию астроглиальных ЩК и активных зон химических аксо-шипиновых или аксо-дендритических синапсов в специфических ядрах POM, VPM и в неспецифическом ядре RTN таламуса. Подобная близость поднимает вопрос функционирования астроглиальных ЩК в этих ядрах таламуса, являющихся центром таламо-кортикальных и кортико-таламические связей. Для специфических VPM и POM ядер таламуса ЩК, близко располагаясь к химическим синапсам, могут облегчать первичную обработку афферентной импульсации непосредственно от внеталамических источников и ее передачу в проекционные слои коры больших полушарий. Участие ЩК выражается в обеспечении ионного, энергетического гомеостаза, а также в регуляции нейротрансмиттерного, в частности, глутаматного обмена между астроцитами и нейронами (Giaume C., et al., 1997; Pellerin L., Magistretti P.J., 2012.). В то время как астроциты через энергозависимые каналы способны усилить нейротрансмиссию путем выделения собственного глутамата, или ослабить передачу путем его поглощения, ЩК способствуют перераспределению нейротрансмиттера внутри астроглиальных отростков благодаря высокой проницаемости и быстрому обмену (Blomstrand F., Giaume C., 2006.; Rouach N., et al., 2008).

Неспецифическое RTN ядро, располагающееся в виде вытянутого скопления ГАМК-ергических нейронов между наружной медулярной пластинкой и внутренней капсулой таламуса, является центром ингибирования нейронов IV и VI слоев коры мозга, внутриталамического (между ядрами VPM, VPL), а также латерального торможения (Lam Y.W., Sherman S.M.,

2015). Астроглиальные ЩК, содействующие этим функциям, могут играть критическую роль в глутаминовом цикле, обеспечивая миграцию глутаматных транспортеров и в регуляцию работы ГАМК-ергических синапсов. Например, после высвобождения ГАМК из пресинаптической терминали, часть молекул нейромедиатора удаляется из межклеточного пространства путем обратного захвата астроцитами. Астроцитарные ЩК способствуют перераспределению ГАМК внутри глиальных клеток, а после того как ГАМК метаболизируется в глутамат и глутамин, эти контакты способствуют миграции глутамина обратно в пресинаптическую терминаль ГАМК-ергического нейрона, где он снова декарбоксилируется до ГАМК (Shigeri Y. et al., 2004).

Полученные данные о существовании нескольких, близко расположенных ЩК, объединяющих три отростка, а также наличии нескольких (до 4-х) очень близко расположенных ЩК, по нашему мнению, свидетельствуют в пользу гипотезы о существовании локальных панглиальных сетей. Возможность существования таких сетей на основе глиальных ЩК показана всего в нескольких работах (Pannasch U., Rouach N., 2013; Griemsmann S., et.al., 2015; Tress O., et.al. 2012; Nualart-Marti A. et.al., 2013). По существующим сведениям такие функциональные сети могут образовываться только между олигодендроцитами и астроцитами и называются панглиальные сети или *gap junction-mediated glial networks*. Сети глиальных ЩК могут быть интегрированы в процессы развития и функционирования миелина (Tress O., et. al. 2012), восстановления потенциала покоя на мембране аксонов путем перераспределения ионов калия (Nualart-Marti A. et.al., 2012), осуществления межклеточного обмена и перераспределения нейроактивных субстанций (Pannasch U., Rouach N. , 2013). Следует отметить, что в таламусе такие сети глиальных клеток, объединенных ЩК, нами были выявлены в основном в области формирования цитоархитектонических группировок «баррелоидов» - в ядре VPM и прилегающем к нему ядре VPL. Объединяясь в сети посредством ЩК глиоциты, по нашему мнению, имеют определяющее значение для циркуляции информации и могут обеспечивать модуляцию функционирова-

ния больших нейронных ансамблей. Безусловно, дальнейшие электрофизиологические эксперименты будут способствовать пониманию физиологической роли панглиальных связей в таламусе.

Непосредственное участие глиальных ЩК в пластических перестройках нейронных сетей в VPM, POM, RTN ядрах таламуса можно рассмотреть на примере обеспечения динамического равновесия ионов калия. Неравномерная активность внутри нейронных сетей сопровождается активацией потенциал-зависимых калиевых каналов в локусах повышенного возбуждения, которые обеспечивают выход ионов калия в межклеточное пространство и реполяризацию мембраны (Pannasch U., Rouach N. , 2013). ЩК, способствуя приобретению астроглией функции пространственного буфера, задействованы в устранении дисбаланса в пространственном распределении ионов калия (Yamamoto T., 1990). Из глиальной клетки, расположенной в локусе повышенной концентрации, калий переходит в область пониженной концентрации и через ЩК в другие клетки сателлитной глии. Далее ионы калия перемещаются в цитоплазме глиальных клеток, высвобождаясь в местах, противоположных от области вхождения – в концевых отростках астроцитов, вызывая местное расширение сосудов (Dunn K.M., Nelson M.T. 2010.). Помимо ионов калия, ЩК устанавливают буферизацию и перераспределение ионов H^+ , Na^+ , Ca^{2+} и др., что, наравне с нейротрансмиттерным гомеостазом является основой генерации локального автономного пейсмекерного ритмогенеза в подкорковых таламических ансамблях мозга, а также дальнейшего развития ритмичной активности в этих структурах. При этом по существующим данным, синхронизацию локальной подпороговой (до генерации импульсов) активности нейронов в пределах одного нейронного ансамбля могут обеспечивать нейрональные ЩК или электрические синапсы, содержащие коннексин 36 (Dere E., Zlomuzica A. 2012.). Межклеточные взаимодействия, осуществляемые астроглиальными ЩК, ограничивают возбудимость нейронов и способствуют образованию «молчащих» синапсов в ядрах таламуса. Формирование «молчащих» синапсов связано с синаптической пластичностью, по-

сколькx переход функционально активных синапсов в «молчашие» значительно сдвигает подпороговый баланс между долговременной потенциацией и долговременной депрессией в сторону синаптической потенции. В отсутствие этого механизма регуляции несбалансированные тормозные и возбуждающие сигналы вместе с повышенной нейрональной активностью могут являться основной причиной развития патологической активности, характерной, например, для эпилепсии (Pannasch U., Rouach N. 2013).

По нашему мнению, локализованные вокруг химических синапсов сети отростков астроцитов, объединенных ЩК являются модуляторной основой индивидуального локального пейсмерного ритмогенеза в нейронных ансамблях ядер VPM и POM таламуса, а также облегчают реализацию тормозной функции ядра RTN. Очевидно, что для обеспечения функционирования изученных таламических ядер существенным является удлиненность выявленных контактов, способствующая передаче большого объема информации между астроцитами, окружающими химические синапсы.

Проанализировав глиальные щелевые контакты в нейропиле коры и таламуса, в том числе с применением электронной иммуногистохимии на следующем этапе мы изучили астроглиальные щелевые контакты в составе элементов нейро-глио-сосудистых ансамблей. Данное комплексное морфологическое исследование щелевых контактов проведено на соматической баррельной коре крыс в зоне проекции вибрисс, что продиктовано актуальностью проблемы взаимоотношений внутри комплекса нейрон - глиальная клетка - сосудистый элемент, в контексте изучения морфо-функциональных особенностей кортикальных колонок.

2.2.3.5. Особенности локализации щелевых контактов нейро-глио-сосудистых комплексах

По материалам этого раздела была опубликована статья «Щелевые контакты в составе нейро-глио-сосудистых ансамблей в колонках баррельной ко-

ры крыс» в журнале «Цитология», Т. 60, №6, в 2018 году авторами Кириченко Е.Ю., Повилайтите П.Е., Логвинов А. К., Кириченко Ю.Г., Филиппова С.Ю.

Как было продемонстрировано нами ранее в главе 2.2.1.1. на рисунке 14 иммуногистохимическое исследование позволяет наиболее четко визуализировать НГСА в коре головного мозга на светооптическом уровне благодаря специфической экспрессии GFAP в клетках астроглии. Более детально строение гемато-энцефалического барьера на уровне микрокапилляра возможно проанализировать при электронномикроскопическом исследовании препаратов, обработанных антителами против GFAP. На электроннограммах четко визуализируются веретеновидные эндотелиальные клетки, перициты, расположенные в дупликатурах базальной мембраны, а также терминальные расширения отростков астроцитов вокруг капилляра, содержащие плотные гранулы хромогена (рисунок 43). Базальная мембрана, отделяющая эндотелиоцит и перицит от астроцита, не содержит продукты реакции.

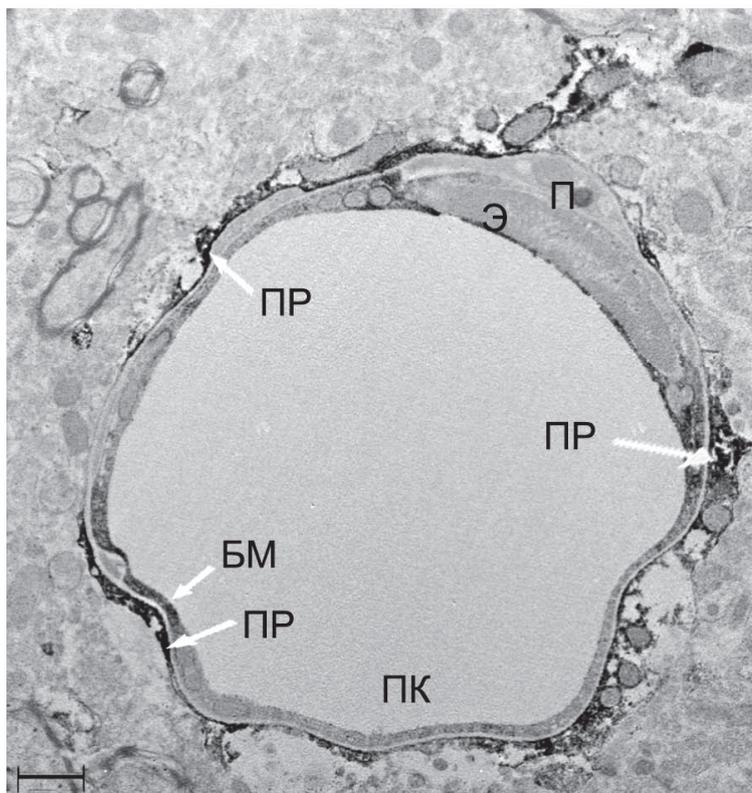


Рисунок 43 – Ультраструктурная организация нейро-глио-сосудистого комплекса и ГЭБ баррельной коры крыс: эндотелиальные клетки, базальная мембрана, перициты и сосудистые отростки астроцитов, содержащие продукт реакции. Условные обозначения: ПК – просвет капилляра, ПР-продукты реакции, БМ – базальная мембрана, П – перицит, Э – эндотелиоцит. Ув. 4200, масштабный отрезок 1000 нм

Детальное ультраструктурное исследование показало, что межastroцитарные щелевые контакты являются еще одним компонентом ГЭБ наряду с эндотелиоцитами, базальной мембраной, перицитами и астроцитами. Типичные щелевые контакты в значительном количестве встречаются в непосредственной близости от стенки микрокапилляров между отростками астроцитов, содержащими хромоген. На рисунке 44А представлен такой щелевой контакт, локализованный между отростками астроцитов, которые содержат продукт иммуногистохимической реакции с антителом к GFAP. Рядом со щелевым контактом визуализируются просвет капилляра, часть перицита и базальная мембрана, прилегающая к астроциту.

Ультраструктура выявленных после иммуногистохимии межastroцитарных щелевых контактов идентична таковой на препаратах, которые не подвергались предварительной иммуногистохимической обработке (рисунок 44Б). Особенностью тонкого строения периваскулярных щелевых контактов является то, что они, как правило, довольно протяженные, а сам контакт нередко прерывистый, пунктирный и сходен с таковым у перфорированных химических синапсов (рисунок 44В). Отростки астроцитов, формирующие контакт, нередко лежат «внахлест», образуя многослойную муфту вокруг сосуда. Также обращает внимание наличие симметричного осмиофильного опушения обеих мембран, формирующих контакт, в зоне нексуса (рисунок 44Г). По нашим данным, нексусы таких соединений характеризуются не только более протяженной обильно опушенной зоной контакта, но нередко имеют специфическую изогнутую форму, что отличает их от прямых щелевых контактов, расположенных на удалении от капилляров.

Электронномикроскопическое исследование ультратонких срезов, полученных после иммуногистохимических реакций с антителами к коннексинам показало, что как коннексин 30 (Cx30), так и коннексин 43 (Cx43) присутствуют в зоне щелевых контактов, соединяющих периваскулярные отростки астроцитов в колонках соматической коры крыс. В частности, Cx30 обнаруживается в цитоплазме отростков астроцитов, окружающих капилляры (рису-

нок 45А). При больших увеличениях выявляется обильное выпадение продукта реакции в зоне некуса щелевых контактов (рисунок 45Б,В). При этом эндотелиоциты, перициты, базальная мембрана и окружающий нейропилъ Sx30 не содержат, что свидетельствует о специфичности данного белка для астроцитов.

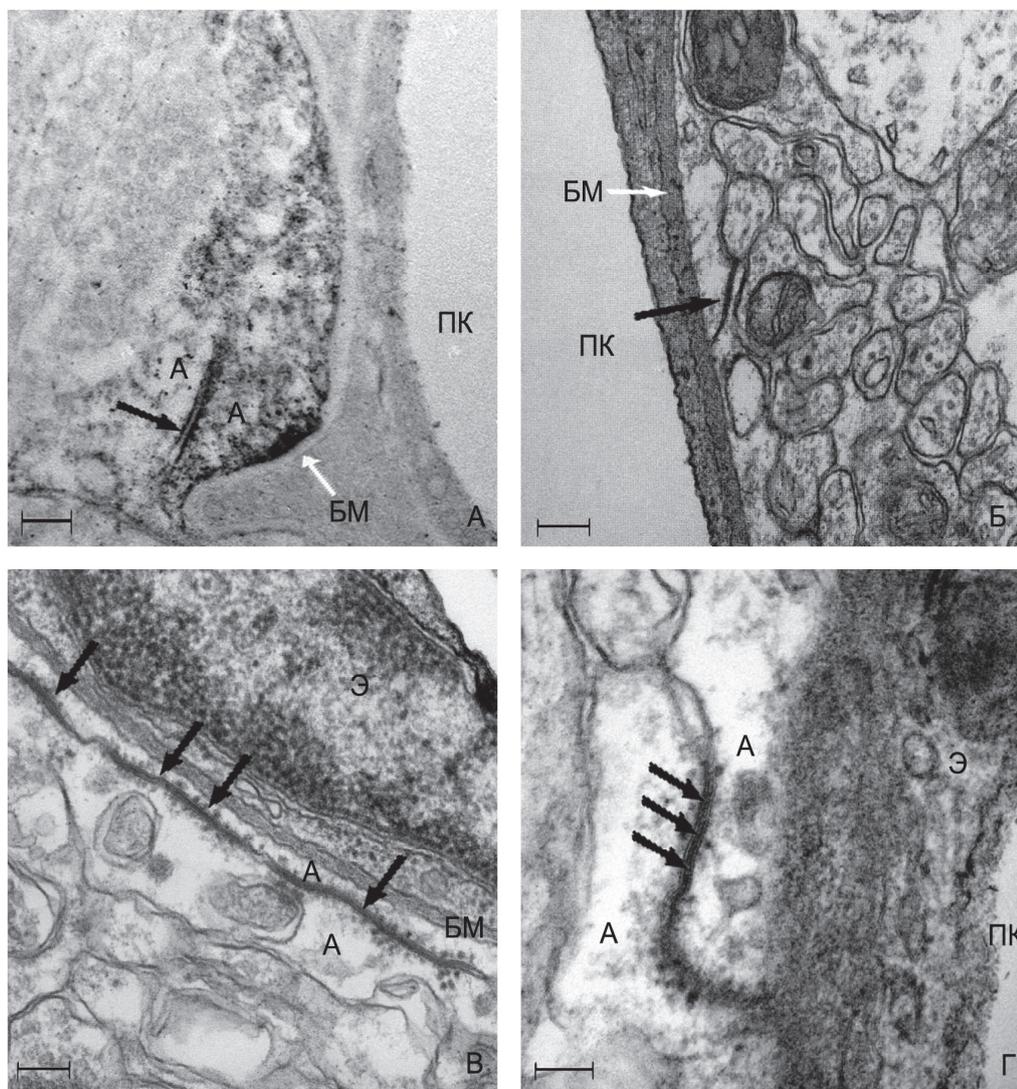


Рисунок 44 - Ультраструктура щелевых контактов (стрелки) сосудистых отростков астроцитов. А - щелевой контакт между отростками астроцитов, продукт реакции в виде электронноплотных зерен (ИГХ – выявление GFAP). Б - щелевой контакт между тонкими астроцитарными отростками без проведения ИГХ. В - прерывистые некусы щелевых контактов между сосудистыми отростками астроцитов вдоль базальной мембраны капилляра. Г - изогнутый щелевой контакт двух астроцитарных отростков, некус щелевого контакта только частично находится в плоскости среза за счет своей конфигурации. Условные обозначения: А-астроцит, остальные те же, что и на рисунке 43. А – Ув. 20 000, масштабный отрезок 400 нм., Б – Ув. 150 000, масштабный отрезок 200 нм, В – Ув. 150 000, масштабный отрезок 200 нм, Г – Ув. 150 000, масштабный отрезок 200 нм

