

# Siateczka na neuronach



## DOROTA NOWICKA

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,  
Polska Akademia Nauk, Warszawa

dnowicka@nencki.gov.pl

Dr Dorothea Nowicka pracuje w Pracowni Molekularnych Podstaw Neuroplastyczności Mózgu, bada wpływ sieci perineuronalnych na plastyczność.

## Jedną z możliwych funkcji sieci perineuronalnych jest ochrona komórek nerwowych

Odkrycie sieci perineuronalnych przypisuje się ojcu współczesnej neuroanatomii Camillo Golgiemu. Ten włoski lekarz i uczonek w 1873 roku w małym laboratorium urządzonym w kuchni opracował metodę barwienia tkanki nerwowej solami srebra, co umożliwiło zaobserwowanie wielu dotychczas nieznanych struktur komórkowych. Między innymi uwidoczniło delikatną siateczkę na powierzchni niektórych neuronów otaczającą ich ciała i początkowe odcinki wypustek nerwowych. To odkrycie początkowo nie spotkało się z wielkim zainteresowaniem. Wybitny hiszpański neuroanatom Santiago Ramón y Cajal, rywal Golgiego, zaliczył je wręcz do artefaktów metody i na wiele lat zahamował rozwój badań. Dopiero w latach 50. XX wieku rozwój technik histologicznych i mikroskopii elektronowej pozwolił potwierdzić istnienie takich struktur w mózgu.

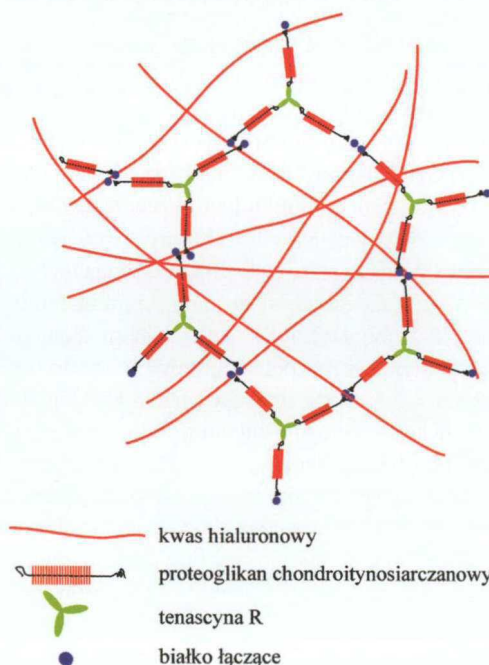
## Heksagonalna struktura

Obecnie uważa się sieci perineuronalne za ustrukturalizowaną formę macierzy zewnątrzkomórkowej, czyli substancji wypełniającej przestrzeń między komórkami nerwowymi i ich wypustkami. Macierz zewnątrzkomórkowa mózgu zawiera głównie wielocukier – kwas hialuronowy, oraz proteoglikany – białka, niosące na swojej powierzchni krótsze łańcuchy innego wielocukru, siarczanu chondroityny. Nie zawiera natomiast kolagenu i elastyny, co wyróżnia tkankę mózgową wśród innych tkanek. Sieć perineuronalna jest siateczką o heksagonalnych oczkach, położoną po zewnętrznej

stronie błony komórkowej neuronu, zbudowaną z kwasu hialuronowego, którego długie łańcuchy stanowią zrab siateczki i podstawę, z którą wiążą się proteoglikany. Specyficzną heksagonalną strukturę sieci utrzymują białka łączące, które kotwiczą cząsteczki proteoglikanów do kwasu hialuronowego, oraz tenascyna R, łącząca poszczególne cząsteczki proteoglikanów między sobą (Ryc. 1). Ze względu na dużą zawartość grup karboksylowych i siarczanowych w łańcuchach cukrowych sieci perineuronalnej mają silny ładunek ujemny. Proteoglikanem, który występuje w sieciach perineuronalnych najobficiej, jest agrekan. Spośród tkanek organizmu agrekan występuje jeszcze w tkance chrzęstnej i razem z kwasem hialuronowym stanowi jej podstawę. Podobieństwo macierzy zewnątrzkomórkowej mózgu i macierzy tkanki chrzęstnej pod względem składu chemicznego jest wyraźne i zaskakujące.

