



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН

ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА

КАТЕДРА „АНАТОМИЯ, ХИСТОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ И БИОЛОГИЯ”

Д-р Светла Пенчева Досева

***МОРФОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ
В РАЗВИТИЕТО НА
КОХЛЕАРНИЯ НУКЛЕАРЕН КОМПЛЕКС***

за придобиване на образователна и научна степен «Доктор» по област на висшето образование „7. Здравеопазване и спорт”, професионално направление „7.1. Медицина”, научна специалност „Анатомия, хистология и цитология” (03.01.02.)

Научен ръководител:

проф. Д-р Емилиян Алексиев Иванов, дм

Официални рецензенти:

Проф. д-р Константин Асенов Койчев, дмн

Проф. д-р Николай Еленков Лазаров, дмн

Плевен • 2014

Дисертационният труд е представен на 207 страници. Съдържа 112 фигури (230 светлинно-микроскопски, 68 електронно-микроскопски снимки и 3 графични изображения). Библиографията обхваща 539 литературни източника.

Експериментите са проведени в лабораториите на катедрата по „Анатомия, хистология и цитология ” при МУ-Плевен, в съответствие с изискванията на Комисия по етика на научноизследователската дейност на МУ- Плевен.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на Разширен катедрен съвет на катедра „Анатомия, хистология и цитология ”, при Факултет „Медицина”, Медицински университет-Плевен, проведен на 16.05.2014 г.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на.....2014 г.от
.....часа в зала

Материалите по защитата са достъпни на сайта на МУ-Плевен:
(<http://www.mu-pleven.bg>)

СЪДЪРЖАНИЕ

I. УВОД	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	8
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	9
IV. РЕЗУЛТАТИ	13
1. Цитоархитектоника и характеристика на невроните на VCN, по време на постнаталното развитие, в материал оцветен по Nissl	13
2. Електронна микроскопия	21
3. Имунохистохимия – доказване на глутаматни рецепторни субединици <i>GluR1</i> , <i>GluR2</i> и <i>GluR3</i>	43
V. ДИСКУСИЯ	48
1. Морфологична характеристика на основните клетъчни типове на VCN по време на постнаталното развитие	48
2. Ултраструктура на BCs и на endbulbs на Held по време на матурацията	50
3. Несинаптични контакти. Соматични протрузии и спини – характерна черта на синапсите в хода на матурацията	56
4. Ефекти на акустичната депривация и аблация върху развитието на невроните	58
5. Клетъчен и гломеруларен полиморфизъм – доказателство за разнообразна функционална роля	59
6. Категоризиране на мъховидните нервни окончания на два типа: <i>extrinsic mf</i> и <i>intrinsic mf</i>	63
7. Глутаматни рецепторни фенотипове в слуховия ядрен комплекс на плъх по време на постнаталното развитие	64
VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ИЗВОДИ	65
VII. ПРИНОСИ	67

Съкращения:

E	ембрионален ден
EP	ендоплазматичен ретикулум
иРНК	информационна рибонуклеинова киселина
P	постнатален ден
ЧМН	черепномозъчен нерв
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
AVCN	anteroventral cochlear nucleus
BC	bushy cell
BDA	biotinylated dextran-amine
Ca	cartwheel cells
CF	characteristic frequency
ChAT	choline acetyltransferase
CN	cochlear nucleus
CNC	cochlear nuclear complex
DCN,	dorsal cochlear nucleus
EPSCs	excitatory post-synaptic currents
EPTA	ethanolic phosphotungstic acid
GABA	γ -aminobutyric acid
GAD	Glutamic acid decarboxylase
GAP-43,	Growth Associated Protein 43
GBC,	globular bushy cell
GCD,	granule cell domain
GCS,	granule cell system
GluR	glutamate receptor subunit
gr	granule cell
high SR	high spontaneous rate
IHC	inner hair cell
IID	interaural intensity difference
ILD	interaural level difference
IP3	inositol 3- phosphate
IPSC	inhibitory postsynaptic current
ITD	interaural time difference
low SR	low spontaneous rate
LRnd	large round
LSO	lateral superior olive
me/me	motheaten mouse
mf,	mossy fiber
mGluR1 α ,	metabotropic glutamate receptor 1 α
MNTB	medial nucleus of the trapezoid body
MRnd	middle round
MSO	medial superior olive
NM,	nucleus magnocellularis
NMDA,	N-methyl-D-aspartate
PSD	postsynaptic density
PVCN,	posteroventral cochlear nucleus
SBC	spherical bushy cell
SCZs	synaptic contact zones
UBC	unipolar brush cell
VCN	ventral cochlear nucleus

I. УВОД

Невробиологията в областта на слуховата сензорна система, през последните години, постигна значителен напредък в изясняване на взаимовръзката структура-функция. Предимство в проучванията е използването на подходящи генетични линии експериментални животни, както с нормален така и с патологично увреден слух, имитиращи човешка форма на нарушение на слуха и глухотата (Bosher, 1966; Dunn, 1996; O'Neil, 2010, 2011). Еволюционното развитие на слуховия процес при птиците и бозайниците и екологичната ниша която те заемат, спомага за оцеляването им и ги прави особено информативни по отношение на това, как определени морфологични структури отговарят за специфични слухови потребности (Gómez-Nieto, 2008, 2009, 2011). Независимо от големите разлики в честотния спектър и интензитета на възприеманите акустични стимули при различните видове, слуховите центрове са изградени от подобни по морфология невронални популации. Въпреки общите ултраструктурни и електрофизиологични характеристики всеки клетъчен тип носи уникални специализации отразяващи конкретния видов модел. Изследванията показват, че морфологично един и същ клетъчен тип се разделя на няколко функционални подтипа, което е във връзка с физикалните характеристики на звука. (Adams, 1986; Alibardi, 2000).

Слуховият процес е отговорен не само за детекцията и провеждането на звуковите сигнали, но интегрира и различни функции на мозъка свързани с равновесието, соматичната сетивност и емоционалното състояние. Тези процеси се реализират с активиране на невронални вериги, свързани с локализация на звуковия източник и паралелна обработката на проприоцептивни, вестибуларни и зрителни сигнали, установяващи движещ се източник на звук (Feliciano, 1993, 1995; Diño, 2001; Newlands, 2003; Haenggeli, 2002, 2005). Идентифицирането на звука е последвано от осъзнаване характеристиките на акустичната информация, в което участват комплексни невронални механизми свързани с познанието и паметта. За разбиране ролята на невроналните кръгове в слуховия процес, пътищата в него са разделени на две системи, условно разграничени на “*core*” и “*belt*”. Системата “*core*” включва спиралния ганглий и съответно слуховия нерв, слуховия ядрен комплекс, централното ядро на *colliculus inferior*, вентралното ядро на *corpus geniculatum mediale* и зона *AI* на първичната слухова кора, които са задължителни междинни ядра на основния възходящ слухов път (Adams, 1979; Moore, 1985; Moore, 1987; Cant, 1986, 1991, 1992, 2003; Pillsbury, 1996; Anderson, 2006). Централните влакна на тази система са заобиколени от допълнителни влакна, които съчетават мултимодална информация от различни източници. Системата “*belt*”, от допълнителни слухови влакна, включва грануларно-клетъчния домен на

слуховия ядрен комплекс, дорзалното (*ICd*) и външното (*ICe*) ядро на *colliculus inferior*, медиалното и дорзалното ядро на *corpus geniculatum mediale*, както и асоциативни и вторични полета на слуховата кора. Предполага се, че повечето от низходящите кортикобулбарни влакна преминават през системата на “*belt*” структурите. Кортикобулбарните проекции задължително достигат до грануларно-клетъчния домен, а не до централните магноцелуларни региони на слуховия комплекс. Като цяло, допълнителните полета в системата на “*belt*” имат модулаторен ефект върху асцендентния път преминаващ през системата “*core*” (Lieberman, 1991; Kandler, 1991, 1993, 2004; Caicedo, 1993; Horváth, 2000; Behrens, 2002; Doucet, 2003; Schofield, 1995, 1995, 2005).

Всички аферентни влакна от кохлеата задължително прекъсват и образуват синапси в първичните слухови ядра, където става началното централно обработване на слуховата информация (Pillsbury, 1996 Lorente de Nó, 1981). Слуховият ядрен комплекс е изграден от няколко популации неврони с характерни морфологични и електрофизиологични особености, които са подредени тонотопично, разделяйки неговата територия на дискретни области. Внесената в първичните слухови ядра кодирана звукова информация се усилва, трансформира и насочва по специфични и неспецифични невронални вериги към по-високите слухови центрове.

Експерименталната хистогенеза показва, че невроните в слуховия ядрен комплекс се развиват в различни периоди по време на матурацията следвайки специфичен модел на растеж и скорост на развитие (Parks, 1979; 2004; Larsen, 1984; Rubel, 2002; Ryugo, 1982, 2006). Морфологичните проучвания на тази структура са важни за разбиране на еволюционните и физикалните фактори, влияещи на матурацията и допринасят за разбиране на произхода, ролята и разпределението на проекциите на слуховия път.

Структурното развитие на центровете по пътя на слуха може да бъде разделено на две фази. Първата фаза е независима от въздействието на акустичните стимули, а втората е зависима от зрелостта на кохлеата и обхваща етапите на развитие след регистриране на слухова функция. При повечето видове основните промени в морфологичното развитие се извършват през първата фаза. Те започват още със затварянето на нервната тръба, миграцията на невроните и аксоналния растеж. Следват процеси свързани с дендритната диференциация и синаптогенеза, при което се установява тонотопичния ред в групирането на невроните. Следва нарастване на клетъчните размери, продължаваща матурация на аксоните и дендритите и стабилизация на синапсите (Brugge, 1981, de Diego, 2002).

Зрелостта на слуховата система при раждането забележимо варира между отделните видове и се намира на различни етапи от развитието. При регистриране начало на слухов процес, морфологичните структури независимо от вида, са на един и същ етап от постнаталната матурация, което е отражение на междувидовите различия в скоростта и модела на

развитие. В слуховата система съществува т. нар. „*silent*” период, преди регистриране на слухова функция, когато матурацията е почти завършена но е забелязано известно забавяне и „отлагане” на ефективен слухов процес (Petralia, 1999). Предполага се че липсата на влияние от околната среда е толкова важно в ранните етапи на развитието, колкото нейното присъствие в по-късните етапи (Brugge, 1978; Brugge, 1981; Cant, 1984).

През втората фаза на развитието аферентната стимулация е необходимо условие за приключване матурацията на невроналните структури. Въпреки многобройните експерименти с промяна на акустичното обкръжение, доказващи ролята на звуковата среда, не са ясни механизмите опериращи преди и след „активиране” на слуховата система. Доказано е че, след установяване на функционираща слухова система структурната матурация на невроните продължава (Cant, 1984; Ford, 2009). Предполага се, че промените по време на краткия сензитивен период, определен като „критичен” имат основно значение за фината настройка и координация на невроналните вериги по пътя на слуха (Caspary, 1985, 2005, 2006; Harris, 2005b; Harris, 2006).

Нашето изследване е фокусирано през втората фаза на матурацията, когато все още не са ясни критериите за ранна идентификация на функциониращите синапси. Установено е, че синаптична трансмисия е налице преди завършването на морфологичната матурация (Carr, 1996; Nicol, 2002). O’Connor и Brugge, (1988) развиват концепцията за т.нар. „морфологична и функционална константа” в която подчертават, че физиологичния отговор към акустични стимули не зависи от слуховия опит, а е установен преди завършване на структурната матурация. Основният набор от възбудни и инхибиторни рецептори е налице в невроните при раждането (Pellegrini-Giampietro, 1991). Установено е че, взаимодействията между растящите аксони и мембранните рецептори имат роля в ранното развитие. Всички субстанции, които изпълняват ролята на невротрансмитери при възрастните, могат да инхибират или стимулират развиващите се неврони (Caicedo, 1999; Campos, 2001). Доказано е че, балансът между глутаматергичната и GABA-ергичната система регулира нивата на иРНК кодираща невротрофични и растежни фактори, които от своя страна определят невроналния растеж и диференциация (Zaffra et al. 1991). Доказано е че, след формиране на функционална слухова система акустичната активност е необходима за нейното прецизиране и поддръжка (Ford, 2009; O’Neil, 2011).

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящето проучване е да се опишат морфологичните характеристики на основни макроневрони на вентралното слухово ядро и да се изследва ултраструктурата на техните големи аксосоматични синапси от кохлеарен произход, по време и след критичния период от постнаталната матурация, както и синаптичните взаимоотношения в грануларноклетъчния домен.

За осъществяване на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Да се направи типизация на невроните на кохлеарния комплекс посредством метода на Нисъл и да се уточнят периодите от постнаталното развитие, в които сферичните, глобуларните и октоподните макроневрони от VCN придобиват морфологични белези характерни за възрастни.

2. Да се направи морфометричен анализ и да се определи динамиката на растежа на глобуларните и октоподните неврони от зоната на VCN по време на постнаталното развитие.

3. Да се направи електронномикроскопско описание на макроневрони-мишени на влакната на слуховия нерв от зоната на VCN и да се опише характеристиката на аксосоматичните синапси на територията на VCN.

4. Да се изследва електронномикроскопската характеристика на грануларноклетъчната популация и синаптичната организация на грануларноклетъчния домен.

5. Да се проследят ефектите на кохлеарната аблация върху макроневрони на DCN и на слуховата депривация върху сферично-клетъчната популация от VCN.

6. Да се изследва експресията на глутаматни рецепторни субединици (GluR1, GluR2, GluR3) в неврони на територията на CNC.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За настоящото проучване беше използван материал от експериментални животни, плъхове от порода Wistar. Използвани бяха общо 104 плъха, разпределени в различни възрастови групи, съобразени със задачите на научното проучване. Те бяха отглеждани и доставени от специализирано отделение (Вивариум) за опитни животни към МУ – Плевен. Изследванията бяха в съгласие с изискванията и правилата на Комисията по етика на научноизследователската дейност на МУ – Плевен за работа с експериментални животни. Експериментите бяха проведени в катедрата по Анатомия, хистология и цитология към МУ – Плевен.

В хода на изследването бяха приложени следните методи: оцветяване по метода на Nissl; трансмисионна електронна микроскопия; морфометричен анализ на полутънки срези; индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимично изследване.

Метод на Nissl

Изследвани бяха слуховите ядра на 24 бели плаха на различни постнатални дни (P) P2, P3, P5, P7, P14, P15, P17, P25 и P60 (P0 – ден на раждане). След интраперитонеална анестезия с Nembutal - pentobarbital sodium (50 mg/kg i.p.), животните бяха транскардиално перфузирани с 10% неутрален формол. След отпрепарирание, мозъчните стволоче се дофиксираха в същия разтвор за 24 h, дехидратираха в редици с възходяща концентрация на C₂H₅OH, просветляваха в канадски балсам, преминаваха през ксилол и включваха в парафинови блокчета по стандартен метод. На парафинов микротом Leitz 1516 се правиха серийни срези с дебелина 8 µm в коронарната равнина, събираха в последователен ред и монтираха върху предметни стъкла. След изсушаване на стайна температура, срезите преминаваха през ксилол, през редици с низходящи концентрации на C₂H₅OH и се оцветяваха по стандартен метод на Nissl с 0.1% Cresyl Violet за 4 - 15min. Използвани бяха критерии за идентификация невроните по схемите на Osen (1969) и Brawer et al. (1974), Tolbert and Morest, (1982), които позволяват ранна идентификация на основните невронални типове. Невроните бяха заснети на микроскопска система Olympus BX 51.

Електронна микроскопия

За електронномикроскопското изследване бяха използвани 26 плъха на възраст P10 – P60. Животните бяха анестезирани с Nembutal - pentobarbital sodium (50 mg/kg i.p.). Транскардиална перфузия през лявата камера беше направена с разтвор от 1.25% glutaraldehyde, 1% paraformaldehyde и 0.015% CaCl₂ в 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2-7.4).

Мозъчните стволоче бяха отделени и постфиксирани за 2h в същия разтвор. След това бяха фиксирани в друг разтвор съдържащ 5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde и 0.06% CaCl₂ със същия буфер. Постфиксацията се извърши с 1% OsO₄ за 1 h, след това материала се дехидратира в нарастващи концентрации на C₂H₅OH, премина през propylene oxide и включи в Durcupan. Ултратънки срези бяха направени на LKB Bromma 8800 Ultratome III с дебелина 40 и 100 nm, двойно контрастирани с 4% uranylacetate и 0.1% lead citrate и наблюдавани с електронен микроскоп Tesla 500 BS.

Морфометричен анализ на полутънки срези

Количествения анализ на растежа на телата на рано диференцираните октоподни и глобуларни неврони беше направен на P2, P5, P14, P15, P25, P35, P60. За целта бяха използвани по три животни от всяка възрастова група (21 плъха). Препаратите бяха обработени по методиката за електронна микроскопия. Всеки пети срез с дебелина 5 µm беше събиран в последователен ред и оцветен с метиленово синьо. За измерване на клетъчната площ бяха избирани глобуларни и октоподни неврони с пълен профил на среза и наличие на ядръца в ядрото. С помощта на софтуер за анализ на изображения AnalySIS 3.2 се измери площта. Данните бяха анализирани статистически и представени в хистограми.

Електронна микроскопия след унилатерална неонатална деструкция на кохлеата

За това изследване бяха използвани 6 плъха, на които бе оперативно отстранена кохлеата в края на първата седмица след раждането. Под обща анестезия беше направена 5mm дъговидна инцизия зад дясната ушна мида. Бластемата на *meatus acusticus externus* беше прерязана, за да се открие *membrana tympani*. Тя беше частично повдигната и с помощта на фина ланцета кохлеата беше разрушена. Краищата на инцизията бяха възстановени. На 50 дневна възраст животните бяха анестезирани и транскардиално перфузирани през лявата камера. Материалът от ипсилатералните ядра беше обработен по стандартния метод за електронномикроскопско изследване, посочен по-горе. Десните темпорални кости бяха проконтролирани на светлинномикроскопски препарати за отчитане на деструкцията. Експерименталното премахване на кохлеата в избрания от нас период осигурява развитие на слуховите ядра без индукция на слуховия нерв.

Морфометричен анализ след акустична деривация

Използвани бяха 15 бели плъха, разделени на три възрастови групи, съответно на 10, 16 и 70 дни след раждането. На първите две групи беше инцизирана кожата зад лявата ушна раковина и лигиран външния слухов проход след стандартна процедура за анестезия, посочена по-горе. Третата група животни служеше за контрола. На 70 ден след раждането животните от трите групи преминаха през стандартната методика за взимане на материал по метода на Nissl. Отделените леви половици на мозъчните стволоче фиксирахме в 10% неутрален формол, които по рутинната методика включихме в парафинови блокчета. Срези с дебелина 7 μm се събираха в последователен ред и се оцветяваха по метода на Nissl с 0.1% Cresyl Violet. Количествено бяха изследвани само неврони с пълен профил на среза, ясни граници и ядръца в ядрото. Невроните бяха заснети на микроскопска система Olympus UC30 увеличение от 1 000 х. С помощта на софтуер за анализ на изображения AnalySIS 3.2 се измери площта. Данните бяха анализирани статистически чрез програма за статистическа обработка на данни StatGraphics Plus 5.1. Данните са представени графично.

Имунохистохимично изследване

Бели плъхове (12 броя) на възраст от P3 – P40 бяха анестезирани с pentobarbital sodium (50 mg/kg i.p.) и перфузирани през лявата камера с физиологичен разтвор и след това с 4% paraformaldehyde (PFA) в PBS, pH 7.4. Мозъчните стволоче се дофиксираха в същия разтвор и по стандартната процедура се включиха в парафин. Коронарни срези с дебелина 8 μm бяха монтирани върху предметни стъкла Superfrost. За имунохистохимично изследване беше използван avidin-biotin-peroxidase (ABC) метод. Срезите бяха депарафинирани и промити с PBS, pH 7.4. Антигенното разкриване беше извършено с 0.1 М цитратен буфер с (pH 6.0) в микровълнова фурна за 25 min. Последва охлаждане за 10 min, промиване на срезите с PBS, след това третиране за 30 min с 1% hydrogen peroxide (H_2O_2) в метанол за блокиране на ендогенната пероксидазна активност и пак промиване с PBS за 15 min. Срезите се инкубираха в 0.5% Triton-X 100 за 10 min. И след това за 1 h на RT в 10% normal goat serum (NGS) (S-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA) в PBS (blocking solution for polyclonal antibodies). Последва инкубиране с първично антитяло в блокиращ серум за 48 h на 4°C. Бяха използвани следните антители: anti-GluR1 (1:1000, 1 $\mu\text{g/ml}$; ab31232), anti-GluR2 (1:1000, 1 $\mu\text{g/ml}$; ab52176), и anti-GluR3-C-terminal antibodies (1:1000, 1 $\mu\text{g/ml}$; ab87609). За контролните срези се пропусна накапването с първично антитяло. Вторичното антитяло Biotinylated Goat anti-Rabbit IgG H&L secondary antibody (1:750; ab97049) в блокиращ серум беше инкубирано за 2h.

Последва третиране с Vectastain ABC-Peroxidase Kit (Reag. A + B) (Elite PK 6100 Standard, Vector Laboratories, Burlingame, CA,) за 90 min и проявяване с хромоген – Vector SG (Peroxidase substrate kit, SK-4700, Vector Laboratories) за 4 – 5 min. След появяване на цветна реакция срезите бяха дехидратирани във възходящи концентрации на етанол, просветлени в ксилол и включени в канадски балсам за визуализация под светлинен микроскоп. За дигитални изображения беше използвана камера Olympus UC30.

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Цитоархитектоника и характеристика на невроните на VCN, по време на постнаталното развитие, в материал оцветен по Nissl

Слуховият ядрен комплекс на плъха е изграден от морфологично и функционално обособени неврони, които се различават по форма и разпределение в отделните подразделения, следвайки общия план на организация на повечето бозайници. На територията на VCN невроналните типове са тонотопично организирани, образувайки отделни полета.

На материал оцветен по Nissl ние проследихме разположението и моделите на оцветяване на основните макроневрони на VCN. Използвани бяха критерии за ранна идентификация на невроните по схемите на Cant, (1982) и Larsen, (1984).

При новородените и първите постнатални дни (P2 - P3), целият ядрен комплекс е обхванат от слой малки, тъмно оцветени клетки. Невроните образуват компактна маса без тенденция за групиране и обособяване на характерните клетъчни полета. Всички невронални популации носят белези на недиференцираност. Те са с ирегуларна форма, издължени клетъчни тела с оскъдна цитоплазма, големи ядра, които заемат почти целия перикарион, с две и повече нуклеоли. (Фиг.1-А, Фиг.1-В, Фиг.2, Фиг.3).

По време на първите три седмици след раждането VCN е малко по обем, плътно запълнено от незрели неврони с различна големина. Молекулярният слой на DCN е оцветен светло, съответно на фиброзната му структура, с наличие на малък брой незрели микроневрони. Популацията от микроневрони е разпръсната във всички зони. Грануларните клетки в целия комплекс имат овални профили, с трудно определими граници. Ядрата им заемат голяма част от перикариона, оградени с тънък цитоплазматичен перваз. Границата между AVCN и PVCN е неясно очертана от тънките, слабо миелинизирани влакна на слуховия нерв. В периода P5 - P7, в задния полюс, плътността на незрелите неврони намалява и още в края на първата седмица се диференцират характерните за тази област макроневрони – октоподни, глобуларни и мултиполярни. Глобуларните клетки са с ексцентрични ядра и оформени перинуклеарни шапчици от Нислова субстанция. Октоподните също имат ексцентрични ядра, тъмна цитоплазма и светли, разграничими проксимални сегменти на основните дендрити. През този период особено впечатляващи с разнообразната си форма и размери са мултиполярните клетки. Те са удължени, с ирегуларна форма и плътна цитоплазма (Фиг.4).