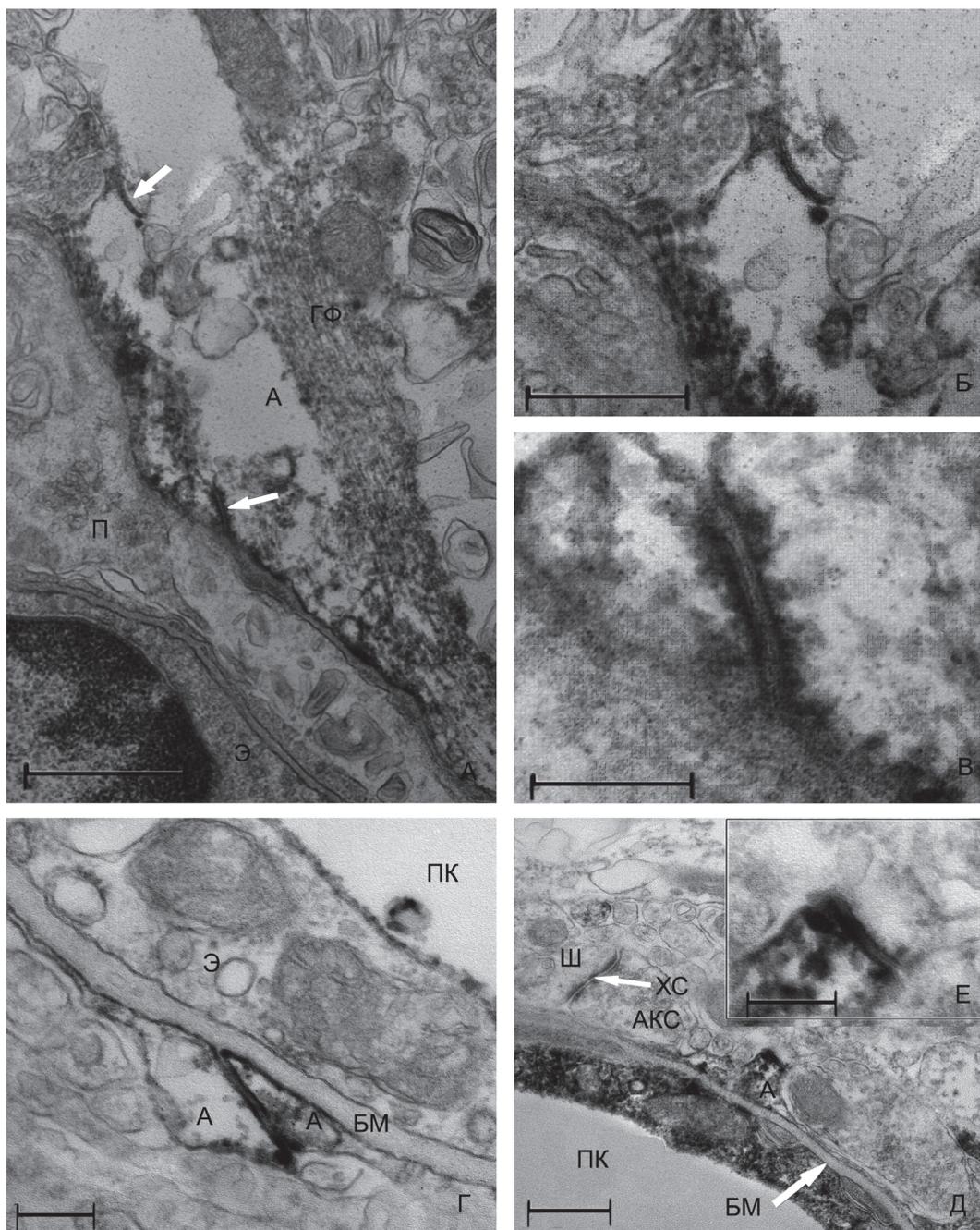


Рисунок 45 - Выявление белков-коннексинов с помощью электронной иммуногистохимии (А-В - коннексин 30, Г-Е – коннексин 43). А – отростки астроцитов, формирующие 2 щелевых контакта и содержащих коннексин 30. Б - увеличенный фрагмент рисунка А, демонстрирующий ультраструктуру одного из щелевых контактов. В - увеличенный фрагмент рисунка А, демонстрирующий ультраструктуру второго щелевого контакта. Г – щелевой контакт между отростками астроцитов, содержащими коннексин 43. Д – щелевой контакт между 2 отростками, только один содержит коннексин 43. Е - увеличенный фрагмент рисунка Д, демонстрирующий ультраструктуру гетеротипического щелевого контакта. Условные обозначения: ГФ - глиофибриллы, ХС - химический синапс, АКС - аксон, Ш – шипик, остальные обозначения те же. А- Ув. 50 000, масштабный отрезок 1000 нм, Б- Ув. 150 000, масштабный отрезок 300 нм, В - Ув. 200 000, масштабный отрезок 250 нм, Г-Ув. 200 000, масштабный отрезок 200 нм, Ув. 80 000, масштабный отрезок 500 нм, Е -Ув. 300 000, масштабный отрезок 175 нм.

При электронномикроскопическом исследовании после проведения реакции с антителами к Сх43 продукты реакции также были локализованы исключительно в тонких веточках астроцитов вокруг сосудов (рисунок 45Г). При этом наибольшая интенсивность реакции наблюдалась с цитоплазматической стороны мембран, соединенных щелевым контактом. Благодаря отсутствию продуктов реакции в самих контактирующих мембранах, ультраструктура ЩК четко определяется даже после проведения иммуногистохимической реакции (рисунок 45Д).

Следует отметить, что в некоторых типичных по ультраструктуре ЩК продукты реакции на Сх43 были локализованы лишь в одном из контактирующих отростков. Вероятно, такие асимметричные контакты могут быть образованы двумя различными типами отростков, один из которых содержит Сх43, а другой - коннексоны, состоящие из коннексина другого типа, то есть, являются гетеротипическими (рисунок 45Д).

В ряде работ было показано, что астроцитарные коннексины играют важную роль в нормальном функционировании мозга. В частности, при одновременной блокаде выработки Сх43 и Сх30 у подопытных животных наблюдались значимые изменения в обмене метаболитов в нервной ткани (Rouach N. et al, 2008), существенные нарушения глио- и нейрогенеза (Kunze A. et al., 2009), демиелинизация и вакуолизация белого вещества (Lutz, S. E. et al., 2009), а также угнетение синаптической передачи в гиппокампе (Pannasch U., Rouach N. 2013). В перечисленных исследованиях в качестве причины наблюдаемых нарушений обсуждается блокирование обмена метаболитами и сигнальными молекулами между астроцитами, которые в отсутствие коннексинов не формируют связанный ЩК единый синцитий. Однако возможные изменения глио-васкулярных отношений в этих моделях не рассматривалось. Полученные нами результаты свидетельствуют, что коннексины участвуют также и в регуляции транспорта различных веществ из сосудистого русла к нейронам и наоборот. По крайней мере два белка – Сх30 и Сх43 - образуют многочисленные ЩК между сосудистыми ножками астроцитов,

следовательно, нарушение экспрессии этих коннексинов должно также драматически отразиться и на функционировании ГЭБ. Вопрос о том, какие именно изменения происходят и как это отражается на работе мозга пока остаётся открытым.

Результаты нашего иммуноэлектронного исследования показали, что в периваскулярных зонах астроциты формируют и гетеротипические ЩК, образованные на стороне астроцита Cx43 и, по-видимому, каким-то другим коннексином со стороны второй контактирующей клетки. В настоящей работе с помощью ультраструктурного исследования невозможно достоверно установить, к какому типу глиоцитов относится вторая клетка. Однако не исключено, что это олигодендроцит, так как, согласно литературным данным, полученным *in vitro*, формирование гетеротипических контактов типа Cx30/Cx43 между астроцитами маловероятно (Orthmann-Murphy J. L. et al., 2007), а другие варианты сочетания можно считать несущественными ввиду очень слабой экспрессии других типов коннексинов в астроцитах. Наоборот, в смешанной культуре клеток, экспрессирующих различные типы коннексинов, сочетания Cx43 и Cx30 с олигодендроцитарными коннексинами Cx47 и Cx32, соответственно, появляются достоверно чаще других сочетаний и формируют при этом функциональные ЩК в отличие от других гетеротипических пар (Orthmann-Murphy J. L. et al., 2007). С другой стороны, в экспериментах с одновременной детекцией антигенов астроцитов и олигодендроцитов на срезах мозга, была показана ко-локализация Cx43 и Cx47 в ЩК зоне перехватов Ранвье (Kamasawa, N. et al., 2005), а также Cx30 и Cx32 в области тел олигодендроцитов (Nagy J.I., et al., 2003), что подтверждает возможность их существования *in vivo*. Роль таких контактов заключается, вероятно, в буферизации внеклеточного K^+ , и потеря этой функции приводит, в частности, к тяжелым нарушениям процесса миелинизации у мышей с выключенной экспрессией Cx32 и Cx47 (Odermatt B. Et al., 2003). Наличие гетеротипических ЩК между астроцитами и олигодендроцитами в периваскулярных зонах

представляет несомненный интерес, тем более что такие контакты в доступной литературе не описаны и их значение остаётся неясным.

При реконструкции трехмерной структуры периваскулярной астроцитарной муфты по серийным ультратонким срезам, выполненной Mathiisen и соавторами (2010) было показано, что сосудистые ножки астроцитов лежат «внахлест». В нашей работе также выявлены эти многослойные периваскулярные астроцитарные муфты. Более того, нами продемонстрировано, что в этих участках образуются протяженные перфорированные ЩК с плотным осмиофильным опушением мембран, формирующих контакт. С одной стороны, наличие крупных нексусов ЩК между соседними сосудистыми отростками астроцитов формирует прочную механическую связь, которая тем более необходима, поскольку плотные контакты других типов в этих зонах не обнаружены (Mathiisen T. M. et al., 2010). С другой стороны, обширные зоны перекрытия ножек астроцитов, «прошитые» протяженными бляшками ЩК, могут служить физическим барьером для проникновения из капилляра по межклеточным пространствам воды и растворимых веществ, прошедших через эндотелиоциты, базальную мембрану, перициты. Предположение о существовании дополнительного барьера, образованного контактами между астроцитами в периваскулярной зоне, находит подтверждение в опытах с проникновением красителя Alexa Fluor 488 через ГЭБ (Nuriya M., 2013). Авторы показали, что астроцитарные ножки препятствуют проникновению этого гидрофильного красителя из паренхимы мозга к просвету кровеносного сосуда. Кроме того, часть сосудистых отростков демонстрировала более длительное время удержания красителя, чем другие, что говорит в пользу существования особенно плотных зон контакта между астроцитами в этих участках. На настоящий момент не известно, какие именно контакты могут отвечать за барьерную функцию астроцитарной периваскулярной муфты, и мы предполагаем, что, крупные ЩК как раз могут играть эту роль.

Осмиофильное опушение на внутренних мембранах ЩК, вероятно, представляет собой макромолекулярные комплексы, которые формируют

внутриклеточные петли белков коннексинов, и в первую очередь Сх43, с белками, участвующими в построении цитоскелета - дребрином, тубулином, актиновыми филаментами, и другими. Эта связь, как известно, необходима для поддержания ЦК в активном состоянии (Ambrosi C., 2016). Наиболее важным следствием образования большого количества ЦК и связи коннексинов с белками цитоскелета может оказаться интенсификация передачи ионов и низкомолекулярных соединений между астроцитами в периваскулярной зоне. В первую очередь, такая связь может обеспечивать проведение Ca^{2+} между астроцитами, как это происходит между отростками астроцитов, прилегающими к химическим синапсам (Giaume C. et al., 2009). Передача кальциевого сигнала от активных химических синапсов по телу астроцита к васкулярной ножке и между соседними сосудистыми отростками может приводить к высвобождению специфических сигналов, модулирующих состояние сосуда в ответ на активность химического синапса, тем самым обеспечивая локальное адаптивное изменение кровотока. Действительно, в ряде исследований подтверждается, что астроциты опосредуют реакцию вазодилатации в ответ на активность нейронов путем повышения внутриклеточной концентрации кальция и с участием таких потенциальных медиаторных молекул, влияющих на сосудистую стенку, как арахидоновая кислота (Mulligan S. J., MacVicar B. A. 2004), ионы натрия (Bernardinelli Y., et al., 2004), лактат (Gordon, G. R. J. et al., 2008) и др.

В связи с вышесказанным можно предположить, что в баррельной коре крыс НГСА могут выступать в роли морфо-функциональной единицы функциональной кортикальной колонки, обеспечивая локальное повышение кровотока в пределах этой колонки в ответ на увеличивающуюся синаптическую активность при стимуляции вибрисс. Это предположение также находит подтверждение в ряде исследований. Так, известно, что астроциты образуют неперекрывающиеся анатомические зоны, которые некоторые авторы рассматривают, как функциональные домены, «синаптические острова», регулирующие работу охватываемых ими химических синапсов и организующие их

в операционные модули, существующие либо независимо от функциональных кортикальных колонок, либо осуществляющие свою функцию в их пределах (Halassa M. M., et al., 2009; Roux, L. et al., 2011; Eilam, R., et al., 2016). В частности, в работе Eilam (2016) было показано ограничение астроцитарных доменов границами колонок баррельной коры крыс. С другой стороны, известно, что регуляция кровотока на микроуровне также определяется границами баррелей (Blinder, P. P., et al., 2013). Так как сосуды сами по себе не проявляют какой-либо пространственной связи с отдельными колонками в соматической коре крыс, можно предположить, что именно астроциты в составе НГСА являются теми функциональными единицами, которые регулируют локальный кровоток в пределах отдельных функциональных кортикальных колонок в баррельной коре грызунов.

Таким образом, можно заключить, что астроциты выступают в качестве основного посредника между нейронами и сосудистым руслом, в комплексе образуя НГСА, выступающие в роли морфо-функциональной единицы функциональной кортикальной колонки. В составе НГСА большую роль играют межастроцитарные ЩК, образованные преимущественно Сх43 и Сх30, которые формируются не только между отростками астроцитов, окружающими химические синапсы (Кириченко Е.Ю. с соавт., 2018), но также и между сосудистыми ножками астроцитов.

Проанализировав локализацию глиальных щелевых контактов и составляющих их белков коннексинов в коре и в таламусе, далее мы сосредоточились на анализе щелевых контактов на серийных срезах с целью изучения близкого расположения щелевых контактов и химических синапсов в объеме. Близкая локализация обоих типов контактов предполагает возможность их совместного участия в процессе локальной синхронизации, обеспечивающей ритмогенез в коре.

2.2.3.6. Анализ щелевых контактов

на серийных ультратонких срезах соматической коры

По материалам этого раздела была опубликована статья «Analysis of the spatial distribution of the gap junctions relative to chemical synapses on the serial ultrathin sections of the rat barrel cortex» в журнале «Neuroscience and Behavioral Physiology», Т. 43, №3, в 2013 году авторами Kirichenko E.Y., Sukhov A.G., Logvinov A.K., Povilaitite P.E.

Анализ серийных ультратонких срезов баррельного поля соматосенсорной коры крыс (отдельные цитоархитектонические группировки нейронов в форме бочонков, или баррелей, являющие зоной проекции вибрисс) был проведен для подробного изучения особенностей расположения ЩК относительно химических синапсов и пространственных взаимоотношений этих типов контактов с близлежащими структурами. Проведенный анализ серийных срезов показал, что все электрические синапсы или ЩК, включая те, которые на одиночных срезах не имеют связи с химическими синаптическими контактами, при анализе их расположения в объеме, на самом деле контактируют с одним или с обоими отростками, формирующими химический аксошиповый или аксодендритический синапс. Причем, как правило, как минимум на одном из срезов серии можно наблюдать близкое расположение ЩК и синаптической щели химического синапса. Кроме того, во всех исследованных нами сериях рядом с первым ЩК в непосредственной близости появлялся другой ЩК. На одном или нескольких срезах серии можно было наблюдать оба этих контакта в одном поле зрения.

Нами анализировались несколько серий электроннограмм, на каждой из которых один и тот же ЩК исследован от момента его появления, до исчезновения из поля зрения.

На рисунке 46 представлен ЩК на различных срезах одной из серий. На электроннограммах для ориентировки отмечено несколько митохондрий, которые видны на большинстве срезов этой серии, также показаны синаптические щели химических синапсов и ЩК.

