

УДК 591.543.42:597+611.81

И.М. Санталова*, Н.А. Пенькова, И.Б. Михеева, Д.А. Мошков

Влияние состояния зимнего оцепенения на трехмерную структуру маутнеровских нейронов у рыб *Perccottus glehni*

UDC 591.543.42:597+611.81

I.M. Santalova*, N.A. Penkova, I.B. Mikheeva, D.A. Moshkov

Effect of Winter Dormancy on Three-Dimensional Structure of the Mauthner Neurons in *Perccottus glehni* Fish

Реферат: При изучении морфологии маутнеровских нейронов (МН) рыб *Perccottus glehni* было выявлено значительное уменьшение их объемов в процессе зимовки, что, вероятно, обусловлено необходимостью экономии энергетических резервов организма. В начальный период зимнего оцепенения было обнаружено уменьшение объемов обоих основных дендритов без изменений в соматической части МН. В период завершения зимовки общий объем сомы и латерального дендрита уменьшился на 50%, а вентрального – на 80%. Предполагается, что уменьшение интегральных объемов нейронов связано с развитием гипометаболизма, а также со значительным снижением потоков афферентной информации, поступающей к МН от слухового и зрительного анализаторов.

Ключевые слова: гипометаболическое состояние, зимовка рыб, *Perccottus glehni*, морфология, маутнеровские нейроны, 3d-реконструкция.

Реферат: При вивченні морфології маутнерівських нейронів (МН) риб *Perccottus glehni* було встановлено значне зменшення їхніх об'ємів у процесі зимівлі, що, ймовірно, обумовлено необхідністю економії енергетичних резервів організму. На початковому періоді зимового заціпеніння виявлено зменшення об'ємів обох основних дендритів без змін у соматичній частині МН. У період завершення зимівлі загальний об'єм соми та латерального дендриту зменшився на 50%, а вентрального – на 80%. Припускається, що зменшення інтегральних об'ємів нейронів пов'язане з розвитком гипометаболізму, а також зі значним зниженням потоків аферентної інформації, яка надходить до МН від слухового та зорового аналізаторів.

Ключові слова: гипометаболічний стан, зимівля риб, *Perccottus glehni*, морфологія, маутнерівські нейрони, 3d-реконструкція.

Abstract: Investigation of the Mauthner neurons (MN) morphology in fish *Perccottus glehni* revealed a significant reduction in their volumes during dormancy, probably stipulated by a need to spare the body energy resources. The initial period of winter dormancy was characterized by a decrease in volumes of both main dendrites with no changes in somatic part of MN. During the terminal period of winter dormancy a total volume of soma and lateral dendrite reduced by 50%, and for the ventral one it did by 80%. It can be assumed that a decrease in integral neuronal volumes is associated with developing hypometabolism, as well as with a significantly decreased inputs of afferent information, entering MN from auditory and visual analyzers.

Key words: hypometabolic state, fish winter dormancy, *Perccottus glehni*, morphology, Mauthner neurons, 3D reconstruction.

Способность живых организмов к выживанию в экстремальных условиях (холод, отсутствие пищи) является предметом исследования биологов и медиков [3, 5, 6, 8]. При введении животных в состояние гибернации появляется возможность создать модель всех состояний организма: от активного при нормотермии до практически полного торможения функций. С помощью этой уникальной физиологической модели можно изучить различные процессы как на организменном, так и на клеточном уровне. Известно, что при гибернации у животных и птиц глубоко подавляется метаболизм, вследствие чего снижается температура тела, частота сердечных сокращений и замедляются другие физиологические функции, однако со-

The capability of living organisms to survive under extreme conditions (cold, lack of food) attracts the attention of biologists and medical scientists [6, 8, 9, 11]. Hibernating animals could be used to develop the models for various states of an organism: from an active mode, at normothermia, to a virtually full functional inhibition. Using this unique physiological model it is possible to study different processes at both organism and cell levels. The metabolism is known to be deeply suppressed in animals and birds during hibernation, accompanied by a decrease in body temperature and heart rate, as well as other physiological functions, however, with preservation of all the mechanisms, providing the return of an animal back to the active functioning [2, 7]. From this point of view the fish species which

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пушино, Россия

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Институтская, 3, г. Пушино, Московская область, Российская Федерация 142290; тел.: (+7 4967) 73-37-96, факс: (+7 4967) 33-05-53, электронная почта: cima@rambler.ru

Поступила 12.12.2014

Принята в печать 19.01.2015

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №2. – С. 114–121. © 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

*To whom correspondence should be addressed: 3 Institutskaya str., Pushchino, Moscow Region, Russia 142290; tel.: +7 4967 73 3796, fax: +7 4967 33 0553, e-mail: cima@rambler.ru

Received December, 12, 2014

Accepted January, 19, 2015

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(2): 114–121.

© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

храняются все механизмы, обеспечивающие возврат животного к последующей активной жизни [4, 14]. С этой точки зрения рыбы, которые способны адаптироваться к разным температурным условиям обитания, являются также интересным научным объектом. Например, ротан *Perccottus glehni* – представитель пресноводных пойкилотермных гидробионтов – населяет пруды, мелкие и заболоченные озера, старицы рек, в которых вода промерзает зимой до дна. Эта рыба отличается низкой оксифильностью, может жить в сильно загрязненных водоемах [2, 13] и не требует специальных условий для содержания, что удобно для лабораторных исследований [7].

Производя сравнительно мало эндогенного тепла и обладая лишь отдельными терморегуляторными реакциями, пойкилотермные животные, в том числе и ротаны, не могут обеспечить постоянство теплообмена в организме. При значительном снижении температуры зимой они переходят в состояние «глубокого сна», для которого характерны подавление двигательной активности, полное прекращение или резкое уменьшение объемов потребляемой пищи, снижение интенсивности обмена. Основным регулирующим звеном в перестройке организма при разных адаптациях, в том числе и при длительных холодовых воздействиях, является центральная нервная система [3]. Поэтому было интересно проследить за структурными изменениями в нейронах исследуемого вида рыб в условиях длительного охлаждения: конец декабря – начало зимнего оцепенения, конец марта – его завершение.

Цель работы – исследование пластических изменений в нейронах ЦНС пресноводных рыб при гипометаболическом состоянии методом трехмерной реконструкции нейронов [9]. Объектами исследования были маутнеровские нейроны (МН) – единственные идентифицированные нейроны позвоночных [11, 21]. Они представляют собой две гигантские нервные клетки, расположенные в продолговатом мозге у всех костистых рыб и амфибий. Маутнеровские нейроны получают афферентные входы от разных анализаторов и способны к сложной интеграции входной активности [11, 20, 21]. Каждый МН у рыб представляет собой своеобразный командный центр, управляющий специфическим поведением животных, – «реакцией страха». Установлена определенная закономерность между уровнем двигательной активности рыб и морфологическими характеристиками их МН, поэтому они являются удобной моделью для изучения взаимосвязи структуры и функции нейронов при различных состояниях организма [10–12, 15, 17].

can adapt to different temperature habitat conditions are also an interesting scientific subject. For example, the rotan fish *Perccottus glehni*, the representative of freshwater poikilothermal aquatic organisms, inhabits ponds, small lakes, wetlands and oxbow rivers, where the water freezes to the bottom in winter. This fish has a low oxyphility and may live in heavily polluted water [3, 4], with no special conditions for maintenance, which is convenient for laboratory studies [10].

The poikilotherms, including the rotans, produce relatively few endogenous heat and possess only several thermoregulatory reactions, and therefore can not provide the constant heat exchange in the body. Under a significant temperature decrease in winter they enter the ‘deep sleep’ state, characterised by suppressed locomotor activity, either a complete termination or a sharp reduction of consumed amount of food, and a decreased metabolism as well. The main trigger in an organism reorganization caused by various adaptations, including those during long-term cold exposures, is the central nervous system [6]. Therefore of interest was to trace the structural changes in neurons of the studied fish species under long-term cooling: the end of December (beginning of winter dormancy) and the end of March (its termination).

This research was aimed to study the plastic changes in neurons of freshwater fish CNS under hypometabolic state using the method of three-dimensional reconstruction of neurons [12]. The Mauthner neurons (MN), the only identified neurons of vertebrates [14, 21], served as the research objects. They represent two giant nerve cells, located in the myelencephalon in all bony fish and amphibians. Mauthner neurons receive afferent inputs from various analyzers and are capable of complex integration of an input activity [14, 20, 21]. Every MN in fish is a kind of command center, controlling specific behaviour in animals (‘fear reaction’). There was established a certain regularity between the level of locomotor activity of fish and morphological characteristics of their MN, therefore they are a convenient model to study the relationship of neuron structure and function in different states of body [5, 13, 14, 16, 17].

Materials and methods

Research was performed in freshwater fish *Perccottus glehni*, caught in Tulchino lake of Serpukhov district, Moscow region. For the experiment we selected the mature individuals of 8–12 cm length and about 200 g weight, and divided them into 3 groups: group 1 ($n = 6$) was in active state (July); group 2 ($n = 4$) was in beginning of dormancy (the end of December); group 3 ($n = 4$) was in the terminal period of winter dormancy (the end of March). All the exper-



Материалы и методы

В работе использовали пресноводную рыбу ротан *Perccottus glehni*, выловленную с помощью удочки в озере Тульчино Серпуховского района Московской области. Для эксперимента отбирали половозрелых животных длиной 8–12 см и массой около 200 г, которых распределили на группы: 1 ($n = 6$) – активное состояние (июль); 2 ($n = 4$) – начало зимовки (конец декабря); 3 ($n = 4$) – выход из зимнего оцепенения (конец марта). Все эксперименты проводили в соответствии с общепринятыми биоэтическими нормами.