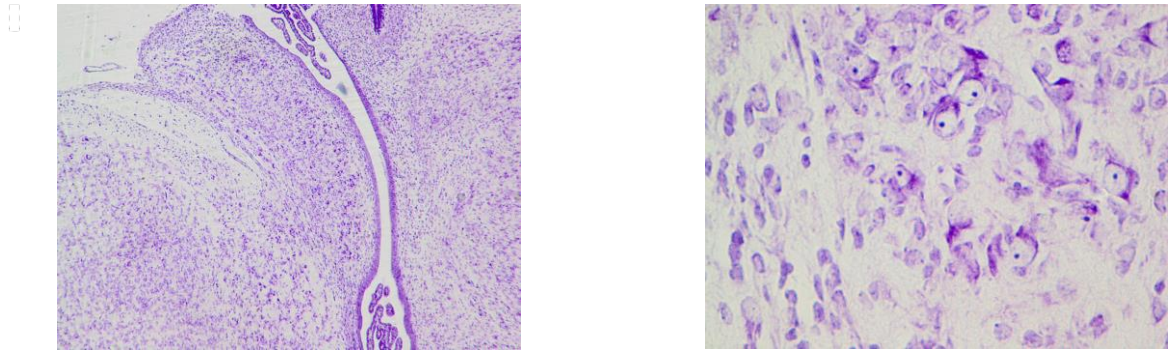
През втората и в началото на третата седмица (P14, P17) територията на AVCN и PVCN е заета от умалени модели на сферични, октоподни,

глобуларни и мултиполярни неврони. Характерни за този период са т. нар. тъмни клетъчни варианти отличаващи се с плътна, хомогенно запълнена с Нислова субстанция цитоплазма. Светлите варианти са с по-груба и неравномерно разпределена Нислова субстанция и създават впечатление за общо по-светла цитоплазма (Фиг. 5, Фиг. 6).

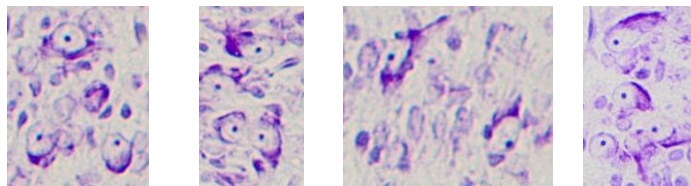
След P20-P25 невроните от всички подразделения са с характеристиките на зрели клетки. Големите сферични клетки са с кръгли или леко овални перикариони във всяко направление на среза, ядрата заемат централна или ексцентрична позиция, около тях Нисловата субстанция формира дискретни рингове или само ясен перинуклеарен слой (Фиг. 8). Вторият основен клетъчен тип на територията на VCN са глобуларните клетки, които се откриват в изобилие близо до бифуркацията на слуховия нерв в полето, означено като интерстициално ядро на Lorente de Nó. Полето с глобуларни клетки „възсяда” областта на първичната бифуркация на слуховия нерв, като се простира и в двете подразделения на комплекса. Тези неврони при плъха показват изразена тенденция за образуване на обособено поле около задния клон на слуховия нерв. През полето на глобуларните клетки преминават снопчета от десцендентните влакна които се насочват по посока на октоподните клетки на PVCN. На P25 глобуларните клетки на територията на VCN са овални или с форма на капка. В зоната на бифуркацията на слуховия нерв те имат по-малки размери и по-издължени клетъчни тела. Ядрата са ексцентрично разположени, Нисловата субстанция е фино диспергирана, с тенденция за оформяне на перинуклеарни шапчици, които при плъха не са така ясно разграничими, както при други видове (Фиг.9). Мултиполярните клетки заемат медиалната част на интерстициалното ядро и се откриват във всички невронални полета на VCN. Те имат неправилен, често триъгълен контур на перикариона и разнообразен модел на разпределение на Нисловата субстанция. Октоподните клетки са с форма на щит и при някои добре се разграничават проксималните сегменти на основните дендрити (Фиг.7). В периода между P20 и P25 ясно се разграничават светли и тъмни варианти от всички клетъчни типове (Фиг.7, Фиг.8, Фиг.9, Фиг.10, Фиг.11).

С напредване на възрастта, PVCN заема по-голяма част от обема на VCN. На фронтални срези формата му е капковидна, с добре маркирани граници към интерстициалното и дорзалното слухово ядро. През втория месец сферичните клетки напълно са оформили характерния Нислов модел, като в светлите варианти по-добре се разграничават Нисловите грануляции, образуващи непълни пръстени. Тъмните варианти са с по-хиперхромни ядра и цитоплазма и съдържат повече Нислова субстанция (Фиг.12). Мултиполярните неврони са с триъгълен контур (Фиг.13). Гигантски мултиполярни клетки, от двете подразделения на комплекса, през този период се откриват рядко (Фиг.14). В края на първия месец октоподните клетки заемат дефинитивно задния полюс на PVCN, където

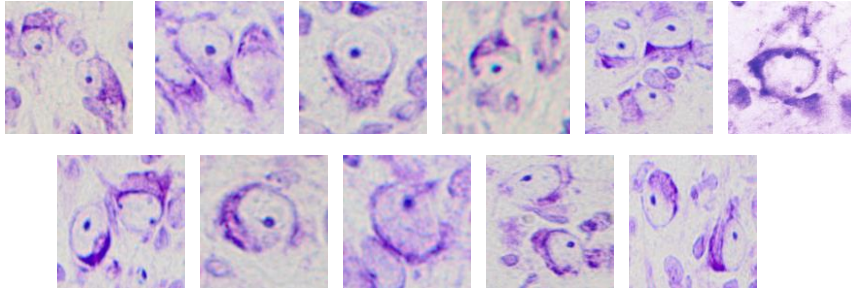
образуват своя област (Фиг.16). В това поле се наблюдават малки и мултиполярни клетки. През втория месец в популацията на глобуларните клетки преобладават тъмните варианти. Те имат капковидна форма, ексцентрични ядра и многобройни, фини Нислови грануляции в цитоплазмата (Фиг.15).



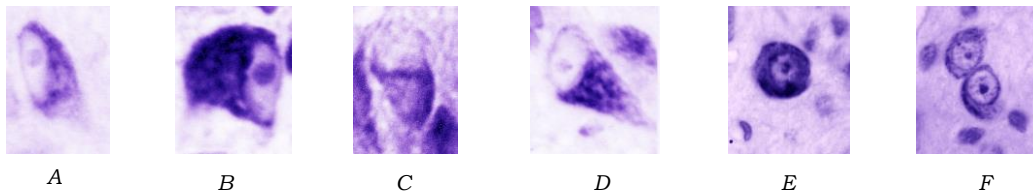
Фиг. 1. (А) Общ вид на слуховото ядро на P2. Коронарен срез. Оцветяване по Nissl. Увел. 40x. (В) Незрели макронеурони от територията на VCN със зона от грануларно-клетъчната пластинка на P2. Оцветяване по Nissl.



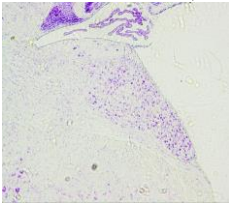
Фиг. 2. Групички от незрели неврони на VCN на P2 с малки неясно очертани грануларни клетки около тях. Оцветяване по Nissl. Увел.1000x



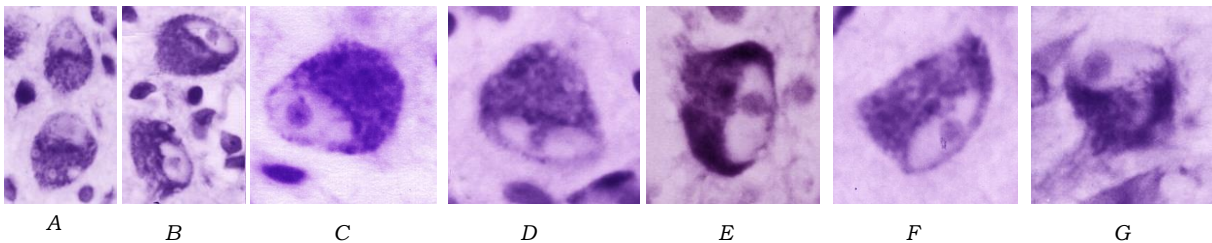
Фиг. 3. Незрели неврони на P2 от територията на VCN. Оцветяване по Nissl. Увел.1000х



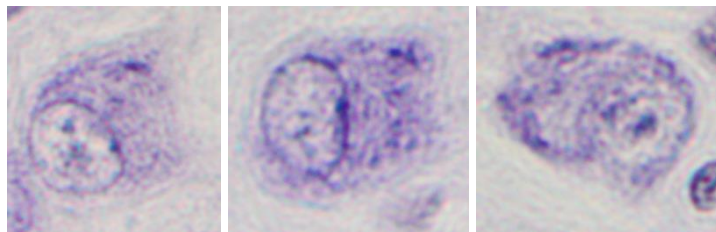
Фиг. 4. Незрели глобуларни клетки (А – D) и сферични клетки (Е, F) от територията на VCN на P6. Оцветяване по Nissl. Увел 1000х.



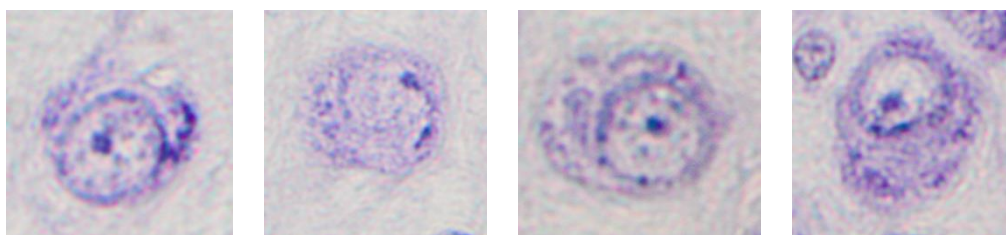
Фиг.5. Общ вид на слухово ядро на P14. Коронарен срез. Оцветяване по Nissl. Увел. 40х.



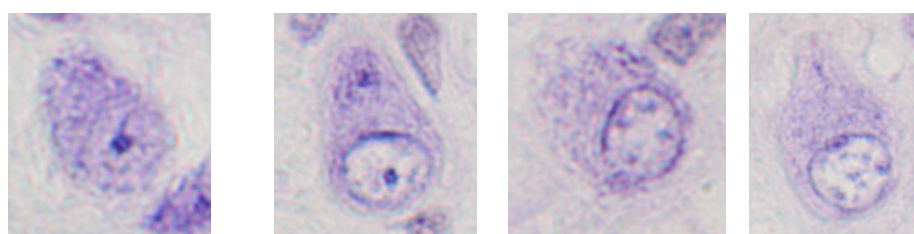
Фиг. 6. „Тъмни” варианти на глобуларни (А,В,С,D) и октоподни (Е,F,G) клетки на P14. Оцветяване по Nissl. Увел.1000х.



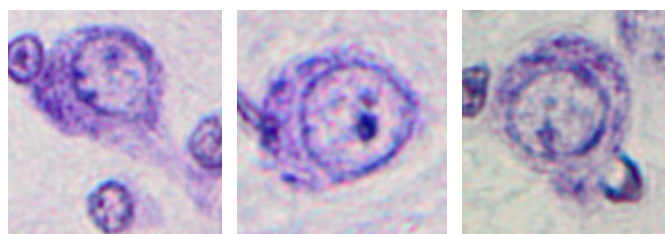
Фиг.7. Светли варианти на октоподни клетки на P25. Увел.1000х



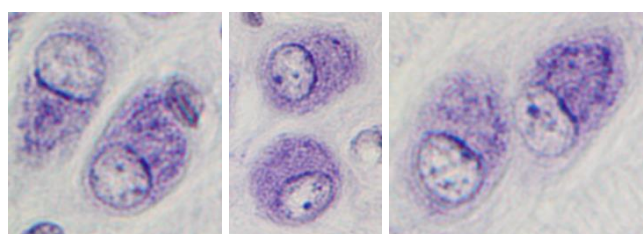
Фиг.8. Светли варианти на сферични клетки на P25. Увел. 1000x



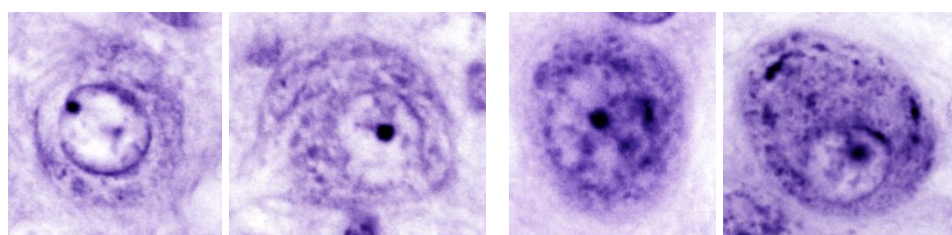
Фиг.9. Светли варианти на глобуларни (A – D) на P25. Увел. 1000x



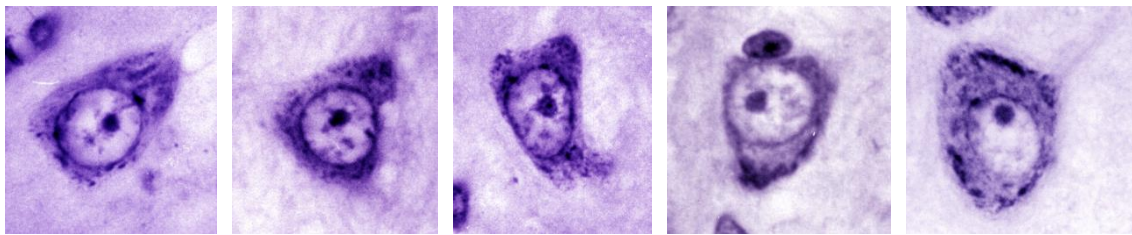
Фиг.10. Тъмни варианти на сферични клетки на P25. Увел. 1000x



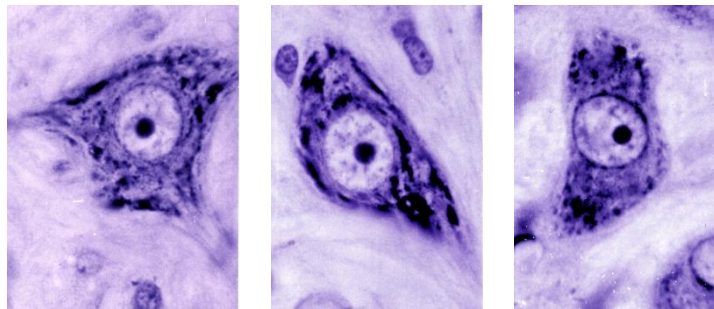
Фиг.11. Тъмни варианти на глобуларни клетки на P25. Увел.1000x



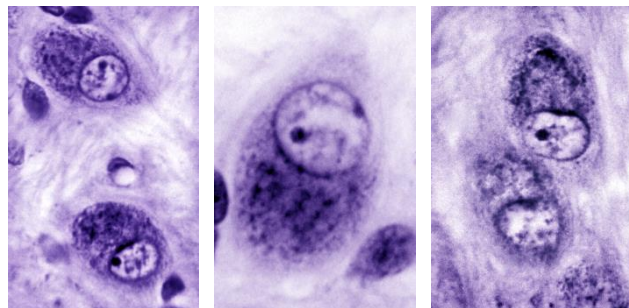
Фиг.12.Сферични клетки – светли и тъмни варианти (P50). Увел. 1000x



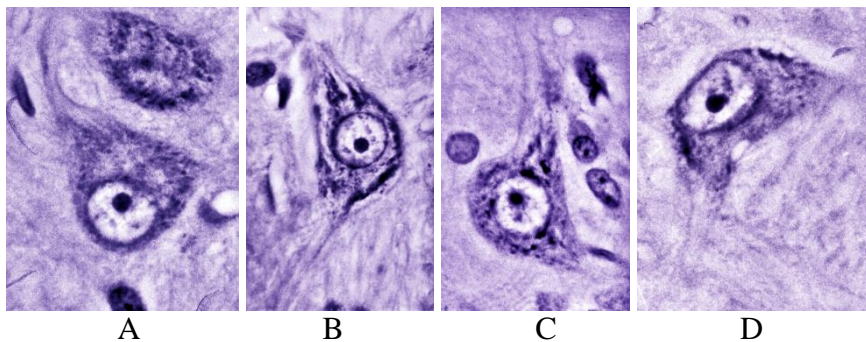
Фиг.13. Мултиполярни неврони от зоната на VCN P50. Увел. 1000х.



Фиг.14. Гигантски мултиполярни от зоната на VCN и дълбоките региони на DCN. Увел. 1000х.

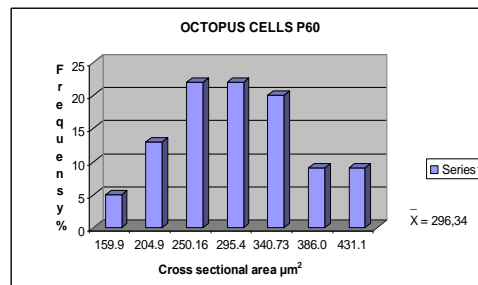
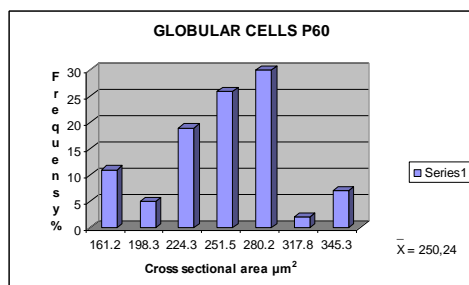
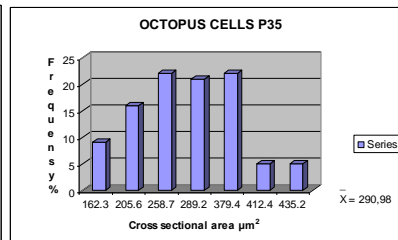
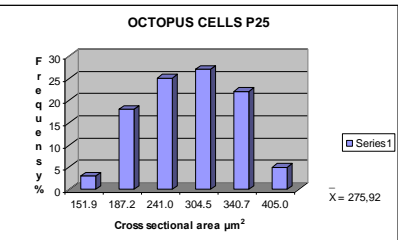
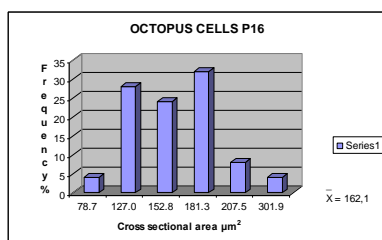
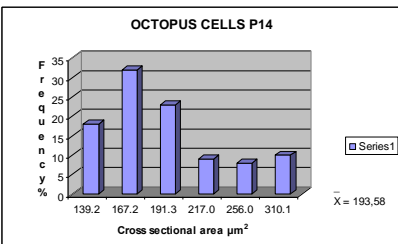
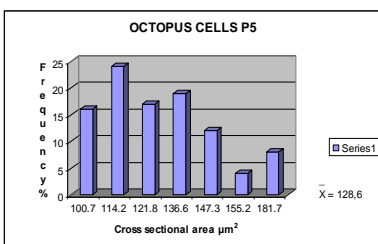
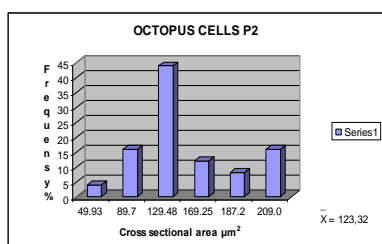
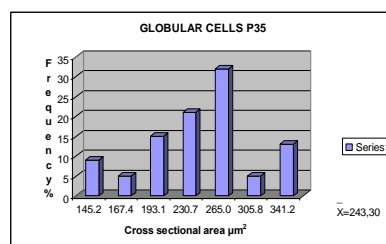
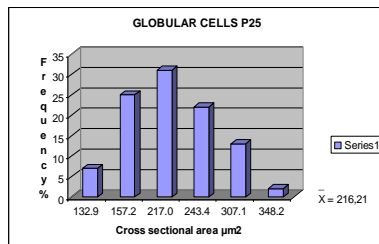
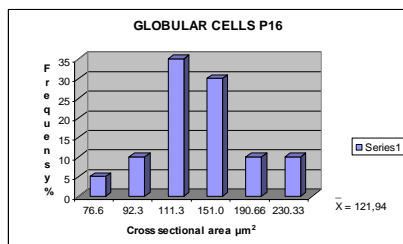
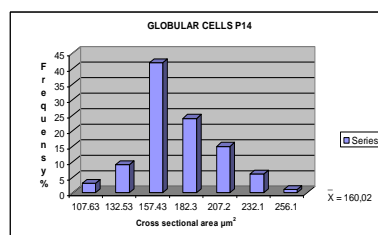
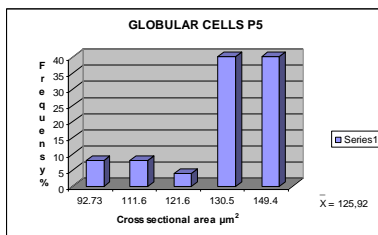
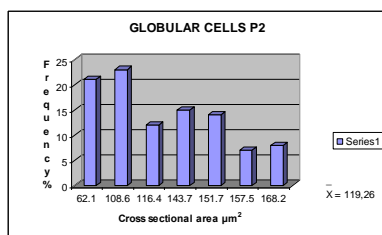


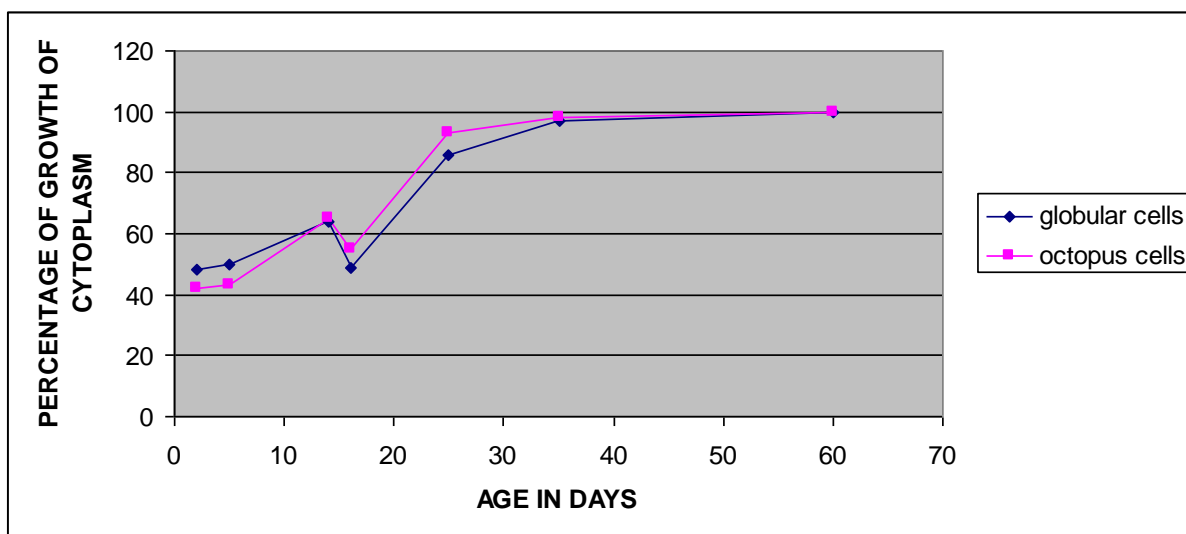
Фиг.15. Глобуларни клетки между P50 и P60 тъмни варианти. Увел. 1000х.



Фиг. 16. Октоподни клетки P50. B, C, D – светли варианти A, E, F, G, H – тъмни варианти. Увел. 1000х

Морфометричен анализ





Количественият анализ показва, че нарастването на клетъчните тела на октоподните и глобуларните неврони във VCN, на бели плъхове е най-интензивно през първия месец след раждането.

По-стръмна е растежната крива на октоподните клетки между 15 и 22 постнатален ден. На P3 площта на глобуларните клетки е 48%, а на октоподните е 42% от площта на морфологично зрелите клетки. Между P3 и P12 растежната крива нараства. И при двата клетъчни типа в периода P12- P15 се наблюдава спад, по-ясно изразен при глобуларните неврони. Следва етап на интензивно нарастване и при двата клетъчни типа до P35. След P40 промените в средната клетъчна площ са незначителни.

Описаният период на интензивен растеж и развитие се последва от втори, по-дълъг период, до 60-я ден, през който невроните достигат окончателните си размери.

2. Електронна микроскопия

Ултраструктура на VCN

За изучаване ултраструктурната характеристика на макронеуроните от слуховия комплекс наблюдавахме региони от предното подразделение на VCN, около корена на слуховия нерв и зони от по-каудалните региони. Идентифицирахме сферични, глобуларни и октоподни неврони, както и разнообразната популация на мултиполярните клетки. Използвахме критериите за ултраструктурна идентификация на невроните при плъх и други бозайници по класификациите на Cant and Morest (1979a,b), Cant and Casseday (1986), Tolbert and Morest (1982); Tolbert et al. (1982); Spirou et al. (2005); Cao et al., (2007), Gómez-Nieto and Rubio (2011).

