

# Пластическая реорганизация синапсов гиппокампа при фармакологической блокаде каннабиноидных рецепторов 1-го типа

Л.Е. Фрумкина<sup>1</sup>, М.Ю. Бобров<sup>2</sup>, А.А. Лыжин<sup>1</sup>, Е.Л. Андрианова<sup>2</sup>, С.К. Королева<sup>1</sup>, Н.А. Боброва<sup>3</sup>, Л.Г. Хаспекгов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ неврологии РАМН, г. Москва

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва

<sup>3</sup>Российский государственный медицинский университет, г. Москва

*Эндогенная каннабиноидная система играет важную физиологическую роль в работе головного мозга, имея прямое отношение к регуляции нейромедиаторных процессов и механизмам нейропластичности. Одним из ключевых звеньев этой системы и удобным объектом для различных экспериментальных воздействий являются каннабиноидные рецепторы 1-го типа (КР1). Нами показаны пластические перестройки синапсов, происходящие в радиальном слое поля СА1 гиппокампа in vitro при фармакологической блокаде КР1. К ультраструктурным признакам этих перестроек отнесены формирование многочисленных перфорированных контактов с удлинёнными синаптическими мембранами изменённой конфигурации, пространственная реорганизация синапсов, появление атипичных синаптических связей. Полученные данные свидетельствуют о том, что участие КР1 в модуляции синаптической передачи является одним из механизмов, обеспечивающих стабильное морфофункциональное состояние синапса и способствующих его сохранению при нарушениях регуляции нейромедиаторных процессов.*

**Ключевые слова:** гиппокамп, культура ткани, каннабиноидные рецепторы, синаптическая регуляция, пластичность, глутамат, нейротоксичность.

Эндогенная каннабиноидная система играет важную физиологическую роль в работе головного мозга, детально рассмотренную в ряде обзоров последних лет [1, 5, 18]. Основными функциональными звеньями эндогенной каннабиноидной системы являются каннабиноидные рецепторы (КР), их эндогенные лиганды – эндоканнабиноиды и внутриклеточные ферменты, обеспечивающие синтез и утилизацию эндоканнабиноидов. К настоящему времени клонированы два типа КР (КР1 и КР2) [4, 15]. Иммуноцитохимический и физиологический анализ показали, что клетками центральной нервной системы экспрессируются в основном КР1, широко распространенные во многих структурах головного мозга, а КР2 локализуются на периферии и в клетках иммунной системы.

Важным свойством эндогенной каннабиноидной системы является способность к ретроградной модуляции синаптической передачи [8]. Она заключается в том, что эндоканнабиноиды, синтезируемые постсинаптическим нейроном в ответ на афферентную стимуляцию, высвобождаются из него и взаимодействуют с КР1, локализованными на аксонных терминалях пресинаптического нейрона, что приводит к торможению выброса из них нейромедиатора. Это свойство эндогенной каннабиноидной системы может иметь большое значение в восстановлении нормальной работы центральных синапсов в условиях патологии, свя-

занной с нарушениями регуляции их нейромедиаторной функции.

В настоящее время общепринята гипотеза, согласно которой одним из основных патогенетических факторов ишемического повреждения центральных нейронов при инсульте является нарушение регуляции глутаматергической синаптической передачи [24]. Каскад ишемических цитотоксических реакций запускается в результате гиперстимуляции рецепторов глутамата, обусловленной его усиленным выбросом из пресинаптических терминалей. Следствием этого является накопление в нейронах ионов кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) прежде всего из-за их избыточного поступления через ионные каналы, управляемые глутаматными рецепторами. Стойкое повышение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  инициирует деструктивные липо- и протеолитические реакции, а также сопровождается генерацией свободных радикалов и реактивных форм кислорода, что, в конечном счете, приводит к необратимым повреждениям нервных клеток.

Поскольку эндогенная каннабиноидная система является эффективным модулятором нейромедиаторных процессов, выяснение ее роли в поддержании нормального морфофункционального состояния синаптических связей приобретает особую актуальность. Одним из экспериментальных подходов к решению этого вопроса является исследо-

вание пластических ультраструктурных перестроек, происходящих в нервной ткани *in vivo* и *in vitro* в результате блокады отдельных функциональных звеньев каннабиноидной системы.