Рыб группы 1, выловленных в июле, сразу брали в эксперимент. Рыб групп 2 и 3, выловленных начале зимы, хранили в 5-литровых прозрачных сосудах с водопроводной водой в холодильной камере с температурой -1°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). На 2–3-е сутки хранения вода в сосудах частично замерзала, что соответствовало состоянию рыб в течение всей зимовки. Таким образом, рыба содержалась в пресной холодной воде, темноте, тишине, без пищи и с ограниченным доступом кислорода, т. е. в условиях, максимально приближенных к естественным.

В процессе эксперимента сосуды с рыбой 1–2 раза в месяц доставали из холодильной камеры на несколько минут для оценки состояния. При наблюдении за рыбой в течение декабря-марта выявлено практически полное отсутствие двигательной активности и сильное подавление дыхания, определяемое по движению жаберных крышек. Данные признаки свидетельствовали об обычном состоянии животных в условиях оцепенения [1, 7].

В день эксперимента рыбу доставали из холодильника, для проверки жизнеспособности ее помещали в воду с температурой 6°C и в течение 5 мин наблюдали за поведением. Если рыба достаточно долгое время сохраняла нормальное положение тела, двигала плавниками и жаберными крышками, то ее отбирали для опыта. Рыбу доставали из воды и декапировали на льду. Выделяли мозг и в капле фиксирующего раствора вырезали участок продолговатого мозга, содержащий МН. Фиксировали 12 ч в 4%-м растворе формальдегида и 2,5%-м растворе глутаральдегида на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,2). Дофиксировали в 2%-м растворе четырехоксида осмия, обезжизивали и заключали в эпоксидную смолу [11].

Для получения серии последовательных срезов толщиной 3 мкм эпоновые блоки резали фронтально на пирамитоме («ЛКВ», Швеция). Срезы, содержащие сомю, латеральный (ЛД) и вентральный (ВД) дендриты МН последовательно фотографировали при $\times 250$ под микроскопом «NU 2E» («Carl Zeiss»,

experiments were conducted according the generally accepted bioethical regulations.

The fish of group 1, caught in July, were immediately taken into the experiment. The fish of groups 2 and 3, caught in the early winter, were held in 5 l transparent containers with tap water in cooling chamber with temperature of -1°C ($\pm 1^{\circ}$). During 2–3 days of storage the water in containers was partially frozen, that corresponded to the conditions of fish inhabitation during the whole winter. Thus, fish were kept in fresh cold water, in dark, silence, with no food and limited oxygen access, *i. e.* under conditions maximally approached to the natural ones.

During the experiment we pulled containers with fish 1–2 times per month from cooling chamber for some minutes to estimate their state. When observing fish during December-March period we revealed quite a complete absence of locomotor activity and a strong suppression of respiration, determined by the movement of opercles. These signs testify to a normal state of animals during dormancy [1, 10].

On the first day of morfological investigation we pulled fish from refrigerator, placed into 6°C water and observed their behaviour for 5 min to verify their viability. If the fish kept the normal body position, moved their fins and opercles for quite a long time, they were selected for the further manipulations. Fish were removed from the water and decapitated on ice. Brain was isolated and a site of the medulla, containing MN was excised in a drop of fixing solution. Then it was fixed for 12 hrs in 4% formaldehyde solution and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2). The samples were then counterstained in 2% osmium tetroxide solution, dehydrated and embedded into epoxy resin [14].

To obtain 3 μm serial sections the epoxy resin blocks were frontally cut with piramitome (LKB, Sweden). The sections containing soma, lateral (LD) and ventral (VD) dendrites of MN were sequentially photographed at $\times 250$ with microscope NU 2E (Carl Zeiss, Germany), equipped with a digital camera Nikon D 5000 (Seiko, Japan). Each section was photographed by multiple parts, as a result we obtained not least than 20 images. Each image overlapped with a neighbouring one to ensure the optimal panorama of a section. Three-dimensional images of the objects were made using the IGL Trace software (Dr. J. Fiala, USA), the quantitative data were obtained with 3D View 3.5 software (Actify, Inc., USA). The volume of soma, LD and VD were calculated separately. The MN volume was presented as the sum of volumes of its parts. [12].

The findings were statistically processed with the Excel software (Microsoft, USA), as well as the KyPlot V2 Beta 15 (32-bit) (developed by Koichi



Германия), снабженным цифровой фотокамерой «Nikon D 5100» («Seiko», Япония). Каждый срез фотографировали по частям, в результате получали не менее 20 изображений. При этом каждое изображение перекрывалось соседним участком для обеспечения оптимальной панорамы среза. Трехмерные изображения объектов выполняли с помощью программы «IGL Trace» (Dr. J. Fiala, США), количественные данные получали с помощью программы «3D View 3.5» («Actify, Inc.», США). Отдельно вычисляли объем сомы, ЛД и ВД дендритов. Объем МН представляли как сумму объемов его частей [9].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы «Excel» («Microsoft», США), а также программы «KyPlot V2 Beta 15» (Koichi Yoshioka, Япония). Для сравнения данных применяли непараметрический критерий Манна-Уитни (U-критерий). Количественные данные представляли в средних величинах и средних квадратичных отклонениях.