Типична черта на макронеуроните на AVCN и в корена на слуховия нерв между P10-P25 е ирегуларната плазматична мембрана на постсинаптичните сферични (SBCs) и глобуларни (GBCs) клетки. Клетъчната мембрана е с вълнообразен контур, изпъкваща между многобройните синаптични терминали. Характерно за глобуларните неврони от всички зони на VCN са соматичните протрузии и спини. Зоните на протрузиите между отделните бутони, в повечето случаи, са лишени от органели (Фиг.17, Фиг.18, Фиг.19, Фиг.20).

Ядрата на сферичните и глобуларни клетки са големи, светли, обичайно централно разположени, въпреки че могат да бъдат наблюдавани и в ексцентрична позиция. Контурът на ядрената обвивка е гладък, без инвагинации. Единично голямо проминиращо ядърце и малки купчинки хетерохроматин заемат светлата кариоплазма, типична за големите неврони (Фиг.22). В ядрата на някои глобуларни, сферични и октоподни неврони ние откриваме нуклеарни включвания под формата на филаментозни нуклеарни пръчици, партикули и нуклеарни листчета (Фиг.20, Фиг.21).

Ядрото е заобиколено с цистерни на гранулиран ER, подредени в сакчета и в някои зони мембраните на гранулиран ER са свързани с външната мембрана на ядрената обвивка. В целия перикарион се откриват рибозоми, формиращи розетки, сакчета от гранулиран ER с асоциирани полирибозоми и многобройни гликогенови гранули. Характерната слоеста структура на перикариона съответства на модела на Нисловата субстанция, описана със светлинна микроскопия от Osen (1969), Cant и Morest (1979). Заобикалящ ядрото е обширен комплекс на Голджи, с тубуларни профили, везикули с електроннопътна сърцевина и в някои случаи покрити везикули. Рехаво организирани тубуларни профили от гранулиран ER, често в непрекъснат контакт с мембрани на субсърфисни цистерни, се откриват в цялата перикариална цитоплазма. Като цяло, цитоплазмата в повечето неврони изглежда тъмна от присъствието на многобройни

свободни рибозоми. Други органели, като митохондрии, лизозоми, мултивезикуларни телца, липофусцинови гранули и микротубули са равномерно разположени в цитоплазмата.

Характерна особеност на цитоархитектониката в предните полета на вентралното ядро са островчета от невропил около плътно пакетирани клетъчни тела и снопчета на големи миелинизирани влакна. Проксималните дендрити на основните макроневрони са превалиращ компонент на невропила. В задните и дорзалните подразделения на VCN, невропилът е забележимо по-сложен, с повече синаптични профили, разнообразни дендритни сегменти, принадлежащи на други типове неврони.

В ранните периоди на синаптичното развитие, мембранните апозиции са изгладени, с отсъствие на соматични инклузии (Фиг.23, Фиг.24). В периферните зони на цитоплазмата, в полетата на апозиция с незрелите синапси се разполагат успоредно подредени цистерни на гранулиран EP. В дълбочина те постепенно се разгъват и оформят необичайни по форма фигури (Фиг.25, Фиг.26, Фиг.27).

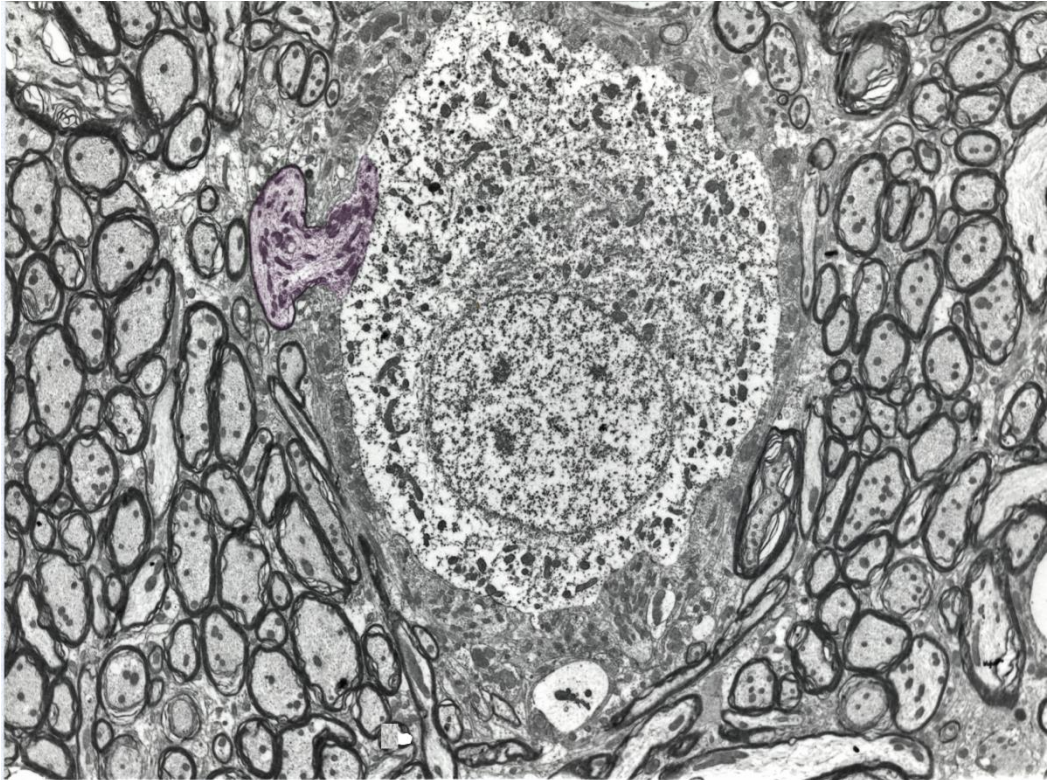
С напредване на възрастта синаптичната цепка се разширява и в нея се открива плътен или филаментозен материал (Фиг.32, Фиг.33). По време на първите 15 постнатални дни фината структура на *endbulbs* остава относително постоянна. В края и непосредствено след критичният период от развитието, пространството между терминала и постсинаптичната клетка става вълнообразно и се разширява. То може да съдържа глиални израстъци (Фиг.38, Фиг.39, Фиг.40) и малки синаптични терминали (Фиг.37).

Незряла черта на синапсите е присъствието на соматични евагинации по посока на терминалите. Откъм соматичната страна се наблюдават мембранни уплътнения, с тенденция за образуване на протрузии по посока на пресинаптичната част (Фиг.28, Фиг.29, Фиг.30, Фиг.31, Фиг.41). Постсинаптичната цитоплазма съдържа тънък слой електронноплътен материал, придаващ на синапса леко асиметричен вид. Постсинаптичните уплътнения (PSDs) са обичайно върху соматични конвекситети и около тях, между пре- и постсинаптичните мембрани, се наблюдават вариращи по размери и брой адхезионни контакти (Фиг.38). Синаптичните контакти са с асиметрични, мембранно-асоциирани уплътнения с везикуларни клъстери, близо до пресинаптичната мембрана. Несинаптичните контакти от типа *attachment plaques* са със симетрични мембранни уплътнения и по-широка интерцелуларна цепка. Някои от адхезионните контакти имат характерна близост с митохондрии и везикуларни органели в пресинаптичния компонент. Адхезионните мембранни контакти от типа *puncta adherentia (attachment plaques)* се наблюдават като къси симетрични мембранни уплътнения, без връзка със синаптичните везикули. PSDs са разграничими от адхезионните контакти по асиметричните мембранни

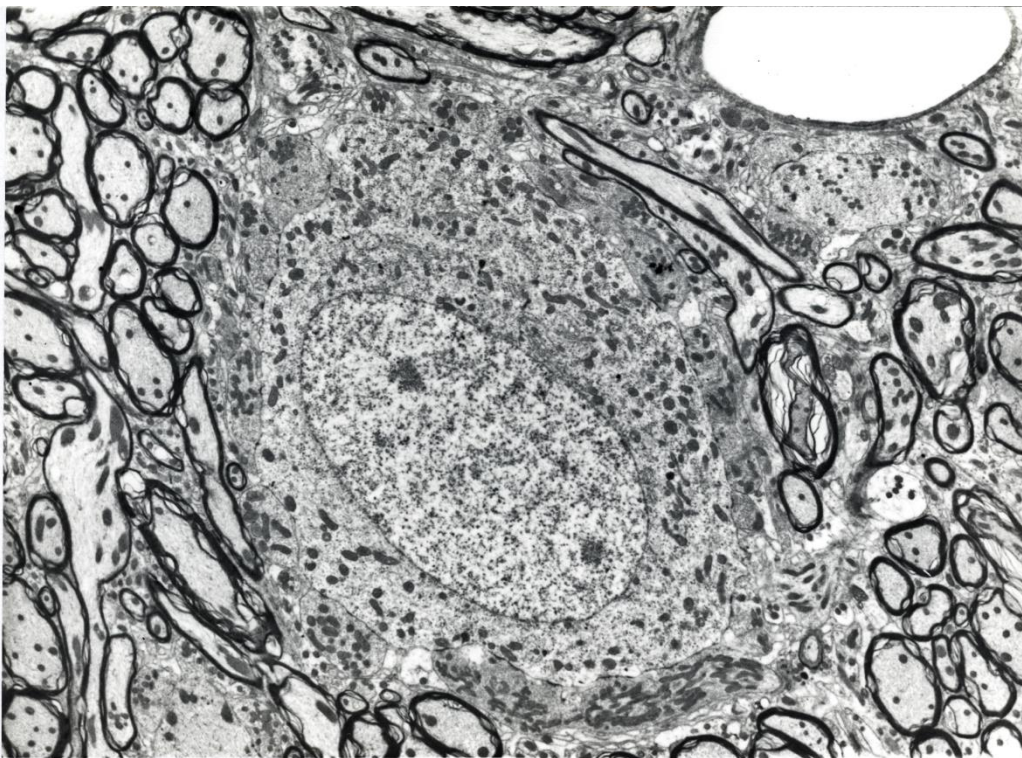
електроннопълтни зони и присъствие на синаптични везикули в периметъра на активната зона. PSD изглеждат като точковидни мембранни уплътнения, разполагащи се върху вътрешната повърхност на соматичните конвекситети и разположени около тях синаптични везикули (Фиг.36, Фиг.40, Фиг.42). По време на първите двадесет постнатални дни, местата на невротрансмитерно освобождаване са маркирани с къси постсинаптични уплътнения (PSDs), с няколко синаптични везикули, а след P20 и PSDs са забележимо по-дълги. Интермембранозни цистерни се появяват между P20 – P30 и стават характерна черта на синаптичните профили (Фиг.43, Фиг.44).

В цялото вентрално подразделение на комплекса каликсовидните окончания участват не само в аксосоматични синапси, но и в аксодендритни синапси със съседни големи дендрити (Фиг.34, Фиг.35, Фиг.38, Фиг.43, Фиг.45, Фиг.46). По време и непосредствено след критичния период от матurationията на комплекса се наблюдават синаптични диади. Те се образуват между две съседни клетки и голямо каликсиформено окончание разположено между тях (Фиг.36).

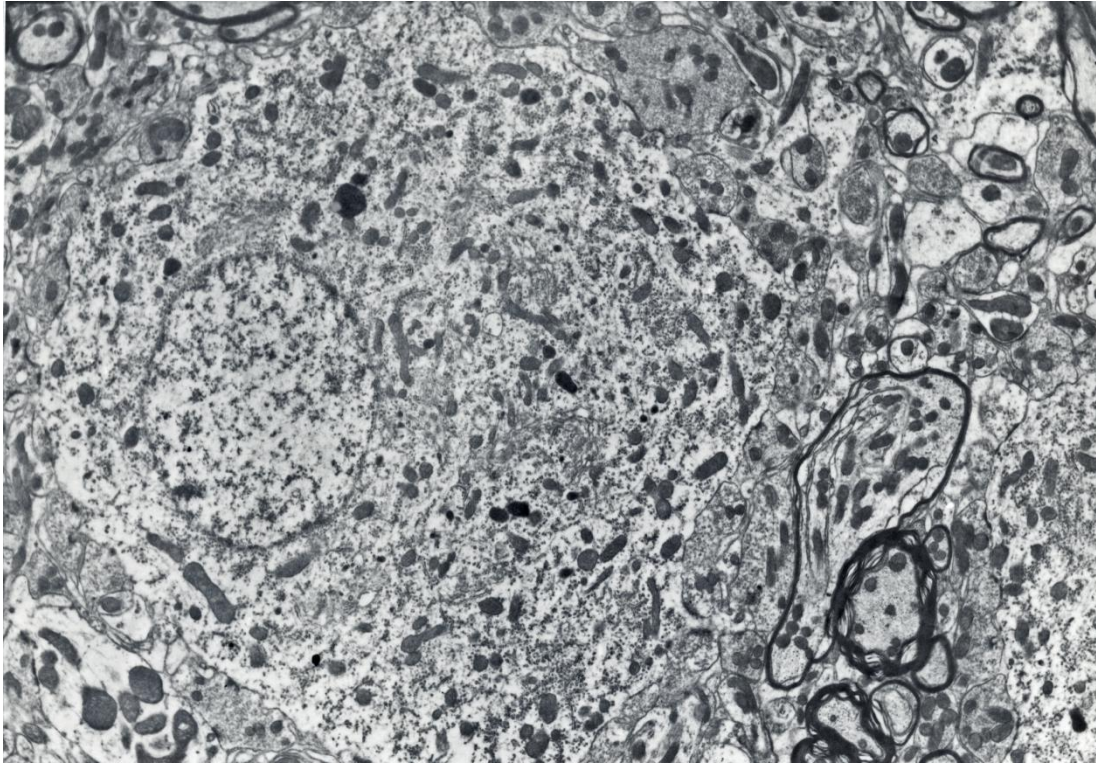
На възраст около P30 каликсовидните синапси придобиват зрял морфологичен вид. На този етап те съдържат микротубули и неврофиламенти, заобиколени от везикули. По соматичната повърхност те изявяват мултиплени синаптични контакти, с характерна огънатост на синаптичната цепка под формата на дъга. С напредване на възрастта се увеличава броя и плътността на синаптичните везикули. Около *endbulbs* се наблюдават преплитащи се астроцитарни ламели от глиални израстъци, понякога организирани в тънка обвивка (Фиг.47, Фиг.48).



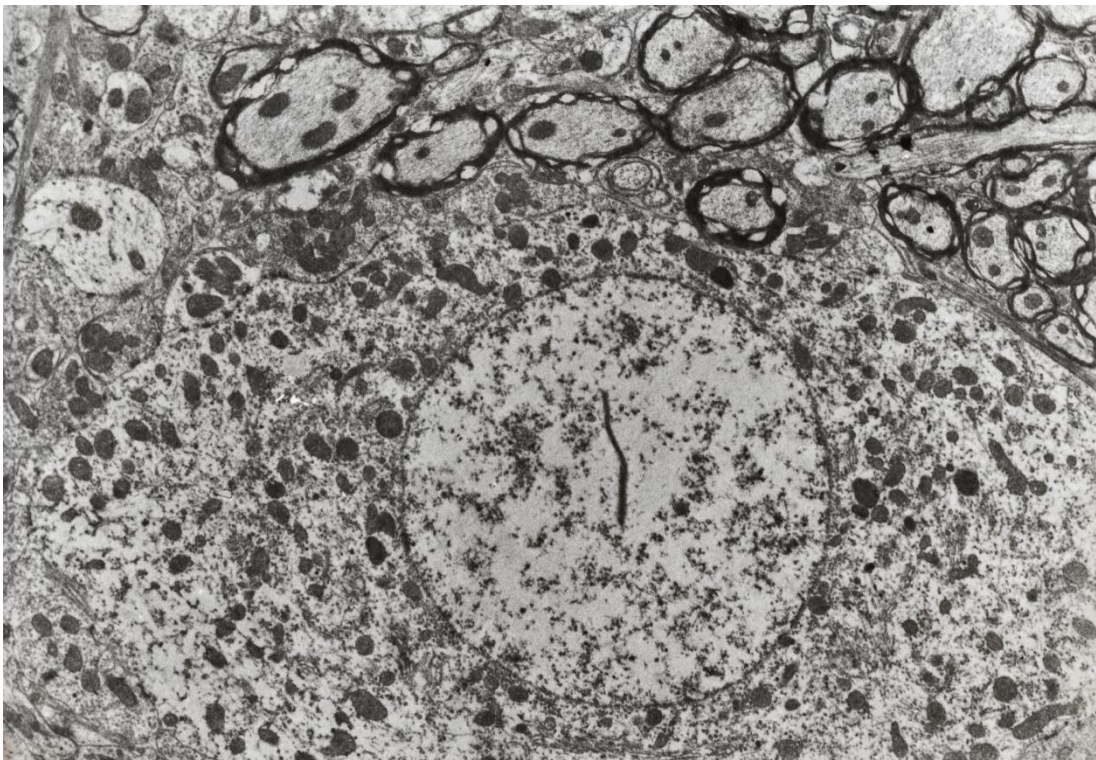
Фиг. 17. Глобуларна клетка от корена на слуховия нерв на P14, заобиколена с миелинизирани нервни влакна. Вляво, освобождаващо се от миелиновата обвивка нервно окончание, формиращо голям аксосоматичен синапс от типа *endbulb*. Увел. 1350x



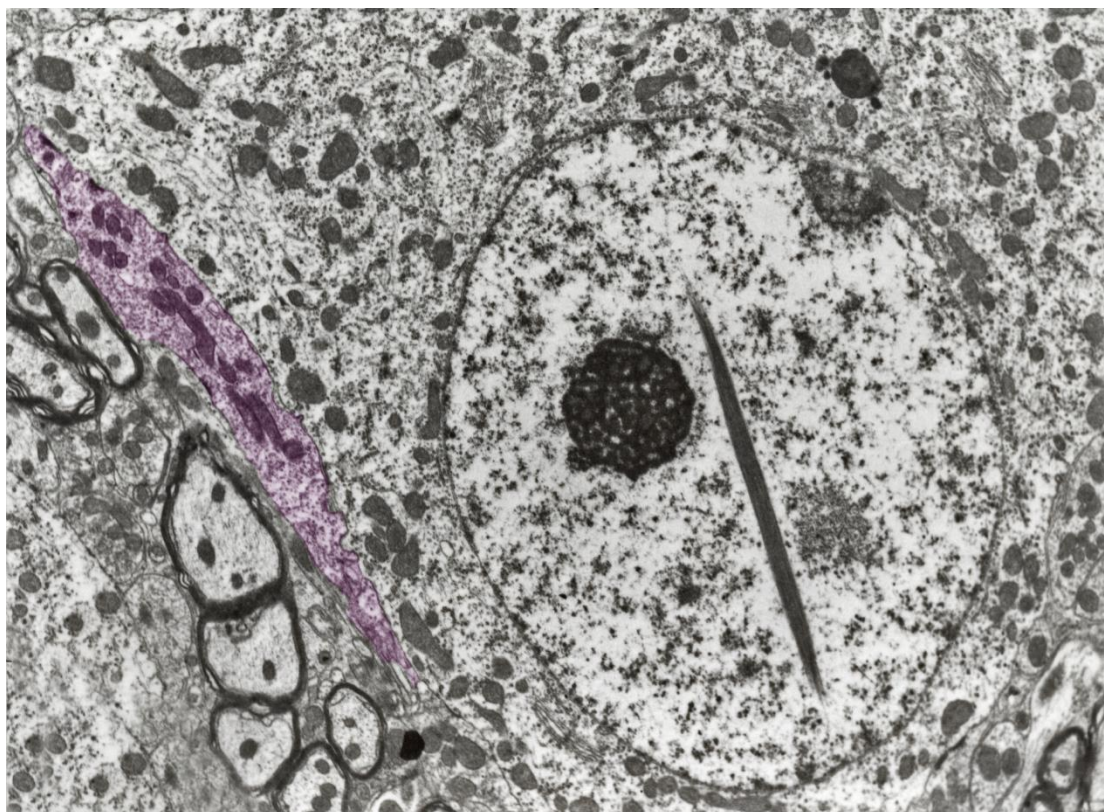
Фиг. 18. Сферична клетка (SBC) от зоната на AVCN на P15, изцяло заобиколена с аксосоматични терминали. Увел. 1350x



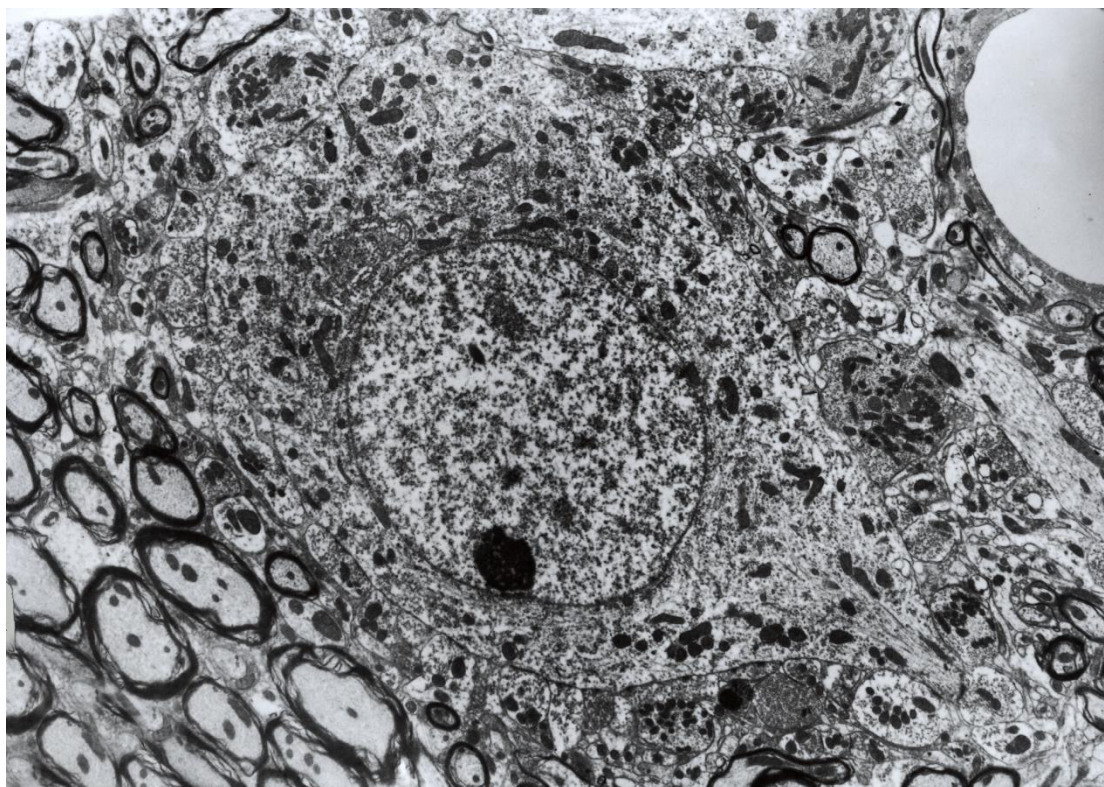
Фиг. 19. Сферична клетка (SBC) от зоната на AVCN на P15 с ирегуларна клетъчна повърхност и протрузии на клетъчната мембрана между многобройните аксосоматични синапси. Увел. 1350x



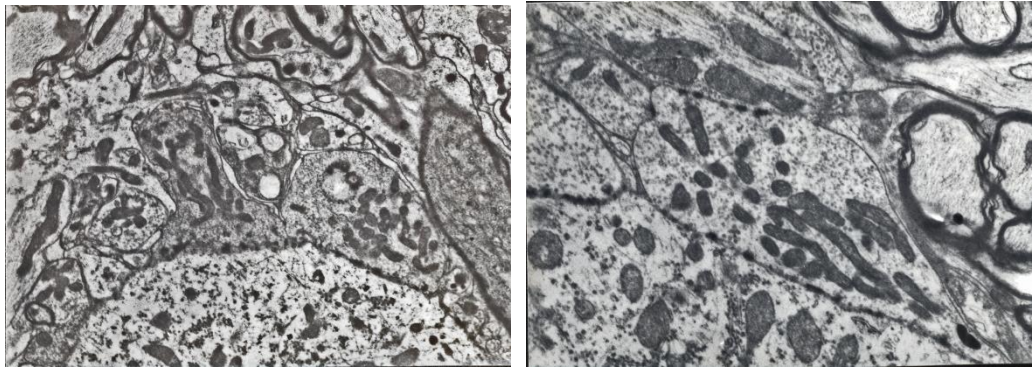
Фиг. 20. Глобуларна клетка на P20 с ирегуларна клетъчна повърхност, нуклеарна пръчица и дисперсен хроматин. Увел. 1600x