## Białka do wykrywania

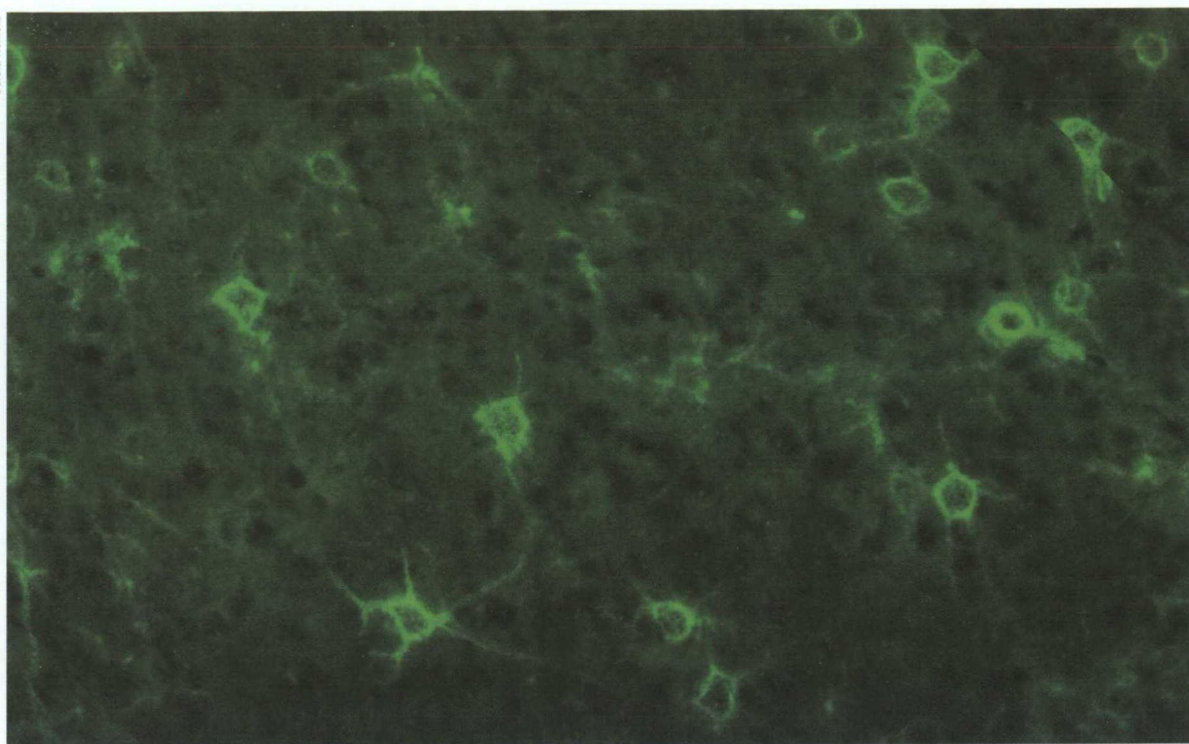
Liczba gatunków zwierząt przebadanych pod kątem występowania w ich mózgu sieci perineuronalnych nie jest imponująca. Najdokładniej zostały opisane sieci perineuronalne w móz-



Dorothea Nowicka

Hipotetyczna struktura  
sieci perineuronalnej

Dorota Nowicka



**Grupa neuronów otoczonych sieciami perineuronalnymi w korze mózgowej myszy**

gach gryzoni – myszy i szczurów. Wiadomo, że są obecne w mózgu myszokoczków, świnki morskiej, kota, psa, owcy, północnoamerykańskiego bizona, szopa pracza. Znalezione są również w mózgach tak egzotycznych zwierząt jak madagaskarski tenrek (*Echinops telfairi*) i oposy *Monodelphis domestica* i *Thylamys elegans*. Również w mózgach naczelnych i człowieka jest wiele komórek otoczonych sieciami perineuronalnymi. U innych niż ssaki kręgowców – ptaków i gadów. Zbliżone wyglądem do sieci struktury zauważono u żaby wodnej *Rana esculenta*. Jest więc prawdopodobne, że sieci perineuronalne występują powszechnie u kręgowców. Nie ma jak dotąd żadnych danych o występowaniu sieci u zwierząt bezkręgowych.