Результаты и обсуждение

Изучение гистологических препаратов продолговатого мозга ротанов показало (рис. 1), что у них МН идентифицируются как две симметрично расположенные клетки с типичным строением: сома, латеральный и вентральный дендриты. Структурная организация МН, трехмерно реконструированных по серийным гистологическим срезам в разные периоды наблюдения, представлена на рис. 2. Анализ структуры нейронов свидетельствует о значительной трансформации объемов всех частей клетки. В начале зимнего оцепенения (конец декабря) уменьшается размер основных дендритов, но соматическая часть нейронов не изменяется (таблица). К концу периода зимовки (конец марта) значительные изменения выявляются во всех частях нейрона. Объем нейронов в соматической части и ЛД уменьшается почти в 2 раза, особенно вентральных дендритов (на 80%), которые сильно укорачиваются и истончаются (рис. 2, С).

В процессе адаптации к сложным условиям среды обитания (холод, голод, сниженная сенсорная информация, дефицит кислорода и др.) у животных формируются жизненно необходимые механизмы, регулирующие метаболизм целого организма, при этом точкой приложения авторегуляторных воздействий являются отдельные клетки. В связи с этим практически все типы клеток животных претерпевают обратимые структурно-функциональные изменения [4, 5, 14]. Нейроны также, приспосабливаясь к воздействиям внешней среды, не

Yoshioka, Japan). To compare the data we used the Mann-Whitney U test. Quantitative data were presented in mean values and the mean square deviation.

Results and discussion

The study of histological preparations of rotan fish *Perccottus glehni* myelencephalon (Fig. 1) demonstrated that the MN could be identified there as two symmetrically located cells with a typical structure: soma, lateral and ventral dendrites. The Fig. 2 shows the structure of MN, three-dimensionally reconstructed from serial histological sections in different periods of observation. The analysis of neuron structure testifies to a significant transformation in the volumes of all cell parts. At the beginning of winter dormancy (end of December) the size of both main dendrites reduces, but somatic part of neurons remains unchanged (Table). By the end of dormancy period (end of March) the significant changes are revealed in all the parts of neuron. The volume of neurons in somatic part and LD reduces almost twice, especially of ventral dendrites (by 80%), which are very shortened and thinned (Figure 2, C).

During adaptation to difficult habitat conditions (cold, hunger, reduced sensory information, oxygen lack, etc.) the animal acquire essential mechanisms, regulating metabolism of the whole body, wherein the application points of autoregulatory effects are single cells. Due to this fact virtually all types of animal cells undergo reversible structural and functional changes [3, 7, 8]. When adapting to the environment effects the neurons not only preserve their integrity, but specifically modify the activity of all their components

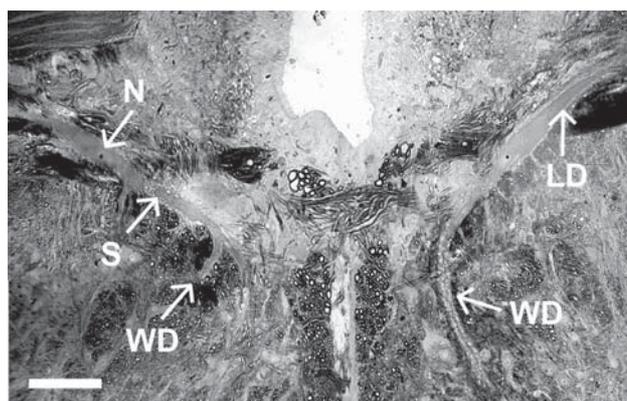


Рис. 1. Макрофотография среза продолговатого мозга рыб *Perccottus glehni*, содержащего правый и левый мавтнеровские нейроны (S – сома; LD и WD – латеральный и вентральный дендриты соответственно; N – ядро нейрона). Масштабный отрезок – 100 мкм.

Fig. 1. Macrophoto of myelencephalon section of fish *Perccottus glehni*, containing right and left Mauthner neurons (S denotes soma; LD and WD are lateral and ventral dendrites, respectively; N is neuronal nucleus). Bar 100 μm .