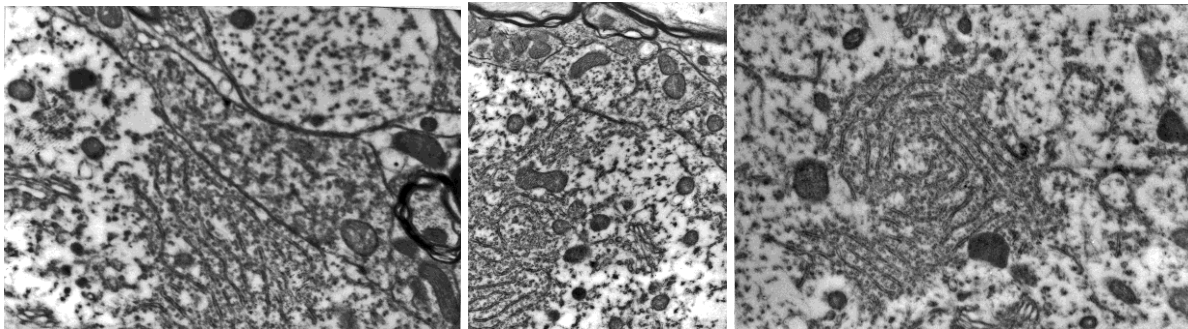
Фиг. 21. Глобуларна клетка с дисперсен рибозомален модел на P22. Вляво голям аксосоматичен синапс, нуклеарна пръчица и ретикуларно ядърце. Увел. 2000x



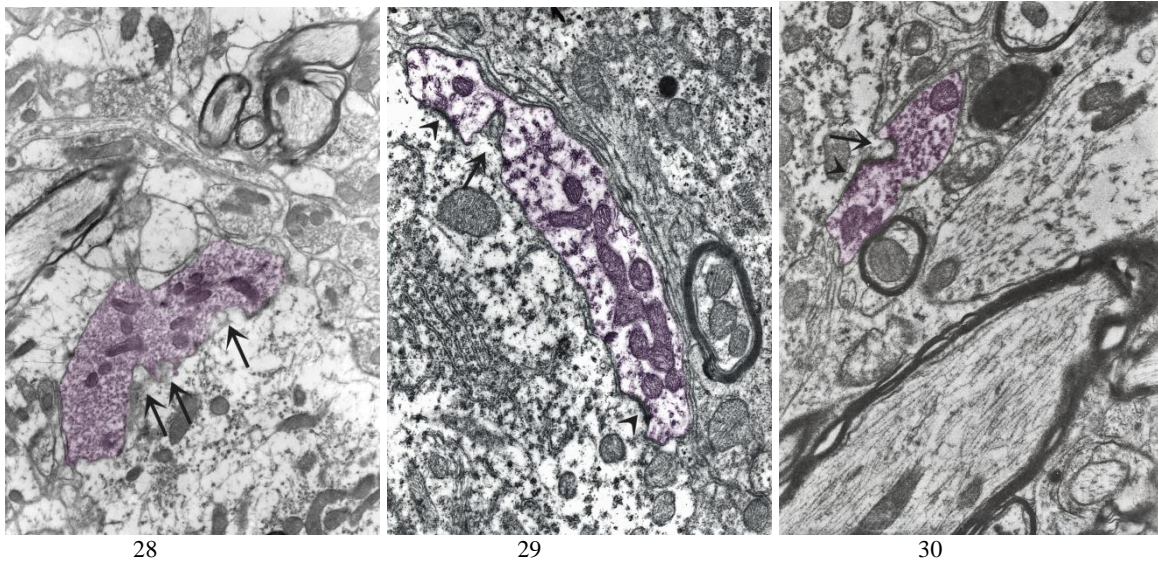
Фиг. 22. Глобуларна клетка с големи аксосоматични синапси от типа *endbulb*, разположени в зоната на появяване на дендрита на P25. Увел. 1250



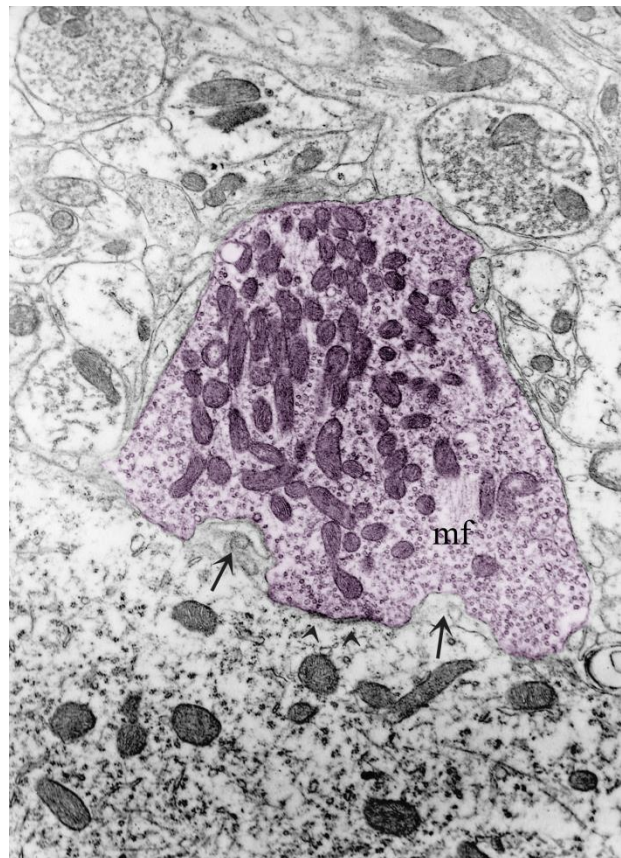
Фиг. 23, 24. Аксосоматични синапси, покриващи голям сегмент от клетъчното тяло, с многобройни електроннопътни точковидни уплътнения в зоните на контакт (P12). Увел. 8000x (фиг. 23) , 10 000x (фиг. 24)



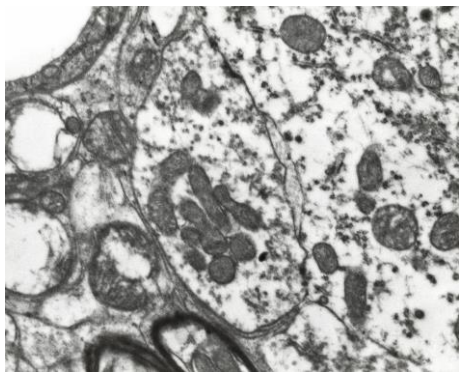
Фиг. 25, 26, 27. Аксосоматични синапси в тясна апозиция между пре- и постсинаптичната мембрана, с характерно разположение на цистерни на ГрЕР и оформяне на преходни телца в периферната цитоплазма (P12). Увел. 10 000x



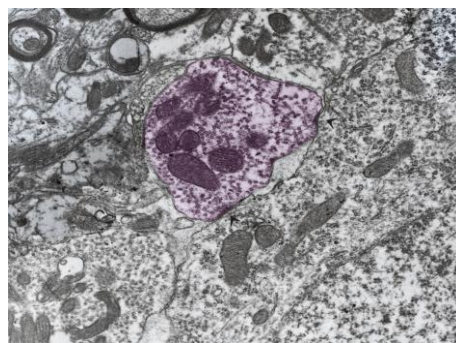
Фиг. 28, 29, 30. Аксосоматичен синапс със соматични протрузии и спини (стрелки) по посока на нервното окончание и активни зони, разположени по синаптични конвекситети. Глиални листове около нервното окончание, образуващи тънка капсула. P16, P17. Увел. 10 000x



Фиг. 31. Аксосоматичен синапс със соматични протрузии и везикуларни профили в дилатирани участъци на синаптичната цепка (стрелки), активни зони (връхчета на стрелките) P20. Увел. 10 000x

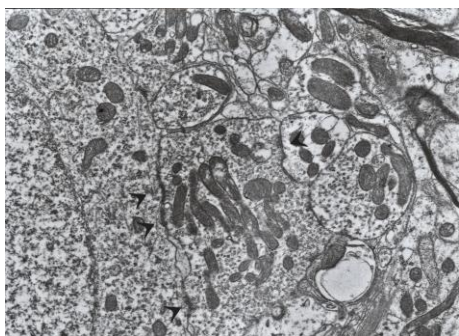


32

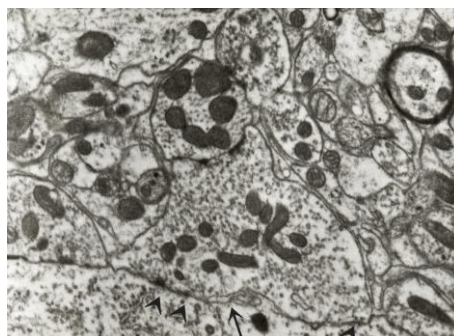


33

Фиг. 32, 33. Аксосоматични синапси с дилатирана синаптическа цепка, изпълнена с филаментозен материал и единични активни зони (връх на стрелките) P13. Увел. 10 000x

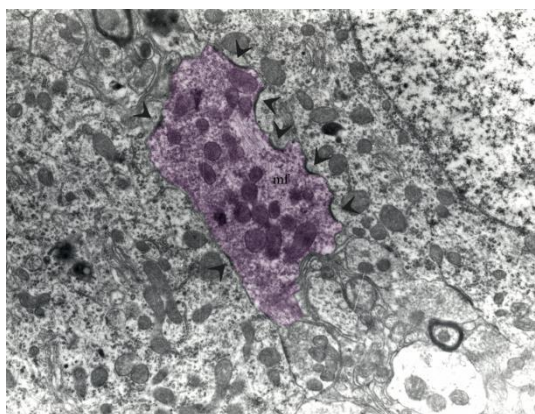


34

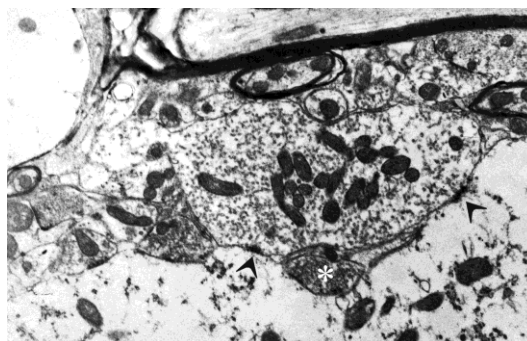


35

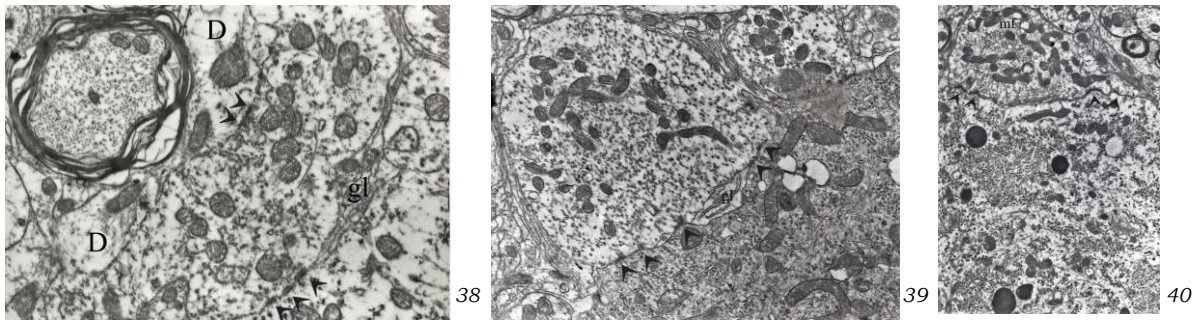
Фиг. 34, 35. Аксосоматични синапси с дилатирана синаптическа цепка с филаментозен материал в нея (стрелка) и единични активни зони (връх на стрелките) P16. Каликсообразните нервни окончания са в състава на комплексни синаптически полета със съседни дендрити и аксонални окончания. Увел. 10 000x



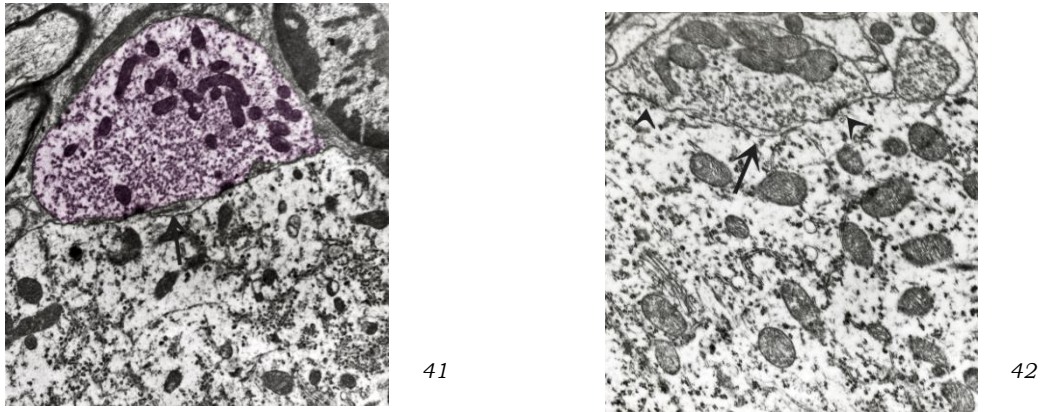
Фиг. 36. Синаптическа диада. Вдясно соматична протрузия и соматични конвекситети с активни зони (връх на стрелките) P20. Увел. 10 000x



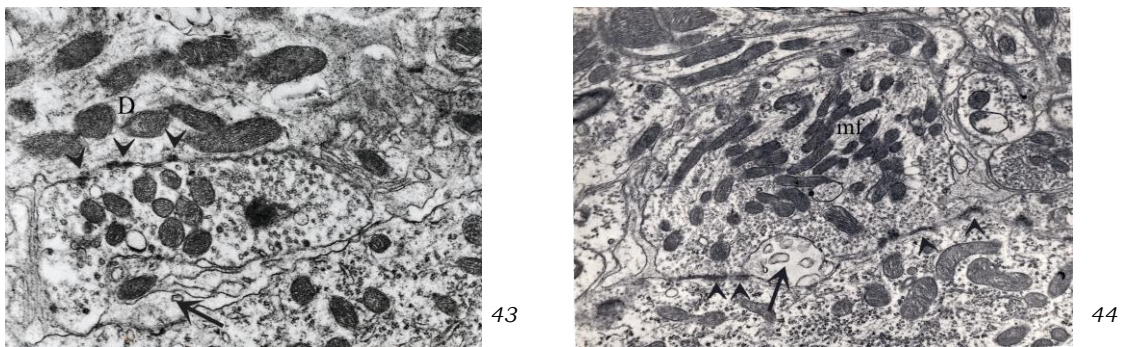
Фиг. 37. Аксосоматичен синапс с дилатирана синаптическа цепка и малко аксонално бутонче в нея, единични активни зони (връх на стрелките) P13. Увел. 10 800x



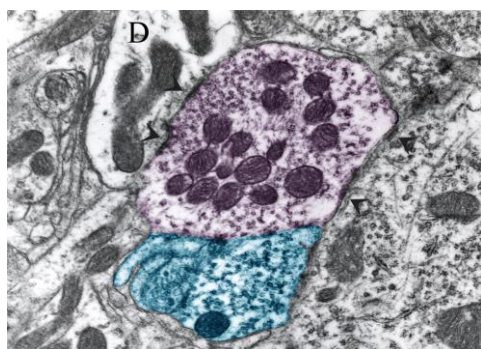
Фиг. 38. Аксосоматичен и аксодендритни синапси (връх на стрелките). Дилатирана синаптична цепка, с разположени в нея глиални листове (gl) и адхезионни контакти откъм страната на неврона P15. Увел. 12 000x. Фиг. 39, 40 Аксосоматични синапси с глиални листове в синаптичната цепка.



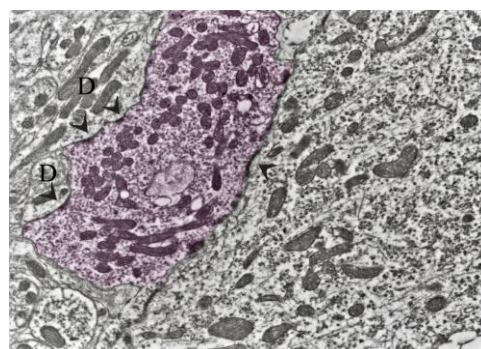
Фиг. 41, 42. Аксосоматични синапси с леко дилатирана синаптична цепка (стрелка), активни зони (връх на стрелките) P18. Увел. 10 000x



Фиг. 43, 44. Аксосоматични синапси с леко дилатирана синаптична цепка с везикуларни профили (стрелка), активни зони (връх на стрелките) P18. Увел. 10 000x

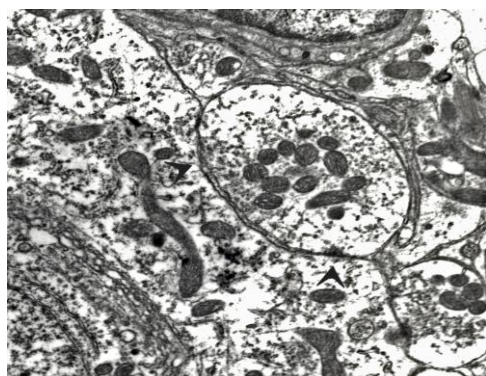


45

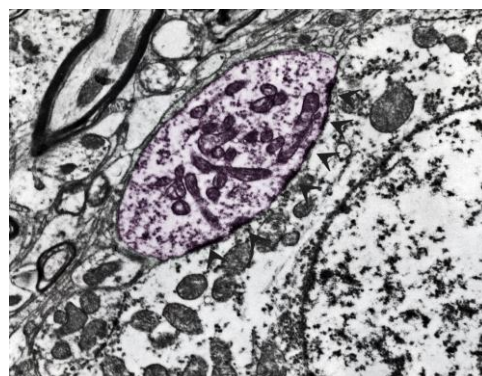


46

Фиг. 45, 46. Аксосоматични и аксодендритни синапси с адхезионни контакти (връх на стрелките). Увел. 9200x



47



48

Фиг. 47, 48. Аксосоматични синапси (връх на стрелките) с характерен контур на синаптичната цепка по посока на неврона. P18. Увел. 8600x

Грануларноклетъчен домен

Нашето изследване е фокусирано върху повърхностния слой от грануларни клетки заобикалящи VCN, групичките от грануларни клетки на територията на VCN и пластинката разделяща VCN от DCN. Тези региони са в съседство, продължават един в друг и получават една и съща информация. Те образуват компактна група, за разлика от тези на DCN, което ги прави подходящи за наблюдение. В изследваните зони на грануларноклетъчния домен регистрираме различни по морфология и синаптична организация микронеурони, най-малките от които са грануларните клетки.

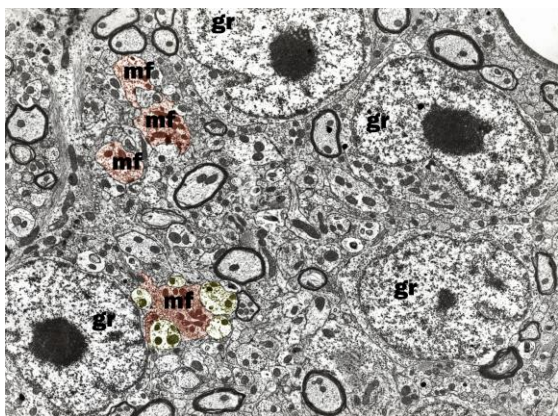
Грануларните клетки са малки неврони с два или три къси, гладки радиращи от тялото дендрити, които се разклоняват и най-често завършват с власинковидни или дигитиформени разширения. Клетъчната мембрана е гладка и очертава овален периметър. Ултраструктурно ядрото е голямо, светло с акумулации от хетерохроматин, често с инвагинации на нуклеарната мембрана, запълващо почти изцяло перикариона (Фиг.49, Фиг.50, Фиг.51, Фиг.52).

Клетките с по-големи размери и с повече цитоплазма определяме като грануларно-асоциирани неврони (Фиг.53).

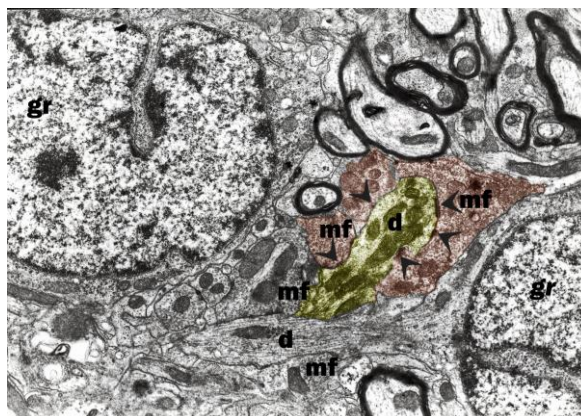
Характерна черта на регионите с микронеурони, при електронномикроскопски наблюдения, е присъствието на мъховидни нервни окончания (*mf*-бутони), участващи в комплексни синаптични полета приличащи на церебеларните розетки. Мъховидните терминали от различните групи участват в гломерули с дендритите както на грануларните клетки, така и на другите микронеурони. В центъра на структурите се разполагат относително големи, ирегуларни профили на мъховидни нервни окончания (*mf*) с плътно пакетирани сферични синаптични везикули, многобройни митохондрии, вариращо количество гликоген и проминиращи активни зони. Гломерулите които наблюдаваме са хетерогенни, както по отношение морфологията на *mf*-терминалите, така и по разнообразната характеристика на контактуващите с тях дендрити. Най-многобройни са синаптичните полета, при които около централните терминали се разполагат дендрити с малки размери и овални профили на напречен срез. Този тип гломерули отнасяме към класическите форми на грануларно-клетъчните гломерули (Фиг.54, Фиг.56). Грануларно-клетъчния гломерул се характеризира с дендрити, забележимо по-малки от диаметъра на мъховидното окончание и къси синапси. Около централната структура (мъховидното нервни окончание) се разполагат дисталните сегменти на дендритите на грануларните клетки, които се разширяват и образуват т. нар. грануларно клетъчни дендритни „лапички” (Фиг.55, Фиг.59, Фиг.60). Грануларноклетъчните гломерули в различните региони от своя страна също показват различия. В повърхностните региони

мъховидното окончание образува синаптични контакти не само върху дендритите на грануларните клетки, но също и върху дендритните спини, пенетриращи мъховидното окончание. Тези дендритни израстъчета са по-дебели и с по-голям калибър от несинаптичните дендритни израстъци (Фиг.55, Фиг.57). В други полета дендритите са с големи размери и неправилна форма, съдържат повече митохондрии, наподобяват вълнички и почти изцяло заобикалят централния терминал. Тези гломерули се отличават от грануларно-клетъчните по уникалните черти на дендритните профили и по-големите тип 1 синаптични контакти с централните мъховидни окончания. Гломерули с подобна морфология определяме като UBC–гломеруларна мозайка (Фиг.58). Дендритите и на грануларните и на UBCs образуват асиметрични синапси, както с централния терминал, така и с периферни по-малки мъховидни окончания (mf1) (Фиг.55, Фиг.58, Фиг.59).

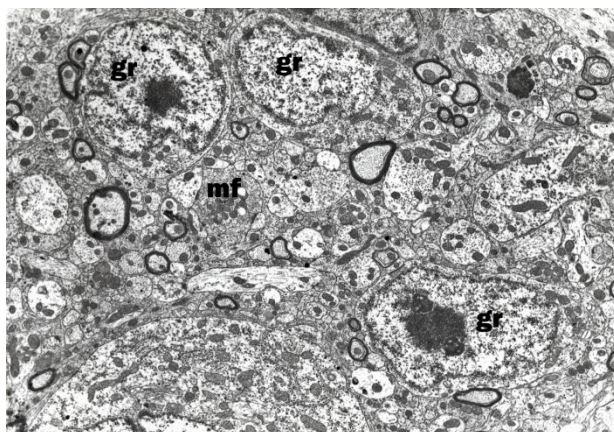
При грануларните клетки синаптичните контакти с mf-бутоните се срещат често върху дендритното стволче (Фиг.50), а върху израстъчетата по-рядко се откриват постсинаптични уплътнения. Цитоскелеталните елементи, също служат за критерии при ултраструктурната идентификация на дендритните профили. Многобройни неврофиламенти са характерни за дендритите на UBC, както и за аксоните, а микротубулите са по-многобройни в дендритите на грануларните клетки. Дендритите могат да се наблюдават в надлъжен план, а при други планове на среза не се откриват контактите им с мъховидния терминал и участието им в синаптичните структури. Поради многото възможни равнини на срезните повърхности не всички компоненти на синаптичните гломерули, включително и „капсулката” от глиални израстъци могат да бъдат документирани.