В данной работе было проведено исследование ультраструктуры синапсов в органоטיפических эксплантатах гиппокампа крыс при фармакологической блокаде КР1 селективным антагонистом SR141716A.

## Материалы и методы

Органоטיפические культуры ткани гиппокампа готовили по методике, описанной ранее [21]. Кратко: 7–9-дневных крыс линии Вистар наркотизировали эфиром, извлекали головной мозг, выделяли гиппокамп и получали его поперечные срезы толщиной 300 мкм на чоппере Мак-Ильвейна (The Mickle Laboratory Engineering, UK). Срезы выдерживали в течение 1–1,5 часа при 4° С в сбалансированном солевом растворе Хенкса с глюкозой (6,5 мг/мл), перенесли на полупроницаемые поликарбонатные мембраны фирмы Millipore, США (по 4–5 срезов на мембрану) и помещали в лунки 6-луночного планшета, каждая из которых содержала по 1 мл питательной среды следующего состава: 25% инактивированной нагреванием лошадиной сыворотки, 25% раствора Хенкса, 50% минимальной среды Игла с добавлением D-глюкозы (25мМ) и L-глутамина (1 мМ). Срезы культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>, 95% воздуха) при 35,5° С в течение 2 недель. Питательную среду меняли 1 раз в 2–3 дня. Начиная с 5–6-го дня, КР1 блокировали *in vitro* добавлением в культуры при смене среды селективного антагониста этих рецепторов SR141716A, 5 мкМ (NIH Chemical Synthesis and Drug Supply Program, USA).

Для нейростологического исследования эксплантаты фиксировали в смеси, содержащей 40%-ный формалин, абсолютный спирт и ледяную уксусную кислоту в соотношении 2:7:1, наклеивали на предметные стекла и окрашивали крезиловым фиолетовым по методу Ниссля.

Для электронной микроскопии эксплантаты фиксировали в 2,5%-ном растворе глутаральдегида на фосфатном буфере (рН 7,2), постфиксировали в 2%-ном растворе четырехоксида осмия и заключали в эпон-412. Ультратонкие срезы, в состав которых входил радиальный слой поля СА1 (см. рис. 1А), просматривали и фотографировали в электронном микроскопе фирмы Hitachi.

## Результаты

В контрольных эксплантатах, окрашенных по методу Ниссля, можно обнаружить все структуры, характерные для интактного гиппокампа *in vivo* (рис. 1А). К ним относятся Аммонов рог (СА), содержащий пирамидный слой, образованный плотно упакованными телами пирамидных клеток, и зубчатая фасция (ЗФ), содержащая хилус с крупными разрозненными нейронами и слой мелких зернистых клеток. В эксплантатах гиппокампа, подвергнутых фармакологической блокаде КР1, гистологически наблюдаются те же структуры, что и в контрольных эксплантатах, при этом не обнаруживается никаких заметных изменений ни в ориентации и локализации клеточных слоев в СА и ЗФ, ни в морфологии нервных клеток.

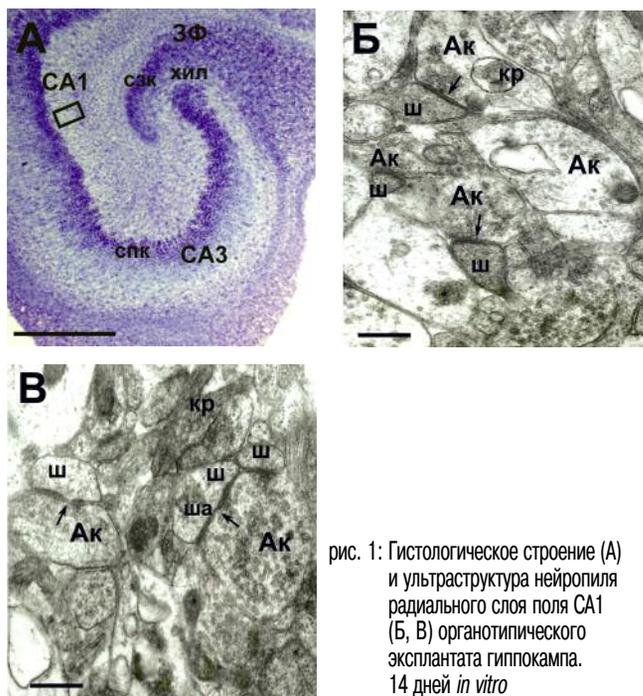


рис. 1: Гистологическое строение (А) и ультраструктура нейропилия радиального слоя поля СА1 (Б, В) органоטיפического эксплантата гиппокампа. 14 дней *in vitro*