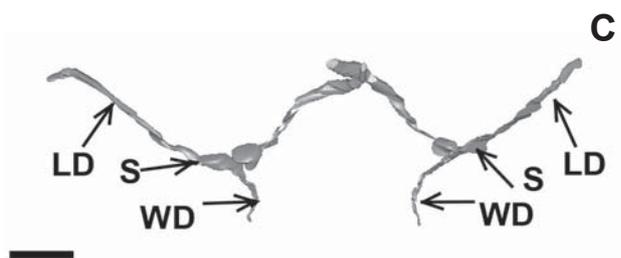
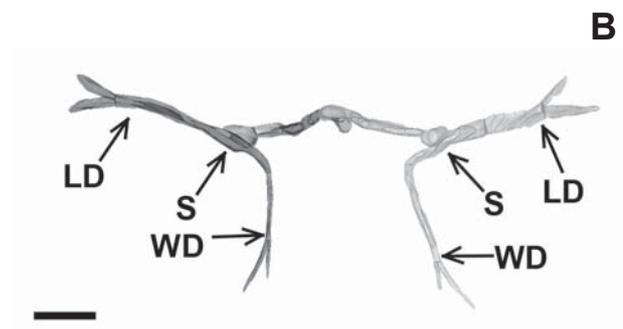
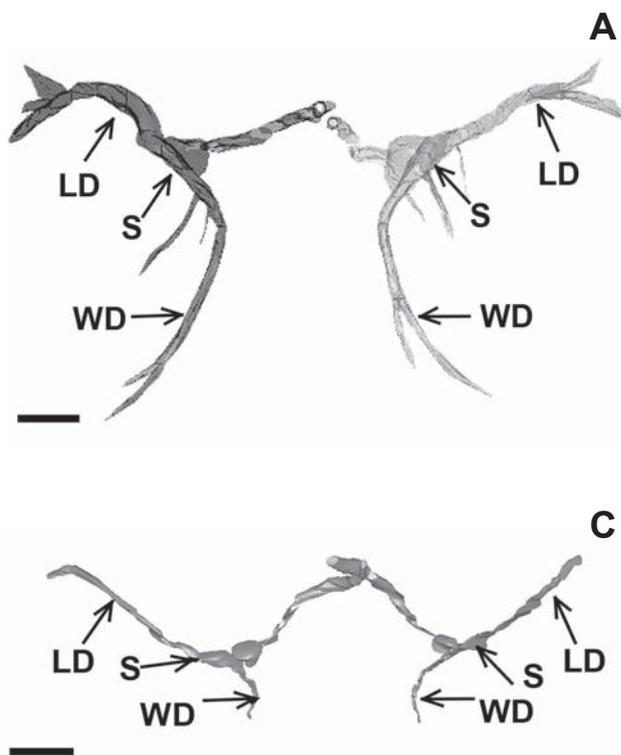


Рис. 2. Трехмерная реконструкция МН рыб *Perccottus glehni* в разные сезонные периоды: **А** – лето (июль); **В** – начало зимовки (декабрь); **С** – завершение зимовки (март) (S – сома; LD и WD – латеральный и вентральный дендриты соответственно; N – ядро нейрона). Масштабный отрезок – 100 мкм.

Fig. 2. Three-dimensional reconstruction of *Perccottus glehni* fish MN in different seasons: **A** – summer (July); **B** – start of winter dormancy (December); **C** – end of dormancy (March); (S denotes soma; LD and WD are lateral and ventral dendrites, respectively; N is neuronal nucleus). Bar 100 μ m.

просто сохраняют свою целостность, но направленно модифицируют работу всех своих компонентов [8, 16, 19], по-видимому, через различные пути сохранения энергетического баланса. Например, суслики в течение зимней спячки экономят более 80% энергии, которая необходима для поддержания обычного уровня метаболизма [4].

Мы обнаружили, что у рыб в состоянии гипометаболизма и вследствие экономии энергетических ресурсов значительно уменьшается объем маутнеровских нейронов. Эти изменения закономерны и физиологически целесообразны. Однако почему структурные изменения происходят в разных участках МН в разной степени?

Известно, что МН получают афферентные окончания, по крайней мере, от трех важнейших анализаторов: вестибулярного, слухового и зрительного [11, 21]. Электрофизиологическими и гистохимическими методами было установлено, что афферентные входы на эти клетки морфологически строго сегрегированы. Статоакустический вход покрывает в виде смешанных синапсов дистальную часть латерального дендрита, вестибулярный – в виде химических синапсов всю поверхность ЛД и сомы [18]. Зрительный вход располагается на дистальной и проксимальной частях ВД [10]. Можно предположить, что в зимний период функция зрения рыб из-за низкой освещенности становится не актуальной, т.к. через лед толщиной 40 см прони-

[11, 15, 18], apparently via different pathways of energy balance preservation. For example, the ground squirrels during winter hibernation save more than 80% of energy, that is necessary to maintain a normal level of metabolism [7].

We found out a significant reduction in the volume of the Mauthner neurons in fish caused by hypometabolic state and corresponding sparing the energy resources. These changes are appropriate and physiologically expedient. But why structural changes occur in different parts of MN to various extent?

The MN are known to receive afferent endings, at least from three major analyzers: vestibular, auditory and visual ones [14, 21]. Electrophysiological and histochemical techniques allowed to established the fact, that afferent inputs onto these cells were strictly segregated morphologically. Stataoacoustic input covers a distal part of lateral dendrite in the form of mixed synapses, a vestibular one does the entire surface of LD and soma as chemical synapses [18]. Visual input is located on distal and proximal parts of VD [13]. We may assume that in winter period the visual function in fish becomes not relevant because of low illumination, since through 40 cm ice only 5–10% of light rays penetrate. Consequently the VD occur to be in a state of natural deprivation. Under conditions of limited visibility there is no need to maintain the whole dendrite in active state, therefore its dimensions are reduced so much, that is undoubtedly beneficial and saves energy