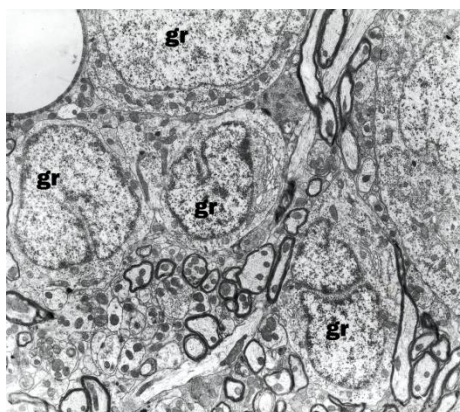
Фиг. 49. Групичка от грануларни клетки (*gr*) и съседния невропил със синаптични гломерули, в центъра на които е разположено мъховидно нервно окончание (*mf*). Увел.1200x



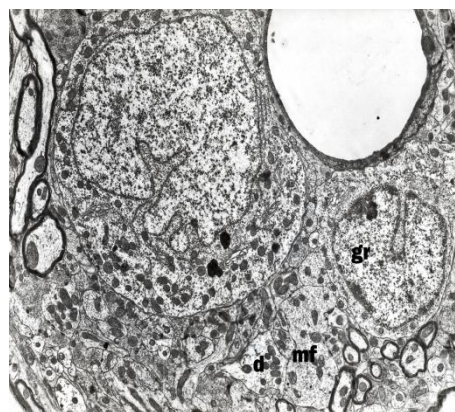
Фиг. 50. Грануларни клетки (*gr*) с проксимални сегменти на дендритите (*d*) и мъховидни нервни окончания (*mf*), контактуващи с тях. Увел.1800x



Фиг. 51. Групичка от грануларни клетки (*gr*) от зоната на VCN, заобиколена от малки по размери миелинизирани нервни влакна. Увел.1200x



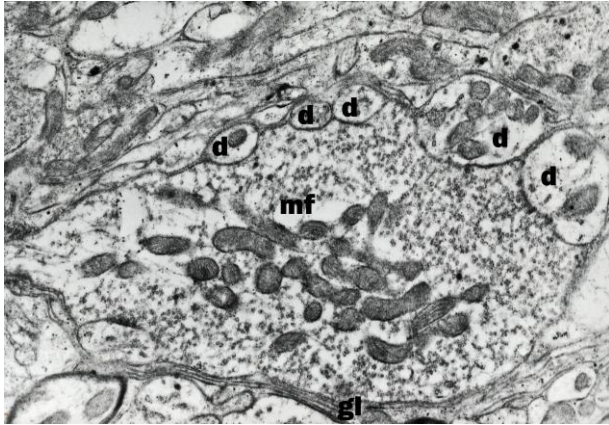
52



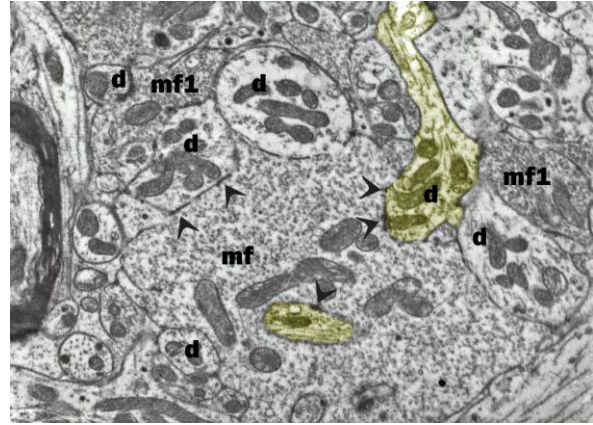
53

Фиг. 52. Грануларни клетки (*gr*) от грануларноклетъчната пластинка на VCN с синаптичен гломерул в центъра; мъховидно нервно окончание (*mf*). Увел.1200x

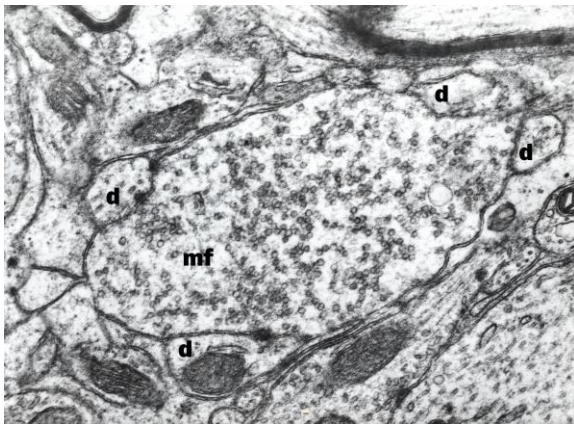
Фиг. 53. Грануларноасоцииран неврор в центъра, вдясно малка грануларна клетка (*gr*), мъховидно нервно окончание (*mf*), контактуващо с голям дендритен профил (*d*). Увел.1200x



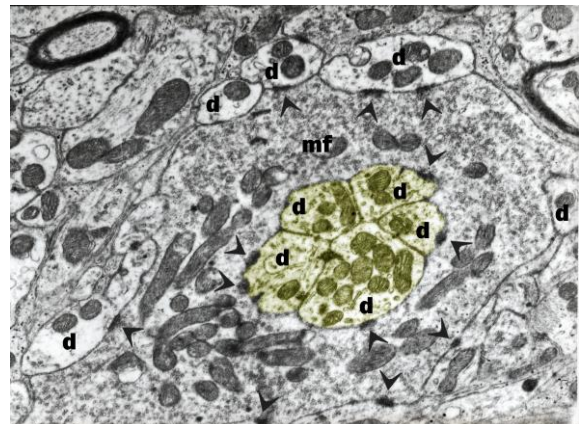
Фиг. 54. Грануларно-клетъчен гломерул, контактуващ с малки и средни по размери дендрити (d); мъховидно нервно окончание (mf); заобиколен с глиални листове (gl) Увел.10 000x



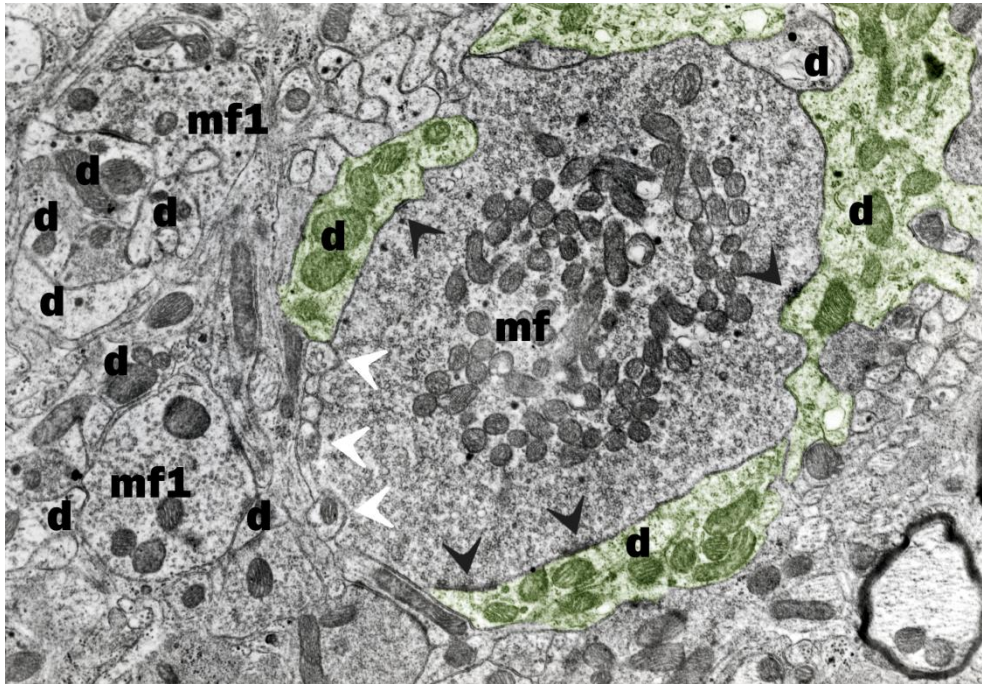
Фиг. 55. Смесен тип гломерул, контактуващ с малки и средни по размери дендрити (d) Грануларно-клетъчна дендритна лапичка и пенетрираща дендритна спина (оцветени) мъховидно нервно окончание (mf); малки мъховидни окончания в периферията (mf1); активни зони (стрелки). Увел.9200x



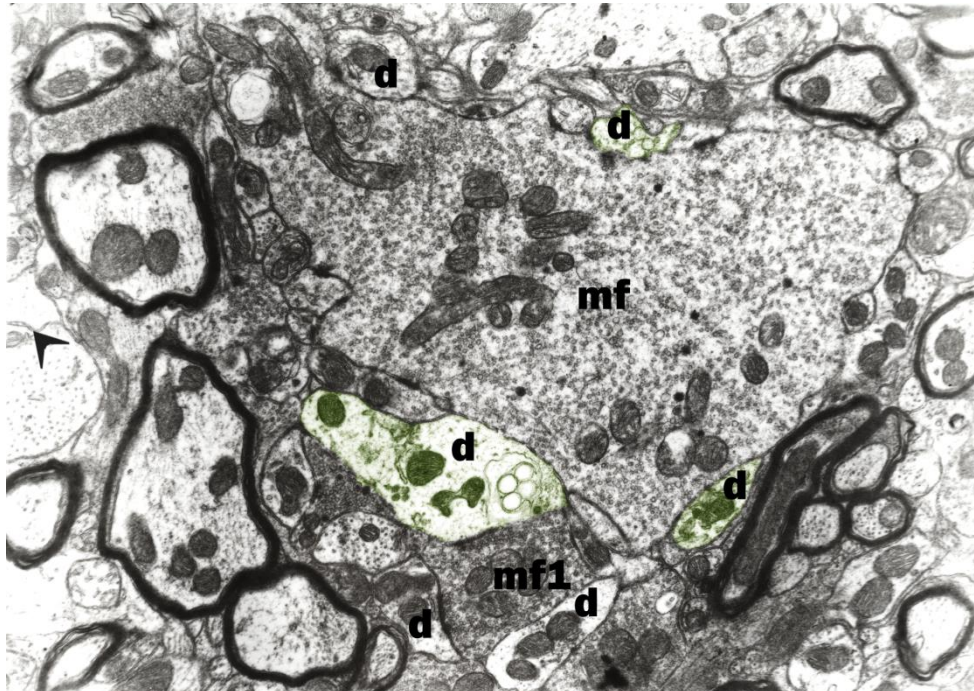
Фиг. 56. Грануларно-клетъчен гломерул, контактуващи с малки и средни по размери дендрити (d); мъховидно нервно окончание (mf). Увел.10200x



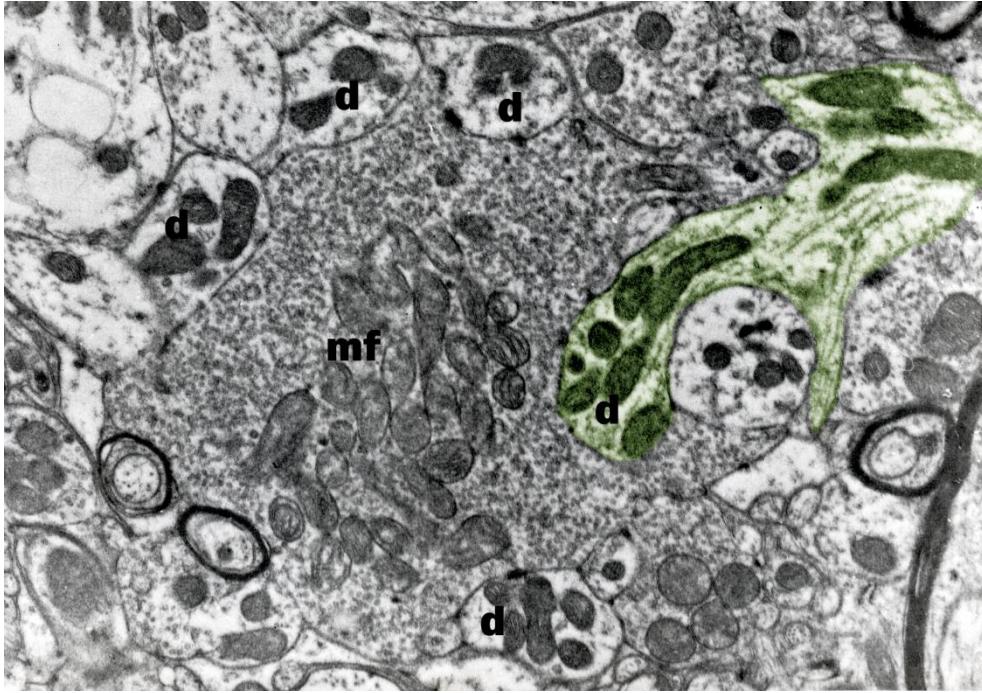
Фиг. 57. Грануларно-клетъчен гломерул с пенетриращи дендритни спина, активни зони (стрелки); дендрити (d). Увел.10000x



Фиг.58. *UBC*-гломеруларна мозайка; централен мъховиден терминал (*mf*); периферни по-малки мъховидни окончания (*mf1*); (*d*) дендрити; активни зони (черни стрелки); малки дендритни профили (бели стрелки). Увел.10200x



Фиг.59. Грануларно-клетъчен гломерул; дендрити (*d*); централно мъховидно окончание (*mf*); малко мъховидно окончание в периферията (*mf1*). Увел. 10000x



Фиг.60. Грануларно-клетъчен гломерул с дендритна „лапичка“; дендрити (*d*); централно мъховидно окончание (*mf*). Увел.10000х

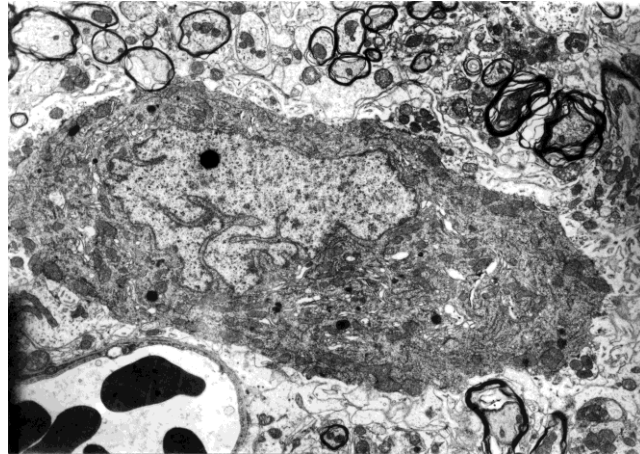
Ултраструктурни промени в полиморфния слой на DCN след унилатерална деструкция на кохлеата

Ние изследвахме късните промени в макронеуроните в полиморфния слой на DCN на слуховото ядро след кохлеарна деструкция. Кохлеата беше отстранена в края на първата седмица след раждането, преди настъпването на т. нар. критичен период на матурацията. Основните типове неврони в наблюдаваното поле са фузиформените и мултиполярните, но поради загубата на типичната за тях синаптоархитектоника тяхното разграничаване и идентифициране е трудно.

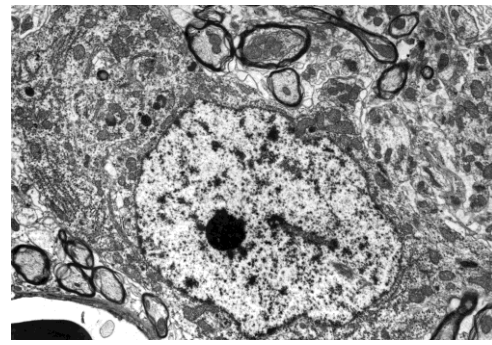
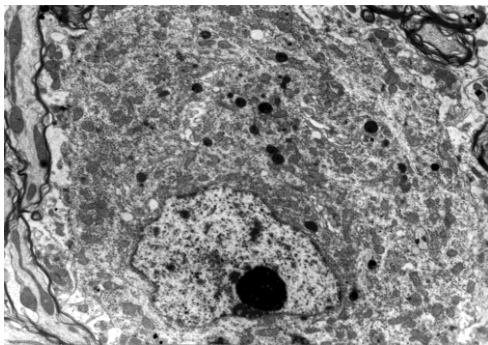
Нашите резултати показват хетерогенна картина на дегенеративни промени. Ултраструктурната характеристика на загиващите неврони изявява невронална смърт с тъмен тип дегенерация. Перикарионите на засегнатите клетки са с намалени размери и неправилна форма. Ядрата заемат ексцентрична позиция с увеличен брой инвагинации на нуклеолемата и вариращи по големина агрегати от хетерохроматин. Клетъчната мембрана е нагъната, с единични синаптични контакти, а свободните повърхности на невроните контактуват с глиални израстъци (Фиг.65, Фиг.66, Фиг.67). На преден план изпъква повишената електронна плътност на цитоплазмата. Гранулираният ендоплазматичен ретикулум показва вакуолно разширени профили и разпръскване на мембранно-свързаните рибозоми с многобройни розетки от полизоми. Голджиевите комплекси се характеризират с дилатирани цистерни, в близост до които се откриват светли вакуоли. Създава се впечатление за увеличение на броя на митохондриите на единица площ, предизвикано най-вероятно от процеса на концентрация на клетъчните органели. Митохондриите са оточни и с променена структура (Фиг.61, Фиг.62, Фиг.63).

Често в цитоплазмата на дегенериращите неврони се откриват миелиноподобни телца и други мембранозни конфигурации, доказателства за фокална цитоплазмена деструкция (Фиг.71). В крайните етапи на тъмния тип дегенерация клетъчните тела са силно деформирани и намалени, а цитоплазматичната организация е заличена (Фиг.64).

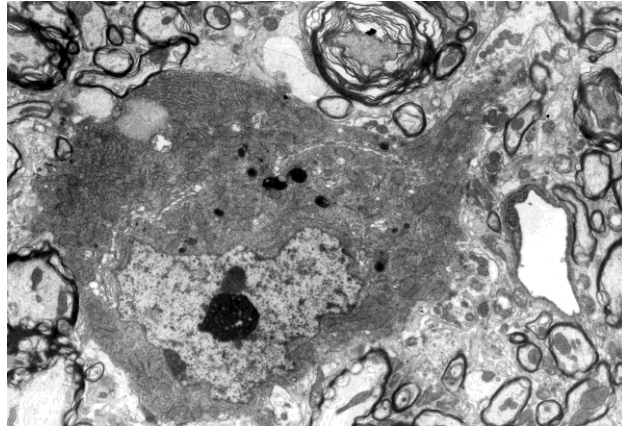
Светлият тип дегенерация се манифестира с увеличена перинуклеарна концентрация на клетъчни органели и интактни синапси. Периферните зони изглеждат светли с намалена осмиофилност и почти без органели. Синапсите по клетъчната мембрана са относително запазени (Фиг. 68, 69, 70, 71).



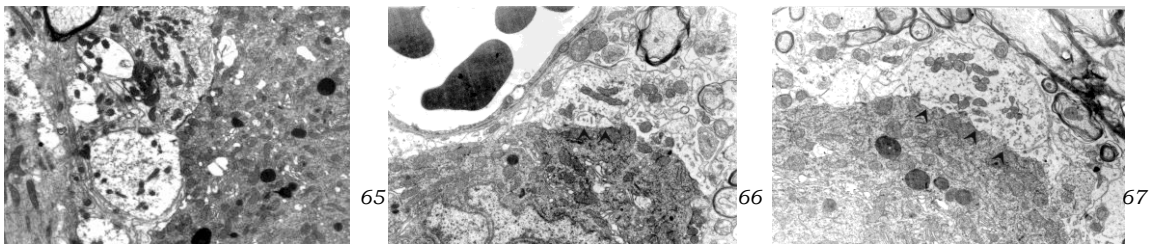
Фиг. 61. Общ вид на клетка с „тъмен” тип дегенерация. Увел.1700х



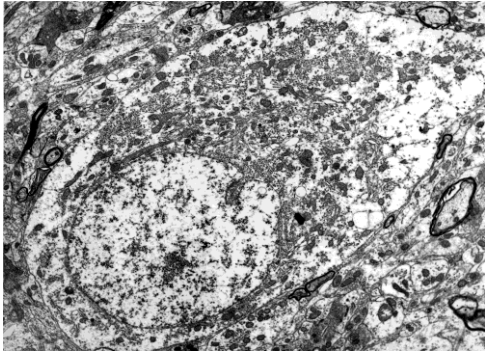
Фиг. 62, 63. „Тъмен” тип дегенерация. Увел.1700х



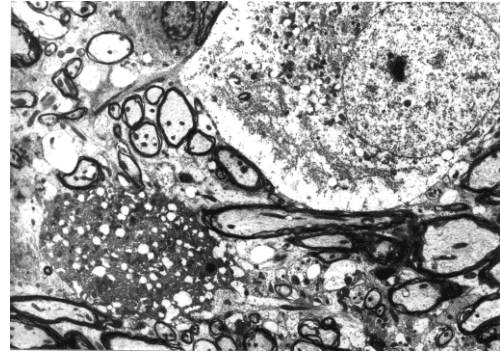
Фиг. 64. Терминален стадий на „тъмен” тип дегенерация с глиални листове в зоните на разрушените аферентни окончания. Увел.1700х



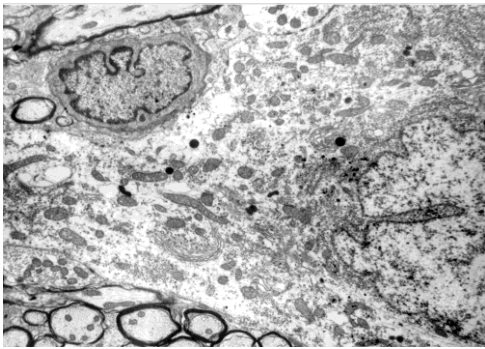
Фиг. 65, 66, 67. Клетки с „тъмен” тип дегенерация и инвагинации на нуклеолемата с аферентни нервни окончания, с редукция на синаптичните везикули и разширени синаптични цепки. Увел.4700х



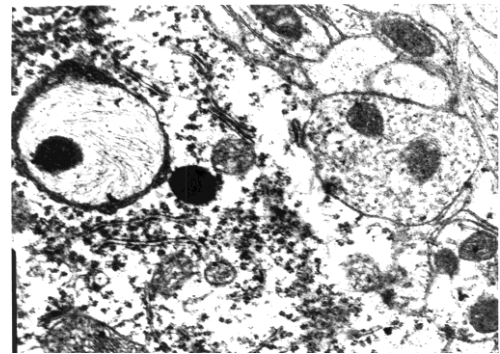
68



69



70

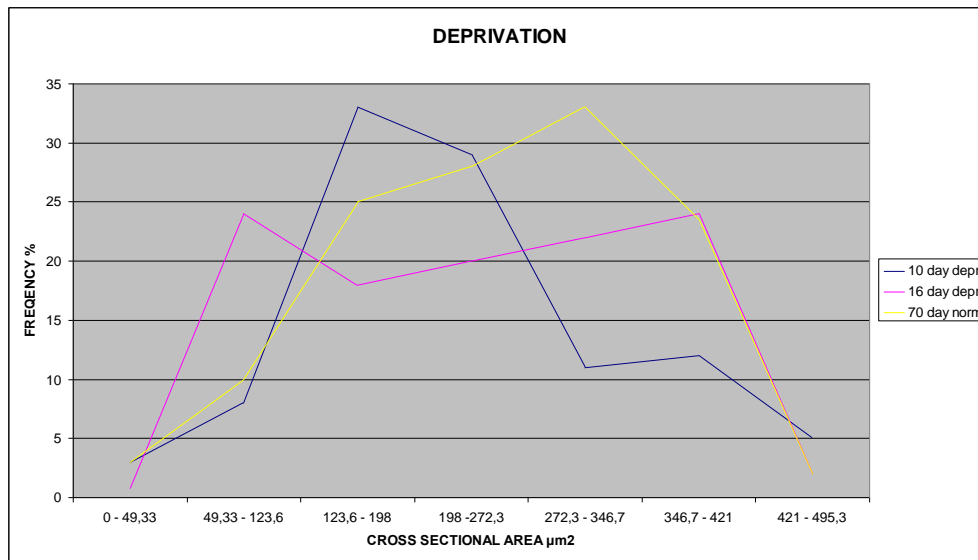


71

Фиг. 68, 69, 70. „Светъл” тип дегенерация с периферна липса на клетъчни органели.