Obecnie w użyciu jest wiele metod, dzięki którym możemy obserwować sieci perineuronalne. Możemy wykryć je za pomocą specyficznych lektyn, tzn. białek roślinnych, mających zdolność do rozpoznawania i wiązania cząsteczek cukrów. Znakujemy je również za pomocą przeciwciał rozpoznających konkretne białka lub epitopy cukrowe. Takie lektyny lub przeciwciała, sprzężone ze markerem fluorescencyjnym, po naświetleniu światłem UV świecą i można je zobaczyć pod mikroskopem (Ryc. 2). Kiedy spojrzymy przez okular mikroskopu na skrawek tkanki mózgowej wykąpany wcześniej w płynie zawierającym wyżej wspomniane znaczniki, zauważymy, że sieci perineuronalne są obecne na powierzchni tylko niektórych neuronów (Ryc. 3). Wydaje się, że są to głównie neurony hamujące (gabaergiczne), wydzielają-

ce kwas gamma-aminomasłowy (GABA) jako neuroprzekaźnik. Neurony te, mimo że stanowią niewielką (10-20%) część całkowitej liczby neuronów w mózgu, spełniają ważną funkcję w utrzymaniu pobudzenia mózgu na właściwym poziomie. Poznano wiele typów tych komórek i – co ciekawe – tylko niektóre z nich są otoczone sieciami. A co jeszcze ciekawsze, nawet w obrębie danego typu jedne komórki są otoczone siecią, inne nie. Dlaczego tak się dzieje? Tego na razie nie wiemy. Pewne badania wskazują, że również niektóre neurony pobudzające wydzielające glutaminian jako neuroprzekaźnik mogą być otoczone sieciami perineuronalnymi. Dane na ten temat są skąpe, ponieważ w przypadku neuronów glutamatergicznych nie dysponujemy wiarygodnymi metodami ich identyfikacji histochemicznej i opieramy się jedynie na obserwacjach morfologicznych.

Komórki otoczone sieciami perineuronalnymi nie są w mózgu rozmieszczone równomiernie. W największym zagęszczeniu występują w obszarach kory mózgowej, do których dociera informacja ze środowiska zewnętrznego, a więc np. w korach wzrokowej, słuchowej czy czuciowej. Możemy je znaleźć również np. w hipokampie, wzgórzu, mózdzku i rdzeniu kręgowym.

### Po co neuronom sieci?

Nie znaleziono dotychczas jednoznacznej odpowiedzi na to pytanie. Wydaje się, że komponent cukrowy sieci perineuronalnych, w szczególności wchodzący w skład prote-

## Sieci perineuronalne – struktury w układzie nerwowym

oglikanów, ze względu na swój polianionowy charakter jest niezwykle istotny i determinuje jej właściwości biofizyczne. Ujemne ładunki zgromadzone na powierzchni sieci sprzyjają zatrzymywaniu wody i kationów. W przypadku neuronów, które są komórkami o szybko zmieniającym się potencjale błonowym, zachowanie właściwego stężenia jonów w pobliżu błony komórkowej ma szczególne znaczenie. Sieć perineuronalna może być magazynem, w którym przechowywane są jony potrzebne do wytwarzania potencjału błonowego, ale również może działać jako bufor pochłaniający ich nadmiar. Hipotezę tę potwierdza obserwacja, że sieci perineuronalne bardzo często są związane z gabaergicznymi neuronami szybko wyładowującymi się (ang. *fast-spiking neurons*). Badania *in vitro* wykazują, że również inne cząsteczki mogą wiązać się ze składnikami sieci perineuronalnej, np. czynniki troficzne, białka sygnałowe, zewnątrzkomórkowe proteazy, chemokiny, cytokiny itd. Sieci perineuronalne mogłyby stanowić rezerwuuar tych substancji, z którego po zadziałaniu odpowiedniego bodźca byłyby uwalniane.

Sieciami perineuronalnym przypisuje się również funkcję neuroprotekcijną, ochronną dla neuronów. Hodowane *in vitro* neurony, które wytwarzają sieci, są wybiórczo odporne na wolne rodniki, nadmierne pobudzenie, wywołane podaniem do hodowli neuroprzekaźnika pobudzającego – glutaminianu. U ludzi neurony otoczone sieciami perineuronalnymi nie ulegają neurodegeneracji w chorobie Alzheimera, kiedy wiele innych neuronów obumiera. Badania *in vitro* również potwierdzają odporność neuronów otoczonych sieciami na obecność beta-amyloidu i białka tau, czyli białek związanych z patologią Alzheimera.