кает всего 5–10% световых лучей, вследствие этого ВД оказываются в состоянии естественной депривации. В условиях ограниченной видимости отсутствует необходимость поддерживать в активном состоянии весь дендрит, поэтому его размеры сильно редуцируются, что приводит к экономии энергетических ресурсов организма. Размеры ЛД также значительно уменьшаются (на 50%, $p < 0,05$). Известно, что на ЛД оканчиваются входы от акустического и вестибулярного анализаторов [18]. Вероятно, слуховая информация в период зимовки также неактуальна, однако сохранение нормального положения тела рыб в воде важно в любое время года, поэтому размеры ЛД изменяются в меньшей степени, чем ВД. Известно, что МН рыб и амфибий очень пластичны и под влиянием различных факторов окружающей среды они могут изменить структурную организацию [11]. Результаты наших исследований показали, что МН рыб могут изменять размеры в достаточно широких пределах. Например, при экспериментальной деафферентации нейронов (энуклеация глаз) значительно уменьшается размер их вентральных дендритов [9, 15]. Таким образом, при снижении сенсорной нагрузки на МН значимо ($p < 0,05$) изменяется их размер и, следовательно, функциональная активность, что позволяет нейронам дифференцированно отвечать на конкретное воздействие [11, 15]. Мы полагаем, что на объем МН главным образом влияет гипометаболизм, а деафферентация нейронов вносит лишь дополнительный вклад в этот процесс.

Пластические изменения в структуре нейронов зимоспящих млекопитающих, находящихся в состоянии гибернации, были обнаружены еще в начале 90-х годов прошлого века. На нейронах гиппокампа сусликов было показано, что размер тел нервных клеток и степень ветвления их дендритов уменьшаются [16]. Подобные морфологические изменения были выявлены и в других отделах мозга (коре и таламусе) [4, 14, 19]. При различных гипотермических воздействиях в препаратах головного мозга хомяков было обнаружено, что структура дендритного древа существенно редуцируется при гибернации [8]. Поскольку строение мозга млекопитающих достаточно сложное, то исследовать структурные перестройки одного нейрона в процессе проведения нескольких экспериментов невоз-

Объем МН рыб *Perccottus glehni* в процессе зимнего оцепенения
Volume of *Perccottus glehni* fish MN during winter dormancy

Период наблюдения Observation period	Объем маутнеровского нейрона $\times 10^3 \text{ мкм}^3$ Volume of the Mauthner neuron $\times 10^3 \mu\text{m}^3$			
	Сома нейрона Neuron soma	Латеральный дендрит Lateral dendrite	Вентральный дендрит Ventral dendrite	Общий объем МН MN total volume
Лето (июль) Summer (July)	83,2 \pm 29,6	86,5 \pm 25,6	60 \pm 10,7	231,3 \pm 53,1
Начало зимнего оцепенения (декабрь) Start of dormancy (December)	82,7 \pm 29,5	46,5 \pm 24,0	23,5 \pm 9,8*	157,75 \pm 58,1
Окончание зимнего оцепенения (март) End of dormancy (March)	48,4 \pm 5,3*	40,8 \pm 12,8*	8,2 \pm 3,0*	95,6 \pm 15*

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с данными лета, $p \leq 0,05$.

Note: * – the differences are statistically significant if compared with summer data, $p \leq 0.05$.

resources of body. The LD sizes are significantly reduced as well (by 50%, $p < 0.05$). It is known that the inputs from acoustic and vestibular analyzers terminate on LD [18]. Probably, the auditory information during dormancy is also not relevant, but keeping of normal body position in water is important for fish at any time of the year, therefore the LD sizes are less changed than VD. It is known that the MN of fish and amphibians are very plastic and under the effect of different environmental factors may change their structural organisation [14]. Our findings have shown that the fish MN may change their size within quite a wide range. For example, under experimental neuron deafferentation (eye enucleation) there is a significant reduction in size of their ventral dendrites [5, 12]. Thus, a decrease in a sensor load on the MN is accompanied with significant ($p < 0.05$) changes of their size and therefore functional activity, that enables neurons to respond to the certain effect in a differentiated way [5, 14]. We believe that the MN volume is mostly affected by hypometabolism, and the neuron deafferentation makes only additional contribution into this process.

Plastic changes in neuron structure of overwintering hibernating mammals were discovered in the early 90s of last century. In hippocampal neurons of ground squirrels there was found a decrease in the size of nerve cell bodies and the branching degree of their dendrites as well [15]. Similar morphological changes



можно. Рыбы для подобных исследований являются более удачной моделью. Использование идентифицированных нейронов Маутнера при изучении сложных механизмов адаптации клеток в процессе гибернации позволяет исследовать структурные изменения во всех частях клетки не только на светооптическом, но и электронно-микроскопическом уровне.

Выводы

В экспериментально созданных условиях зимовки рыб *Percottus glehni* с использованием метода трехмерной реконструкции было выявлено значительное изменение объема маутнеровских нейронов. Возможно, что в условиях воздействия длительной гипотермии в сочетании с естественной деафферентацией маутнеровских нейронов определяющим фактором пластических перестроек в нейронах является снижение метаболической активности вследствие необходимости экономии энергетических ресурсов животного. В результате гипометаболизма, а также после снижения потоков афферентной информации объем МН уменьшается, поскольку отсутствуют условия и необходимость поддерживать их в полноценном состоянии.