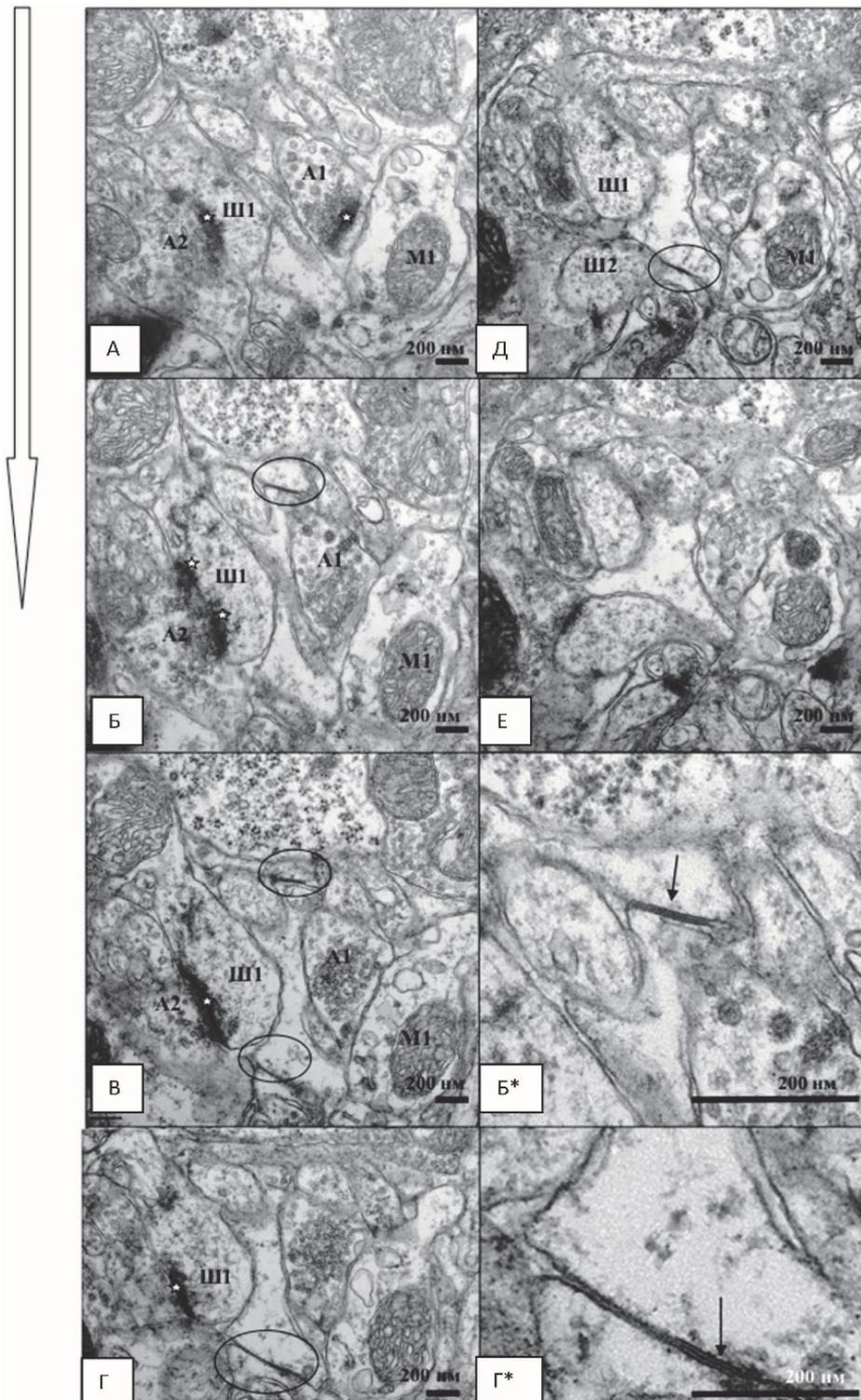


Рисунок 46 – Расположение ЩК и аксо-шиповых синапсов баррельной коры мозга крысы на серийных срезах. На первом срезе имеется аксон и шипик, отмечены митохондрия и несколько химических синапсов (А). На втором срезе овалом обозначен ЩК между отростками, один из этих отростков мембранами контактирует с отмеченными шипиком и аксоном, а второй с мембраной нейрона (Б). Такая же картина наблюдается на третьем срезе (В), где ЩК находится в плоскости среза, что видно при большем увеличении. На четвертом срезе первый ЩК исчезает из поля зрения, но на противоположном конце отростка, на котором он формировался, появляется второй ЩК с более протяженной плотной зоной контакта (Г, овал). На пятом срезе видно, что отростки, между которыми формируется ЩК, контактируют с двумя шипиками, один из которых на предыдущих четырех срезах формировал аксошиповый химический синапс (Д). На шестом срезе второй ЩК пропадает, однако мы наблюдаем, что второй шипик также формирует аксошиповый химический синапс (Е). Зона второго ЩК, также как и первого, демонстрируется при большем увеличении. Б* – увеличенный участок Б, демонстрирующий типичную ультраструктуру первого ЩК, Г* – увеличенный участок Г, где плотная зона второго ЩК находится в плоскости среза. Условные обозначения: звездочка-активная зона химического синапса, овалом обозначена область формирования ЩК, А-аксон, Ш-шипик, Н-нейрон, М-митохондрия

Все кадры пронумерованы по порядку от первого до последнего, те кадры, где ЩК находится в плоскости среза, сняты дополнительно при большем увеличении и обозначены порядковым номером соответствующего кадра со звездочкой (рисунок 46).

Анализ срезов данной серии показал, что отдельные щелевые контакты выявляются обычно только на 3-4 последовательных срезах, то есть, на протяжении до 210-280 нм, после чего их структура уже не визуализируется (подробные пояснения в подписи к рисунку).

На других сериях нами наблюдалась сходная картина расположения обоих типов контактов: в серии на двух или трех срезах подряд визуализировался один ЩК между двумя отростками, один из которых на следующих срезах оказывался аксоном или шипиком, который в свою очередь формировал аксошипиковый химический синапс. Когда первый ЩК на следующих срезах серии пропадал, рядом с аксошипиковым химическим синапсом в поле зрения появлялся другой ЩК (рисунок 47).

Измерение расстояний между синаптическими контактами баррельной коры, как на серийных, так и на одиночных срезах показал, что среднее расстояние между одним и другим ЩК, как и расстояние между одним и другим химическим синапсом было в два-три раза больше, чем расстояние между ЩК и химическим синапсом.

Ультраструктурное исследование баррельной коры на серийных срезах позволяет представлять среднюю протяженность ЩК в объеме. На большинстве серий зона ЩК прослеживалась на двух-трех срезах, учитывая толщину каждого среза (70 нм), можно заключить, что в среднем размер одного ЩК не превышает 200-280 нм.

Таким образом, на всех срезах исследованных нами серий обнаруживались близко расположенные химические ассиметричные синапсы и ЩК. На серийных срезах прослеживается контакт мембран отростков, образующих ЩК с отростками – аксонами, дендритами, шипиками, формирующими химические аксодендритические и аксошипиковые синапсы.

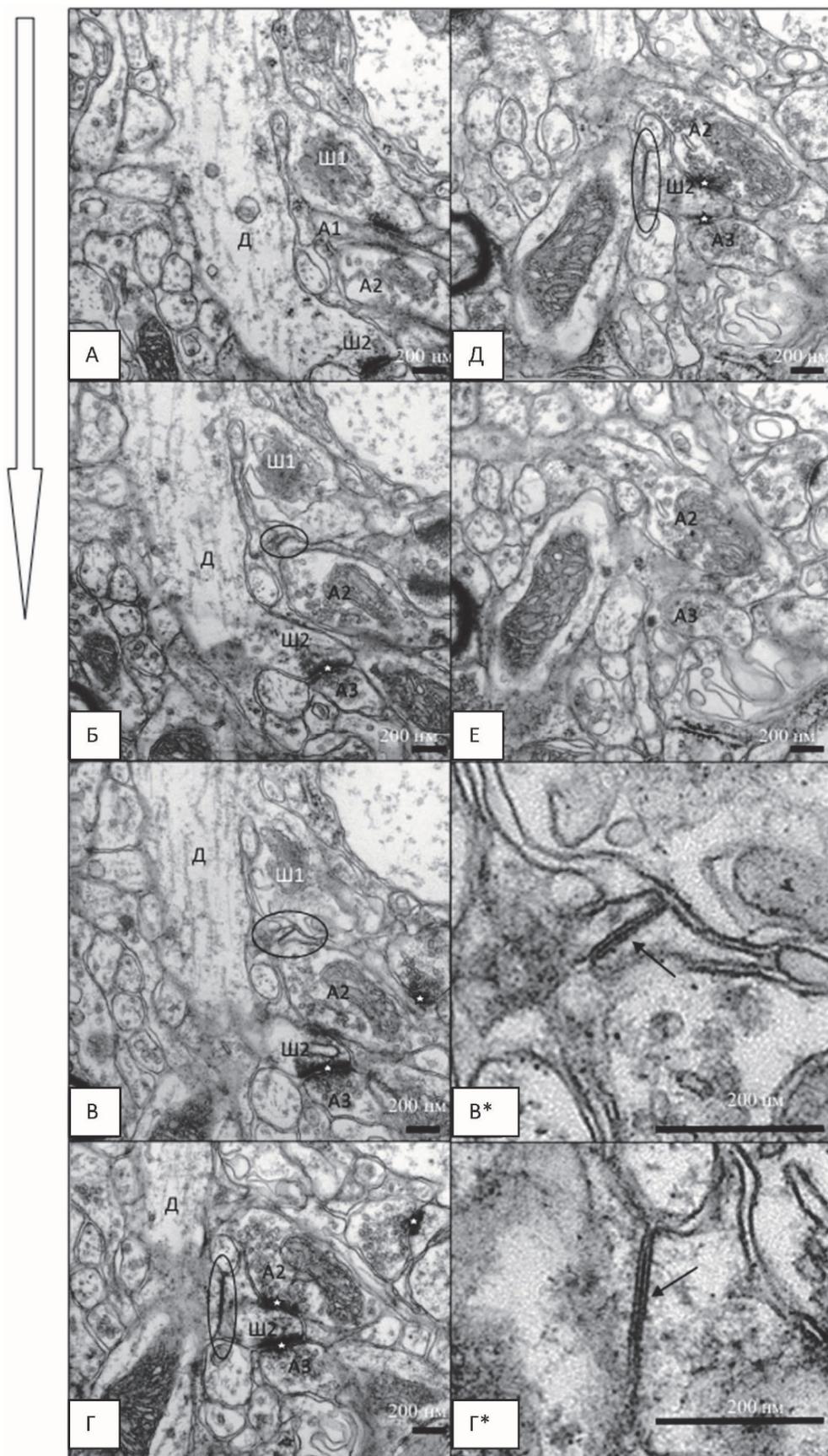


Рисунок 47 – ШК рядом со стволом дендрита. А – первый срез, Б – второй срез, появившийся ШК отмечен овалом, В - структура ШК находится в плоскости среза, Г – первый ШК исчезает, овалом указан второй ШК, Д – второй ШК в плоскости среза, Е – второй ШК исчезает. В* – увеличенный участок В, где зона первого ШК находится в плоскости среза. Г* – увеличенный участок Г, где зона второго ШК находится в плоскости среза. Условные обозначения: звездочка – активная зона химического синапса, овалом обозначена область формирования ШК, А – аксон, Ш – шипик, Д – дендрит

На отдельных срезах ЩК расположен так, что находится в непосредственной близости от активной зоны химического синапса, на других срезах серии наблюдается только контакт плазмалемм отростков синапсов различного типа. Интересно, что во всех проанализированных сериях на отдельных срезах можно видеть два различных щелевых контакта, то есть, по видимому, ЩК расположены парами и относительно близко не только к химическим синапсам, но и друг к другу.

Полученные нами при исследовании ЩК на серийных срезах результаты, так же как и описанные ранее полученные данные при изучении одиночных срезов, свидетельствуют о том, что практически все ЩК нейропилия соматической коры расположены рядом с химическими синапсами, находятся с ними в тесной связи и даже контактируют с ними. В пользу теории их взаимной скооперированной деятельности может свидетельствовать и очень малое расстояние между ЩК и химическими синапсами, в то время как различные ЩК расположены значительно дальше друг от друга. На проанализированных нами сериях срезов в основном наблюдались контакты плазмолеммы одного из отростков, формирующих ЩК, с плазмолеммой шипика, формирующего химический синапс, т.е. с постсинаптической частью химического синапса. Кроме того, пресинаптические части — аксоны аксо-дендритных и аксо-шипиковых синапсов формировали и ЩК, и химические синапсы одновременно, что было показано ранее (Кириченко с соавт., 2017). При этом такие случаи, когда оба типа межклеточных контактов расположены рядом или даже на одном отростке, в соматической коре не являются редкостью, как было отмечено и на одиночных срезах. В немногочисленных работах, проведенных с использованием серийных срезов, было также показано расположение ЩК и химических синапсов рядом и даже на одном структурном элементе (Fukuda T., Kosaka T., 2000), была отмечена и возможность существования аксо-аксональных ЩК (Schmitz D., et. al., 2001). Учитывая такие варианты расположения ЩК, можно предположить, что они играют функциональную роль в локальной синхронизации активности нейронов одного ансамбля на

пресинаптическом уровне. Поскольку конечные внутрикорковые разветвления одиночных афферентных аксонов имеют дивергентный расходящийся характер, то, скорее всего, тесно прилегающие друг к другу химические синапсы, связанные электрическим контактом, принадлежат разным восходящим аксонам нейронов, участвующих в образовании таламокортикальных связей. При этом появление потенциала действия в одном из контактирующих синапсов может приводить к электротоническому развитию потенциала действия в соседнем синапсе благодаря электротонической передаче через ЩК с низким сопротивлением и последующим антидромным распространением этого потенциала по внутрикорковым разветвлениям второго аксона таламокортикального пути по типу аксон-рефлекса с синхронной активацией других синаптических контактов второго аксона.

Исследования онтогенетических аспектов синаптогенеза показывают, что ЩК формируются раньше, чем химические синапсы (Elias L. A., et.al., 2007; Todd K. L., et.al., 2010). В то же время, близкое расположение и взаимосвязь ЩК и химических синапсов в зрелой специализированной структуре мозга - баррельной коре свидетельствуют о вероятности формирования ЩК и позже начала закладки химических синапсов в онтогенезе, в том числе, для обеспечения синхронизации осцилляторной активности контактирующих элементов за счет не только химического, но и электротонического взаимодействия.

Изучая ЩК на серийных срезах, мы пришли к выводу, что существуют трудности в установлении истинного соотношения количества ЩК и химических синапсов в коре. Благодаря округлой форме, отчетливо выраженному постсинаптическому уплотнению и наличию пузырьков в пресинаптической части химические синапсы на электронно-микроскопических фотографиях выявляются лучше, вне зависимости от того, тангенциально, сагиттально или фронтально ориентирован срез. В нашем исследовании ЩК возможно было выявить только в том случае, когда его плотная протяженная структура оптимально ориентирована вдоль плоскости среза, структуру тангенциально

срезанных ЩК нам идентифицировать не удалось, хотя для химических синапсов это возможно. Кроме того, на всех изученных нами сериях срезов ЩК были видны в основном на трех срезах подряд, что позволяет предположить, что протяженность области плотного прилегания мембран ЩК составляет не менее 200 нм. Таким образом, количество ЩК может значительно превышать то количество в коре, которое представляется при морфометрических исследованиях на одиночных срезах. Установление истинного количества ЩК в коре является важным для понимания функций этих контактов, а также для анализа строения нейронных ансамблей, и глиальных сетей объединенных ЩК.

Таким образом, взаимное расположение химических синапсов и ЩК свидетельствует в пользу их кооперированной деятельности, в частности, об их участии в осуществлении функции синхронизации ритмической активности нейронов одного ансамбля. ЩК могут синхронизировать подпороговый сигнал, обеспечивая локальную синхронизацию, а многочисленные химические синапсы, в том числе перфорированные, могут осуществлять дистантную синхронизацию ритмической активности, достигшей порогового для импульсного разряда значения. Благодаря такой взаимной кооперированной деятельности обоих типов синаптических контактов осуществляется синхронизация ритмической активности и, как следствие, полноценное формирование ритмической активности.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное в настоящей работе исследование роли щелевых контактов и составляющих их белков-коннексинов в нейро-глиальных и нейро-глио-васкулярных взаимодействиях в таламокортикальной системе мозга крыс показало их участие в формировании функциональных сетей и ансамблей клеток и в обеспечении функционирования комплекса нейрон - глиальная клетка - сосудистый элемент.

Выбор объектов исследования продиктован тем, что баррельная кора является удобной моделью для исследования функционирования локальных нейронных и глиальных ансамблей. Группировки нейронов в виде баррелей являются частным случаем общего принципа колончатой организации коры мозга. Как известно, каждая вибрисса имеет представительство в коре в виде отдельного барреля, причем каждому баррелю на уровне релейного ядра таламуса соответствует еще одна группировка таламокортикальных клеток - баррелоидов. При стимуляции соответствующей вибриссы можно наблюдать ответы в соответствующем баррелоиде и барреле, более того, при прямой электрической стимуляции соответствующего бочонка можно наблюдать антидромные фокальные ответы в соответствующем баррелоиде.

Морфофункциональной основой индивидуального ритмогенеза в колонке является локальный, ограниченный диаметром бочонков характер ветвления дендритов звездчатых тормозных нейронов IV слоя с наличием у них дендро-дендритических щелевых контактов, или электрических синапсов. Наличие электротонической связи между нейронами бочонка позволяет предполагать участие щелевых контактов в синхронизации ритмической активности нейронов этих цитоархитектонических группировок.

В первой части настоящей работы приведены результаты проведенных иммуногистохимических исследований особенностей пространственного распределения в бочонках S1 коры, а также в вентральных и ретикулярном ядрах таламуса нейрональных белков (синаптофизина, нейрофиламентов, парвальбумина), антигенов глиальных клеток (глиального фибриллярного

кислого белка и основного белка миелина) и обсуждается их возможная роль в структурной организации баррельной коры и ядер таламуса.

Нами установлены существенные закономерности распределения нейрональных и глиальных белков как на фронтальных и на тангенциальных срезах коры и таламических ядер в области формирования баррелей четвертого слоя коры и баррелоидов таламуса. Полученные результаты показали, что распределение синаптофизина, нейрофиламентов, а также глиального фибриллярного кислого белка позволяет идентифицировать баррельную кору на тонких 4 мкм тангенциальных срезах (с помощью антител к Syn, NF, GFAP), и на фронтальных срезах (с помощью антител к NF). Распределение этих белков привязано к цитоархитектонике баррельной коры: большая часть химических синапсов, равно как и крупных отростков нейронов сосредоточена в стенках и септах баррелей, в то время как группировки астроцитов расположены в их полостях. По нашему мнению, более мелкие отростки нейронов направлены в полость баррелей, где переплетаясь формируют умеренное количество химических синапсов в близком контакте с астроглиальными элементами.

Изучение экспрессии парвальбумина показало, что в баррельной коре и в таламусе имеются элементарные ансамбли тормозных PV⁺ нейронов. Такие нейроны являются ведущими в обеспечении таламо-кортикальных взаимоотношений, организуя внутриколончатую и внутриталамическую ритмическую активность мозга. Установлено, что PV⁺ нейроны расположены преимущественно в септах баррелей, что может быть связано с направлением хода дендритов PV⁺ нейронов во внутренней части бочонка и возможным формированием дендро-дендритных щелевых контактов (электрических синапсов), что, в свою очередь, наравне в глиальными щелевыми контактами астроцитов, может являться морфологической основой индивидуального локального пейсмекерного ритмогенеза и регуляции функционального состояния, как корковых колонок, так и баррелоидов. Относительно ядер таламуса также установлено, что миелинизированные и немиелинизированные отростки

нейронов в VPM и VPL ядрах таламуса имеют горизонтально ориентированное параллельное расположение, их наибольшее скопление располагается в RT ядре.

В целом полученные в этом разделе результаты показали, что по экспрессии нейроглиальных антигенов, баррелоиды таламуса имеют схожее с баррелями строение: между отдельными баррелоидами, расположены крупные пучки нейрональных отростков, содержащих нейрофиламенты, также в таламических зонах проекции вибрисс имеются скопления астроглиальных элементов и нейро-глио-сосудистые комплексы. Наличие в VPM и VPL ядрах кальций - связывающего белка PV и гормон-подавляющего нейропептида Som свидетельствует о присутствии специфических тормозных связей в этих ядрах, являющихся «центрами» таламокортикальной передачи в четвертый слой коры мозга. Принимая во внимание неоднородность строения четвертого слоя баррельной коры и таламических ядер, следует предположить, что эти структуры имеют особую клеточную и синаптическую организацию, с неоднородным распределением химических синапсов, астроглиальных элементов, миелинизированных и немиелинизированных отростков.