А. Общий вид эксплантата. Окраска крезиловым фиолетовым. СА1, СА3 – поля Аммонова рога; ЗФ – зубчатая фасция; хил – хилус; спк – слой пирамидных клеток; сзк – слой зернистых клеток. Прямоугольником обозначен участок радиального слоя поля СА1, где исследовалась ультраструктура. Масштаб 500 мкм (здесь и далее для оценки масштаба указан размер маркерной полоски).  
Б. Макулярные аксошипииковые контакты (показаны стрелками).  
В. Аксошипииковые контакты (показаны стрелками) с единичными перфорациями. Здесь и на других рисунках: Ак – аксон; Д – дендрит; ш – шипик; ша – шипиковый аппарат; кр – конус роста. Масштаб 0,5 мкм.

При ультраструктурном исследовании было установлено, что среди синапсов в радиальном слое поля СА1 контрольных эксплантатов преобладают типичные ассиметричные аксодендритные и аксошипииковые макулярные контакты с небольшой протяженностью синаптических мембран (рис. 1Б). В нем содержатся также единичные сложные аксошипииковые синапсы конвергентного или дивергентного типов и так называемые «перфорированные» аксошипииковые контакты, в которых постсинаптическое уплотнение разделено на 2–3 сегмента (рис. 1В). Дендритные шипики идентифицируются по форме и наличию мелкогранулярного материала и шипикового аппарата, состоящего из вакуолей, разного размера пузырьков и мелких уплотненных цистерн. Все компоненты шипикового аппарата присутствуют только в крупных шипиках, а характерными признаками шипиков меньшего размера являются мелкогранулярный материал, отдельные вакуоли, пузырьки или цистерны. Кроме того в нейропиле содержатся межклеточные пространства, конусы роста отростков, варикозно измененные аксоны и дендриты и дендритные филоподии, что свидетельствует о продолжающемся синаптогенезе.

Фармакологическая блокада КР1 приводит к выраженным ультраструктурным перестройкам синапсов. Прежде всего обращает на себя внимание появление многочисленных аксодендритных и аксошипииковых контактов со значительной протяженностью синаптических мембран и наличием в них большого числа перфораций, до 5–6 и более, которые могут располагаться на протяжении всего контакта (рис. 2). Пресинаптические аксонные терминалы заполнены синаптическими пузырьками, а шипики содержат

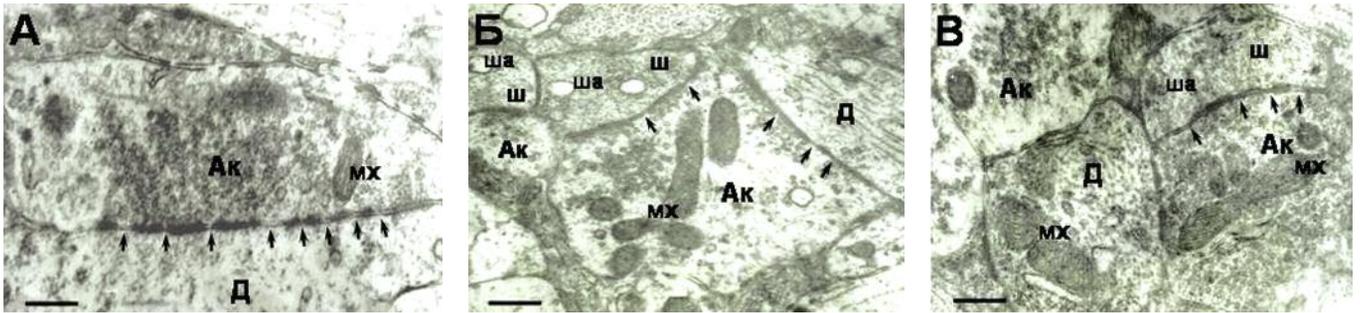


рис. 2: Перфорированные аксодендритные (А–В) и аксошиповые (Б, В) синапсы при блокаде КР1. Здесь и на последующих рисунках: перфорации показаны стрелками; мх – митохондрии. Масштаб 0,5 мкм.