Литература

1. Анисимова И.М. Лавровский В.В. Ихтиология. – М.: Высш. шк., 1983. – 255 с.
2. Голованов В.К., Ручин А.Б. Критический термический максимум головешки-ротана *Percottus glenii* в разные сезоны года // Вопросы ихтиологии. – 2011. – Т. 51, №6. – С. 822–827.
3. Игнат'ев Д.А., Гордон Р.Я., Патрушев И.В., Попов И.В. Функциональное состояние головного мозга зимоспящих и незимоспящих при различных температурах животных // Успехи физиол. наук. – 2012. – Т.43, №1. – С. 48–74.
4. Израилова Г.Р., Халилов Р.А., Адиева А.А. Современные подходы к исследованию гипотермии // Фундаментальные исследования. – 2014. – Т. 5, №11. – С. 1046–1058.
5. Калабухов Н.И. Спячка млекопитающих. – М.: Наука, 1985. – 259 с.
6. Карадужева Е.В., Санталова И.М., Захарова Н.М. Особенности молекулярных и морфологических изменений в кардиомиоцитах зимоспящих сусликов в разные периоды годового цикла // Биофизика. – 2014. – Т. 59, №5. – С. 926–932.
7. Каранова М.В. Состав свободных аминокислот крови и мышц ротана *Percottus glehni* в период подготовки и завершения гибернации // Журнал эвол. биохимии и физиологии. – 2009. – Т. 45, №1. – С. 59–68.
8. Марченко В.С., Буцкий К.И. Нейропластичность головного мозга хомяков при гипотермии. – LAP LAMBERT Academic Publishing, 2013. – 60 с.
9. Михайлова Г.З., Коканова Н.А., Тирас Н.Р., Мошков Д.А. Трехмерная реконструкция и определение объема нейрона. – М.: Либроком, 2012. – 80 с.

were revealed in other parts of brain (cortex and thalamus) [2, 7, 19]. The structure of dendritic tree in hamster brain preparations was found out as significantly reduced under different hypothermic effects [11]. Since the mammalian brain structure is quite complex, it is impossible to investigate the structural rearrangements in one neuron during number of experiments. Fish are more appropriate model for these studies. The use of the identified Mauthner neurons in studying the complex mechanisms of cell adaptation during hibernation enables the investigation of the structural changes in all cell parts not only at light-optical level, but electron-microscopic one as well.

Conclusions

Using the method of three-dimensional reconstruction we revealed a significant change in the Mauthner neuron volume of fish *Percottus glehni* in the experimentally simulated overwintering conditions. A decrease in metabolic activity due to a need to spare energy resources of animal is possibly a determining factor of plastic rearrangements in neurons under conditions of long-term hypothermia effect in combination with natural deafferentation of the Mauthner neurons. As a result of hypometabolism, as well as after a decrease in afferent information inputs the MN volume is reduced, since there are no conditions and no need to maintain them in normal state.

References

1. Anisimova I.M., Lavrovskiy V.V. Ichthyology. Moscow: Vysshaya Shkola; 1983.
2. Carey H.V., Andrews M.T., Martin S.L. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev* 2003; 83(4): 1153–1181.
3. Chemagin A.A. Distribution of Amur sleeper (*Percottus glenii* Dybowski, 1877) in the Lower Irtysh floodplain lakes. *Fundamentalnye Issledovaniya* 2014; 12(11): 2656–2660.
4. Golovanov V.K., Ruchin A.B. Critical thermal maximum of fish *Percottus glenii* in different seasons. *Journal of Ichthyology* 2011; 51(6): 822–827.
5. Grigorieva E.E., Shtanchayev R.S., Mikhailova G.Z. et al. Correlation between the size of individual parts of Mauthner neurons in goldfish and their integral function after enucleation of the eye. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 2012; 42(1): 52–57.
6. Ignat'ev D.A., Gordon R.Ya., Patrushev I.V., Popov I.V. The functional brain state of hibernators and nonhibernators at different temperatures of animals. *Usp Fiziol Nauk* 2012; 43(1): 48–74.
7. Israilova G.R., Khalilov R.A., Adieva A.A. Modern approaches in studying hypothermia. *Fundamentalnye Issledovaniya* 2014; 11(5): 1046–1058.
8. Kalabukhov N.I. Hibernation of mammals. Moscow: Nauka; 1985.
9. Karaduleva E.V., Santalova I.M., Zakharova N.M. Specific molecular and morphological changes in cardiomyocytes of hibernating ground squirrels in different periods of annual cycle. *Biofizika* 2014; 59(5): 926–932.