На следующем этапе нашей работы было выполнено исследование белков щелевых контактов – коннексинов с целью выявления их возможной коэкспрессии с основными белками нейронов и глиии, для понимания морфофункциональной роли ЩК в этих структурах. Использованы методы иммуногистохимии и иммунофлюоресцентной конфокальной микроскопии. В качестве первичных антител были использованы антитела к PV, ГФАБ, астроглиальному Sx43, астроглиальному Sx30 и нейрональному Sx36 .

В баррельной коре во всех слоях продемонстрировано значительное количество клеток, синтезирующих нейрональный Sx36 и потенциально способных формировать электрические синапсы. Экспрессия Sx36 имеет различный характер - цитоплазматическое окрашивание большинства клеток и их отростков, мембранное окрашивание нейронов, пунктирное окрашивание нейропиля, а также поперечно срезанных, радиально направленных коллате-

ралей. На серийных срезах установлена ко-локализация добавочного нейропептида парвальбумина и Сх36 в одних и тех же клетках. Эти данные свидетельствуют о сохранении электротонического проведения между нейронами коры взрослого мозга и указывают на потенциальную роль электрических синапсов в осуществлении механизма нейрональной коммуникации и торможения. Наши результаты подтвердили устоявшуюся в доступной литературе гипотезу о существовании обширного анатомического субстрата для электрической связи парвальбумин-содержащих нейронов в соматосенсорной коре взрослой крысы.

Изучение в коре локализации астроглиального Сх43 показало, что он экспрессируется теми же нейронами IV и V слоев коры, в которых была выявлено повышенное цитоплазматическое содержание Сх36. По нашим наблюдениям, в отличие от локализации других исследованных нейроглиальных антигенов, характерных для нервной ткани, экспрессия коннексинов (в частности, Сх43) в коре головного мозга, как правило, менее выраженная, при больших увеличениях выглядит как «точечная» или «зернистая», что, по видимому, ассоциировано с количеством щелевых контактов и полуканалов. Кроме того, в настоящей работе установлена гетерогенность экспрессии астроглиальных коннексинов (Сх43, Сх30) в коре головного мозга крыс, как по локализации, так и по интенсивности. По нашим данным, распределение коннексинов Сх43 и Сх30 в норме в мозге имеет существенные отличия, однако причины различной способности субпопуляций астроцитов синтезировать разные типы коннексинов не были исследованы и функциональное значение этого феномена неизвестно. Остается открытым вопрос о способности Сх30 формировать ЩК, исследованию этой проблемы посвящен отдельный раздел нашей работы.

Изучение экспрессии различных типов коннексинов в ядрах таламуса показало, что наибольшее количество Сх36 и Сх43 содержится в VPM, VPL и RT ядрах таламуса по сравнению с другими основными структурами мозга, располагающимися в плоскости среза – корой, гиппокампом, гипоталамусом,

другими ядрами таламуса. По нашим данным, экспрессия коннексинов в ядрах VPM/VPL наблюдается в тех же участках, что и экспрессия парвальбумина, что может свидетельствовать о формировании плотной сети как глиальных, так и нейрональных щелевых контактов в исследуемых ядрах. Такие сети могут участвовать в обработке внешних сенсорных сигналов в подкорковых структурах и их передаче в корковые модули. Установлено, что в ядре RT коннексин 36 отсутствует, при этом, коннексин 43 экспрессируется в нейропиле. Учитывая полученные нами данные, синаптическая передача в RTN ядре обеспечивается без участия щелевых контактов, содержащих Cx36, но с участием панглиального синцития, образованного щелевыми контактами, содержащими Cx43. С помощью конфокальной микроскопии показана экспрессия Cx43 в виде крупных и мелких гранул на дистальных и проксимальных отростках и телах астроцитов, локализованных вокруг микрокапилляров и входящих в ГЭБ. Судя по этим данным, астроглиальные щелевые контакты входят в состав периваскулярных астроцитарных муфт и участвуют в осуществлении функций ГЭБ.

Проведенное нами исследование локализации различных коннексинов в структурах коры и таламических ядрах свидетельствуют о высоком потенциале исследований в области взаимного влияния астроглии и нейронов взрослого мозга. Полученные в этом разделе результаты о наличии и распределении коннексинов в коре и таламусе подразумевают необходимость установления связи локализации белка на светооптическом уровне и образования глиальных или нейрональных щелевых контактов. В связи с этим, последний раздел работы посвящен электронномикроскопическому и иммуноэлектронномикроскопическому исследованию ЩК.

На ультраструктурном уровне ЩК определяются как уплотненные ровные участки на мембранах отростков нервных и глиальных клеток. При больших увеличениях такие контакты обладают характерной для типичного ЩК семислойной структурой: две контактирующие трехслойные мембраны, между которыми располагается узкая щель шириной около 3 нм.

Выявленные в коре и таламических ядрах межнейрональные ЩК были представлены следующими типами: аксо-дендритические, дендро-дендритические, а также «смешанные» контакты. В настоящем исследовании были впервые выявлены аксо-дендритические ЩК, как в области коры, так и в ядрах таламуса. Этот тип контактов может играть определенную функциональную роль в локальной синхронизации активности нейронов одного ансамбля на пресинаптическом уровне. При этом возникновение потенциала действия в одном из синаптических контактов приводит к потенциалу действия в другом синаптическом контакте при помощи ЩК с низким антидромным сопротивлением и распространением потенциала в обоих афферентах. Подобная локализация ЩК до сих пор не была описана и в этой связи представляет большой интерес. Мы полагаем, что проведение сигнала при помощи электрических синапсов, наравне с тесным пространственным взаимодействием астроглиальных ЩК и асимметричных химических синапсов, представляют собой особенность функциональной организации специфических и неспецифических ядер таламуса. Морфометрическое исследование показало большее количество нейрональных ЩК в коре по сравнению с таламическими ядрами. Кроме того, по нашим данным наибольшее количество электрических синапсов среди исследуемых ядер в таламусе локализовано в области формирования баррелоидов - в VPM ядре. По видимому структурно-функциональная особенность баррелей и баррелоидов также способствует формированию электрических дендро-дендритических связей между нейронами одного модуля для обеспечения локальной подпороговой синхронизации активности нейронов в пределах одного подкоркового модуля, более поздние этапы синхронизации при этом обеспечиваются химическими синапсами. Обнаруженные в настоящем исследовании смешанные синапсы представляют собой близко локализованные на мембране одного дендрита дендро-дендритический ЩК и симметричный аксо-дендритический химический синапс. Хотя смешанные синапсы в неокортексе впервые описаны достаточно давно, однако до сих пор мало известно о той роли, которую они

играют в нервной системе позвоночных. Предполагается, что электротонический компонент в смешанных синапсах у млекопитающих может быть связан с долговременной потенциацией и/или синхронизацией высокочастотных колебаний, а также обсуждается их роль в обеспечении пластических изменений в нейрональных цепях.

Результаты, полученные при исследовании ультраструктуры глиальных щелевых контактов, в том числе на серийных срезах, а также с применением метода электронной иммуногистохимии показывают, что в соматической коре, вентральных ядрах (VPM, Pom, VPL) и ретикулярном (RT) ядрах таламуса локализованы многочисленные одиночные и близкорасположенные ЩК между отростками астроцитов, создающие панглиальный синцитий. Эти щелевые контакты содержат коннексин 43, могут быть различной длины и конфигурации, образованы различными по площади отростками. В коре и в таламусе аксонные терминалы и химические аксо-шиповые синапсы окружены астроглиальными оболочками, формирующими ЩК и содержащие коннексин 43. Такая система трехчастного синапса обеспечивает свободный межклеточный обмен и динамическое равновесие ионов, что отражается на нейронной передаче сигнала в этих структурах.

В коре и в таламусе выявлено близкое расположение активных зон химических синапсов и нексусов ЩК. Такая взаимная локализация свидетельствует в пользу участия высокопроницаемых щелевых контактов в быстрой регуляции нейротрансмиттерного гомеостаза, в том числе, глутаматного, между астроцитами и нейронами. В таламических ядрах существуют локальные панглиальные сети, состоящие из нескольких (до 4-х) очень близкорасположенных ЩК. Такие сети могут участвовать в процессах функционирования миелина, восстановления потенциала покоя на мембране, осуществления межклеточного обмена ионов и нейроактивных субстанций, например глутамата.

По нашим данным, астроциты выступают в качестве основного посредника между нейронами и сосудистым руслом, в комплексе образуя

НГСА, выступающий в роли морфо-функциональной единицы функциональной кортикальной колонки. В составе НГСА большую роль играют ЩК, образованные преимущественно коннексином 43 и коннексином 30, и присутствующие не только между отростками астроцитов, окружающими химические синапсы, но также и между васкулярными ножками астроцитов. ЩК НГСА могут выполнять как соединительную для отростков астроцитов, так и барьерную функции.

Поскольку щелевые контакты, как основной способ межклеточной передачи между клетками глии и дополнительный способ межклеточного обмена между нейронами играют важнейшую роль в ее нормальном функционировании, нарушение межклеточной сообщаемости через ЩК приводит к масштабным нарушениям гомеостаза ЦНС и работы нейронных сетей. В связи с этим, изучение локальных особенностей экспрессии основных коннексинов, образующих щелевые контакты астроглии – коннексина 43 и коннексина 36, - является фундаментальной задачей, решение которой позволит обозначить новые пути для исследований в области регуляции щелевых контактов при развитии различных нейродегенеративных заболеваний в ветеринарии. Белки коннексины являются потенциальными терапевтическими мишенями при лечении скрепи инфекций у овец и коз, губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота, трансмиссивной энцефалопатии норок. Кроме того, ЩК и полуканалы играют ключевую роль при различных паразитарных инфекциях ЦНС позвоночных: токсоплазмозов, шистосомозов, случной болезни непарнокопытных и су-ауру верблюдов, лошадей, ослов, мулов и собак. Более того, ЩК способствуют внутриклеточному и межклеточному распространению вируса чумы собак при демиелинизирующем энцефалите, а также вируса псевдобешенства и развития болезни Ауески у свиней. Отдельно следует отметить, что в настоящее время альтерации ЩК и коннексинов рассматривают в качестве важного патогенетического механизма развития глиальных опухолей головного мозга млекопитающих.

ВЫВОДЫ

1. В баррельной коре S1, в вентральных и ретикулярном таламических ядрах крыс в стенках каждого барреля и баррелоида расположены нейронные ансамбли, характеризующиеся высокой экспрессией парвальбумина. В центральной части каждого барреля и баррелоида локализованы глиальные клетки (астроциты), что свидетельствует о структурно-функциональной схожести нейро-глиальных ансамблей в этих корковых и подкорковых зонах.

2. В корковых и таламических зонах представительства вибрисс имеется плотная сеть глиальных и нейрональных щелевых контактов, благодаря которой осуществляется метаболическая и электротоническая коммуникация при обработке сенсорных сигналов между корой и подкорковыми структурами.

3. Экспрессия белков щелевых контактов астроглии коннексина 43 и коннексина 30 в коре и таламусе крыс гетерогенна. Коннексин 43 выявляется преимущественно в нейропиле в виде точек различного диаметра на отростках и телах астроцитов, а также в периваскулярных астроцитарных муфтах. Коннексин 30 локализован в цитоплазме и в отростках астроцитов, контактирующих с сомой нейронов. Эти данные свидетельствуют о наличии субпопуляций астроцитов, экспрессирующих различные типы коннексинов в головном мозге.

4. Щелевые контакты нейронов в коре и таламусе головного мозга представлены следующими типами: аксо-дендритические, дендро-дендритические и «смешанные» синапсы. В баррельной коре сформировано больше нейрональных щелевых контактов по сравнению с таламическими ядрами. В ядрах таламуса наибольшее количество этих контактов локализовано в области формирования баррелоидов в заднепостеромедиальном ядре. Полученные данные свидетельствуют о формировании электротонических связей между тормозными парвальбумин-содержащими клетками как корко-

вых, так и подкорковых модулей для обеспечения локальной подпороговой синхронизации активности нейронов в этих структурах.

5. В коре и таламусе имеются многочисленные одиночные и близко-расположенные глия-глиальные щелевые контакты, содержащие коннексин 43 и создающие локальный панглиальный синцитий. По количеству такие глиальные щелевые контакты значительно преобладают над нейрональными в исследуемых структурах, что указывает на их участие в процессах циркуляции информации и обеспечения модуляции функционирования больших нейронных ансамблей.

6. В коре и в таламусе мозга крыс аксонные терминалы и химические аксо-шиповые синапсы окружены астроглиальными оболочками, соединенными щелевыми контактами, содержащими коннексин 43. В системе трехчастного синапса астроглия может играть роль пространственного ионного буфера, благодаря которой обеспечивается регуляция нейронной передачи сигнала и восстановлению потенциала покоя на мембране нейронов в этих структурах.

7. В комплексе нейро-глио-сосудистых ансамблей сформированы гомотипические и гетеротипические щелевые контакты, образованные коннексином 43 и коннексином 30, которые соединяют васкулярные ножки астроцитов. Расположение щелевых контактов в нейро-глио-сосудистых ансамблях свидетельствует об их роли в поддержании целостности астроцитарной муфты, а также в осуществлении ограничительной функции ГЭБ.

Практические предложения

Ведущая роль щелевых контактов в синхронизации ритмической активности и ее поддержании указывает на их ключевую роль при развитии патологической эпилептиформной активности. Новый терапевтический подход для лечения эпилепсии и уменьшения побочных эффектов эпилептогенеза млекопитающих может быть основан на использовании специфических для ЦНС блокаторов щелевых контактов нейронов.

Блокаторы глиальных синцитиев, создаваемых щелевыми контактами, рекомендуется использовать в качестве терапевтической мишени в стратегии лечения нейродегенеративных заболеваний, связанных с массовой межклеточной передачей инфекционных агентов на большие расстояния в мозге (ретровирусные, микробные и прионные инфекции).

Высокая реактивность антител к астроглиальному коннексину 43 способствует их использованию для выявления новых эффективных показателей диагностики и прогноза развития первичных глиальных опухолей головного мозга млекопитающих.

Для разработки рациональных стратегий, позволяющих осуществлять контролируемую доставку соответствующих лекарственных веществ в клетки ЦНС, рекомендуется учитывать функциональное состояние щелевых контактов, входящих в состав гематоэнцефалического барьера.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

Учитывая существование нейронных сетей ГАМК-ергических нейронов, содержащих добавочный нейропептид парвальбумин и объединенных щелевыми контактами в колонках соматосенсорной коры, целесообразно исследовать и сравнить подобные анатомические субстраты в других функциональных областях коры головного мозга, включая зрительную и моторную кору.

Данные о роли астроглиальных ЩК для нормального функционирования клеток мозга могут служить основой дальнейших исследований распределения таких контактов между отростками опухолевых клеток в астроцитарных опухолях различной степени малигнизации (Grade I-Grade IV), что будет способствовать пониманию значения ЩК в процессах малигнизации, инвазии и метастазирования. Кроме того, данные о гетерогенности астроглии по экспрессии коннексинов могут служить основой разработки новых представлений о биологии глиальных опухолей ЦНС животных.

Новое перспективное направление в изучении распространения прионных инфекций животных – исследование межклеточного проведения в пораженных астроцитах PrPSc посредством нанотрубочек и щелевых контактов с целью блокирования этого механизма.

Принимая во внимание возможное значение щелевых контактов в развитии различных патологических процессов ЦНС, целесообразно продолжить их исследование в клеточных культурах нейронов и глиии, а также в модельных экспериментах при ишемии, эпилепсии, болезни Альцгеймера и др.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ пространственного расположения щелевых контактов относительно химических синапсов на серийных ультратонких срезах баррельной коры крыс / Е. Ю. Кириченко, А. Г. Сухов, А. К. Логвинов, П. Е. Повилайтите // Морфология. – 2012. – Т. 141, №. 2. – С. 13.
2. Бережная, Л. А. Общие принципы нейронной организации ядер дорсального таламуса человека / Л. А. Бережная // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2013. – Т. 7, №. 4. – С. 32–38
3. Дуриян, Р. А. Кортикальный контроль неспецифических систем мозга / Р. А. Дуриян. – М. : Медицина, 1975. – 203 с.
4. Зефирова, А. Л. Везикулярная гипотеза освобождения медиатора в синапсе / А. Л. Зефирова // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, №. 9. – С. 10.
5. Кириченко Е. Ю. Структурно-функциональное исследование механизмов организации веретенообразной активности нейронов бочонка соматической коры крысы : дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13 / Кириченко Евгения Юрьевна. – Ростов-на-Дону, 2009. – 151 с.
6. Кириченко, Е. Ю. Щелевые контакты нейронов в корковых колонках и в вентральных ядрах таламуса / Е. Ю. Кириченко, А. К. Логвинов, С. Ю. Филиппова // Цитология. – 2017. – Т. 59, №. 10. – С. 705–710.
7. Коган, А. Б. О нейронной организации центральных механизмов рефлексов с вибрисс / А. Б. Коган, А. Г. Сухов // Физиол. журнал СССР им. Сеченова. – 1977. – Т. 63, №. 2. – С. 224.
8. Коган, А. Б. Физиология человека и животных / А. Б. Коган, Г. И. Косицкий. – М. : Изд-во «Высшая школа», 1984. – Ч. 1, 2. – 288 с.
9. Кратин, Ю. Г. Неспецифические системы мозга / Ю. Г. Кратин, Т. С. Сотниченко. – Л. : Наука: Ленингр. отд-ние, 1987. – 158 с.
10. Крутовских, В. А. Роль межклеточных взаимодействий через щелевые контакты в канцерогенезе : дис. ... д-ра мед наук: 14.00.14 / Крутовских Владимир Андреевич. – Санкт-Петербург, 2005. – 176 с.