Фиг.71. „Светъл” тип дегенерация с присъствие на филаментозно телце. Увел. 2400х.

Възрастовозависими ефекти на акустичната депривация върху сферичните неврони на AVCN



Слуховата депривация е експериментален модел, който отчита влиянието на звуковите стимули върху невроните на слуховия път. Слуховата депривация може да се прилага едностранно или двустранно в различни периоди от матурацията на слуховата система.

Резултатите от измерването на сферичните клетки от контролната група, показват честотно разпределение в интервала от $49,33 - 495,3 \mu\text{m}^2$ с тенденция графиката да оформи бимодална крива с пикове в интервала $123,6 - 198 \mu\text{m}^2$ и $272,3 - 346,7 \mu\text{m}^2$. Моноауралната акустична депривация наложена на 10 ден след раждането, е преди пневматизацията на *meatus acusticus externus* и *cavum tympani*. До 12 ден тези структури са запълнени с мезенхимна тъкан и липсва рефлекс на Прайер. Данните от планиметрията на сферичните неврони в тази експериментална група показват изместване на ляво спрямо контролите. Кривата очертава стеснено плато, в което преобладаващия процент клетки са с размер $123,6 - 198 \mu\text{m}^2$.

При депривиранията на 16 ден животни, морфологичната и функционална матурация е завършена. Честотното разпределение на клетъчните повърхности очертава по-ниска крива спрямо контролите с пикове в диапазона $49,33 - 123,6 \mu\text{m}^2$ и $346,7 - 421 \mu\text{m}^2$.

3. Имунохистохимия – доказване на глутаматни рецепторни субединици *GluR1*, *GluR2* и *GluR3*

Ние изследвахме експресията на три субединици от глутаматния рецепторен комплекс. Проследена е диференциалната имунопозитивност в отделните неврони, в различни етапи от постнаталната матурация на кохлеарния комплекс. На неговата територия този тип глутаматни рецептори присъстват, както по телата на невроните, така и по дендритите в заобикалящия ги невропил. Представените резултати не отразяват количествените разлики в имунореактивността между субпопулациите от неврони. Степените на качествено оцветяване са оценени субективно и са отчетени като слаба, средна и силна имунопозитивност. Специално внимание е обърнато на рецепторната експресия на три невронални типа на територията на VCN – сферични, глобуларни и октоподни клетки..

Интензивно имунопозитивиране на *GluR1* наблюдаваме в първите постнатални дни, след това то постепенно намалява и изчезва в края на първата седмица. Интензивно маркирани незрели, удължени по форма неврони се забелязват на територията на DCN, заобиколени от фоново оцветен невропил (Фиг.72 А, В).

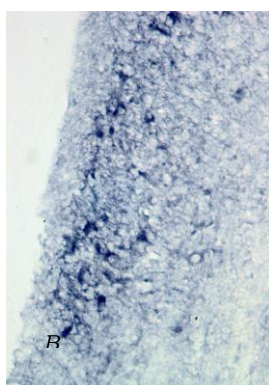
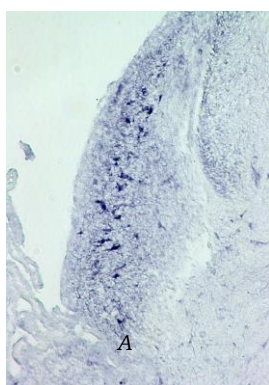
На P3 имунопозитивни за *GluR2* неврони се откриват във всички наблюдавани полета. Оцветени са незрелите фузиформените неврони от повърхностните слоеве и невропила около тях, съдържащ техните дендрити. Удължените и ирегуларни по форма клетки на DCN показват средна и висока степен на имунопозитивност (Фиг.73, 74, 75).

На P11 във VCN се разграничават многобройни имунопозитивни за *GluR2* глобуларни и октоподни неврони. През този период грануларно-клетъчните зони на територията на VCN са добре оформени. Малките клетки от грануларноклетъчните полета, особено пластинката покриваща VCN и слоя от грануларни клетки между основните подразделения, са интензивно имунопозитивни (Фиг.76).

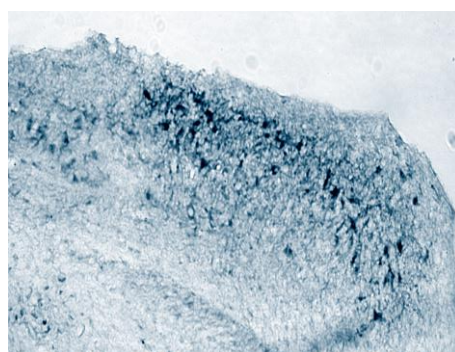
На P24 повечето клетъчни тела в AVCN и PVCN са със слаба и средна имунопозитивност, а невропилното имунобелязване на *GluR2* е сравнително хомогенно в цялото вентрално подразделение на комплекса. Среден интензитет на оцветяване отчитаме в полетата на глобуларните и октоподните клетки (Фиг.77, 78).

На P11 имунопозитивност за *GluR3* се наблюдава в целия комплекс. Клетъчните профили са по-интензивно маркирани от тези за *GluR2*. Средна и висока степен на позитивиране на имунореакцията отчитаме за глобуларните и октоподните клетки (Фиг.79).

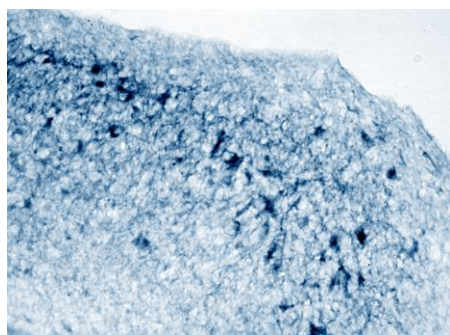
След P11 интензитета на оцветяване на невроните се увеличава прогресивно до P24. В периода P24 до P30 разпределението и интензитета на имунопозитивиране на всички антители е като при възрастни животни (Фиг.80, 81, 82, 83).



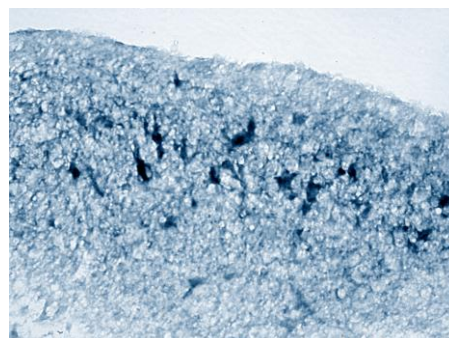
Фиг.72 (А и В) Коронарен срез на слуховото ядро на P3 с интензивна имунопозитивност на GluR1 в невропила и в големи, ирегуларни неврони от зоната на DCN. Увел. 100x



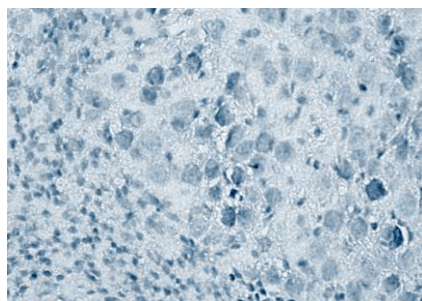
Фиг. 73. Коронарен срез на слухово ядро на P3. Интензивно имунопозитивирание на GluR2 в макроневрони на DCN и VCN, и на невропила. Увел. 100x.



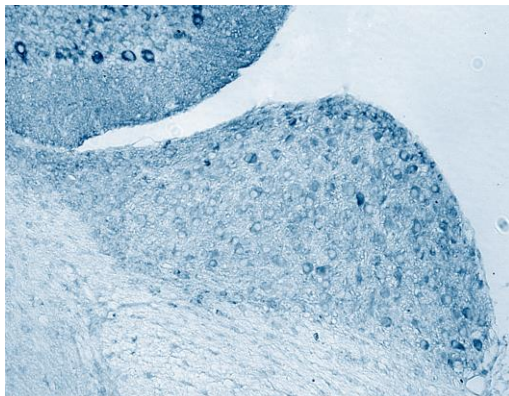
Фиг. 74. Коронарен срез на дорзално слухово ядро на P3. Интензивно имунопозитивирание на GluR2 във фузиформени макроневрони на DCN. Увел. 200x.



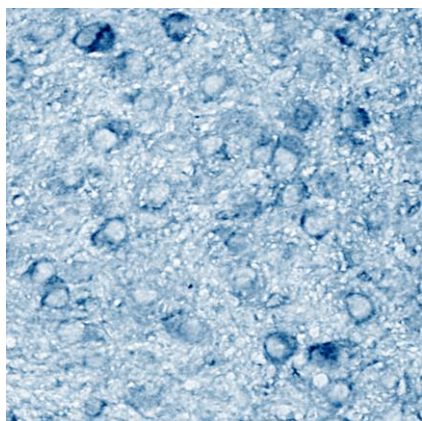
Фиг. 75. Коронарен срез на дорзално слухово ядро на P3. Интензивно имунопозитивирание на GluR2 във фузиформени макроневрони на DCN. Увел. 200x.



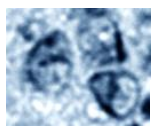
Фиг. 76. Слаба и средно интензивна имунопозитивност за GluR2 на макроневрони от зоната на VCN и интензивна за микроневроните от грануларно-клетъчния домен на P11. Увел. 200x



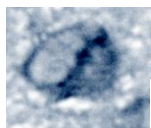
Фиг. 77. Коронарен срез на VCN на P24. Слаба и средно интензивна имунопозитивност на GluR2 в макроневроните на VCN. Увел. 100x



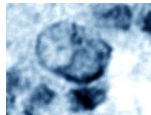
A



B

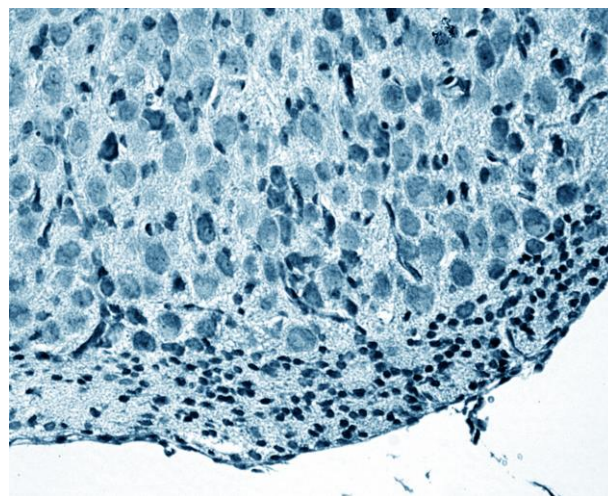


C

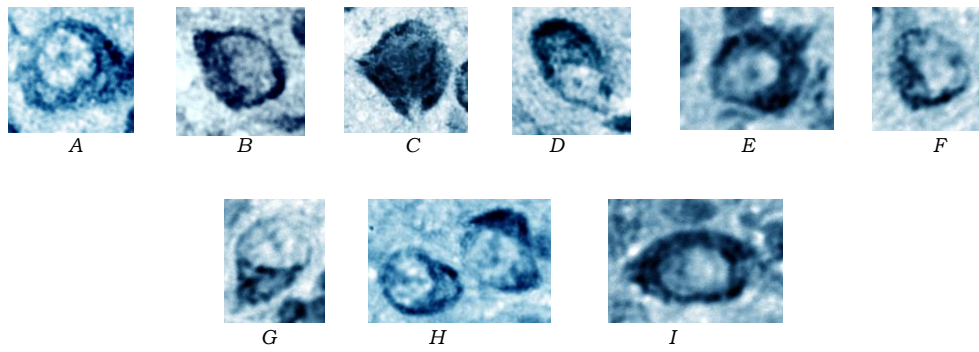


D

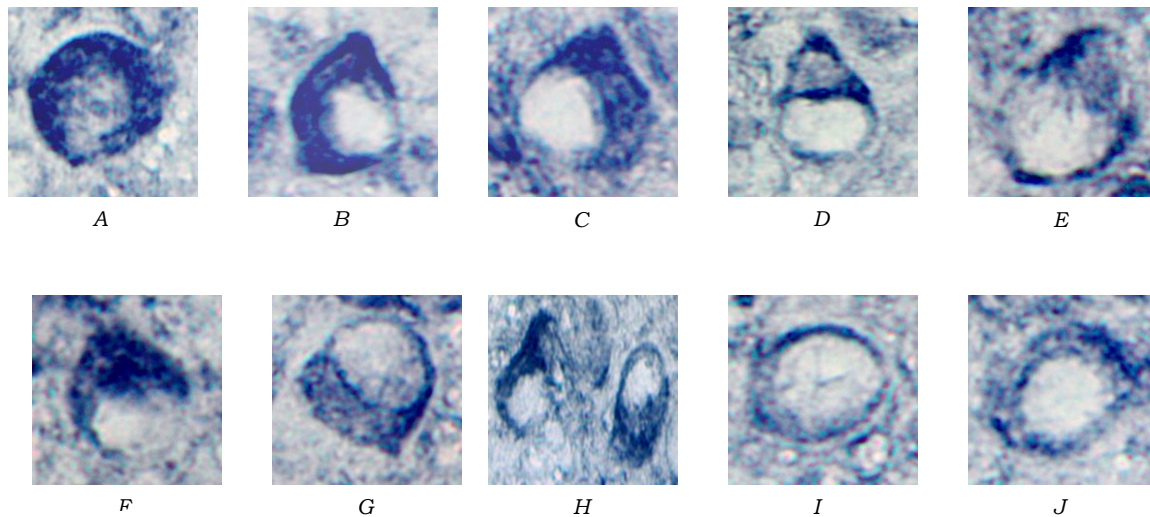
Фиг.78. Зона от теритогрията на VCN. Слаба и средно интензивна имунопозитивност на GluR2 (A), интензивна за единични глобуларни (B,C, D) и сферични (E) неврони и дифузна в невропила на P24. Увел. 200x



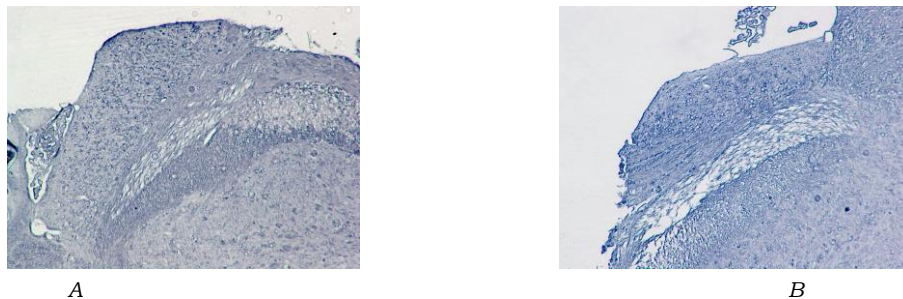
Фиг. 79. Коронарен срез през зоната на VCN на P11. Откриват се макроневрони с мозаечен интензитет на имунопозитивност на GluR3. Интензивна имунопозитивност на микроневроните от



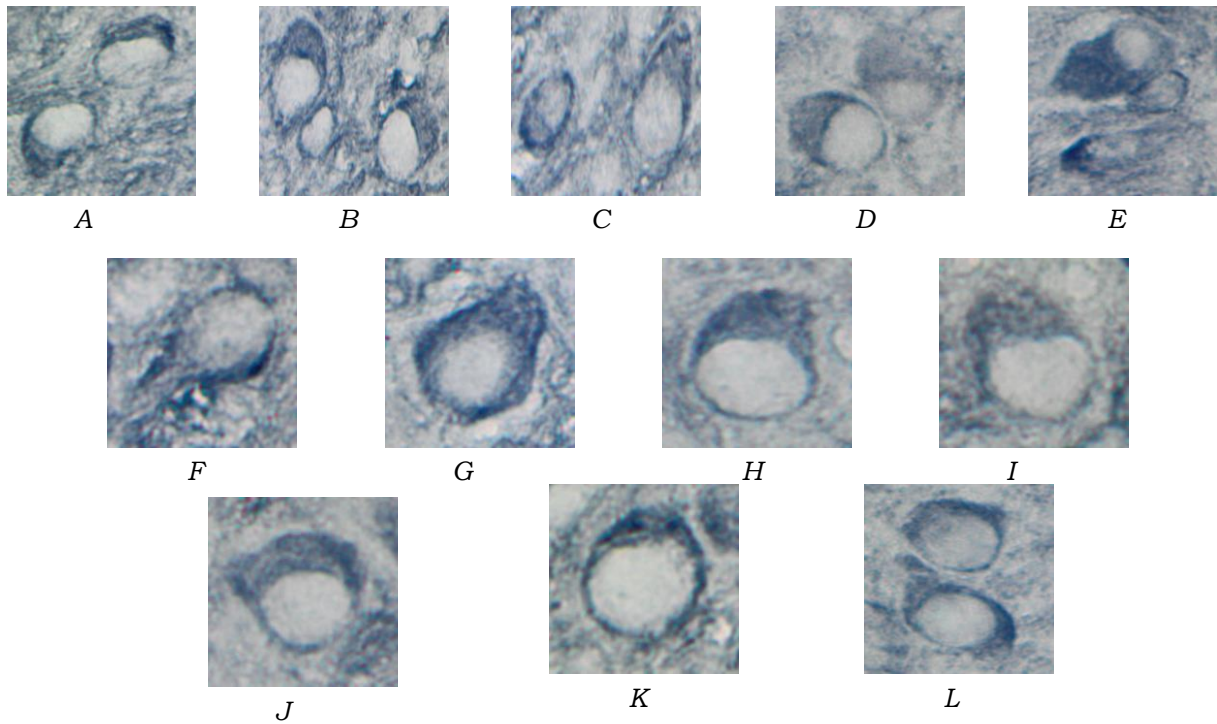
Фиг.80. Интензивна имунопозитивност на сферична (A, I, E), октоподни (B, C, F) и глобуларни (D, G, H) неврони на P24. Увел.200x



Фиг.81. Интензивна имунопозитивност за GluR3 в октоподни (A, B, C, G), глобуларни (D, E, F, H) и сферични (I, J) клетки P24. Увел.200x



Фиг. 82. Коронарни срези на слуховото ядро с интензивна имунопозитивност на макроневроните на VCN за GluR3 на P36 (A) и P40 (B). Увел.100x



Фиг.83. Глобуларни (А, С, D, E, F, G, I), октоподни (В, H, J) и сферични (K, L) клетки с интензивна имунопозитивност за GluR3 на P40. Увел. 200x

V. Дискусия

1. Морфологична характеристика на основните клетъчни типове на VCN по време на постнаталното развитие

Представените изследвания показват, че популациите от макронеурони на територията на VCN при белия плъх са организирани в отделни области по модела на всички бозайници (Lorente de Nó, 1933; Osen, 1969; Baker, 1974; Cant and Morest, 1979a; Moore, 1979; Moore, 1980; Lorente de Nó, 1981; Cant, 1982; Hackney, 1990; Gómez-Nieto, 2009). Макронеуроните от отделните зони, се диференцират на различни етапи в процеса на матурация, което води до промяна на вътрешната организация на полетата и ламелите, локализацията и ориентацията на клетъчните типове и синаптичните взаимоотношения. Тези процеси определят междувидовите различия в цитоархитектониката на CNC при различните класове бозайници (Lorente de Nó, 1933; Osen, 1969; Baker, 1974; Moore, 1979; Cant and Morest, 1979a; Moore, 1980; Lorente de Nó, 1981; Cant, 1982; Webster, 1982; Moore, 1987; Hackney, 1990; Gómez-Nieto, 2009).

В нашето проучване проследихме цитологичните характеристики на основните макронеурони на VCN в периода от раждането до P60. В хода на наблюдението, още в края на първата постнатална седмица, повечето неврони изявяват типично за определения вид клетка, разпределение на Нисловата субстанция. Изследването установява двуфазен модел в развитието на глобуларните и октоподните неврони на VCN на белите плъхове. Първата фаза е времето на бързо нарастване, когато клетките достигат 90% от големината си. Втората фаза е по-продължителна, с по-бавни и постепенни промени, в края на която клетките придобиват окончателните си размери и цитологични характеристики. Времето на бърз растеж на макронеуроните при различните видове бозайници се различава от установените от нас срокове за белите плъхове, но независимо от вида, винаги се простира след т.нар. критичен период в развитието на кохлеата и след отварянето на meatus acusticus externus, когато е снижен прага на слуховата рецепция (Shnerson and Pujol, 1983; Larsen 1984; Webster 1988a).

Невроналната матурация на територията на VCN се определя от влиянието на по-високо разположените центрове на слуховия път. Всички клетки от оливарната и периоливарната клетъчна група са източник на мощни обратни проекции към невроните на VCN (Strominger, 1978; Cant, 2003). Те влияят върху тяхната активност и структурно многообразие или водят до отключване на програмирана клетъчна смърт. Базоапикалното съзряване на кохлеата и тонотопичното разпределение на звуковите

честоти, от друга страна, също определят времето на съзряване и характеристиката на невроните (Moore, 1987; Walsh, 1987, 1988; Walsh, 1992; Cant, 2003; Gómez-Nieto, 2009).

Полето на сферичните клетки при плъхове и други низши бозайници е изградено от два клетъчни варианта, които се доближават много до сферичната форма. При приматите и човека те са хомогенна популация с почти еднакви размери и овална форма на тялото (Moore, 1979; Gómez-Nieto, 2009, 2011). Обяснение за сигнификантната разлика в големините на перикарионите се търси в тяхната честотна репрезентация в горните оливарни ядра, към които те проектират. Големите сферични клетки са нискочестотни и поддържат аксони, които арборизират билатерално към MSO и LSO ядра на горния оливарен комплекс. Малките сферични клетки са високочестотни с аксони, които проецират само в латералното ядро на горната олива в силно стеснен диапазон (Warr, 1982, 1983; Cant and Casseday, 1986; Yin and Chan, 1990; Schofield, 1995; Webster, 1996; Fitzpatrick et al., 1997; Cant, 2003). Матурацията на големите сферични и глобуларните клетки е в паралел с биауралните взаимодействия, чиито невроналните вериги се развиват след 40-ия ден в хода на онтогенезата (Clypton and Silverman, 1977; Warr, 1982, 1983; Moor and Cant, 2003). Интерауралните разлики в скоростта на провеждане на стимулите (ITDs) са ключови за локализацията на звуците. ITDs-пътища използват разликите във времето за достигането на звуковия сигнал до двете уши в хода на установяване мястото на източника. Общото схващане за биауралната сензитивност включва модел на съвпадения на тази детекция, при която невроните генерират отговор само когато биауралната аферентна стимулация конвергира симултантно (Carr, 1990, 1996; Grothe, 2000; McAlpine et al., 2001; Cant, 2003). Глобуларните клетки, подобно на сферичните, са хетерогенна популация и са специализирани за предаване на информация с висока скорост, с кратка латентност. Многообразието в размерите им се потвърждава от данните за техните проекции. Повечето глобуларни клетки проецират в контралатералното трапецовидно тяло, а други – в постероventралната периоливарна клетъчна група, описана при плъхове. С това се обяснява обширното поле на тези неврони, докато при висшите бозайници този клетъчен тип е ограничен само около корена на слуховия нерв (Hackney, 1990; Cant, 2003; Young, 2004; Gómez-Nieto, 2009).

Октоподните клетки при отделните видове низши бозайници се отличават по гъстота, форма на клетъчното тяло и разпределение на Нисловите грануляции. Те проецират към ядрата на латералния лемнискус, които са източник на оливокохлеарния път. У човека и приматите броят на октоподните клетки намалява, което се обяснява с влиянието на масивните десцендентни пътища (Hackney, 1990; Gómez-Nieto, 2009). Наблюдаваните мултиполярни клетки се намират във всички подразделения на комплекса,

без да имат точна характеристика и топография Установено е, че гигантските мултиполярни клетки са по-многобройни при висшите бозайници във връзка с цефализацията на слуховата система (Young, 2004; Hackney, 1990; Cant, 2003; Young, 2004; Gómez-Nieto, 2009).

Постнаталното развитие на невроналните типове, по отношение размерите на клетъчните тела, преминава през два периода. По време на първия, размерите на невроните се увеличават рязко. През втория период, промените са бавни и в зависимост от вида, продължителността му може да се простира до дванадесетата седмица.