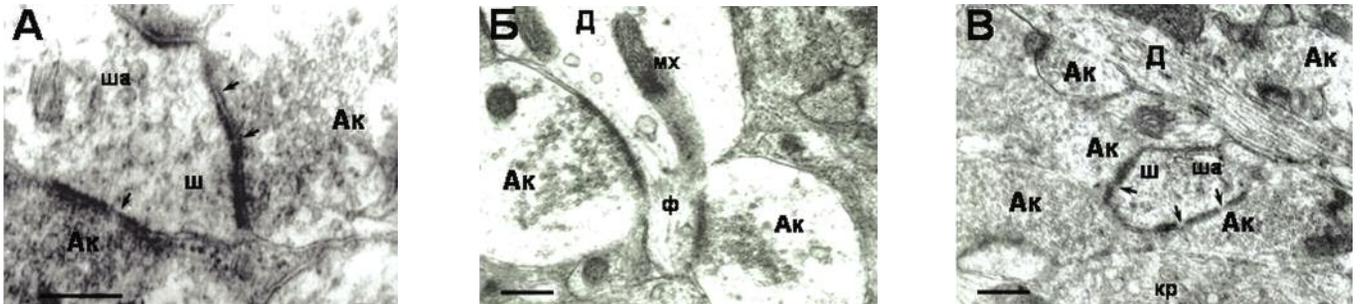


рис. 3: Формирование контактов сегментированного типа при блокаде КР1. ф – филоподия. Масштаб 0,5 мкм.

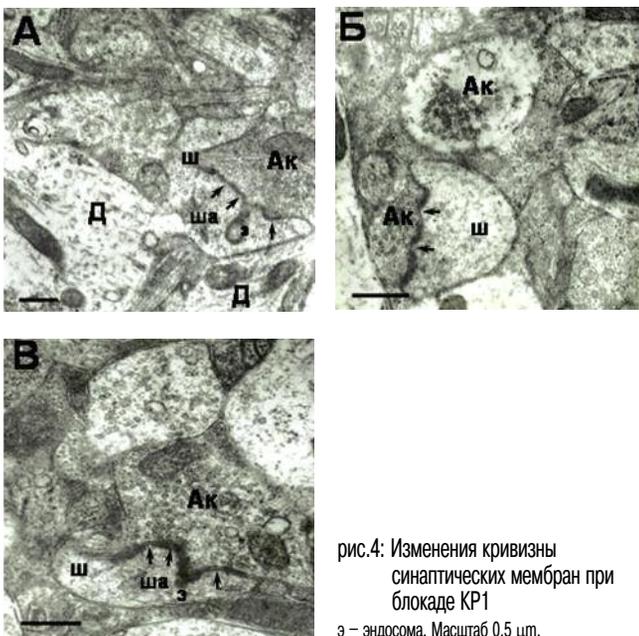


рис.4: Изменения кривизны синаптических мембран при блокаде КР1  
э – эндосома. Масштаб 0,5 мкм.

хорошо выраженный шипиковый аппарат. Среди перфорированных синапсов обнаруживаются контакты сегментированного типа с глубоким погружением шипика (рис. 3А, В) или дендритной филоподии (рис. 3Б) в пресинаптическую терминаль, в результате чего образуются два нейромедиаторных сегмента, в каждом из которых постсинаптическое уплотнение может содержать перфорации.

В перфорированных аксошиповых синапсах с большой протяженностью синаптических мембран кривизна последних может изменяться. В одних контактах, с волно-

той формой постсинаптического уплотнения, пресинаптическая терминаль погружена в постсинаптический элемент (рис. 4А), в других, наоборот, пресинаптическая терминаль полностью или частично охватывает постсинаптическую мембранную специализацию (рис. 3В). Синаптические мембраны могут иметь и волнообразную конфигурацию (рис. 4Б, В).