11. Лапенко, Т. К. Изучение методом ретроградного аксонного транспорта ПХ внутрикорковых связей между группами нейронов – «бочонками» в соматической области коры мозга крысы / Т. К. Лапенко, Л. Н. Подладчикова // *Нейрофизиология*. – 1983. – Т. 15, № 1. – С. 22–26.
12. Леонтович, Т. А. Нейронная организация подкорковых образований переднего мозга / Т. А. Леонтович. – М. : Медицина, 1978. – 383 с.
13. Лиманский, Ю. П. Структура и функции системы тройничного нерва / Ю. П. Лиманский. – Киев : Наукова думка, 1976. – 255 с.
14. Николлс, Дж. От нейрона к мозгу / Дж. Николлс, Р. Мартин, П. М. Балабан. – М. : УРСС, 2003. – 671 с.
15. Распределение нейрональных и глиальных антигенов в колонках соматосенсорной коры мозга крысы (иммуногистохимическое исследование) / Е. Ю. Кириченко, А. К. Логвинов, П. Е. Повилайтите, А. О. Гранкина // *Морфология*. – 2014. – Т. 145, № 2. – С. 7–11.
16. Серков, Ф. Н. Нейрофизиология таламуса / Ф. Н. Серков, В. Н. Казаков. – Киев : Наукова думка, 1980. – 260 с.
17. Ситникова, Е. Ю. Структурно-функциональная организация соматосенсорной системы в норме и при абсанс-эпилепсии : автореферат дис. ... д-ра биол. наук: 03.03.01 / Ситникова Евгения Юрьевна. – Москва, 2014. – 34 с.
18. Сухов, А. Г. Внутрикорковый механизм генерации веретенообразной активности в колонках соматической коры крысы / А. Г. Сухов, Т. С. Сердюк, Л. А. Коняхина // *Вестник Южного научного центра РАН*. – 2007. – Т. 3, № 2. – С. 86–94.
19. Сухов, А. Г. Нейронная организация тактильного анализатора крысы / А. Г. Сухов. – Ростов-на-Дону : Изд-во Ростовского университета, 1992. – 100 с.

20. Сухов, А. Г. Роль афферентных входов в морфофункциональной организации нейронов IV слоя соматосенсорной коры / А. Г. Сухов, Т. К. Лапенко // Институт мозга. – 1978. – С. 158–159.
21. Сухорукова, Е. Г. Структурная организация астроцитов 1 слоя коры головного мозга человека / Е. Г. Сухорукова // Морфология. – 2010. – Т. 137, №. 4. – С. 185.
22. Толкунов, Б. Ф. Стриатум и сенсорная специализация нейронной сети / Б. Ф. Толкунов. – Л. : Наука. – 1978. – С. 12–14.
23. Хожай, Л. И. Морфогенез слоя I коры мозга мышей в пренатальный период развития / Л. И. Хожай, В. А. Отеллин // Онтогенез. – 1999. – Т. 30, №. 1. – С. 40.
24. Щелевые контакты в составе нейро-глио-сосудистых ансамблей в колонках баррельной коры крыс / Е. Ю. Кириченко, А. К. Логвинов, С. Ю. Филиппова и др. // Цитология. – 2018. – Т. 60, №. 6. – 448–454.
25. Экклс, Д. Физиология синапсов / Д. Экклс. – М., 1966. – 395 с.
26. A connexin 26 mutation causes a syndrome of sensorineural hearing loss and palmoplantar hyperkeratosis (MIM 148350) / K. Heathcote, P. Syrris, N. D. Carter, M. A. Patton // Journal of medical genetics. – 2000. – V. 37, №. 1. – P. 50–51.
27. A mechanism of gap junction docking revealed by functional rescue of a human-disease-linked connexin mutant / X. Q. Gong, So Nakagawa, T. Tsukihara, D. Bai // Journal of cell science. – 2013. – V. 126, №. 14. – P. 3113–3120.
28. A morphological analysis of thalamocortical axon fibers of rat posterior thalamic nuclei: a single neuron tracing study with viral vectors / S. Ohno, E. Kuramoto, T. Furuta et al. // Cerebral cortex. – 2012. – V. 22, №. 12. – P. 2840–2857.
29. A new alternatively spliced transcript of the mouse connexin32 gene is expressed in embryonic stem cells, oocytes, and liver / G. Söhl, M. Theis, G. Hallas et al. // Experimental cell research. – 2001. – V. 266, №. 1. – P. 177–186.

30. A new exon in the 5' untranslated region of the connexin32 gene / S. Duga, R. Asselta, L. Del Giacco et al. // *European journal of biochemistry*. – 1999. – V. 259, № 1–2. – P. 188–196.
31. A reporter allele for investigating connexin 26 gene expression in the mouse brain / M. A. Filippov, S. G. Hormuzdi, E. C. Fuchs, H. Monyer // *European Journal of Neuroscience*. – 2003. – V. 18, №. 12. – P. 3183–3192.
32. A second alternative transcript of the gap junction gene connexin32 is expressed in murine Schwann cells and modulated in injured sciatic nerve / G. Söhl, C. Gillen, F. Bosse et al. // *European journal of cell biology*. – 1996. – T. 69, №. 3. – P. 267–275.
33. A ubiquitous family of putative gap junction molecules / Y. Panchina, I. Kelmanson, M. Matz et al. // *Current biology*. – 2000. – V. 10, № 13. – P. R473–R474.
34. Ahissar, E. Closed-loop neuronal computations: focus on vibrissa somatosensation in rat / E. Ahissar, D. Kleinfeld // *Cerebral Cortex*. – 2003. – V. 13, №. 1. – P. 53–62.
35. Allen, N. J. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity / N. J. Allen, B. A. Barres // *Current opinion in neurobiology*. – 2005. – V. 15, №. 5. – P. 542–548.
36. Analysis of recurrent inhibitory circuit in rat thalamus: neurophysiology of the thalamic reticular nucleus / A. Shosaku, Y. Kayama, I. Sumitomo et al. // *Progress in neurobiology*. – 1989. – V. 32, № 2. – P. 77–102.
37. Analysis of the spatial distribution of gap junctions relative to chemical synapses on serial ultrathin sections of the rat barrel cortex / E. Y. Kirichenko, A. G. Sukhov, A. K. Logvinov, P. E. Povilaĩtite // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2013. – V. 43, №. 3. – P. 336–340.
38. Anatomical pathways involved in generating and sensing rhythmic whisker movements / L. W J Bosman, A. R. Houweling, C. B. Owens et al. // *Frontiers in integrative neuroscience*. – 2011. – V. 5. – P. 53.

39. Astrocyte morphology is confined by cortical functional boundaries in mammals ranging from mice to human / R. Eilam, R. Aharoni, R. Arnon, R. Malach // *Elife*. – 2016. – V. 5. – P. e15915.
40. Astrocytes assemble thalamocortical synapses by bridging NRX1 α and NL1 via hevin / S. K. Singh, J. A. Stogsdill, N. S. Pulimood et al. // *Cell*. – 2016. – V. 164, № 1-2. – P. 183–196.
41. Astrocyte-to-neuron intercellular prion transfer is mediated by cell-cell contact / G. S. Victoria, A. Arkhipenko, S. Zhu et al. // *Scientific reports*. – 2016. – V. 6. – P. 20762.
42. Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss / M. M. Halassa, C. Florian, T. Fellin et al. // *Neuron*. – 2009. – V. 61, №. 2. – P. 213–219.
43. Astroglial connexin 43 sustains glutamatergic synaptic efficacy // *Philosophical Transactions of the Royal Society B* / O. Chever, U. Pannasch, P. Ezan, N. Rouach // *Biological Sciences*. – 2014. – V. 369, №. 1654. – P. 20130596.
44. Astroglial connexin immunoreactivity is specifically altered at β -amyloid plaques in β -amyloid precursor protein/presenilin1 mice / X. Mei, P. Ezan, C. Giaume, A. Koulakoff // *Neuroscience*. – 2010. – V. 171, № 1. – P. 92–105.
45. Astroglial gap junctions shape neuronal network activity / U. Pannasch, M. Derangeon, O. Chever, N. Rouach // *Communicative & integrative biology*. – 2012. – V. 5, № 3. – P. 248–254.
46. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission / N. Rouach, A. Koulakoff, V. Abudara et al. // *Science*. – 2008. – V. 322, № 5907. – P. 1551–1555.
47. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions / C. Giaume, A. Koulakoff, L. Roux et al. // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2010. – V. 11, №. 2. – P. 87–99.

48. Autophagy: a pathway that contributes to connexin degradation / A. Lichtenstein, P. J. Minogue, E. C. Beyer, V. M. Berthoud // *Journal of cell science*. – 2011. – V. 124, № 6. – P. 910–920.
49. Bai, D. Atrial fibrillation-linked GJA5/connexin40 mutants impaired gap junctions via different mechanisms / D. Bai // *FEBS letters*. – 2014. – V. 588, №. 8. – P. 1238–1243.
50. Baker, R. Electrotonic coupling between neurones in the rat mesencephalic nucleus / R. Baker, R. Llinas // *The Journal of Physiology*. – 1971. – V. 212, №. 1. – P. 45–63.
51. Baldwin, K. T. Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis / K. T. Baldwin, C. Eroglu // *Current opinion in neurobiology*. – 2017. – V. 45. – P. 113–120.
52. Barrel cortex function / D. Feldmeyer, M. Brecht, F. Helmchen et al // *Progress in neurobiology*. – 2013. – V. 103. – P. 3–27.
53. Bedner, P. Functional redundancy and compensation among members of gap junction protein families? / P. Bedner, C. Steinhäuser, M. Theis // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2012. – V. 1818, №. 8. – P. 1971–1984.
54. Benarroch, E. E. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system / E. E. Benarroch // *Mayo Clinic Proceedings*. – Elsevier, 2005. – V. 80, №. 10. – P. 1326–1338.
55. Bennett, M. V. L. Electrical coupling and neuronal synchronization in the mammalian brain / M. V. L. Bennett, R. S. Zukin // *Neuron*. – 2004. – V. 41, №. 4. – P. 495–511.
56. Bernardinelli, Y. Astrocytes generate Na⁺-mediated metabolic waves / Y. Bernardinelli, P. J. Magistretti, J. Y. Chatton // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – V. 101, №. 41. – P. 14937–14942.
57. Beyer, E. C. Connexin mutants and cataracts / E. C. Beyer, L. Ebihara, V. M. Berthoud // *Front Pharmacol*. – 2013. – V. 4. – P. 43.

58. Blanc, E. M. Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca²⁺ homeostasis and cell death / E. M. Blanc, A. J. Bruce-Keller, M. P. Mattson // *Journal of neurochemistry*. – 1998. – V. 70, №. 3. – P. 958–970.

59. Blomstrand, F. Kinetics of endothelin-induced inhibition and glucose permeability of astrocyte gap junctions / F. Blomstrand, C. Giaume // *Journal of neuroscience research*. – 2006. – V. 83, №. 6. – P. 996–1003.

60. Bozzola, J. J. *Electron Microscopy: principles and techniques for biologists* / J. J. Bozzola, L. D. Russel. – Boston : Jones and Bastlett Publishers, 1992. – 542 p.

61. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles / G. R. J. Gordon, H. B. Choi, R. L. Rungta et al. // *Nature*. – 2008. – V. 456, №. 7223. – P. 745–749.

62. Brecht, M. Dynamic representation of whisker deflection by synaptic potentials in spiny stellate and pyramidal cells in the barrels and septa of layer 4 rat somatosensory cortex / M. Brecht, B. Sakmann // *The Journal of physiology*. – 2002. – V. 543, №. 1. – P. 49–70.

63. Brecht, M. Whisker maps of neuronal subclasses of the rat ventral posterior medial thalamus, identified by whole-cell voltage recording and morphological reconstruction / M. Brecht, B. Sakmann // *The Journal of Physiology*. – 2002. – V. 538, №. 2. – P. 495–515.

64. Bruzzone, R. Structure and function of gap junctions in the developing brain / R. Bruzzone, R. Dermietzel // *Cell and tissue research*. – 2006. – V. 326, №. 2. – P. 239–248.

65. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex / T. A. Weissman, P. A. Riquelme, L. Ivic et al. // *Neuron*. – 2004. – V. 43, №. 5. – P. 647–661.

66. Canine distemper virus persistence in demyelinating encephalitis by swift intracellular cell-to-cell spread in astrocytes is controlled by the viral

attachment protein / G. Wyss-Fluehmann, A. Zurbriggen, M. Vandeveld, P. Plattet // *Acta Neuropathol.* – 2010. – V. 119. – P. 617–630.

67. Cell type-specific three-dimensional structure of thalamocortical circuits in a column of rat vibrissal cortex / M. Oberlaender, C. P. D. de Kock, R. Bruno et al. // *Cerebral cortex.* – 2012. – V. 22, № 10. – P. 2375–2391.

68. Changes in neuronal migration in neocortex of connexin43 null mutant mice / S. Fushiki, J. L. P. Velazquez, L. Zhang et al. // *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.* – 2003. – V. 62, № 3. – P. 304–314.

69. Characterization of panglial gap junction networks in the thalamus, neocortex, and hippocampus reveals a unique population of glial cells / S. Griemsmann, S. P. Höft, P. Bedner et al. // *Cerebral Cortex.* – 2015. – V. 25, № 10. – P. 3420–3433.

70. Chausson, P. Dynamics of intrinsic dendritic calcium signaling during tonic firing of thalamic reticular neurons / P. Chausson, N. Leresche, R. C. Lambert // *PLoS One.* – 2013. – V. 8, № 8. – P. e72275.

71. Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons / D. F. Condorelli, R. Parenti, F. Spinella et al. // *European Journal of Neuroscience.* – 1998. – V. 10, № 3. – P. 1202–1208.

72. Connexin 43 astrocytopathy linked to rapidly progressive multiple sclerosis and neuromyelitis optica / K. Masaki, S. O. Suzuki, T. Matsushita et al. // *PLoS One.* – 2013. – V. 8, № 8. – P. e72919.

73. Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells / J. H. C. Lin, T. Takano, M. L. Cotrina et al. // *Journal of Neuroscience.* – 2002. – V. 22, № 11. – P. 4302–4311.

74. Connexin 47 (Cx47)-deficient mice with enhanced green fluorescent protein reporter gene reveal predominant oligodendrocytic expression of Cx47 and display vacuolized myelin in the CNS / B. Odermatt, K. Wellershaus, A. Wallraff et al. // *Journal of Neuroscience.* – 2003. – V. 23, № 11. – P. 4549–4559.

75. Connexin and pannexin mediated cell-cell communication / E. Scemes, S. O. Suadicani, G. Dahl, D. C. Spray // *Neuron glia biology*. – 2007. – V. 3, № 3. – P. 199.
76. Connexin expression by radial glia-like cells is required for neurogenesis in the adult dentate gyrus / A. Kunze, M. R. Congreso, C. Hartmann et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – V. 106, № 27. – P. 11336–11341.
77. Connexin expression in electrically coupled postnatal rat brain neurons / L. Venance, A. Rozov, M. Blatow et al. // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 2000. – V. 97, № 18. – P. 10260–10265.
78. Connexin29 and connexin32 at oligodendrocyte and astrocyte gap junctions and in myelin of the mouse central nervous system / J. I. Nagy, A. V. Ionescu, B. D. Lynn, J. E. Rash // *Journal of Comparative Neurology*. – 2003. – V. 464, № 3. – P. 356–370.
79. Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential / B. Teubner, V. Michel, J. Pesch et al. // *Human molecular genetics*. – 2003. – V. 12, № 1. – P. 13–21.
80. Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance / J. I. Nagy, D. Patel, P. A. Ochalski, G. L. Stelmack // *Neuroscience*. – 1999. – V. 88, № 2. – P. 447–468.
81. Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS / S. S. Scherer, S. M. Deschênes, Y. T. Xu et al. // *Journal of Neuroscience*. – 1995. – V. 15, № 12. – P. 8281–8294.
82. Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy / S. S. Scherer, Y. T. Xu, E. Nelles et al. // *Glia*. – 1998. – V. 24, № 1. – P. 8–20.
83. Connexin43 forms supramolecular complexes through non-overlapping binding sites for drebrin, tubulin, and ZO-1 / C. Ambrosi, C. Ren, G. Spagnol et al. // *PloS one*. – 2016. – V. 11, № 6. – P. e0157073.

84. Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning / N. Kamasawa, A. Sik, M. Morita et al. // *Neuroscience*. – 2005. – V. 136, №. 1. – P. 65–86.
85. Connexins: synthesis, post-translational modifications, and trafficking in health and disease / T. Aasen, S. Johnstone, L. Vidal-Brime et al. // *International journal of molecular sciences*. – 2018. – V. 19, № 5. – P. 1296.
86. Connors, B. W. Electrical synapses in the mammalian brain / B. W. Connors, M. A. Long // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2004. – V. 27. – P. 393–418.
87. Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas / R. Oliveira, C. Christov, J. S. Guillamo et al. // *BMC cell biology*. – 2005. – V. 6, №. 1. – P. 7.
88. Corticostriatal projections from rat barrel cortex have an anisotropic organization that correlates with vibrissal whisking behavior / K. D. Alloway, J. Crist, J. J. Mutic, S. A. Roy // *Journal of Neuroscience*. – 1999. – V. 19, №. 24. – P. 10908–10922.
89. Coupling in rat hippocampal slices: dye transfer between CA1 pyramidal cells / R. D. Andrew, C. P. Taylor, R. W. Snow, F. E. Dudek // *Brain research bulletin*. – 1982. – V. 8, №. 2. – P. 211–222.
90. Cox, C. L. Nucleus reticularis neurons mediate diverse inhibitory effects in thalamus / C. L. Cox, J. R. Huguenard, D. A. Prince // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. – V. 94, №. 16. – P. 8854–8859.
91. Cuzon Carlson, V. C. GABAA receptor subunit profiles of tangentially migrating neurons derived from the medial ganglionic eminence / V. C. Cuzon Carlson, H. H. Yeh // *Cerebral Cortex*. – 2011. – V. 21, №. 8. – P. 1792–1802.

92. Cx36 makes channels coupling human pancreatic β -cells, and correlates with insulin expression / V. Serre-Beinier, D. Bosco, L. Zulianello et al. // *Human molecular genetics*. – 2009. – V. 18, № 3. – P. 428–439.