Светлите клетъчни варианти в ранните етапи на матурацията, при оцветяване по Nissl, приемаме за клетки в различен стадий на невронална смърт, което обяснява специфичния ход на растежните криви. Тези неврони, следвайки процесите свързани с механизмите на програмираната клетъчна смърт, загиват поради невъзможността да осъществят адекватни синаптични връзки (Larsen, 1984). Тъмните варианти (хиперхромни), са тези с по-висока концентрация на клетъчни органели, което е физиологично явление в процеса на формиране на адекватни синаптични връзки. Електронномикроскопски те се отличават с по-висока концентрация и по-равномерно разпределение на цитоплазмените органели, което им позволява да поддържат структурния и функционалния интегритет на нарастващите аксони (O'Connor, 1979; Nicol, 2002; Gómez-Nieto, 2011).

2. Ултраструктура на BCs и на *endbulbs* на *Held* по време на матурацията

След достигане на тонотопично „правилния“ неврон-мишена, аксоните на асцендентните разклонения на слуховия нерв образуват синапси, чиято морфология се определя от идентичността на постсинаптичната клетка. Все още не е известно как индивидуалните окончания от типа *endbulbs* се насочват към многобройните терминални дестинации на територията на VCN, при модел в който всяка ганглийна клетка контактува с единична вътрешна рецепторна клетка (ИНС). Отворен е въпросът за взаимоотношенията в невроналната верига, включваща ИНСs, спирални ганглийни клетки и клетки-мишени от типа BCs. Повечето контакти между слуховите аксони и постсинаптичните клетки са стандартни бутонovidни окончания, но комплексната характеристика на звуковия стимул се запазва от необичайно големите каликси на *Held*. Техните размери и синаптични специализации са гаранцията за бърза и надеждна синаптична трансмисия, необходима за първоначалната детекция и синхронизация на скоростта при провеждане на звуковите стимули (Lorente de Nó, 1981; Ryugo and Sento, 1991; Spöndlin, 1973;

Lieberman, 1980, 1982b; Ryugo et al., 2006; Ford, 2009; Gómez-Nieto, 2011; Lauer, 2013).

Непълна е информацията как големите каликсообразни синапси (*endbulbs* на *Held*) оформят характерната си морфология. Изследванията при пиле, мишка и котка разкриват консервативен модел в последователността на събитията, въпреки че синаптичното развитие при мишка е постнатално, а при котка – пренатално (Limb and Ryugo, 2000; Ryugo and Fekete, 1982; Ryugo et al., 2006; Ryugo and Parks, 2003). По време на най-ранните стадии в удължаването на влакната, аксоните на ганглийните клетки образуват типичните големи растежни конуси. След формиране на първоначалния контакт, окончанията постепенно се разклоняват, разширяват, като размерите им надминават 10 – 15 пъти първоначалните, обхващайки голям сегмент от повърхността на клетъчното тяло. Нововъзникналите *endbulbs* в началото са малки разширения, но електронната микроскопия разкрива ирегуларитети на аксоналната мембрана, образуващи интердигитации с тялото на невроните от типа BCs (Ryugo et al., 2006; Ford, 2006; Gómez-Nieto, 2011).

Ранните стадии на синаптогенезата са отражение на адхезионните взаимодействия между молекулите по пре- и постсинаптичните мембрани. Дескриптивните изследвания върху ролята на междуклетъчните взаимодействия излагат на преден план идеята за съществуването на уникален клетъчноповърхностен маркер по мембраните на клетките-мишени, който стимулира слуховите окончания за развитие по посока на *endbulb*, а не в стандартен бутон. Предполага се наличието на уникална каскада от събития, която е валидна и ограничена само за основното асцендентно клонче, но не и за по-малките колатерални разклонения в субрегионите на VCN (Ryugo and Parks, 2003; Ryugo et al., 2006; Gómez-Nieto, 2011; Lauer, 2013).

На възраст около P15 тялото на BC, във всички наблюдавани от нас региони, е изцяло покрито със синаптични окончания, със задължителното присъствие на тези от каликсообразен тип. Под клетъчната мембрана, в полетата на апозиция със синаптичните терминали, се откриват субсърфисни цистерни и успоредно подредени цистерни от гранулиран EP. Тази локализация на гранулирания EP е индикация за повишените метаболитни нужди на синапсите по време на матurationта им. Цистерните на гранулирания EP се разгъват в дълбочина и оформят фигури, наподобяващи ламинарни телца. Те са необичайни клетъчни органели, наблюдавани в перикариона и големите дендрити на някои сетивни неврони (Morest, 1979; Cant, 1981). Ламинарните телца, както и нематозомите съдържат плътен грануларен материал, както и успоредно подредени тубуларни профили с $d = 25\text{nm}$, но с триламинарна структура (Cant, 1981).

Ядрата на сферичните и глобуларните клетки са големи, светли, обичайно централно разположени. Контурът на ядрената обвивка е гладък, без инвагинации. В светлата кариоплазма се наблюдават единично голямо проминиращо ядърце и малки струпвания от хетерохроматин. В ядрата на някои неврони правят впечатление нуклеарните инклузии под формата на филаментозни нуклеарни пръчици, партикули и т.нар. нуклеарни листчета. Нуклеарни включвания в големи сетивни неврони са наблюдавани от някои автори и вероятно присъствието им зависи от възрастта и експерименталния вид животни (Feldman and Peters, 1972). Те са с неизяснена роля, въпреки че още в края на XIX век Mann (1894) описва в ядрото пръчици с полулунна форма. Първоначално те са били интерпретирани от Ranconi (1895) като кристалоидни структури и нуклеарни хомолози на центрозомата. По-късно е установено, че са изградени от успоредно разположени, плътно пакетирани филаменти с $d = 7$ nm, не съдържат РНК или ДНК, а само протеини (Kim et al. 1970, Seite et al. 1971). Доказано е, че техните размери се увеличават след електрична стимулация и вероятно присъствието им е индикация за повишена активност на периферния рецептор по посока на неврона. Периода, в който ние ги наблюдаваме, около P15- P20 е с доказана повишена физиологична активност на слуховия нерв (Ryugo and Parks, 2003; Ryugo et al., 2006; O'Neil et al., 2011).

В хода на постнаталното развитие, броят на първичните (primary) кохлеарни каликсообразни окончания, контактуващи с единична клетка намалява, а се увеличава броят на некохлеарните (non-primary) окончания. Този процес предполага разделянето на endbulbs в мултиплени разклонения и/или ретракция като резултат на двупосочната комуникация между пре- и постсинаптичните елементи, с участието на молекулярни сигнали (Suter and Forsher, 2000). С наличието на повече от един каликсообразен синапс върху ВС се реализира конвергенция на аферентният информационен поток и синхронизацията на клетъчният отговор (Joris et al., 1994; Limb, 2000). Отделните терминали върху клетъчното тяло са разделени един от друг, което намалява възможността за потенциален „cross-talk” контакт между тях. Поради това характерно разположение, въпреки голямото количество глутамат освободено от един голям синаптичен терминал, не настъпва десензитизация на постсинаптичните глутаматни рецептори или активация на пресинаптичните метаботропни глутаматни рецептори на съседните каликсообразни окончания (Takahashi et al. 1996; Ford, 2006).

Мултиплените синаптични контакти са от типа синаптични диади. Синаптичните диади се образуват от единично възбудно окончание, контактуващо с две различни, съседни ВСs. Такива взаимоотношения са морфологичен субстрат и доказателство за разпространение на аферентната информация в пределите на малки невронални групи,

характерни за територията на VCN. Те са описани както при примати, така и при други бозайници (Gómez-Nieto and Rubio, 2009, 2011).

По време на първите петнадесет постнатални дни фината структура на *endbulbs* остава относително постоянна. В края и непосредствено след критичният период, пространството между терминала и постсинаптичната клетка става вълнообразно и постепенно се разширява между мултиплените точки на синаптичния контакт. В това пространство наблюдаваме наличие на глиални израстъци и малки синаптични терминали. Синаптичната цепка в повечето от синапсите е заета от плътен или филаментозен материал. Интермембранозни цистерни в синаптичната цепка, характерни за по-зрелите синапси, се появяват като мехурчета между пре- и постсинаптичните мембрани около P20 – P30 и ние ги отчитаме, като характерна черта на синаптичните профили. При триизмерна реконструкция е доказано, че цистерните образуват система от канали, лежащи между пре- и постсинаптичните мембрани (Ryugo et al., 1997, 2006). Тяхната роля е изследвана в състояние на интензивно трансмитерно освобождаване (при експерименти с висока концентрация на екстрацелуларен калций или апликация на *phorbol* естери) в резултат на което, във връзката *endbulbs-bushy* клетки настъпва постсинаптична рецепторна десензитизация (Oleskevich et al. 2000; Oleskevich and Walmsley, 2000). Това състояние се интерпретира като резултат на взаимодействието между мембранните специализации или мултивезикуларно освобождаване в една активна зона. В такъв случай, каналите и глиалните протрузии между *endbulbs* и постсинаптичните клетъчни мембрани, най-вероятно служат за трансмитерен *uptake* при редуциране на глутаматната акумулация (Cant and Morest, 1979; Tong and Jahr, 1994).

Интердигитациите между мембраните на *endbulbs* и сферичните и глобуларните клетки са характерни морфологични черти, наблюдавани по време на развитието. Те са структурни специализации, които увеличават и заздравяват повърхностния контакт между двата невронални елемента (Jhaveri and Morest, 1982b; Neises et al., 1982; Carr and Boudreau, 1996 Ryugo et al., 2006). Интердигитациите са индикация за ефективен трансмембранен транспорт на вода и йони. В случая с *endbulbs* те участват в динамичните процеси на синаптично образуване и стабилизация, за които е необходим интензивен трансмембранен транспорт. При големите синапси от типа *endbulbs* тези мембранни специализации са отражение на двупосочната комуникация между пре- и постсинаптичните елементи. Везикуларното рециклиране се възприема като част от събитията по време на синаптогенезата (Ahmari et al, 2000; Friedman et al., 2000). Допуска се и освобождаване на някои сигнални молекули от макроневроните, за които *endbulbs* притежават комплиментарни рецептори. От друга страна, не е известна природата на пресинаптичния сигнал към постсинаптичните

клетки-мишени. Трансмембранната обмяна би активирала транскрипционни фактори и каскадите на втори посредник или би отворила канали, водещи до привличане, стабилизация или елиминация на дадени синаптични окончания (Rubel and Fritzsich, 2002; Fritzsich et al., 2004; Lu, 2004).

Специализирани синаптични контакти наблюдавахме през втората и третата постнатална седмица. Това е период преди регистриране на слуховата функция и отвеждане на и електрофизиологични потенциали характерни за възрастните (Gulley, 1978; O'Neil, 2011). Синаптичните контакти са с асиметрични, мембранноасоциирани уплътнения с везикуларни клъстери, близо до пресинаптичната мембрана. Ултраструктурно, в синаптичните активни зони се наблюдават приплеснати, ирегуларни по форма субцелуларни уплътнения, които на напречни срези изглеждат като задебелявания от електронноплътен материал, прикрепени до постсинаптичната мембрана. Постсинаптичните уплътнения (*PSDs*) се разполагат на обичайното си място върху вътрешната повърхност на соматичните конвекситети и изглеждат като точковидни мембранни уплътнения. Местата на невротрансмитерно освобождаване са маркирани с къси *PSDs* с няколко синаптични везикули, а други *PSDs* са забележимо по-дълги. По време на първите петнадесет постнатални дни *PSDs* са вариращи по дължина, като с напредване на възрастта, в активните зони се увеличава броя и плътността на синаптичните везикули. Към P30 се наблюдава прогресивна рестрикция в спектъра от дължини на *PSDs*. След диференцирането на големите подобни на палка синапси в тънки клончета и по-малки разширения, синаптичните профили забележимо намаляват размерите си, с което успоредно се намалява и броя на *PSDs* на профил. Постсинаптичните уплътнения съдържат рецептори за невротрансмитерите и са асоциирани с Ca^{2+} -*calmodulin*-зависима протеин киназа (Kennedy, 1989; Ahmar and Buchanan, 2000). В постсинаптичната мембрана са доказани и допълнителни молекули на сигнална трансдукция и други рецептори (метаботропни, волтаж-зависими йонни канали и помпи). Пресинаптичната мембрана участва във везикуларното освобождаване на трансмитерите, но също съдържа и *reuptake* рецептори и транспортери, инактивиращи синаптичната трансмисия. Броят и пространственото разположение на тези молекули определят синаптичния механизъм и начина на интерцелуларната комуникация при провеждането на сигнала (Ahmari and Buchanan, 2000; Ford, 2009). Демонстрирано е, че *endbulbs* от влакна с висока спонтанна активност имат по-малки активни зони, отколкото тези от влакна с ниска спонтанна активност. При нормални условия влакната с висока спонтанна активност показват по-високи спайкове на електрична активност, което означава, че тази активност по някакъв начин предизвиква преподреждане на активните зони в по-малки,

но по-многобройни модули. Тази реорганизация служи за ангажиране на по-голям участък от пресинаптичната мембрана в тясна апозиция до постсинаптичните уплътнения в увеличените на брой активни зони. Релативното увеличаване на периметъра на PSDs е важно за везикуларното освобождаване и рециклиране (Nieto-Sampedro et al. 1982; Ahmari, Buchanan, 2000; O'Neil, 2011). PSD е динамична структура и нейните размери се определят от активността на синапса. Неактивните зони на плазмалемата съдържат други йонни канали, рецептори и помпи. Например, метаботропни глутаматни рецептори в малкомозъчната кора (Baude et al., 1994), Na^+ канали в невромускулните синапси (Nusser et al., 1994) концентрирани в мембраната непосредствено заобикаляща PSD. Модел с малки мултиплени активни зони е много по-ефективен за транспорт на йони и метаболити, както и на отделни молекули от PSD-регионите към *non*-PSD регионите. На пресинаптичната страна, мултипления модел позволява приближаване на зоните на везикуларно освобождаване и рециклиране в повече активни зони. По този начин транспортерите и рецепторите за *reuptake* запазват близост с местата на трансмитерно освобождаване и увеличават ефективността си. Бързото отстраняване на излишъка от трансмитер в синаптичната цепка редуцира десензитизацията на постсинаптичните рецептори (Trussel and Fischbach, 1989; Körpl, 1994; Ford, 2006). За постигане на максимална ефективност при синаптичното провеждане пре- и постсинаптичните специализации изграждат уникално пространствено пренареждане. Този процес най-вероятно е резултат на обмяна на молекулни сигнали и в двете посоки. Намалването на нервната активност след сензорна депривация води до образуване на по-големи активни зони в синаптичните полета. Едно от обясненията за този пластицитет е индуцирано от активността повишено ниво на Ca^{2+} в постсинаптичната клетка, което активира ензими, въздействащи върху компоненти на PSDs, в резултат на което те се променят. Ензимната активност с резултат деградация на молекули в зоната на PSD, в следствие на повишената електрична активност, влияе върху разделянето и формирането на нови синапси (Baude, 1993, 1994; Ahmari and Buchanan, 2000).

Везикуларното рециклиране (*turnover*) се приема за важен фактор засягащ морфологията на PSD. Синаптичните везикули са високо специализирани и морфологично пластични структури, чиито брой и форма отразяват физиологичните нужди на синапса в точно определен момент (Koenig, 1989). Синапсите с ниска спонтанна активност притежават по-малко везикули на единица площ, отколкото тези с висока. Скоростта на синаптичното сливане и *turnover* определят гъстотата на везикулите, но във всички изследвания е потвърдено, че окончанията с висока активност съдържат повече везикули. Малкото на брой везикули, в

някои терминали, вероятно отразява резервния пул, а големия брой на везикулите включва групата на *ready releasable pool* (Koenig et al., 1989).

3. Несинаптични контакти. Соматични протрузии и спини – характерна черта на синапсите в хода на матурацията

Мембранни контакти от типа *puncta adherentia (attachment plaques)* се наблюдават като къси симетрични мембранни уплътнения, без връзка със синаптичните везикули. Предполага се, че в ранното постнатално развитие те имат роля в механичното прикрепване на клетките (Peters et al., 1991). Несинаптичните контакти от адхезионен тип са със симетрични мембранни уплътнения и разграничима интерцелуларна цепка. Някои от тях имат характерна близост с митохондрии и везикуларни органели в пресинаптичния компонент. *Puncta adherentia* често се откриват в асоциация с PSD и синаптични везикули. Около P20 *puncta adherentia* постепенно намаляват. Преходните интерцелуларни контакти, наподобяващи епителиални клетъчни специализации, наблюдавани по време на постнаталното развитие, са с неизяснена роля. Някои от повърхностните контакти най-вероятно улесняват обмяната на химични сигнали, участващи в стабилизацията на нервните окончания от типа *endbulbs* или елиминация на други, а вероятно и в други процеси по време на развитието, все още неясни (Ryugo et al., 2006).

Незряла черта на синапса е присъствието на соматични евагинации по посока на синапса. Откъм соматичната страна се наблюдава мембранно уплътнение, с тенденция за образуване на протрузия по посока на синаптичния терминал. Постсинаптичната мембрана образува характерни изпъквания, които се разгъват в два типа постсинаптични израстъци (*appendages*). Едните, по-често наблюдавани, върху глобуларните клетъчни профили са определени като спини с дължина 1 μm с филаментозна мрежа, а другите, по-рядко срещани са туберозни израстъци съдържащи цистерни, наподобяващи тези на гладкия ER, а също случайни рибозоми и покрити везикули (Jhaveri and Morest, 1982; Neises et al., 1982; Carr and Boudreau, 1996; Ryugo et al., 2006). Предполага се, че соматичните изпъквания (*appendages*) имат ключова роля в насочването на аксона към специфично място по повърхността на неврона (Neises et al., 1982). Мембранните интердигитации, присъствието на мембранни „адхезии”, маркирани чрез акумулация на електронно плътен материал (*puncta adherentia*) са характерни особености на незрелите синапси. Адхезионните контакти от типа *puncta adherentia* обичайно се образуват в соматичната цитоплазма срещу протрузията на *endbulb*, но не и в цитоплазмата на *endbulb* срещу соматичната протрузия (Jontes et al., 2000; Lendvai et al., 2000; Baker, 2010).

Соматичните и дендритни спинозни протрузии и т.нар. протоспини са структурни доказателства за формиране на синапси с пристигащите

аксони (Vaughn, 1989; Dunn et al., 1998). Те са преходни структури по време на развитието, въввлечени в процеса на взаимодействие между аферентните аксони и мишените по време на синаптогенеза (Morara et al., 2001). Предполага се, че нервната стимулация води до образуване на синаптични спино, които са евагинации на мембраната и специализираната цитоплазма на нивото на PSD. Спините се приемат за място на мембранно рециклиране, в следствие на *turnover* на синаптични везикуларни мембрани по време на интензивното невротрансмитерно освобождаване. Присъствието на соматични спино отключва процеси на реорганизация на мембраната на постсинаптичното уплътнение и са причина за ирегуларитет и промяна на формата на синапсите като цяло. Новата популация от синапси би изявила перманентна експресия на „подсилени” контакти за синаптична трансмисия, където ирегуларитетите са морфологичния субстрат за по-ефективна трансмисия, в сравнение с единична голяма активна зона (Edwards, 1995).

В най-ранните етапи върху SBCs не се различават други аферентни нервни окончания (Ryugo et al., 2006). Незрелите калици на *Held* са определени като протокаликси и се разпознават на P2. Те са с т.нар. „*spoon-like*” форма, обикновено единично разположени върху невроните. По време на ранното постнатално развитие колатералите, излизаци от основния каликс, инервират съседни неврони. Контактът с клетките и образуването на синапсите се реализира с участието на молекулите на *NB-2* и *ephrin-B2* (Toyoshima et al., 2009). След регистриране на слухова функция се наблюдава нагъване на пресинаптичната мембрана с образуване на дигитиформени израстъци. Смята се, че този процес отразява движението на глиалните израстъци, съдържащи глутаматни рецептори и транспортери, окупиращи синаптичната цепка (Friedland DR, 2006; Ford et al., 2009). Като цялостна тенденция, по време на първите тридесет дни е наблюдавано намаляването на броя на *puncta adherentia*, увеличаване размерите на постсинаптичните уплътнения, появяването на интермембранозни цистерни и изглаждане на плазматичната мембрана. Формата на контура между пре- и постсинаптичния компонент е показателна за сливането на синаптичната везикуларна мембрана с плазматичната. Класическият синаптичен контакт между *endbulbs* и сферичните клетки при възрастните е описан като куполовидна „*dome-shaped*”. С електронен микроскоп PSDs са с типично конвексно закривяване, по-изразено при синапсите с висока спонтанна активност. Такава конфигурация се приема за резултат на пролонгирани разлики между стимулите на синаптичната активност (Gulley et al., 1978; Köppl C, 1994; Baker CA, 2010).

В периода около тридесетия ден след раждането морфологията на синапсите от типа *endbulbs* е стабилизирана и придобива

„зрял” морфологичен вид, въпреки че каликсите продължават да нарастват до третия месец (Ryugo et al. 2006; Baker CA, 2010).

4. Ефекти на акустичната депривация и аблация върху развитието на невроните

Патологичните последствия след слухова депривация засягат размера и вида на мишените (клетъчно тяло, дендритно стволче или дендритни спино), пресинаптичните характеристики на мястото на освобождаване на синаптичните везикули, размера и формата на синаптичните везикули, природата на невротрансмитерите и невромодуляторите и типа на транспортерите. Променят се също постсинаптичните трансмитерни рецепторни субединици, формата и извивката на *PSDs*, йонните канали, асоциирания втори посредник и ретроградната сигнализираща система. Правилното провеждане на акустичните сигнали от неврон към неврон се определя от прецизното пространствено подреждане на всички изброени структури (Webster, 1988; Snider, 1992; O’Neil et al., 2011; Hildebrandt, 2011). Липсата на сензорна стимулация преди настъпване на критичния период е причина за перманентни алтерации на структурата и функцията на основните макроневрони. Критичният период на индуцирана невронална смърт от аферентната депривация зависи от възрастта. Загубата на сензитивност към деаферентацията приблизително съвпада с началото на слухов процес (Ehret, 1976).

Наблюдаваните от нас дегенеративни промени са в резултат на загубата на пресинаптичните структури в период от време когато се сумират ефектите на физиологичната за този период клетъчна смърт и тази от деаферентацията (Trune, 1982, 1982; Moore et al., 1998). Отстраняването на кохлеата преди критичния период на нейното развитие причинява изяви дегенеративни промени в макроневроните от централния полиморфен слой на DCN с намаляване броя и размерите на постсинаптичните неврони и до редуция на техните еферентни проекции (Kane, 1974; Webster and Webster, 1979; Trune, 1982; Garden et al., 1995; Moore et al., 1998).

Късните ефекти от деаферентацията се свързват с липсата на невротрофични субстанции от аферентните аксони. Те по механизма на сигналните вериги водят до инфлукс на Ca^{2+} и активиране на деградиционните процеси (Garden et al., 1994, 1995; Sie, 1992; Zirpel, 1998). Регистрираното разпръскване на рибозомите и мембранно-асоциираните полирибозоми на свободни елементи е типичен дегенеративен феномен. Вакуолизацията в зоната на комплекса на Голджи и промените в митохондриите са неспецифични реакции в резултат на влошен клетъчен метаболизъм.

Невроните, които описваме с хипотрофична на органели цитоплазма в периферията, изразяват по-бавна клетъчна реакция и вероятно те са по-малко зависими от аферентните стимули, а част от макроневроналната популация не показва отклонение от нормата (Trune, 1982; Sie, 1992; Garden et al., 1994, 1995; Moore et al., 1998). Нашият експеримент подкрепя идеята за ключовата роля на критичния период в хода на онтогенезата. Същият експеримент, проведен върху възрастни животни, не води до дегенеративни промени в централния регион на DCN поради наличието на други поддържащи пресинаптични структури, чиито източник са десцендентни и интрануклеарни кохлеарни вериги (Trune, 1982, 1982; Kandler and Friauf, 1993).

5. Клетъчен и гломеруларен полиморфизъм – доказателство за разнообразна функционална роля

Изследванията през последните години върху GCS показват присъствието на комплексните синаптични полета във всички зони на грануларния домен. В тях се намират сложно организирани пре- и постсинаптични невронални компоненти, в разнообразни синаптични взаимоотношения, заобиколени от астроцитарни ламели. В центъра на тези полета винаги присъства голям аксонален терминал, приличащ на церебеларните мъховидни розетки. Той съдържа сферични синаптични везикули и е заобиколен от разнообразни дендритни профили, които от своя страна контактуват с аксонални бутони на *Golgi*-наподобяващи интерневрони. Доказано е, че по време на развитието, както на церебелума, така и на слуховото ядро, формирането на напълно развити розетни комплекси се постига само след конвергенцията на определен брой дендрити (Mugnaini et al., 1967; Altman et al, 1997; Morin et al., 2001). Влакната, реализиращи централната инервация в тези зони на невропила са наречени кохлеарни *mf*-окончания, поради приликата си с гломерулите в церебеларния грануларен слой, въпреки че са по-малки по размери и не така впечатляващо кълбовидни (Mugnaini E, 1969, 1972, 1985, 1987, 1994, 1997; 2000; Diño et al, 2000, 2001).