Наряду с указанными выше изменениями происходит пространственная реорганизация перфорированных контактов, которая заключается в образовании сложных синаптических комплексов. К ним относятся синапсы, в которых одна аксонная терминаль формирует несколько контактов на крупном разветвленном шипике (рис. 4А), а также на нескольких шипиках разного размера (рис. 5А), образуя синапсы дивергентного типа. Помимо дивергентных формируются синапсы конвергентного типа, когда несколько аксонов образуют контакты с одним шипиком (рис. 5Б).

Обращает на себя внимание появление атипичных синаптических соединений, к которым можно отнести симметричные шипико-соматические (рис. 6А) и шипико-шипиковые (рис. 6Б, В) контакты. Для последнего вида синапсов характерна глубокая инвагинация мелкого шипика в крупный, содержащий шипиковый аппарат. В основании некоторых шипиков можно обнаружить цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума, а также так называемые спинулы, или эндоцитозные органеллы (эндосомы, см. рис. 4А, В и рис. 6В). К последним относятся везикулы с гладкой или шероховатой наружной поверхностью мембран и вакуоли, а также разной величины и формы трубчатые структуры с двойной мембраной.

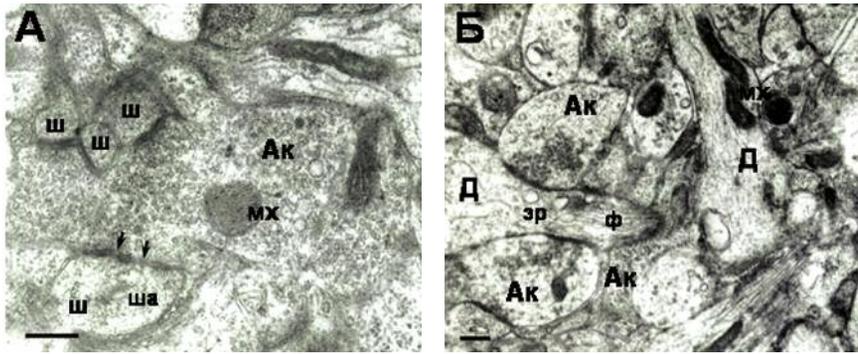


рис. 5: Формирование сложных синаптических комплексов при блокаде КР1

А. Контакты одного аксона на нескольких шипиках. Синапс дивергентного типа.

Б. Контакты нескольких аксонов на одной дендритной филоподии или на одном шипике (см. рис. 3В). Синапсы конвергентного типа.

зр – гладкий эндоплазматический ретикулум; ф – филоподия. Масштаб 0,5  $\mu\text{m}$ .

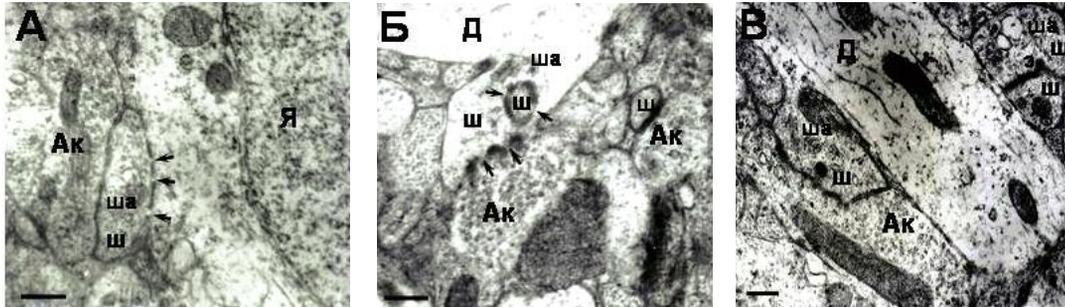


рис. 6: Атипичные синаптические контакты, формирующиеся при блокаде КР1

А. Шипико-соматический контакт.

Б, В. Шипико-шипиковые контакты.