93. Cytoplasmic and nuclear localization of myelin basic proteins reveals heterogeneity among oligodendrocytes / R. J. Hardy, R. A. Lazzarini, D. R. Colman, V. L. Friedrich Jr. // *Journal of neuroscience research*. – 1996. – V. 46, № 2. – P. 246–257.

94. Dandy-Walker malformation in patients with KID syndrome associated with a heterozygote mutation (p. Asp50Asn) in the GJB2 gene encoding connexin 26 / I. Todt, J. Mazereeuw-Hautier, B. Binder, P. J. Willems // *Clinical genetics*. – 2009. – V. 76, № 4. – P. 404–408.

95. de N3, R. L. Recovery cycle of motoneurons / R. L. de N3, H. T. Graham // *American Journal of Physiology-Legacy Content*. – 1938. – V. 123, № 2. – P. 388–399.

96. Defective vascular development in connexin 45-deficient mice / O. Kruger, A. Plum, J. S. Kim et al. // *Development*. – 2000. – V. 127, № 19. – P. 4179–4193.

97. Degradation of gap junction connexins is regulated by the interaction with Cx43-interacting protein of 75 kDa (CIP75) / J. L. Kopanic, B. Schlingmann, M. Koval et al. // *Biochemical Journal*. – 2015. – V. 466, № 3. – P. 571–585.

98. Deletion of astrocyte connexins 43 and 30 leads to a dysmyelinating phenotype and hippocampal CA1 vacuolation / S. E. Lutz, Y. Zhao, M. Gulinello et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2009. – V. 29, № 24. – P. 7743–7752.

99. Dense and overlapping innervation of pyramidal neurons by chandelier cells / M. Inan, L. Blázquez-Llorca, A. Merchán-Pérez et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2013. – V. 33, № 5. – P. 1907–1914.

100. Dere E. Gap junctions in the brain: physiological and pathological roles / E. Dere. – Academic Press, 2012. – 304 p.

101. Dere, E. The role of gap junctions in the brain in health and disease / E. Dere, A. Zlomuzica // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2012. – V. 36, № 1. – P. 206–217.
102. Differential anatomical and cellular patterns of connexin43 expression during postnatal development of rat brain / T. Yamamoto, J. Vukelic, E. L. Hertzberg, J. I. Nagy // *Developmental brain research*. – 1992. – V. 66, № 2. – P. 165–180.
103. Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues / R. Dermietzel, O. Traub, T. K. Hwang et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1989. – V. 86, № 24. – P. 10148–10152.
104. Direct gap junction communication between malignant glioma cells and astrocytes / W. Zhang, W. T. Couldwell, M. F. Simard et al. // *Cancer research*. – 1999. – V. 59, № 8. – P. 1994–2003.
105. Druga, R. Neocortical inhibitory system / R. Druga // *Folia Biol (Praha)*. – 2009. – V. 55, № 6. – P. 201–217.
106. Dunn, K. M. Potassium channels and neurovascular coupling / K. M. Dunn, M. T. Nelson // *Circulation Journal*. – 2010. – P. 1003120644–1003120644.
107. Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus / C. E. Landisman, M. A. Long, M. Beierlein et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2002. – V. 22, № 3. – P. 1002–1009.
108. Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks / S. G. Hormuzdi, M. A. Filippov, G. Mitropoulou et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2004. – V. 1662, № 1-2. – P. 113–137.
109. Elevated connexin43 immunoreactivity at sites of amyloid plaques in Alzheimer's disease / J. I. Nagy, D. Patel, P. A. Ochalski, G. L. Stelmack // *Brain research*. – 1996. – V. 717, № 1-2. – P. 173–178.

110. Elias, L. A. B. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex / L. A. B. Elias, D. D. Wang, A. R. Kriegstein // *Nature*. – 2007. – V. 448, №. 7156. – P. 901–907.
111. Eng, L. F. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000) / L. F. Eng // *Neurochem Res*, 200. – 25. – P. 1439–1451.
112. ERp29 restricts Connexin43 oligomerization in the endoplasmic reticulum / S. Das, T. D. Smith, J. Das Sarma et al. // *Molecular biology of the cell*. – 2009. – V. 20, №. 10. – P. 2593–2604.
113. Expression of connexin36 in the adult and developing rat brain / N. Belluardo, G. Mudò, A. Trovato-Salinaro et al. // *Brain research*. – 2000. – V. 865, №. 1. – P. 121–138.
114. Expression of connexin43 mRNA in adult rodent brain / E. Simbürger, A. Stang, M. Kremer, R. Dermietzel // *Histochemistry and cell biology*. – 1997. – V. 107, №. 2. – P. 127–137.
115. Expression of connexins in embryonic mouse neocortical development / C. Cina, J. F. Bechberger, M. A. Ozog, C. C. G. Naus // *Journal of Comparative Neurology*. – 2007. – V. 504, №. 3. – P. 298–313.
116. Expression of Cx36 in mammalian neurons / D. Condorelli, F. N. Belluardo, A. Trovato-Salinaro, G. Mudò // *Brain Research Reviews*. – 2000. – V. 32, №. 1. – P. 72–85.
117. Expression of gap junction protein connexin36 in multiple subtypes of GABAergic neurons in adult rat somatosensory cortex / Y. Ma, H. Hioki, M. Konno et al. // *Cerebral cortex*. – 2011. – V. 21, №. 11. – P. 2639–2649.
118. Extensive dysregulations of oligodendrocytic and astrocytic connexins are associated with disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model / Y. Cui, K. Masaki, R. Yamasaki et al. // *Journal of neuroinflammation*. – 2014. – V. 11, №. 1. – P. 42.
119. Falk, M. M. Degradation of connexins and gap junctions / M. M. Falk, R. M. Kells, V. M. Berthoud // *FEBS letters*. – 2014. – V. 588, №. 8. – P. 1221–1229.

120. Feldmeyer, D. Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex / D. Feldmeyer // *Frontiers in neuroanatomy*. – 2012. – V. 6. – P. 24.
121. Fields, R. D. Purinergic signalling in neuron–glia interactions / R. D. Fields, G. Burnstock // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2006. – V. 7, № 6. – P. 423–436.
122. Fonseca, C. G. Upregulation in astrocytic connexin 43 gap junction levels may exacerbate generalized seizures in mesial temporal lobe epilepsy / C. G. Fonseca, C. R. Green, L. F. B. Nicholson // *Brain research*. – 2002. – V. 929, № 1. – P. 105–116.
123. Fukuda, T. Gap junctions linking the dendritic network of GABAergic interneurons in the hippocampus / T. Fukuda, T. Kosaka // *Journal of Neuroscience*. – 2000. – V. 20, № 4. – P. 1519–1528.
124. Fukuda, T. Ultrastructural study of gap junctions between dendrites of parvalbumin-containing GABAergic neurons in various neocortical areas of the adult rat / T. Fukuda, T. Kosaka // *Neuroscience*. – 2003. – V 120, № 1. – P. 5–20.
125. Functional defects of Cx26 resulting from a heterozygous missense mutation in a family with dominant deaf-mutism and palmoplantar keratoderma / G. Richard, T. W. White, L. E. Smith et al. // *Human genetics*. – 1998. – V. 103, № 4. – P. 393–399.
126. Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina / S. Hombach, U. Janssen-Bienhold, G. Söhl et al. // *European Journal of Neuroscience*. – 2004. – V. 19, № 10. – P. 2633–2640.
127. Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein / B. Teubner, J. Degen, G. Söhl et al. // *The Journal of membrane biology*. – 2000. – V. 176, № 3. – P. 249–262.
128. Functional properties of channels formed by the neuronal gap junction protein connexin 36 / M. Srinivas, R. Rozental, T. Kojima et al. // *Journal of Neuroscience*. – 1999. – V. 19, № 22. – P. 9848–9855.
129. GABAergic parvalbumin-immunoreactive large calyciform presynaptic complexes in the reticular nucleus of the rat thalamus / B. Csillik,

A. Mihály, B. Krisztin-Pévay et al. // *Journal of chemical neuroanatomy*. – 2005. – V. 30, №. 1. – P. 17–26.

130. Galarreta, M. A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses / M. Galarreta, S. Hestrin // *Nature*. – 1999. – V. 402, №. 6757. – P. 72–75.

131. Galarreta, M. Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast-spiking GABAergic interneurons in adult mouse neocortex / M. Galarreta, S. Hestrin // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – V. 99, №. 19. – P. 12438–12443.

132. Galarreta, M. Spike transmission and synchrony detection in networks of GABAergic interneurons / M. Galarreta, S. Hestrin // *Science*. – 2001. – V. 292, №. 5525. – P. 2295–2299.

133. Gap junction proteins and their role in spinal cord injury / R. S. Tonkin, Y. Mao, S. J. O'Carroll et al. // *Frontiers in molecular neuroscience*. – 2015. – V. 7. – P. 102.

134. Gap junction structures: Analysis of the x-ray diffraction data / L. Makowski, D. L. Caspar, W. C. Phillips, D. A. Goodenough // *The Journal of cell biology*. – 1977. – V. 74, №. 2. – P. 629–645.

135. Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex / V. Houades, A. Koulakoff, P. Ezan et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2008. – V. 28, №. 20. – P. 5207–5217.

136. Gap junctions among dendrites of cortical GABAergic neurons establish a dense and widespread intercolumnar network / T. Fukuda, T. Kosaka, W. Singer, R. A. W. Galuske // *Journal of Neuroscience*. – 2006. – V. 26, №. 13. – P. 3434–3443.

137. Gap junctions compensate for sublinear dendritic integration in an inhibitory network / K. Vervaeke, A. Lőrincz, Z. Nusser, R. A. Silver // *Science*. – 2012. – V. 335, №. 6076. – P. 1624–1628.

138. Gap Junctions in the Composition of Neurogliovascular Ensembles in Rat Cortical Barrel Columns / E. Y. Kirichenko, P. E. Povilyaitis, A. K. Logvinov et al. // *Cell and Tissue Biology*. – 2018. – V. 12, № 6. – P. 477–483.
139. Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca²⁺ increases between chromaffin cells in adrenal slices: a role in catecholamine release / A. O. Martin, Marie-Noëlle Mathieu, C. Chevillard, N. C. Guérineau // *Journal of Neuroscience*. – 2001. – V. 21, № 15. – P. 5397–5405.
140. Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures / M. M. Froes, A. H. Correia, J. Garcia-Abreu et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – V. 96, № 13. – P. 7541–7546.
141. Genomic organization and chromosomal localization of the mouse Connexin36 (mCx36) gene / F. Cicirata, R. Parenti, F. Spinella et al. // *Gene*. – 2000. – V. 251, № 2. – P. 123–130.
142. Geschwind, M. D. Prion diseases / M. D. Geschwind // *Neuroinfectious Disease*. Minneapolis, Minn. – 2015. – P. 1612–38.
143. Giaume, C. Astroglial wiring is adding complexity to neuroglial networking / C. Giaume // *Frontiers in neuroenergetics*. – 2010. – V. 2. – P. 129.
144. Giaume, C. From a glial syncytium to a more restricted and specific glial networking / C. Giaume, X. Liu // *Journal of Physiology-Paris*. – 2012. – V. 106, № 1-2. – P. 34–39.
145. Giaume, C. Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions / C. Giaume, A. Taberner, J. M. Medina // *Glia*. – 1997. – V. 21, № 1. – P. 114–123.
146. Gibson, J. R. Functional properties of electrical synapses between inhibitory interneurons of neocortical layer 4 / J. R. Gibson, M. Beierlein, B. W. Connors // *Journal of neurophysiology*. – 2005. – V. 93. – P. 467–480.
147. Gibson, J. R. Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex / J. R. Gibson, M. Beierlein, B. W. Connors // *Nature*. – 1999. – V. 402, № 6757. – P. 75–79.

148. GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the oculodentodigital dysplasia phenotype / W. A. Paznekas, B. Karczeski, S. Vermeer et al. // *Human mutation*. – 2009. – V. 30, № 5. – P. 724–733.
149. Golding, N. L. Dendritic sodium spikes are variable triggers of axonal action potentials in hippocampal CA1 pyramidal neurons / N. L. Golding, N. Spruston // *Neuron*. – 1998. – V. 21, №. 5. – P. 1189–1200.
150. González, D. Molecular basis of voltage dependence of connexin channels: an integrative appraisal / D. González, J. M. Gómez-Hernández, L. C. Barrio // *Progress in biophysics and molecular biology*. – 2007. – V. 94, №. 1-2. – P. 66–106.
151. Goodenough, D. A. Bulk isolation of mouse hepatocyte gap junctions: Characterization of the principal protein, connexin / D. A. Goodenough // *The Journal of cell biology*. – 1974. – V. 61, №. 2. – P. 557.
152. Goodenough, D. A. Methods for the isolation and structural characterization of hepatocyte gap junctions / D. A. Goodenough // *Methods in membrane biology*. – Springer, Boston, MA, 1975. – P. 51–80.
153. Gray, C. M. The temporal correlation hypothesis of visual feature integration: still alive and well / C. M. Gray // *Neuron*. – 1999. – V. 24, №. 1. – P. 31–47.
154. Growth retardation in glioma cells cocultured with cells overexpressing a gap junction protein / D. Zhu, G. M. Kidder, S. Caveney, C. C. Naus // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1992. – V. 89, № 21. – P. 10218–10221.
155. Guillery, R. W. Structure and connections of the thalamic reticular nucleus: advancing views over half a century / R. W. Guillery, J. K. Harting // *Journal of Comparative Neurology*. – 2003. – V. 463, №. 4. – P. 360–371.
156. Haas, J. S. Activity-dependent long-term depression of electrical synapses / J. S. Haas, B. Zavala, C. E. Landisman // *Science*. – 2011. – V. 334, № 6054. – P. 389–393.

157. Haidarliu, S. Size gradients of barreloids in the rat thalamus / S. Haidarliu, E. Ahissar // *Journal of comparative neurology*. – 2001. – V. 429, №. 3. – P. 372–387.
158. Henderson, T. A. What makes subcortical barrels? / T. A. Henderson, M. F. Jacquin // *The barrel cortex of rodents*. – Springer, Boston, MA, 1995. – P. 123–187.
159. Herrmann, H. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics / H. Herrmann, U. Aebi // *Current opinion in cell biology*. – 2000. – V. 12, №. 1. – P. 79–90.
160. Heterogeneity in expression of functional ionotropic glutamate and GABA receptors in astrocytes across brain regions: insights from the thalamus / S. Höft, S. Griemsmann, G. Seifert, C. Steinhäuser // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2014. – V. 369, №. 1654. – P. 20130602.
161. Heteromeric, but not homomeric, connexin channels are selectively permeable to inositol phosphates / W. A. Ayad, D. Locke, I. V. Koren, A. L. Harris // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – V. 281, №. 24. – P. 16727–16739.
162. Hinrichsen, C. F. L. Synapses and cluster formation of the mouse mesencephalic fifth nucleus / C. F. L. Hinrichsen, L. M. H. Larramendi // *Brain Research*. – 1968. – V. 7, №. 2. – P. 296–299.
163. Horton, J. C. The cortical column: a structure without a function / J. C. Horton, D. L. Adams // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2005. – V. 360, №. 1456. – P. 837–862.
164. Hu, H. Fast-spiking, parvalbumin⁺ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function / H. Hu, J. Gan, P. Jonas // *Science*. – 2014. – V. 345, №. 6196. – P. 1255263–1255263.

165. Hubel, D. H. Function architecture of macaque monkey visual cortex, Ferrier Lecture / D. H. Hubel // Proc. R. Soc. Lond., B. – 1977. – V. 198. – P. 1–59.
166. Huusko, N. Parvalbumin immunoreactivity and expression of GABAA receptor subunits in the thalamus after experimental TBI / N. Huusko, A. Pitkänen // Neuroscience. – 2014. – V. 267. – P. 30–45.
167. Identification of cells expressing Cx43, Cx30, Cx26, Cx32 and Cx36 in gap junctions of rat brain and spinal cord / J. E. Rash, T. Yasumura, K. G. Davidson et al. // Cell communication & adhesion. – 2001. – V. 8, № 4-6. – P. 315–320.
168. Identification of connexin36 in gap junctions between neurons in rodent locus coeruleus / J. E. Rash, C. O. Olson, K. G. V. Davidson et al. // Neuroscience. – 2007. – V. 147, № 4. – P. 938–956.
169. Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs / C. C. J. Lin, K. Yu, A. Hatcher et al. // Nature neuroscience. – 2017. – V. 20, № 3. – P. 396–405.
170. Immunohistochemical detection of the neuronal connexin36 in the mouse central nervous system in comparison to connexin36-deficient tissues / C. Meier, E. Petrasch-Parwez, Hans-Werner Habbes et al. // Histochemistry and cell biology. – 2002. – V. 117, № 6. – P. 461–471.
171. Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice / S. G. Hormuzdi, I. Pais, F. E. LeBeau et al. // Neuron. – 2001. – V. 31, № 3. – P. 487–495.
172. Inhibitory effect of mouse neocortex layer I on the underlying cellular network / D. Shlosberg, S. L. Patrick, Y. Buskila, Y. Amitai // European Journal of Neuroscience. – 2003. – V. 18, № 10. – P. 2751–2759.
173. Innexin-3 forms connexin-like intercellular channels / Y. Landesman, T. W. White, T. A. Starich et al. // Journal of Cell Science. – 1999. – V. 112, № 14. – P. 2391–2396.

174. Insight into the PrPC→ PrPSc conversion from the structures of antibody-bound ovine prion scrapie-susceptibility variants / F. Eghiaian, J. Grosclaude, S. Lesceu et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – V. 101, №. 28. – P. 10254–10259.

175. Interactions with astroglia influence the shape of the developing dendritic arbor and restrict dendrite growth independent of promoting synaptic contacts / G. S. Withers, J. R. Farley, J. R. Sterritt et al. // PloS one. – 2017. – V. 12, № 1. – P. e0169792.

176. Ivy, G. O. Ephemeral cellular segmentation in the thalamus of the neonatal rat / G. O. Ivy, H. P. Killackey // Developmental Brain Research. – 1981. – V. 2, №. 1. – P. 1–17.

177. Jones, E. G. The core and matrix of thalamic organization / E. G. Jones // Neuroscience. – 1998. – V. 85, №. 2. – P. 331–345.