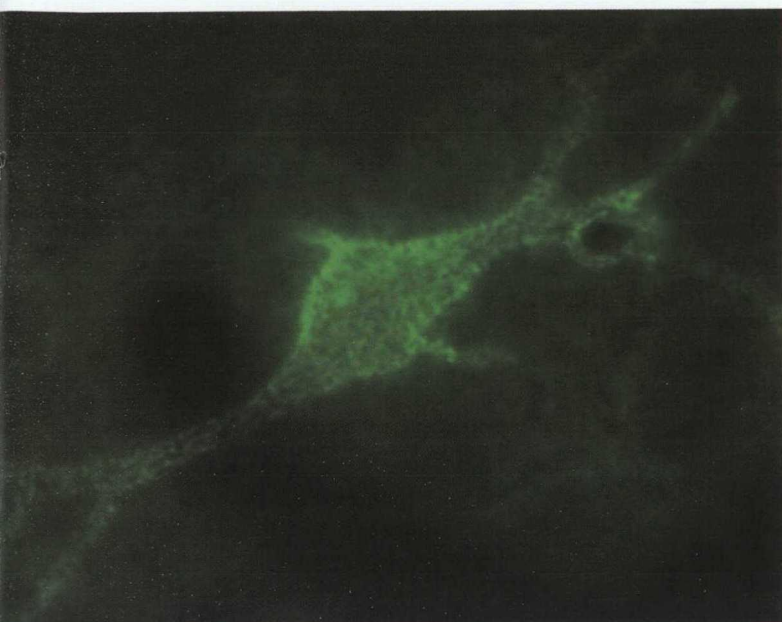
### Sieć i uczenie się

Mózg ma zdolność modyfikacji swojej funkcji pod wpływem bodźców środowiska, uczenia się lub uszkodzenia. Zjawisko to nazywamy plastycznością neuronalną lub neuroplastycznością. Wydaje się, że ma ono bardzo złożony charakter, regulowany na różnych poziomach, od genów do struktury. Podstawą neuroplastyczności jest zmiana właściwości, liczby i położenia synaps, a w efekcie przebudowa sieci połączeń synaptycznych. Obecność sieci perineuronalnych na powierzchni neuronów

utrudnia dostęp nowym synapsom do powierzchni błony neuronu, a siatkowata struktura stabilizuje te istniejące i utrudnia lub wręcz uniemożliwia neuroplastyczność.

Pierwszych dowodów na prawdziwość hipotezy o udziale sieci w neuroplastyczności dostarczyły badania plastyczności rozwojowej kory wzrokowej u szczurów. Wiadomo, że rozwój kory wzrokowej przebiega etapami. U młodych zwierząt, na pewnym ściśle określonym etapie rozwoju, kora wzrokowa jest niezwykle plastyczna. Objawia się to m.in. tym, że możemy wpływać na jej funkcjonowanie i strukturę np. poprzez ograniczenie dopływu bodźca wzrokowego do jednego oka (tzw. deprywacja jednooczna). Po kilku dniach takiej deprywacji kora przestaje odpowiadać na bodźce wzrokowe płynące z zamkniętego oka (nawet po jego otwarciu), natomiast reaguje silniej na sygnał z oka niedeprywowanego. Przedział czasu, w którym takich zmian możemy dokonać, nazywamy okresem krytycznym. Po upływie okresu krytycznego kora wzrokowa staje się niewrażliwa na nasze manipulacje bodźcem wzrokowym. Okazuje się, że zamknięcie okresu krytycznego ściśle zbiega się w czasie z pojawieniem się i dojrzewaniem sieci perineuronalnych w korze wzrokowej. Ich obecność stabilizuje utworzoną prawidłową sieć połączeń i późniejsza deprywacja wzrokowa nie jest w stanie jej naruszyć.

Funkcję sieci perineuronalnych w ograniczeniu plastyczności kory wzrokowej jednoznacznie potwierdziły eksperymenty deprywacyjne u starszych zwierząt, którym do kory wzrokowej wstrzyknięto bakteryjny enzym, chondroitynazę ABC, trawiającą reszty chondroitynosiarczanowe proteoglikanów wchodzących w skład sieci. Zniszczenie sieci umożliwiło zmiany w funkcjonowaniu kory, takie jakie obserwowano w okresie krytycznym. Znaczenie sieci perineuronalnych w plastyczności potwierdzono także w modelach opartych na badaniu pamięci, np. w tzw. warunkowaniu strachu, które polega na wytworzeniu asocjacji między bodźcem obojętnym a awersyjnym, zwykle bólowym. U młodych zwierząt ta reakcja jest możliwa do odwrócenia (tzw. wygaszanie reakcji), ponieważ obszary mózgu zaangażowane w ten proces (ciało migdałowe) są jeszcze plastyczne. U dorosłych reakcja jest bardzo trwała. Zniszczenie sieci perineuronalnych u dorosłych zwierząt za pomocą chondroitynazy ABC pozwoliło na wygaszenie reakcji, a więc przywrócenie neuroplastyczności. Udział sieci w plastyczności



Dorota Nowicka

Neuron z kory  
czuciowej szczura  
otoczony siecią  
perineuronalną,  
wyznakowaną  
fluorescencyjnie

rozwojowej wydają się również potwierdzać badania na ptakach, u których wykazano zaangażowanie sieci perineuronalnych w proces uczenia się śpiewu przez młode osobniki.