Я – ядро; э – эндосома. Масштаб 0,5  $\mu\text{m}$ .

## Обсуждение

В данной работе впервые показано, что устранение модулирующего влияния эндогенной каннабиноидной системы на синаптическую передачу путем длительной фармакологической блокады КР1 приводит к выраженным пластическим перестройкам синаптических контактов. Эти перестройки заключаются прежде всего в формировании перфорированных синапсов с удлиненными синаптическими мембранами, содержащими большое число перфораций.

Результаты исследований последних лет свидетельствуют о том, что подобные изменения происходят при усиленной стимуляции синаптических входов, в частности, при индукции длительной посттетанической потенциации в пирамидных нейронах поля СА1 гиппокампа, и указывают на повышение эффективности синаптической передачи [16, 20, 23, 25], обусловленное возможностью дополнительной реализации нейромедиатора в каждом сегменте перфораций [7, 10]. Усилению нейротрансмиссии, по данным ряда авторов, способствуют и другие наблюдавшиеся нами признаки ультраструктурной реорганизации синапсов, такие как увеличение площади рецепторной поверхности синапса, сегментирование самих контактов [7, 9], модификация кривизны синаптических мембран [3, 6, 14], образование сложных синаптических комплексов [11, 22], появление атипичных форм синапсов [17, 20].

На изменение функционального состояния синапсов, вызываемое фармакологической блокадой КР1, указывает и то, что основными постсинаптическими элементами аксошипиковых перфорированных контактов являются крупные шипики, содержащие различные компоненты шипикового аппарата, в том числе цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума и эндосомы. Последние, как было показано ранее, могут участвовать в транспорте

ровке рецепторов глутамата, ответственных за проведение возбуждения, в постсинаптическое уплотнение и тем самым способствовать повышению эффективности синаптической передачи [19]. Кроме того, появление в шипиках везикул с шероховатой поверхностью и их тесный контакт с постсинаптическим уплотнением перфорированных синапсов является ультраструктурным признаком участия этих везикул в транспорте к нему глутаматных рецепторов [19], увеличении его протяженности и формировании перфораций [16].

Результаты исследований, проведенных нами ранее, показали, что длительная посттетаническая потенциация в нейронах поля СА1 срезов гиппокампа после хронического введения антагониста КР1 *in vivo* значительно облегчается [2]. То же самое происходит и в срезах гиппокампа мышей с генетической блокадой КР1 (КР1-нокауты), в которых ультраструктура синапсов также подвергается значительным пластическим перестройкам [13]. Кроме того, как при фармакологической, так и при генетической блокаде КР1 обнаружена повышенная подверженность нейронов гиппокампа *in vitro* цитотоксическому действию одного из агонистов глутаматных рецепторов (каиновой кислоты) [12].

Таким образом, результаты наших исследований в сопоставлении с данными, полученными другими авторами, свидетельствуют о том, что модулирующее влияние эндогенной каннабиноидной системы на синаптическую передачу является одним из механизмов, обеспечивающих стабильное морфофункциональное состояние синапсов и способствующих его сохранению при нарушениях регуляции нейромедиаторных процессов.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант №05-04-49444).