178. K⁺-induced reversal of astrocyte glutamate uptake is limited by compensatory changes in intracellular Na⁺ / M. C. Longuemare, C. R. Rose, K. Farrell et al. // Neuroscience. – 1999. – V. 93, № 1. – P. 285–292.

179. Keller, A. Neonatal whisker clipping alters intracortical, but not thalamocortical projections, in rat barrel cortex / A. Keller, G. C. Carlson // Journal of Comparative Neurology. – 1999. – V. 412, №. 1. – P. 83–94.

180. Kepes, J. J. Pleomorphic xanthoastrocytoma: A distinctive meningocerebral glioma of young subjects with relatively favorable prognosis a study of 12 cases / J. J. Kepes, L. J. Rubinstein, L. F. Eng // Cancer. – 1979. – V. 44, № 5. – P. 1839–1852.

181. Kies, M. W. Myelin basic protein / M. W. Kies // Scandinavian Journal of Immunology. – 1982. – V. 15. – P. 125–146.

182. Kirichenko, E. Y. Role of gap junctions in local rhythmogenesis in cortical columns / E. Y. Kirichenko, P. E. Povilaitite, A. G. Sukhov // Neuroscience and behavioral physiology. – 2009. – V. 39, №. 2. – P. 199–202.

183. Kirichenko, E. Y. Ultrastructural study of glial gap junctions in the thalamic nuclei of rat / E. Y. Kirichenko, G. A. Churyumova, A. K. Logvinov //

Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2016. – V. 10, № 3. – P. 207–217.

184. Kivrak, B. G. Development of the principal nucleus trigeminal lemniscal projections in the mouse / B. G. Kivrak, R. S. Erzurumlu // Journal of Comparative Neurology. – 2013. – V. 521, № 2. – P. 299–311.

185. Kleopa, K. A. How do mutations in GJB1 cause X-linked Charcot – Marie – Tooth disease? / K. A. Kleopa, C. K. Abrams, S. S. Scherer // Brain research. – 2012. – V. 1487. – P. 198–205.

186. Korn, H. Electrotonic coupling between neurons in the rat lateral vestibular nucleus / H. Korn, C. Sotelo, F. Crepel // Experimental Brain Research. – 1973. – V. 16, № 3. – P. 255–275.

187. Koulakoff, A. Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes / A. Koulakoff, P. Ezan, C. Giaume // Glia. – 2008. – V. 56, № 12. – P. 1299–1311.

188. Kozoriz, M. G., Bates, D. C., Bond, S. R., Lai, C. P. K., Moniz, D. M. Passing potassium with and without gap junctions / M. G. Kozoriz, D. C. Bates, S. R. Bond et al. // Journal of Neuroscience. – 2006. – V. 26, № 31. – P. 8023–8024.

189. Laird, D. W. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation / D. W. Laird // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2005. – V. 1711, № 2. – P. 172–182.

190. Lam Y. W. Functional topographic organization of the motor reticulothalamic pathway / Y. W. Lam, S. M. Sherman // Journal of neurophysiology. – 2015. – V. 113, № 9. – P. 3090–3097.

191. Lam, Y. W. Functional organization of the thalamic input to the thalamic reticular nucleus / Y. W. Lam, S. M. Sherman // Journal of Neuroscience. – 2011. – V. 31, № 18. – P. 6791–6799.

192. Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes /

P. Kunzelmann, W. Schröder, O. Traub et al. // *Glia*. – 1999. – V. 25, № 2. – P. 111–119.

193. Lee, S. C. Electrical and chemical synapses between relay neurons in developing thalamus / S. C. Lee, S. J. Cruikshank, B. W. Connors // *The Journal of Physiology*. – 2010. – V. 588, № 13. – P. 2403–2415.

194. Liu, X. B. Fine structural localization of connexin-36 immunoreactivity in mouse cerebral cortex and thalamus / X. B. Liu, E. G. Jones // *Journal of comparative neurology*. – 2003. – V. 466, № 4. – P. 457–467.

195. Logvinov, A. K. Laminar distribution of gap-junctions in rat somatic cortical columns / A. K. Logvinov, E. Y. Kirichenko, P. E. Povilaitite // *Journal of integrative neuroscience*. – 2009. – V. 8, № 04. – P. 425–431.

196. Long, M. A. Small clusters of electrically coupled neurons generate synchronous rhythms in the thalamic reticular nucleus / M. A. Long, C. E. Landisman, B. W. Connors // *Journal of Neuroscience*. – 2004. – V. 24, № 2. – P. 341–349.

197. Loss of connexin36 channels alters β -cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca^{2+} and insulin oscillations, and basal insulin release / M. A. Ravier, M. Güldenagel, A. Charollais et al. // *Diabetes*. – 2005. – V. 54, № 6. – P. 1798–1807.

198. Lübke, J. Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex / J. Lübke, D. Feldmeyer // *Brain Structure and Function*. – 2007. – V. 212, № 1. – P. 3–17.

199. Martina, M. Distal initiation and active propagation of action potentials in interneuron dendrites / M. Martina, I. Vida, P. Jonas // *Science*. – 2000. – V. 287, № 5451. – P. 295–300.

200. Maza, J. Defining a minimal motif required to prevent connexin oligomerization in the endoplasmic reticulum / J. Maza, J. D. Sarma, M. Koval // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – V. 280, № 22. – P. 21115–21121.

201. Mc Alonan, K. The thalamic reticular nucleus: more than a sensory nucleus? / K. Mc Alonan, V. J. Brown // *The Neuroscientist*. – 2002. – V. 8, № 4. – P. 302–305.
202. McCarthy, K. M. Pseudorabies Virus Infection Alters Neuronal Activity and Connectivity In Vitro / K. M. McCarthy, D. W. Tank, L. W. Enquist // *PLoS Pathog.* – 2009. – V. 5, № 10. – P. e1000640.
203. Micevych, P. E. Distribution of mRNAs coding for liver and heart gap junction proteins in the rat central nervous system / P. E. Micevych, L. Abelson // *Journal of Comparative Neurology*. – 1991. – V. 305, № 1. – P. 96–118.
204. Mixed electrical–chemical synapses in adult rat hippocampus are primarily glutamatergic and coupled by connexin-36 / F. Hamzei-Sichani, K. G. V. Davidson, T. Yasumura et al. // *Frontiers in neuroanatomy*. – 2012. – V. 6. – P. 13.
205. Molecular and functional properties of regional astrocytes in the adult brain / L. Morel, M. S. R. Chiang, H. Higashimori et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2017. – V. 37, № 36. – P. 8706–8717.
206. Mountcastle, V. B. Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex / V. B. Mountcastle // *Journal of neurophysiology*. – 1957. – V. 20, № 4. – P. 408–434.
207. mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory / W. Huang, P. J. Zhu, S. Zhang et al. // *Nature neuroscience*. – 2013. – V. 16, № 4. – P. 441–448.
208. Mulligan, S. J. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions / S. J. Mulligan, B. A. MacVicar // *Nature*. – 2004. – V. 431, № 7005. – P. 195–199.
209. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking / G. Gaietta, T. J. Deerinck, S. R. Adams et al. // *Science*. – 2002. – V. 296, № 5567. – P. 503–507.
210. Nagy, J. I. Astrocyte and oligodendrocyte connexins of the glial syncytium in relation to astrocyte anatomical domains and spatial buffering /

J. I. Nagy, J. E. Rash // *Cell communication & adhesion*. – 2003. – V. 10, № 4-6. – P. 401–406.

211. Nagy, J. I. Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS / J. I. Nagy, J. E. Rash // *Brain research reviews*. – 2000. – V. 32, № 1. – P. 29–44.

212. Nagy, J. I. Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system / J. I. Nagy, F. E. Dudek, J. E. Rash // *Brain Research Reviews*. – 2004. – V. 47, № 1-3. – P. 191–215.

213. Naus, C. An anterograde HRP-WGA study of aberrant corticorubral projections following neonatal lesions of the rat sensorimotor cortex / C. Naus, B. A. Flumerfelt, A. W. Hryciyshyn // *Experimental brain research*. – 1985. – V. 59, № 2. – P. 365–371.

214. Naus, C. C. Implications and challenges of connexin connections to cancer / C. C. Naus, D. W. Laird // *Nature Reviews Cancer*. – 2010. – V. 10, № 6. – P. 435–441.

215. Neural elements containing glutamic acid decarboxylase (GAD) in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat; immunohistochemical studies by light and electron microscopy / P. T. Ohara, A. R. Lieberman, S. P. Hunt, J. Y. Wu // *Neuroscience*. – 1983. – V. 8, № 2. – P. 189–211.

216. Neuronal gap junctions in the mouse main olfactory bulb: morphological analyses on transgenic mice / T. Kosaka, M. R. Deans, D. L. Paul, K. Kosaka // *Neuroscience*. – 2005. – V. 134, № 3. – P. 757–769.

217. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex / S. C. Noctor, A. C. Flint, T. A. Weissman et al. // *Nature*. – 2001. – V. 409, № 6821. – P. 714–720.

218. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons / J. DeFelipe, P. L. López-Cruz, R. Benavides-Piccione et al. // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2013. – V. 14, № 3. – P. 202–216.

219. Nishida, H. Direct astrocytic contacts regulate local maturation of dendritic spines / H. Nishida, S. Okabe // *Journal of Neuroscience*. – 2007. – V. 27, № 2. – P. 331–340.
220. Nualart-Marti, A. Gap junction communication in myelinating glia / A. Nualart-Marti, C. Solsona, R. D. Fields // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2012. – V. 1828, № 1. – P. 69–78.
221. Nuriya, M. Diffusion properties of molecules at the blood–brain interface: potential contributions of astrocyte endfeet to diffusion barrier functions / M. Nuriya, T. Shinotsuka, M. Yasui // *Cerebral Cortex*. – 2013. – V. 23, № 9. – P. 2118–2126.
222. On the organization of astrocytic gap junctions in rat brain as suggested by LM and EM immunohistochemistry of connexin43 expression / T. Yamamoto, A. Ochalski, E. L. Hertzberg, J. I. Nagy // *Journal of Comparative Neurology*. – 1990. – V. 302, № 4. – P. 853–883.
223. Orkand, R. K. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia / R. K. Orkand, J. G. Nicholls, S. W. Kuffler // *Journal of neurophysiology*. – 1966. – V. 29, № 4. – P. 788–806.
224. Orthmann-Murphy, J. L. Gap junctions couple astrocytes and oligodendrocytes / J. L. Orthmann-Murphy, C. K. Abrams, S. S. Scherer // *Journal of Molecular Neuroscience*. – 2007. – V. 35, № 1. – P. 101–116.
225. Oyamada, M. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms / M. Oyamada, K. Takebe, Y. Oyamada // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2013. – V. 1828, № 1. – P. 118–133.
226. Oyamada, M.. Regulation of connexin expression / M. Oyamada, Y. Oyamada, T. Takamatsu // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2005. – V. 1719, № 1-2. – P. 6–23.
227. Panglial gap junctional communication is essential for maintenance of myelin in the CNS / O. Tress, M. Maglione, D. Mayet al. // *Journal of Neuroscience*. – 2012. – V. 32, № 22. – P. 7499–7518.

228. Pannasch, U. Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior / U. Pannasch, N. Rouach // Trends in neurosciences. – 2013. – V. 36, № 7. – P. 405–417.
229. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain / R. Bruzzone, S. G. Hormuzdi, M. T. Barbe et al. // Proceedings of the national academy of sciences. – 2003. – V. 100, №. 23. – P. 13644–13649.
230. Pathophysiology of gap junctions in the brain / R. Hamdan, M. Yehia, R.S. Talhouk, M.E. El-Sabban // Elsevier Inc.: San Diego, 2013. – P. 31–49.
231. Peculiarities of the cytoarchitectonics and some afferent systems of the parietal cortex / D. Pinault, J. Bourassa, M. Deschênes et al. // Folia morphologica. – 1972. – V. 20, № 2. – P. 161–162.
232. Peinado, A. Immature neocortical neurons exist as extensive syncytial networks linked by dendrodendritic electrical connections / A. Peinado // Journal of Neurophysiology. – 2001. – V. 85, № 2. – P. 620–629.
233. Pellerin, L. Sweet sixteen for ANLS / L. Pellerin, P. J. Magistretti // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 2012. – V. 32, № 7. – P. 1152–1166.
234. Perea, G. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information / G. Perea, M. Navarrete, A. Araque // Trends in neurosciences. – 2009. – V. 32, № 8. – P. 421–431.
235. Pereda, A. E. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses / A. E. Pereda // Nature Reviews Neuroscience. – 2014. – V. 15, № 4. – P. 250–263.
236. Phelan, P. Innexins get into the gap / P. Phelan, T. A. Starich // Bioessays. – 2001. – V. 23, № 5. – P. 388–396.
237. Phelan, P. Innexins get. The axonal arborization of single thalamic reticular neurons in the somatosensory thalamus of the rat / P. Phelan, T. A. Starich // European Journal of Neuroscience. – 1995. – V. 7, № 1. – P. 31–40.

238. Pinault, D. The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept / D. Pinault // *Brain research reviews*. – 2004. – V. 46, № 1. – P. 1–31.
239. Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli / L. Roux, K. Benchenane, J. D. Rothstein et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – V. 108, № 45. – P. 18442–18446.
240. pp60src-mediated phosphorylation of connexin 43, a gap junction protein / L. W. M. Loo, J. M. Berestecky, M. Y. Kanemitsu, A. F. Lau // *Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – V. 270, № 21. – P. 12751–12761.
241. Priest, C. Gap junction proteins in inhibitory neurons of the adult barrel neocortex / C. Priest, J. Alison, A. Thompson // *Somatosensory & motor research*. – 2001. – V. 18, № 4. – P. 245–252.
242. Proteins and mechanisms regulating gap-junction assembly, internalization, and degradation / A. F. Thévenin, T. J. Kowal, J. T. Fong et al. // *Physiology*. – 2013.
243. Proximity of excitatory synapses and astroglial gap junctions in layer IV of the mouse barrel cortex / C. Genoud, V. Houades, R. Kraftsik et al. // *Neuroscience*. – 2015. – V. 291. – P. 241–249.
244. Prusiner, S. B. Prions / S. B. Prusiner // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1998. – V. 95. – P. 13363–13383.
245. Pseudorabies Virus Infection Alters Neuronal Activity and Connectivity In Vitro / Kelly M. McCarthy, David W. Tank, Lynn W. Enquist // *PLoS Pathog*. – 2009. – Vol. 5. – № 10. – P. e1000640.
246. Rakic, P. Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective / P. Rakic // *Glia*. – 2003. – V. 43, № 1. – P. 19–32.
247. Rakic, P. Specification of cerebral cortical areas / P. Rakic // *Science*. – 1988. – V. 241, № 4862. – P. 170–176.
248. Regulation of connexin-43, GFAP, and FGF-2 is not accompanied by changes in astroglial coupling in MPTP-lesioned, FGF-2-treated Parkinsonian mice / M. Rufer, S. B. Wirth, A. Hofer et al. // *Journal of neuroscience research*. – 1996. – V. 46, № 5. – P. 606–617.

249. Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation / N. Toni, Pierre-Alain Buchs, I. Nikonenko et al. // Journal of Neuroscience. – 2001. – V. 21, № 16. – P. 6245–6251.

250. RhoA/ROCK Regulates Prion Pathogenesis by Controlling Connexin 43 Activity / Hee-Jun Kim, Mo-Jong Kim, Mohd Najib Mostafa et al. // International Journal Molecular Science. – 2020. – Vol. 21. – № 4. – P. 1255.

251. RhoA/ROCK Regulates Prion Pathogenesis by Controlling Connexin 43 Activity / H. J. Kim, Mo-Jong Kim, M. N. Mostafa et al. // International journal of molecular sciences. – 2020. – V. 21, №. 4. – P. 1255.

252. Riesner, D. Biochemistry and structure of PrPC and PrPSc / D. Riesner // British medical bulletin. – 2003. – V. 66, № 1. – P. 21–33.

253. Ripple (~ 200-Hz) oscillations in temporal structures / A. Draguhn, R. D. Traub, A. Bibbig, D. Schmitz // Journal of clinical neurophysiology. – 2000. – V. 17, №. 4. – P. 361–376.

254. Robertson, J. D. Ultrastructure of two invertebrate synapses / J. D. Robertson // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. – 1953. – V. 82, № 2. – P. 219–223.

255. Robinson, G. Electron microscopy 2: Tissue preparation, sectioning and staining / G. Robinson, T. Gray // Theory and practice of histological techniques. (eds. Bancroft JD, Stevens A.), Churchill livingstone. – New York, 1990. – P. 525–562.

256. Role of Gap Junctions and Hemichannels in Parasitic Infections / J. L. Vega, M. Subiabre, F. Figueroa et al. // Biomed Res Int. – 2013. – V. 2013. – P. 589130.

257. Role of glial filaments in cells and Tumors of glial origin: a review / J. T. Rutka, M. Murakami, P. B. Dirks et al. // J. Neurosurg. – 1997. – 87. – P. 420–430.

258. Roles of gap junctions, connexins, and pannexins in epilepsy / S. Mylvaganam, M. Ramani, M. Krawczyk, P. L. Carlen // Front Physiol. – 2014. – V. 5. – P. 172.