В наблюдаваните от нас зони на грануларния домен – пластинката от грануларни клетки, повърхностния слой от грануларни клетки на VCN и островчетата от грануларни клетки на територията на VCN, *mf*-терминалите могат да бъдат разграничени според размерите си в две групи – големи и малки. Големите *mf*-терминали обичайно заемат централна позиция в синаптичния гломерул, а тези с по-малки размери са разположени в периферията на комплексната структура. Големите *mf*-терминали контактуват с разнообразни по размери и конфигурация дендритни профили. В случаите, когато постсинаптичните дендрити са с малки размери, овални и кръгли по форма, асиметричните синаптични

контакти са единични, а при по-големите дендрити – синаптичните контакти са по-многобройни. Гломерули с това описание категоризираме към популацията на класическите грануларноклетъчни гломерули. Грануларноклетъчните гломерули, както в слуховото ядро, така и в церебелума се характеризират с дендрити забележимо по-малки от диаметъра на мъховидното окончание и къси синаптични контакти ($< 0.5 \mu\text{m}$) (Mugnaini, 1969, 1972, 1985, 1987, 1994, 1997; 2000; Diño et al., 2000, 2001).

Гломерули, при които централния терминал е напълно обхванат от дендритни профили, покриващи критериите на дендрити на *UBCs*, причисляваме към категорията на *UBCs*-синаптичните гломерули. *UBCs* гломерулите се характеризират с дендрити с по-голям диаметър, образуващи неправилна мозайка и синапси с ирегуларен контур ($>1 \mu\text{m}$). Грануларно-клетъчните дендрити, в повечето случаи, са с гладка повърхност, а *UBCs*-дендритите са по-големи, неправилни с многобройни израстъци (Mugnaini E, 1980, 1994).

Трета категория гломерули са от смесен тип, при които дендритите имат характеристиките и на грануларни и на *UBCs*-дендритни профили. Този вид гломерули преобладават в избраните от нас зони и изявяват голямо разнообразие по отношение морфологията на дендритите. В тях правят впечатление характерните дигитиформени дендритни разширения и синаптичните дендритни спинови, пенетриращи централното мъховидно окончание. При всички изследвани видове, но не във всички полета на грануларния домен, са регистрирани подобни смесени форми, в които дендритите имат различна характеристика и принадлежат на повече от един тип микроневрони (Mugnaini, 1980, 1994).

В грануларноклетъчните гломерули, поради множеството активни зони върху единично дендритно разширение (дендритна „лапичка“), синапсите са стабилни и импулсите от мъховидните терминали предизвикват отговори във всички дендрити. В резултат на това, цялата аферентна информация се „сумира“ в клетъчното тяло, при което грануларните клетки регистрират информация от ограничен честотен спектър, но от различни източници. В някои случаи, когато къси и относително дебели дендрити на грануларна или *UBCs* осъществяват контакт с единичен мъховиден терминал се допуска, че цялата аферентна информация всъщност активира единична клетка. С *patch-clamp recordings* на церебеларни *UBCs* е доказано, че импулси от единичен мъховиден бутон продуцират дълготраеща деполяризация и непрекъснати продължителни акционни потенциали (Rossi et al., 1995). По този начин, продължителността на активацията на *UBCs* може да служи като механизъм за усиляване на сигналите и следователно участието на тези микроневрони в обработката на информацията, се различава коренно от тази на грануларните клетки. При *chestnut*-клетките аферентна

информация се получава върху самите тела или в зони на невроните близо до тях. При този модел информацията от многобройни мъховидни терминали конвергира върху перикариона въз основа на което, тези микроневрони са наречени неврони-“*summator*” (колектори) на цялата аферентна информация (Mugnaini, 1969, 1972, 1985, 1987, 1994, 1997; 2000; Diño et al., 2000, 2001).

В зоните на синаптичните комплекси се наблюдават разнообразни аферентни влакна, които образуват не само големи окончания, но и малки окончания *en passant* и други терминални вариетети. Предполага се, че някои от малките бутони са автентични мъховидни влакна от глутаматергични и холинергични вериги, които не се развиват в типични розетки, а принадлежат към „отхвърлените”, неуспели да осъществят адекватен контакт с правилната мишена, влакна (Yao et al., 1996; Moore, 1988; Yao and Godfrey, 1999; Behrens et al., 2002). В невропила на слуховия комплекс се наблюдават и на т.нар. „синаптични гнезда”, които съдържат големи аксонални терминали, но не контактуват с грануларните клетки и не са част от типичните гломерули. Съществуват и субпопулации от грануларни клетки, които не притежават типичните дендритни „лапички” около мъховидния терминал, а участват в аксодендритни синапси само с дендритните стволчета (McDonald and Rasmussen, 1971; Mugnaini et al., 1980a; Hutson and Morest, 1996; Morest, 1997; Hurd et al., 1999).

Функционалната роля на малките пръстоподобни израстъци от дендритите на *UBCs*, грануларните клетки и *chestnut*-клетките е неизвестна. В повърхностния слой и пластинката от грануларни клетки тънките филиформени израстъци от *UBCs* и грануларните клетки не участват в синаптични контакти с мъховидните терминали. По-дебелите протуберанции на някои от грануларно-асоциираните неврони са неизменно синаптични, както са и дендритните израстъчета на грануларните клетки от DCN. Тези вариации най-вероятно отразяват фундаментално различна функция на дигитиформените структури. Възможно е синаптичните протрузии да служат за увеличаване на полето на синаптичната повърхност с мъховидните бутони, да изолират индивидуалните активни зони или да предоставят морфологичен „субстрат”, с който да модифицират силата на аферентния сигнал чрез увеличаване дължината на постсинаптичните уплътнения (Mugnaini, 1969, 1972, 1985, 1987, 1994, 1997; 2000; Diño et al., 2000, 2001).

Несинаптичните изпъквания на *UBCs* и грануларните клетки също са с неясна роля и е възможно да служат за утилизирание на излишния невротрасмитер, който в противен случай би попаднал в плътно изпълнения със синаптични везикули мъховиден нервен терминал. Тези предположения биха могли да се докажат след идентификация на подходящи невротрансмитерни транспортери.

Полирибозималните комплекси, в близка асоциация с дендритни спини или тубуларни цистерни, участват в зависима от активността синаптична модификация (Steward and Reeves, 1988; Steward, 1995; Steward and Schuman, 2001). Дендритната локализация на органели за синтез на протеини определя наличието на клетъчни микродомени за специализирана функция. Предполага се участието им в сортиране на протеини, компоненти за цитоскелеталната конструкция, трафика на рецептори и синаптичния пластицитет (Wang and Tiedge, 2004; Sutton and Schuman, 2006). Дендритите на някои микроневрони съдържат молекулярни компоненти за инициране на синтетичен процес, независимо от клетъчното тяло. Не е ясно как локалната модификация на синапсите в кръговете, в които те участват биха улеснили обработката на сигналите, подпомагайки *feedback* контрола (Mugnaini, 1969, 1972, 1985, 1987, 1994, 1997; 2000; Diño et al., 2000, 2001).

Грануларноклетъчните гломерули в различните региони от своя страна показват различия в зависимост от субпопулацията от грануларни клетки. Въпреки структурните прилики между грануларните клетки, разнообразието от аферентните влакна към отделните подразделения предполага съществуването на подгрупи между тях. Установено е, че субпопулациите на грануларните клетки се различават функционално, но все още не са напълно определени морфологично. Те се различават по локализация, източник на мъховидните окончания, с които контактуват и синаптичната организация на гломерулите, в които участват. Няма ясна класификация на тези микроневрони, въпреки че някои автори разграничават четири типа – тип1 и тип2 наподобяват обичайните грануларни клетки, а тип3 и тип4 приличат по-скоро на Голджи клетките или на ектопични малки неврони от други полета (Sobrinho and Gallego, 1972).

В повърхностните региони на DCN например, мъховидното окончание образува синаптични контакти не само върху дендритите на предполагаемите грануларни клетки, но също и върху дендритните спини, пенетриращи мъховидното окончание. В DCN тези дендритни протрузии са по-дебели и с по-голям калибър от несинаптичните дендритни израстъци на грануларните клетки в сравнение със зоните на VCN (Diño and Mugnaini, 2008).

Причините за обособяване на морфологични варианти не са ясни, но най-вероятно разнообразните форми зависят от фактори, регулиращи генната експресия по време на ранното развитие или произлизат епигенетично, през периода на адаптацията към клетъчното обкръжение. Допуска се и зависимост от функционалните параметри на мъховидните окончания, упражняващи забележим ефект върху мишените.

Предполага се, че аферентната инервация и електричната активност влияят, както върху невроналната пролиферация, миграция и

диференциация, така и върху разпределението на типовете микроневрони в домена (Spitzer, 2006). Установено е, че както грануларните клетки, така и *UBCs* се срещат извън точните граници на CN и тези допълнителни зони също са част от грануларноклетъчната система (GCS). От друга страна, *UBCs* във вентралното слухово ядро и в корена на вестибуларния нерв се определят от някои автори като „ектопични” клетки с неизяснена роля (Diño and Mugnaini, 2008).

6. Категоризиране на мъховидните нервни окончания на два типа: *extrinsic mf* и *intrinsic mf*

По аналогия с малкия мозък приемаме, че болшинството от мъховидните окончания в слуховото ядро произлизат от източници извън кохлеарния домен. Този тип нервни терминали са с по-големи размери и ние ги причисляваме към популацията на външните мъховидни нервни окончания – т.нар. *extrinsic mf*. Те от своя страна показват забележими вариации по размери и форма и условно могат да се разделят на големи и малки (Zhan, 2006, 2007). Болшинството от малките *mf*-терминали принадлежат към категорията на *intrinsic mf*, с ендегенен произход. Тази категоризация не може да се приложи към всички типове *mf*-терминали. Някои от тях са с ендегенен произход и също са с големи размери, а други от слуховата кора завършват като големи *mf* и малки *mf*-терминали, но и като класически бутонovidни окончания (Zhan, 2006, 2007; Mugnaini et al., 2011). Доказано е, че два типа клетки от магноцелуларния регион на VCN терминират в грануларния домен – октоподните (Golding et al., 1995) и D-звездovidните (Oertel et al., 1990). Октоподните са възбудни неврони и в някои региони техните аксони оформят големи *mf*-мъховидни терминали. Обикновено те са разположени в полето около телата на октоподните клетки и в грануларно-клетъчната пластинка, но не и в повърхностния слой грануларни клетки от предното подразделение на вентралното ядро. *UBCs* имат също характерни аксони, завършващи като малки мъховидни окончания. Аксоните на изброените три класа клетки съставляват популацията на вътрешните мъховидни нервни окончания – *intrinsic mf* (Mugnaini et al., 2011).

Микроневроните в грануларноклетъчния домен имат широк спектър от функции. В него невроните от типа *UBCs* са дефинирани като “*signal amplifier*” – усилващи сигнала, грануларните клетки като “*coincidence detector*” – детектори на едновременно пристигаща информация и *chestnut* клетките като “*summator*”, поради факта, че получават информация от многобройни мъховидни бутони, произлизащи от различни източници (Weedman et al., 1996b)

7. Глутаматни рецепторни фенотипове в слуховия ядрен комплекс на плъх по време на постнаталното развитие

Активацията на глутаматните рецептори и бързата синаптична трансмисия са от ключово значение за постнаталното развитие на невроните. Във всички зони на слуховото ядро са доказани *AMPA* рецепторни субединици, характеризиращи се с бърза кинетика и висока Ca^{2+} пропускливост. Все още малко се знае за процесите на регулация и контрол върху експресията на отделните субединици в състава на рецепторните комплекси. Установено е, че комбинациите от индивидуалните *AMPA* рецептори се променят драстично през постнаталния период от развитието (Rubio, 1997, 1999, 2004; Caicedo and Eubalin, 1999). При неонаталните плъхове се доказват както *AMPA*, така и *NMDA* рецептори, но след третата постнатална седмица *NMDA* компонента отсъства и синаптичният поток се генерира след активация само на рецептори от типа *AMPA* (Isaacson and Walmsley, 1995b; Petralia RS, 1997; Bellingham et al. 1998; Pliss, 2009).

Настоящото изследване демонстрира характерен модел в експресията на *AMPA* рецепторните субединици. Основна тенденция по време на развитието е увеличаващата се по интензивност експресия на индивидуалните субединици с установяване модел на възрастни през четвъртата седмица. Невроните в слуховото ядро от отделните зони, изглежда притежават рецепторни комплекси със сходна композиция на рецепторните субединици и промените, които се очакват с напредване на възрастта са по-скоро количествени, а не отнасящи се до промяна в комбинациите. В други зони като *LSO*, *MNTB* и *VLL*, основните промени се изразяват в тотална рекомпозиция на рецепторите.

Joshi et al. (2004) са изследвали експресионните нива на *AMPA* субединиците *GluR1-4* в *MNTB*, посредством специфични антитела и пероксидазно оцветяване на три възрастови групи P5/6, P9/10, и P18-20. Като индикатор на експресионните нива е използван интензитета на пикселите на цитоплазматичното оцветяване на невроните на *MNTB* и е установено, че *GluR1* доминира в незрелите неврони, а *GluR3* е със слаба експресия по време на първите три постнатални седмици (Joshi et al., 2004). Цялостната соматична експресия на *GluR1-4* и особено на *GluR1* намалява по време на първите три постнатални седмици. *GluR2* има слаба експресия във всички възрасти и се предполага, че това е субединицата, която най-малко допринася за промените в кинетиката на *AMPA* рецепторите по време на развитието. *GluR1*, *GluR3* и *GluR4* се експресират във всички стадии на развитие и релативното доминиране на някои от субединиците, определящи характеристиките на *EPSCs*, определят и фенотипа на целия *AMPA* рецепторен комплекс.

За слуховите ядра се дискутира специфичен модел на развитие, при който има нарастваща необходимост от преходна експресия на определени субединици. За други региони преходната експресия съвпада с промени, свързани с пластицитета и формиране на нови аферентни връзки. Допуска се и възможността, преходната експресия на рецепторните субединици да е компонент от механизъм, участващ в адекватното установяване и развитие на изключително специфични връзки (Petralia, 1997; Caicedo and Euybalin, 1999; Joshi et al., 2004).

По време на постнаталното развитие, в слуховите центрове, се разграничават два рецепторни фенотипа. В първия доминира *GluR1* и вероятно този фенотип участва в първите стъпки на синаптичното и рецепторното формиране и консолидация. Вторият фенотип се отличава с висока Ca^{2+} пропускливост и по принцип се установява по време на критичния период, но може да съвпадне и с периодите характерни за първия вариант. И двата фенотипа не са генерализирани в цялата ЦНС, а са уникални за определени региони и са регистрирани в точно определени етапи от развитието. Крайното формиране на *AMPA*-рецепторния комплекс не следва опростен модел на развитие, а включва постоянни клетъчно-специфични промени в композицията, в резултат на които разнообразни рецепторни фенотипове се появяват или изчезват (Raman, 1994; Ravindranathan et al., 2000; Rubio, 1997, 1999).

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ИЗВОДИ

В настоящето изследване ние се постарахме да представим различни аспекти от развитието на слуховия ядрен комплекс. Специално внимание обърнахме на ултраструктурните детайли на два основни клетъчни типа и техните големи аксосоматични синапси от територията на вентралното подразделение на комплекса. Описани са особеностите в морфологията на клетъчното тяло и уникалните черти на синапсите, произлизащи от тип 1 спирални ганглийни клетки. Надяваме се, че с наблюденията си върху грануларно-клетъчната система допълваме представата за изключителната хетерогенност на комплексните синаптични полета.

Въз основа на нашите проучвания и данните от литературата, ние достигнахме до следните по-важни изводи:

1. На базата на модела на оцветяване на невроните по метода на Nissl, в хода на онтогенетичното развитие, невроните се разграничават на светли и тъмни варианти.

2. В изследването установихме двуфазен модел в развитието на глобуларните и октоподните неврони на белите плъхове. Първата фаза е времето на бързо нарастване, когато клетките достигат 90% от зрялата си големина. Втората фаза е по-продължителна, с по-бавни и постепенни промени, в края на която клетките достигат окончателните си размери и цитологични характеристики.

3. Етапите на бързи и съществени преобразования в развитието на невроните установихме през втората и третата постнатална седмица, което съвпада с критичния период в развитието на VCN. Времето на морфологично съзряване на макроневронеите е независимо от цитоархитектоничната и тонотопичната област, в която е локализиран дадения клетъчен тип.

4. По време на критичния период от развитието на слуховото ядро каликсобразните аксосоматични синапси променят забележимо ултраструктурата си и показват преходни и перманентни черти, доказващи функционална активност.

5. В грануларно-клетъчните зони на територията на вентралното слухово ядро преобладаващ вид са т. нар. чисти форми на грануларно-клетъчните синаптични гломерули и единични UBC-синаптични мозайки.

6. Акустичната депривация и кохлеарната деструкция имат забележим ефект върху матurationията на невроните. С тези експерименти доказваме ролята на акустичните стимули за преживяването и крайната диференциация на макроневронеите-мишени на първични слухови влакна.

7. Възрастово-зависимите промени в имунопозитивизирането на глутаматните рецептори изявяват различни модели. GluR1 се експресира в първите постнатални дни. GluR2 има преходна интензивна експресия през втората постнатална седмица седмица, а GluR3 започва да се позитивира около P10 с прогресивно увеличаване на интензитета на имунобелязване в края на първия месец.

VII. ПРИНОСИ

- Проучена е цитоархитектониката на кохлеарният ядрен комплекс на белия плъх и матурацията на два основни клетъчни типа глобуларни и октоподни клетки по време на постнаталното развитие.
- Прецизирана е ултраструктурната характеристика и синаптичната организация на макроневроните на вентралното слухово ядро по време на онтогенетичното развитие.
- Приведени са морфологични доказателства за непрекъснато променящата се морфология на големите аксосоматични синапси в централната нервна система, в зависимост от стадия на развитие и характеристиките на акустичните стимули.
- Направено е комплексно изследване на морфологичната характеристика на големите каликсовидни синапси на Хелд и композицията на техните глутаматни рецепторни субединици по време на онтогенезата.
- Описана е морфологичната хетерогенност на синаптичните гломеруларни полета на територията на VCN на белия плъх чрез електронномикроскопско описание на централните мъховидни терминали и заобикалящите ги дендритните профили.
- Потвърдена е ролята на периферната част на слуховия анализатор за развитието на първичните слухови ядра.

ПУБЛИКАЦИИ

СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

На д-р С. Пенчева, к-ра Анатомия

1. Ivanov E, S. Pencheva Cytoarchitecture of ventral cochlear nucleus. Sci. Works of Medical University - Pleven. 1996;16-19.
2. Пенчева С, Ст Трифонов, Н. Нарлиева. Морфологична характеристика на макроневрони в зоната на вентралното слухово ядро по време на постнаталния период. ЮБИЛЕЙНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ - СТАРА ЗАГОРА. 2002; том I:26-30.
3. Pencheva S, E. Ivanov, N. Narlieva. Ultrastructural changes in the dorsal cochlear nucleus polymorph layer after neonatal removal of the cochlea. Annual Proceedings IMAV. 2003;9(1):118-120.
4. Иванов Е, С. Пенчева. Развитие на клетките на спиралния ганглий. Медицински преглед. 2013;49(2):31-40, обзор

ДОКЛАДИ ОТ КОНФЕРЕНЦИИ И КОНГРЕСИ

Свързани с дисертационния труд

1. Pencheva, S., E. Ivanov, K. Koichev. Ontogenetic development of ventral cochlear nucleus. X Нац. Конгрес по анатомия, Ст Загора. 1989:121
2. Пенчева, С., Е. Иванов, К. Койчев. Онтогенетично развитие на глобуларните неврони от вентралното слухово ядро. Юбилейна научна сесия, Плевен, 21, 1994.
3. Pencheva S., E. Ivanov, K. Koichev. Influence of the monaural acoustic deprivation on spherical cells of anteroventral cochlear nucleus. XIII National Congress of BAS with International Participation, Varna 1997
4. Pencheva S., E. Ivanov. Glomerular synapses and synaptic arrangements in the cochlear nuclei of rat – an electron microscope study. 32nd Balkan Medical week, 21-23 September 2012, Nis, Serbia
5. Pencheva S., E. Ivanov. Ultrastructure of the granule cells and granule-cell synaptic glomeruli in the cochlear nuclear complex of the rat. XXI NATIONAL CONGRES of the Bulgarian Anatomical Society with international participation, Sofia, May 31 – June 2, 2013.
6. Pencheva S., E. Ivanov, N. Lazarov. Granule cells of the cochlear nucleus in rats: ultrastructural and immunohistochemical study. ARCHIVES of the Balkan Medical Union, Volume 48, 3-Supplement, September 2013, Chisinau, Moldova

DEPARTMENT OF ANATOMY, HISTOLOGY AND CYTOLOGY

Svetla Pencheva Doseva

MORPHOLOGICAL ASPECTS IN DEVELOPMENT OF
THE COCHLEAR NUCLEAR COMPLEX

PhD Thesis

Scientific advisor:

Prof. Emiliyan Aleksiev Ivanov, MD, DM

Official Reviewers:

Prof. Nikolai Elenkov Lazarov, MD, DMSc
Prof. Konstantin Asenov Koichev, MD, DMSc

Morphological aspects in development of the Cochlear nuclear complex

The cochlear nuclear complex is the site of the first central synapse in auditory system. The auditory nerve enters the cochlear complex and sends branches to the ventral cochlear nucleus and the dorsal cochlear nucleus. Surrounding these two core areas are regions of granule cells. Granule cells and the other microneurons are present also in defined regions of ventral and dorsal cochlear nuclei collectively termed “granule cell domain”.

The neurons of the cochlear nucleus are dependent on input from auditory nerve for survival during a critical period of development.

We have used electron microscopic and immunohistochemical methods to describe the immature features of neurons and synapses during postnatal development of the cochlear nuclei. We examined the morphology of different classes of macroneurons and granule cells. We described ultrastructure of large auditory nerve terminals (endbulbs of Held) and synaptic relationships between a class of large synaptic terminals called mossy fibers and their targets within subdivisions of the granule cell domain. We have also studied the expression of AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole) receptor subunits in the cochlear nuclear complex of the developing rat.

Typical morphologic features observed during endbulb development were the interdigitations of endbulbs and bushy cell membranes. The somatic appendages have been postulated to have a role in the guidance of the axon to a specific location on the surface of the neuron. Structural evidences of synapse formation with incoming axons have been provided.

We investigated heterogenous class of granule cells innervated by mossy nerve endings and different dendrite classes in synaptic glomeruli. The mossy fibers are large, irregularly shaped terminals that are filled with round synaptic vesicles and mitochondria. Each terminal is surrounded by dendritic profiles upon which it forms asymmetric synaptic contacts. GluR1, GluR2 and GluR3 subunits of glutamate receptors were expressed in the first four postnatal weeks. The role of sensory input on neuronal development have been examined with models of sensory deprivation.

The mossy fiber glomeruli are similar to those described in the cerebellum and the dendritic profiles were hypothesized to belong to granule cells.

The results confirm parallel fiber pathways as glutamatergic and identify a synaptic population, projecting to granule cells, which is likely glutamatergic. During the development GluR3 staining resembled that of the GluR2. Age-related changes in labelling of GluR3 subunit in the microneuronal types between P10 and P40 were characterized by a progressive increase in the staining intensity.

Key words: bushy cells, endbulbs of Held, granule cell, mossy fiber, immunohistochemistry

Изказвам своята искрена благодарност на научния си ръководител проф. д-р Емилиян Иванов за неговата съпричастност. Незаменимите познания и умения, които той ми предаде в дългогодишната ни съвместна работа ми дадоха куража и увереността да завърша настоящия труд, за което съм му дълбоко признателна.

Благодаря на екипа на лабораторията при катедрата по Анатомия, хистология и цитология при МУ – Плевен за професионализма и личната им отдаденост по време на експерименталната работа.

Благодаря за безценната техническа помощ на Анелия Георгиева.

Благодаря на колегите от катедрата за подкрепата и ценните съвети.