## Список литературы

1. Хаспеков Л.Г., Бобров М.Ю. Эндогенная каннабиноидная система и ее защитная роль при ишемическом и цитотоксическом повреждении нейронов головного мозга. *Нейрохимия* 2006; 23: 85–105.
2. Brenz Verca M., Khaspekov L., Monory K. et al. Involvement of endogenous cannabinoid system in regulation of hippocampal synaptic plasticity. In: International Symposium "Hippocampus and Memory" (Abstracts). Puschino, 2006: 52.
3. Calverley R.K.S., Jones D.G. Contributions of dendrite spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain Res. Rev.* 1990; 15: 215–249.
4. Devane W.A., Dysarz F.A., Johnson M.R. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 1988; 34: 605–613.
5. Di Marzo V., Bifulco M., De Petrocellis L. The endocannabinoids system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004; 3: 771–784.
6. Dyson S.E., Jones D.G. Synaptic remodelling during development and maturation: junction differentiation and splitting as a mechanism for modifying connectivity. *Brain Res.* 1984; 315: 125–137.
7. Edwards F.A. Anatomy and electrophysiology of fast central synapses lead to a structural model for long-term potentiation. *Physiol. Rev.* 1995; 75: 759–787.
8. Freund T.F., Katona I., Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* 2003; 83: 1017–1066.
9. Ganeshina O., Berry R.W., Petralia R.S. et al. Synapses with segmented, completely partitioned postsynaptic density express more AMPA receptors than other axospinous synaptic junction. *Neuroscience* 2004; 125: 615–623.
10. Geinisman Y. Perforated axospinous synapses with multiple, completely partitioned transmission zones: probable structural intermediates in synaptic plasticity. *Hippocampus* 1993; 3: 417–434.
11. Harris K.M., Fiala J.C., Ostroff L. Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2003; 358: 745–748.
12. Khaspekov L.G., Brenz Verca M.S., Frumkina L.E. et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* 2004; 19: 1691–1698.
13. Khaspekov L., Brenz Verca M., Frumkina L. et al. CB1 cannabinoid receptor-mediated protection against excitotoxic damage of hippocampal neurons *in vitro*: histological and ultrastructural analysis. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2005; 15 (Suppl. 2): 216.
14. Marrone D.F., Petit T.L. The role of synaptic morphology in neural plasticity: structural interactions underlying synaptic power. *Brain Res. Rev.* 2002; 38: 291–308.
15. Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346: 561–564.
16. Matsuzaki M., Honkura N., Ellis-Davies G.C.R., Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendrite spines. *Nature* 2004; 429: 761–776.
17. Neuhoff H., Roeper J., Schweizer M. Activity-dependent formation of perforated synapses in cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 1999; 11: 4241–4250.
18. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4: 873–884.
19. Spacek J., Harris K.M. Trans-endocytosis via spinules in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 2004; 24: 4233–4241.
20. Stewart M.G., Medvedev N.I., Popov V.I. et al. Chemically-induced long-term potentiation increases the number of perforated and complex postsynaptic densities but does not alter dendritic spine volume in CA1 of adult mouse hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.* 2005; 21: 3368–3378.
21. Stoppini L., Buchs P.-A., Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Meth.* 1991; 37: 173–182.
22. Toni N., Buchs P.-A., Nikonenko I. et al. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 1999; 402: 421–425.
23. Toni N., Buchs P.-A., Nikonenko I. et al. Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation. *J. Neurosci.* 2001; 21: 6245–6251.
24. White B.C., Sullivan J.M., DeGracia D.J. et al. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* 2000; 179: 1–33.
25. Yuste R., Bonhoeffer T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term plasticity. *Ann. Rev. Neurosci.* 2001; 24: 1071–1089.

## Plastic reorganization of hippocampal synapses resulted from pharmacological blockade of type 1 cannabinoid receptors

L.E. Frumkina<sup>1</sup>, M.Yu. Bobrov<sup>2</sup>, A.A. Lyzhin<sup>1</sup>, E.L. Andrianova<sup>2</sup>, S.K. Koroleva<sup>1</sup>, N.A. Bobrova<sup>3</sup>, L.G. Khaspekov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

<sup>2</sup>Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

<sup>3</sup>Russian State Medical University, Moscow

**Key words:** hippocampus, tissue culture, cannabinoid receptors, synaptic regulation, plasticity, glutamate, neurotoxicity.

Endogenous cannabinoid system plays an important physiological role in brain functioning, being related to regulation of neuromediator processes and mechanisms of neuroplasticity. Cannabinoid receptors of type 1 (CB1) represent one of the key elements of this system and convenient object for various experimental effects. We showed plastic reorganization of synapses in hippocampal CA1 stratum radiatum *in vitro* resulted from pharmacological blockade of CB1. The ultrastructural features of this

reorganization are the formation of numerous perforated contacts with elongated synaptic membranes of modified configuration, spatial synaptic rearrangement, and the appearance of atypical synaptic connections. The obtained results suggest that involvement of CB1 in modulation of synaptic transmission is one of the mechanisms which ensure the stable morphofunctional state of synapse and promote its integrity in disturbances of neurotransmission regulation.