259. Røttingen, J. Ruled by waves? Intracellular and intercellular calcium signalling / J. Røttingen, J. G. Iversen // *Acta physiologica scandinavica*. – 2000. – V. 169, № 3. – P. 203.
260. Saporta, S. The organization of projections to selected points of somatosensory cortex from the cat ventrobasal complex / S. Saporta, L. Kruger // *Brain research*. – 1979. – V. 178, № 2-3. – P. 275–295.
261. Scemes, E. Calcium waves between astrocytes from Cx43 knockout mice / E. Scemes, R. Dermietzel, D. C. Spray // *Glia*. – 1998. – V. 24, № 1. – P. 65–73.
262. Scheibel, M. E. Patterns of organization in specific and nonspecific thalamic fields / M. E. Scheibel // *The thalamus*. – 1966. – P. 13–46.
263. Scherer, S. S., Wrabetz, L. Molecular mechanisms of inherited demyelinating neuropathies / S. S. Scherer, L. Wrabetz // *Glia*. – 2008. – V. 56, № 14. – P. 1578–1589.
264. Schipke, C. G. Astrocyte responses to neuronal activity / C. G. Schipke, H. Kettenmann // *Glia*. – 2004. – V. 47, № 3. – P. 226–232.
265. Schlaepfer, W. W. Presidential address: neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease / W. W. Schlaepfer // *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. – 1987. – V. 46, № 2. – P. 117–129.
266. Schmitz, D. Axo-axonal coupling: a novel mechanism for ultrafast neuronal communication / D. Schmitz, S. Schuchmann, A. Fisahn et al. // *Neuron*. – 2001. – V. 31, № 5. – P. 831–840.
267. Scita, G. The endocytic matrix / G. Scita, P. P. Di Fiore // *Nature*. – 2010. – V. 463, № 7280. – P. 464–473.
268. Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins / T. W. White, R. Bruzzone, S. Wolfram et al. // *The Journal of cell biology*. – 1994. – V. 125, № 4. – P. 879–892.

269. Selective monoclonal antibody recognition and cellular localization of an unphosphorylated form of connexin43 / J. I. Nagy, W. E. Li, C. Roy et al. // *Experimental cell research*. – 1997. – V. 236, № 1. – P. 127–136.
270. Sequence and phylogenetic analyses of 4 TMS junctional proteins of animals: connexins, innexins, claudins and occludins / V. B. Hua, A. B. Chang, J. H. Tchieu et al. // *The Journal of membrane biology*. – 2003. – V. 194, №. 1. – P. 59–76.
271. Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain / V. Houades, N. Rouach, P. Ezan et al. // *Neuron glia biology*. – 2006. – V. 2, № 1. – P. 3.
272. Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms / A. Ylinen, A. Bragin, Z. Nádasdy et al. // *Journal of Neuroscience*. – 1995. – V. 15, № 1. – P. 30–46.
273. Shigematsu, N. Gap junctions interconnect different subtypes of parvalbumin-positive interneurons in barrels and septa with connectivity unique to each subtype / N. Shigematsu, A. Nishi, T. Fukuda // *Cerebral Cortex*. – 2019. – V. 29, № 4. – P. 1414–1429.
274. Shigeri, Y. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs / Y. Shigeri, R. P. Seal, K. Shimamoto // *Brain Research Reviews*. – 2004. – V. 45, № 3. – P. 250–265.
275. Sjöstrand, F. S. The ultrastructure of the intercalated discs of frog, mouse and guinea pig cardiac muscle / F. S. Sjöstrand, E. Andersson-Cedergren, M. M. Dewey // *Journal of ultrastructure research*. – 1958. – V. 1, № 3. – P. 271–287.
276. Sloper, J. J. An electron microscope study of the commissural connexions of the primate motor complex / J. J. Sloper // *Journal of anatomy*. – 1972. – V. 111, № Pt 3. – P. 503.
277. Sloper, J. J. Gap junctions between dendrites and somata of neurons in the primate sensori-motor cortex / J. J. Sloper, T. P. S. Powell // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*. – 1978. – V. 203, № 1150. – P. 39–47.7

278. Söhl, G. Gap junctions and the connexin protein family / G. Söhl, K. Willecke // *Cardiovascular research*. – 2004. – V. 62, № 2. – P. 228–232.
279. Solan, J. L. Spatio-temporal regulation of connexin43 phosphorylation and gap junction dynamics / J. L. Solan, P. D. Lampe // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2018. – V. 1860, № 1. – P. 83–90.
280. Somatotopic organization in the rat thalamic reticular nucleus / A. Shosaku, Y. Kayama, I. Sumitomo // *Brain research*. – 1984. – V. 311, № 1. – P. 57–63.
281. Soto, C. The intricate mechanisms of neurodegeneration in prion diseases / C. Soto, N. Satani // *Trends in molecular medicine*. – 2011. – V. 17, № 1. – P. 14–24.
282. Spatiotemporal distribution of Connexin45 in the olivocerebellar system / R. S. Van Der Giessen, S. Maxeiner, P. French et al. // *Journal of Comparative Neurology*. – 2006. – V. 495, № 2. – P. 173–184.
283. Spatiotemporal patterns of electrocorticographic very fast oscillations (> 80 Hz) consistent with a network model based on electrical coupling between principal neurons / R. D. Traub, R. Duncan, A. J. C. Russell et al. // *Epilepsia*. – 2010. – V. 51, № 8. – P. 1587–1597.
284. Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice / S. Maxeiner, O. Krüger, K. Schilling et al. // *Neuroscience*. – 2003. – V. 119, № 3. – P. 689–700.
285. Staehelin, I. A. Junctions between living cells / I. A. Staehelin, B. E. Hull // *Scientific American*. – 1978. – V. 238, № 5. – P. 140–153.
286. Steriade, M. Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems / M. Steriade // *Journal of neurophysiology*. – 2001. – V. 86, № 1. – P. 1–39.
287. Steriade, M. Synchronized activities of coupled oscillators in the cerebral cortex and thalamus at different levels of vigilance / M. Steriade // *Cerebral cortex* (New York, NY: 1991). – 1997. – V. 7, № 6. – P. 583–604.

288. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome / K. Willecke, J. Eiberger, J. Degen et al. // *Biological chemistry*. – 2002. – V. 383, № 5. – P. 725–737.
289. Structural organization of the barrel cortex in rats (an immunohistochemical study) / A. K. Logvinov, E. Yu. Kirichenko, P. E. Povilaitite, A. G. Sukhov // *Neuroscience and behavioral physiology*. – 2011. – V. 41, № 1. – P. 6–9.
290. Structure of the connexin 26 gap junction channel at 3.5 Å resolution / S. Maeda, S. Nakagawa, M. Suga et al. // *Nature*. – 2009. – V. 458, № 7238. – P. 597–602.
291. Structure, chromosomal localization, and brain expression of human Cx36 gene / N. Belluardo, A. Trovato-Salinaro, G. Mudò et al. // *Journal of neuroscience research*. – 1999. – V. 57, № 5. – P. 740–752.
292. Stuart, G. J. Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites / G. J. Stuart, B. Sakmann // *Nature*. – 1994. – V. 367, № 6458. – P. 69–72.
293. Suga, M. description of the structural determination procedures of a gap junction channel at 3.5 Å resolution / M. Suga, S. Maeda, S. Nakagawa et al. // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. – 2009. – V. 65, № 8. – P. 758–766.
294. Suzuki, N. Inhibitory neurons in the anterior piriform cortex of the mouse: classification using molecular markers / N. Suzuki, J. M. Bekkers // *Journal of Comparative Neurology*. – 2010. – V. 518, № 10. – P. 1670–1687.
295. Synaptic connections between layer 4 spiny neurone-layer 2/3 pyramidal cell pairs in juvenile rat barrel cortex: physiology and anatomy of interlaminar signalling within a cortical column / D. Feldmeyer, J. Lübke, R. A. Silver, B. Sakmann // *The Journal of physiology*. – 2002. – V. 538, № 3. – P. 803–822.

296. Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin36 / M. R. Deans, J. R. Gibson, C. Sellitto // *Neuron*. – 2001. – V. 31, №. 3. – P. 477–485.
297. Takeuchi, H. Gap junctions and hemichannels composed of connexins: potential therapeutic targets for neurodegenerative diseases / H. Takeuchi, A. Suzumura // *Frontiers in cellular neuroscience*. – 2014. – V. 8. – P. 189.
298. Tam, S. J. Connecting vascular and nervous system development: angiogenesis and the blood–brain-barrier/ S. J. Tam, R. J. Watts // *Annu Rev Neurosci*. – 2010. – V. 33. – P. 379–408.
299. Thalamocortical innervation pattern in mouse auditory and visual cortex: laminar and cell-type specificity / X. Y. Ji, B. Zingg, L. Mesik et al. // *Cerebral Cortex*. – 2015. – V. 26. – P. 2612–2625.
300. The barrel cortex as a model to study dynamic neuroglial interaction / C. Giaume, M. Maravall, E. Welker, G. Bonvento // *The Neuroscientist*. – 2009. – V. 15, №. 4. – P. 351–366.
301. The cortical angiome: an interconnected vascular network with noncolumnar patterns of blood flow / P. P. Blinder, P. S. Tsai, J. P. Kaufhold et al. // *Nature neuroscience*. – 2013. – V. 16, №. 7. – P. 889.
302. The human connexin32 gene is transcribed from two tissue-specific promoters / I. M. Neuhaus, L. Bone, S. Wang et al. // *Bioscience reports*. – 1996. – V. 16, №. 3. – P. 239–248.
303. The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus / A. Wallraff, R. Köhling, U. Heinemann et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2006. – V. 26, №. 20. – P. 5438–5447.
304. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins / A. Baranova, D. Ivanov, N. Petrash et al. // *Genomics*. – 2004. – V. 83, №. 4. – P. 706–716.

305. The murine gap junction gene connexin36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development / G. Söhl, J. Degen, B. Teubner, K. Willecke // FEBS letters. – 1998. – V. 428, № 1-2. – P. 27–31.

306. The novel mouse connexin39 gene is expressed in developing striated muscle fibers / J. von Maltzahn, C. Euwens, K. Willecke, G. Söhl // Journal of cell science. – 2004. – V. 117, № 22. – P. 5381–5392.

307. The organization and structure of the thalamic afferents from the barrel cortex in the mouse; a PHA-L study / P. V. Hoogland, E. Welker, H. Van der Loos, F. G. Wouterlood // Cellular thalamic mechanisms. – 1988. – P. 152–162.

308. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction / T. M. Mathiisen, K. P. Lehre, N. C. Danbolt, O. P. Ottersen // Glia. – 2010. – V. 58, №. 9. – P. 1094–1103.

309. The role of connexin43–Src interaction in astrocytomas: a molecular puzzle / A. Tabertero, E. Gangoso, M. Jaraíz-Rodríguez, J. M. Medina // Neuroscience. – 2016. – V. 323. – P. 183–194.

310. The role of gap junction channels during physiologic and pathologic conditions of the human central nervous system / E. A. Eugenin, D. Basilio, J. C. Sáez et al. // Journal of Neuroimmune Pharmacology. – 2012. – V. 7, №. 3. – P. 499–518.

311. The role of gap junctions in seizures / P. L. Carlen, S. Mylvaganam, M. Ramani, M. Krawczyk // Brain research reviews. – 2000. – V. 32, №. 1. – P. 235–241.

312. The role of the neuro-astro-vascular unit in the etiology of ataxia telangiectasia / L. Meshulam, R. Galron, S. Kanner et al. // Frontiers in Pharmacology. – 2012. – V. 3. – P. 157.

313. Theis, M. Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity / M. Theis, C. Giaume // Brain research. – 2012. – V. 1487. – P. 88–98.

314. Three patterns of oscillatory activity differentially synchronize developing neocortical networks in vivo / J. W. Yang, I. L. Hanganu-Opatz, Jyh-Jang Sun, H. J. Luhmann // *Journal of Neuroscience*. – 2009. – V. 29, № 28. – P. 9011–9025.

315. Three-dimensional axon morphologies of individual layer 5 neurons indicate cell type-specific intracortical pathways for whisker motion and touch / M. Oberlaender, Z. S. R. M. Boudewijns, T. Kleele et al. // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 2011. – V. 108, № 10. – P. 4188–4193.

316. Todd, K. L.. Gap junction expression is required for normal chemical synapse formation / K. L. Todd, W. B. Kristan, K. A. French // *Journal of Neuroscience*. – 2010. – V. 30, № 45. – P. 15277–15285.

317. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner / A. Araque, V. Parpura, R. P. Sanzgiri, P. G. Haydon // *Trends in neurosciences*. – 1999. – V. 22, №. 5. – P. 208–215.

318. Trosko, J. E. Cell-cell communication in carcinogenesis / J. E. Trosko, R. J. Ruch // *Front Biosci*. – 1998. – V. 3, №. 3. – P. d208–236.

319. Tunneling Nanotubes and Gap Junctions-Their Role in Long-Range Intercellular Communication during Development, Health, and Disease Conditions / J. Ariazi, A. Benowitz, V. De Biasi et al. // *Front. Mol. Neurosci*. – 2017. – V. 10. – P. 333.

320. Two functionally distinct networks of gap junction-coupled inhibitory neurons in the thalamic reticular nucleus / S. C. Lee, S. L. Patrick, K. A. Richardson, B. W. Connors // *Journal of Neuroscience*. – 2014. – V. 34, № 39. – P. 13170–13182.

321. Ultrastructure of giant and small thalamic terminals of cortical origin: a study of the projections from the barrel cortex in mice using Phaseolus vulgaris leuco-agglutinin (PHA-L) / P. Hoogland, V. F. G. Wouterlood, E. Welker, H. V. D. Loos // *Experimental brain research*. – 1991. – V. 87, № 1. – P. 159–172.

322. Upregulation of Connexin 43 Expression Via C-Jun N-Terminal Kinase Signaling in Prion Disease / Geon-Hwi Lee, Byungki Jang, Hong-Seok Choi et al. // *J Alzheimers Dis.* – 2020. – Vol. 49. – № 4. – P. 1005–19.

323. Upregulation of connexin 43 expression via C-jun N-terminal kinase signaling in prion disease / G. H. Lee, B. Jang, Hong-Seok Choi et al. // *Journal of Alzheimer's Disease.* – 2016. – V. 49, № 4. – P. 1005–1019.

324. Upregulation of Connexin 43 Expression Via C-Jun N-Terminal Kinase Signaling in Prion Disease / G-H Lee, B. Jang, H-S Choi et al. // *J. Alzheimers Dis.* – 2020. – V. 49, № 4. – P. 1005-19.

325. Wang, D. D. The astrocyte odyssey / D. D. Wang, A. Bordey // *Progress in neurobiology.* – 2008. – V. 86, № 4. – P. 342–367.

326. Weller, W. L. Barrels in cerebral cortex altered by receptor disruption in newborn, but not in five-day-old mice (*Cricetidae* and *Muridae*) / W. L. Weller, J. I. Johnson // *Brain Research.* – 1975. – V. 83. – P. 504–508

327. Wiedenmann, B. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles / B. Wiedenmann, W. W. Franke // *Cell.* – 1985. – V. 41, № 3. – P. 1017–1028.

328. Wise, S. P. Cells of origin and terminal distribution of descending projections of the rat somatic sensory cortex / S. P. Wise, E. G. Jones // *Journal of Comparative Neurology.* – 1977. – V. 175, № 2. – P. 129–157.

329. Wise, S. P. Developmental studies of thalamocortical and commissural connections in the rat somatic sensory cortex / S. P. Wise, E. G. Jones // *Journal of Comparative Neurology.* – 1978. – V. 178, № 2. – P. 187–208.

330. Wonders, C. P. A spatial bias for the origins of interneuron subgroups within the medial ganglionic eminence / C. P. Wonders // *Dev Biol.* – 2008. – V. 314, № 1. – P. 127–136.

331. Woolsey, T. A. Comparative anatomical studies of the SmL face cortex with special reference to the occurrence of “barrels” in layer IV /

T. A. Woolsey, C. Welker, R. H. Schwartz // *Journal of Comparative Neurology*. – 1975. – V. 164, № 1. – P. 79–94.

332. Woolsey, T. A. Some Anatomical Bases of Cortical Somatotopic Organization / T. A. Woolsey // *Brain, behavior and evolution*. – 1978. – V. 15, № 5-6. – P. 348–371.

333. Woolsey, T. A. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex: the description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units / T. A. Woolsey, H. Van der Loos // *Brain research*. – 1970. – V. 17, № 2. – P. 205–242.

334. Wu, J. I. Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application / J. I. Wu, L. H. Wang // *Journal of Biomedical Science*. – 2019. – V. 26, № 1. – P. 8.

335. Zhang, C. Expression of connexin 45 in the olfactory system / C. Zhang, D. Restrepo // *Brain research*. – 2002. – V. 929, № 1. – P. 37–47.

336. Zhang, X. L. Electrotonic coupling between stratum oriens interneurons in the intact in vitro mouse juvenile hippocampus / X. L. Zhang, L. Zhang, P. L. Carlen // *The Journal of physiology*. – 2004. – V. 558, № 3. – P. 825–839.

337. Zhou, M. Freshly isolated hippocampal CA1 astrocytes comprise two populations differing in glutamate transporter and AMPA receptor expression / M. Zhou, H. K. Kimelberg // *Journal of Neuroscience*. – 2001. – V. 21, № 20. – P. 7901–7908.

338. Zidell, R. H. A simple dye-coupling assay for evaluating gap junctional communication: the importance of transcription and translation on the establishment of dye-coupling / R. H. Zidell, R. Loch-Caruso // *Cell biology international reports*. – 1990. – V. 14, № 7. – P. 613–628.

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ЦНС – центральная нервная система

ЩК - щелевые контакты

ПК — полуканалы

СЭМ - сканирующая электронная микроскопия

ЭР -эндоплазматический ретикулум

Cx -коннексин

ДНК- дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК -рибонуклеиновая кислота

мРНК- микро рибонуклеиновая кислота

ГАМК-ергический - содержащий ГАМК

АМРА - рецептор α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты

цАМФ- Циклический аденозинмонофосфат

КЭП - модифицированный гуанозиновый нуклеотид, который добавляется на 5' (передний) конец незрелой матричной рибонуклеиновой кислоты

ВОЗ - Всемирная Организация Здравоохранения

пСм- пико-Сименс

Cx36 - коннексин 36

Cx43- коннексин 43

Cx30 – коннексин 30

S1 – область соматосенсорной коры головного мозга

VPL- вентропостеролатеральное ядро таламуса

VPM- вентропостеромедиальное ядро таламуса

PoM- постеромедиальное ядро таламуса

RTN- ретикулярное ядро таламуса

ГЭБ- гематоэнцефалический барьер

PrPSc-патологическая форма прионного белка

ГФКБ- глиальный фибриллярный кислый белок

БСА- бычий сывороточный альбумин

PV- парвальбумин

SOM- соматостатин

DAPI- 4'-6-диамидино-2-фенилиндоль

ГАМК - гамма аминomásляная кислота