### Sieć i pamięć

Mózgi zwierząt dorosłych, a nawet starych, zachowują pewną zdolność do neuroplastyczności. Sieci perineuronalne nie są dane raz na zawsze i mogą być modyfikowane przez różne czynniki. Jednym z nich jest np. aktywność neuronalna, czyli poziom pobudzenia neuronów w danym obszarze mózgu.

Przetrzymanywanie myszy w tzw. wzbogaconym środowisku, dostarczającym większej liczby bodźców (np. trzymanie ich w klatkach z dużą liczbą zabawek), powoduje spadek liczby sieci w mózdzku, a także w korze wzrokowej. Zaobserwowano również spadek liczby sieci w obszarach graniczących z uszkodzoną - np. w wyniku udaru lub urazu - tkanką. W naszych badaniach wykazaliśmy, że w obszarach kory mózgowej przyległych do miejsca udaru, liczba sieci perineuronalnych znacznie spada (nawet o 80%). Uważamy, że to zjawisko może być mechanizmem umożliwiającym reorganizację sieci synaptycznej i np. przejęcie funkcji obszarów uszkodzonych przez ocalałą korę. Z drugiej jednak strony rehabilitacja uszkodzonego rdzenia kręgowego (czyli stymulacja określonej grupy neuronów) powoduje zwiększenie liczby sieci perineuronalnych w pobliżu lezji. Wydaje się więc, że natura zależnych od aktywności neuronalnej zmian w liczbie i/lub

strukturze sieci zależy od tego, w jakim obszarze mózgu te zmiany badamy, prawdopodobnie też od wieku zwierzęcia i konkretnego układu neuronalnego.

Nie zmienia to jednak faktu, że sieci podlegają modyfikacjom. Czynniki mającymi wpływ na ich liczbę i strukturę są enzymy proteolityczne, np. zewnątrzkomórkowe metaloproteazy z rodziny MMP, oraz glikolityczne, np. hialuronidazy, trawiące kwas hialuronowy. O ile wiedza na temat roli proteolizy w procesie degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej i sieci perineuronalnych w szczególności jest udokumentowana, niezwykle mało wiadomo na temat enzymów, które mają zdolność trawienia składników cukrowych nadających sieciom ich charakterystyczne właściwości. To otwiera nowe pole do badań nad regulacją sieci. Wspomniane eksperymenty z zastosowaniem chondroitynazy ABC jednoznacznie wskazują, że usunięcie cukrowych elementów sieci skutkuje przywróceniem mózgowi młodszej plastyczności. Nasze badania sugerują, że z wiekiem liczba sieci perineuronalnych, przynajmniej w niektórych obszarach mózgu, wzrasta. Być może ten wzrost jest odpowiedzialny za pogorszenie naszych zdolności poznawczych, które obserwujemy już po czterdziestce. Możliwość wpływania na sieci perineuronalne i poprawy zdolności uczenia się, pamięci u starszych ludzi jest kuszącą perspektywą. Chondroitynaza ABC podana do uszkodzonego rdzenia kręgowego u szczura umożliwia reorganizację połączeń synaptycznych i znacząco poprawia efekty rehabilitacji. Metody te jako zbyt inwazyjne są jednak trudne do zastosowania u ludzi. Zidentyfikowanie endogennych czynników modyfikujących sieci perineuronalne (np. enzymów glikolitycznych), a następnie substancji wpływających na ich aktywność w sposób wybiórczy i kontrolowany, które można by podawać np. w postaci tabletki, zrewolucjonizowałoby leczenie mózgu.

Tabletka poprawiająca pamięć, lecząca skutki demencji, wspomagająca leczenie urazów mózgu i rdzenia kręgowego... Święty Graal? Kto wie, może jednak kiedyś go odnajdziemy? ■

#### Chcesz wiedzieć więcej?

Karetko-Sysa M., Skangiel-Kramska J., Nowicka D. (2011). Disturbance of perineuronal nets in the perilesional area after photothrombosis is not associated with neuronal death. *Experimental neurology*, 231(1):113-26.