10. Михеева И.Б., Григорьева Е.Е., Михайлова Г.З. и др. Серотонинергические синапсы на вентральном дендрите маутнеровского нейрона (ультраструктурное исследование с использованием иммунозолотой метки // Морфология. – 2013. – Т. 143, №1. – С. 11–15.
11. Мошков Д.А. Адаптация и ультраструктура нейрона. – М.: Наука, 1985. – 200 с.
12. Санталова И.М., Мошков Д.А., Чайлахян Л.М. Эффект блокатора Ca²⁺-каналов верапамила на структуру и функцию маутнеровских нейронов золотой рыбки // Доклады Акад. наук. – 2004. – Т. 398, №5. – С. 715–717.
13. Чемагин А.А. Распространение ротана-головешки (PERCCOTTUS GLENII DYBOWSKI, 1877) в пойменных озерах нижнего Иртыша // Фундаментальные исследования. – 2014. – Т.12, №11. – С. 2656–2660;
14. Carey H.V., Andrews M.T. and Martin S.L. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature // *Physiol. Rev.* – Vol. 83. – P. 1153–1181
15. Grigorieva E.E., Shtanchaev R.S., Mikhailova G.Z. et al. Correlation between the size of individual parts of Mauthner neurons in goldfish and their integral function after enucleation of the eye // *Neuroscience and Behavioral Physiology.* – 2012. – Vol. 42, №1. – P. 52–57.
16. Popov V.I., Bocharova L.S., Bragin A.G. Repeated changes of dendritic morphology in the hippocampus of ground squirrels in the course of hibernation // *Neuroscience.* – 1992. – Vol. 48, №1. – P. 45–51.
17. Santalova I.M., Moshkov D.A. Smooth endoplasmic reticulum in fish Mauthner cells at different functional states // *Neuroscience,* 1999. – Vol. 89, №2. – P. 593–602.
18. Szabo T.M., McCormick C.A., Faber D.S. Otolith endorgan input to the Mauthner neuron in the goldfish // *J. Comp. Neurol.* – 2007. – Vol. 505, №5. – P. 511–525.
19. von der Ohe C.G., Darian-Smith C., Garner C.C., Heller H.C. Ubiquitous and temperature-dependent neural plasticity in hibernators // *J. Neurosci.* – 2006. – Vol. 26, №41. – P. 10590–10598.
20. Weis S.A., Zottoli S.J., Do S.C. et al. Correlation of C-start behaviors with neural activity recorded from the hindbrain of free-swimming goldfish (*Carassius auratus*) // *J. Exp. Biol.* – 2006. – Vol. 209, Pt. 23. – P. 4788–4801.
21. Zottoli S.J., Hordes A.R., Faber D.S. Localization of optic tectal input to the ventral dendrite of the goldfish Mauthner cell // *Brain Res.* – 1987. – Vol. 401, №1. – P. 113–121.
10. Karanova M.V. The composition of free amino acids of *Perccottus glehni* blood and muscles of during preparation and completion of hibernation. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 2009; 45(1): 59–68.
11. Marchenko V.S., Butskiy K.I. Brain neuroplasticity in hamsters at hypothermia. Saarbrucken: LAP LAMBERT Academic Publishing; 2013.
12. Mikhailova G.Z., Kokanova N.A., Tiras N.P., Moshkov D.A. Three-dimensional reconstruction and volume determination of neuron. Moscow: Librokomb; 2012.
13. Mikheeva I.B., Grigor'eva E.E., Mikhailova G.Z. et al. Serotonergic synapses on the ventral dendrite of Mauthner neuron (ultrastructural study using immuno-gold labeling. *Morfologiya* 2013; 143(1): 11–15.
14. Moshkov D.A. Adaptation and neuron ultrastructure. Moscow: Nauka; 1985.
15. Popov V.I., Bocharova L.S., Bragin A.G. Repeated changes of dendritic morphology in the hippocampus of ground squirrels in the course of hibernation. *Neuroscience* 1992; 48(1): 45–51.
16. Santalova I.M., Moshkov D.A. Smooth endoplasmic reticulum in fish Mauthner cells at different functional states. *Neuroscience* 1999; 89(2): 593–602.
17. Santalova I.M., Moshkov D.A., Chailakhyan L.M. Effect of verapamil, a Ca²⁺ channel blocker on structure and function of goldfish Mauthner neurons. *Doklady Biological Sciences* 2004; 398(5): 715–717.
18. Szabo T.M., McCormick C.A., Faber D.S. Otolith endorgan input to the Mauthner neuron in the goldfish. *J Comp Neurol* 2007; 505(5): 511–525.
19. von der Ohe C.G., Darian-Smith C., Garner C.C., Heller H.C. Ubiquitous and temperature-dependent neural plasticity in hibernators. *J Neurosci* 2006; 26(41): 10590–10598.
20. Weis S.A., Zottoli S.J., Do S.C. et al. Correlation of C-start behaviors with neural activity recorded from the hindbrain of free-swimming goldfish (*Carassius auratus*). *J Exp Biol* 2006; 209(Pt 23): 4788–4801.
21. Zottoli S.J., Hordes A.R., Faber D.S. Localization of optic tectal input to the ventral dendrite of the goldfish Mauthner cell. *Brain Res* 1987; 401(1): 113–121.