

Л.Е.Фрумкина¹, И.Л.Конорова², О.П.Александрова², Н.Н.Боголепов¹, Л.Г.Хаспекоев²

РЕОРГАНИЗАЦИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ НЕЙРОНОВ НОВОЙ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК

¹ Лаборатория ультраструктуры и цитохимии мозга (руков. — академик РАН Н.Н.Боголепов) и ² лаборатория экспериментальной нейроцитологии (руков. — д-р биол. наук Л.Г.Хаспекоев), отдел исследований мозга, Научный центр неврологии, Москва

Исследована ультраструктура нейронов в слоях III–V коры большого мозга крыс через 24 ч после внутрибрюшинного (n=3) или внутривенного (n=3) введения внеклеточной ДНК (внкДНК) в дозе $7,7 \times 10^{-5}$ г/кг. Обнаружены пластические перестройки ядерного хроматина, гипертрофия ядрышка, глубокие инвагинации ядерной оболочки, гиперплазия митохондрий и их тесный контакт с другими органеллами, а также с ядром, формирование тубуловезикулярных телец в цитоплазме, которые могут способствовать усилению транспорта синаптических пузырьков в пресинаптические терминалы аксонов, активация астроцитарной глии. Полученные данные свидетельствуют о том, что введение внкДНК приводит к ультраструктурным перестройкам нейронов новой коры, направленным на активацию синтеза белка, повышение эффективности синаптической передачи и усиление энергетического метаболизма, что может способствовать репаративным и компенсаторно-восстановительным процессам при ишемической патологии головного мозга.

Ключевые слова: кора головного мозга, нейроны, ультраструктура, пластичность, внеклеточная ДНК

В последние годы значительно расширился фронт исследований механизмов ишемического повреждения головного мозга и поиска фармакологических нейропротекторов, необходимых для стимуляции регенераторных и компенсаторно-восстановительных процессов при церебральной ишемии. На модели ишемии мозга у животных показан preconditionирующий нейропротекторный эффект активации Toll-подобных рецепторов, в том числе TLR9-рецептора, участвующего в связывании и эндоцитозе фрагментов ДНК [4, 11]. Наивысший уровень экспрессии TLR9 в мозгу отмечается в корковых нейронах [12]. В острой стадии ишемического инсульта выявлена обратная зависимость объема инфаркта мозга и динамики неврологического дефицита от концентрации циркулирующих в плазме крови фрагментов внеклеточной ДНК (внкДНК) — агонистов TLR9 [2]. Показано, что внкДНК играет роль эндогенного, постоянно действующего фактора крови, регулирующего гемодинамику мозга как в норме, так и при нарушенном кровообращении. ВнкДНК активно взаимодействует с различными клетками организма [8], включая нейроны [7]. Добавление в культуру клеток-зерен мозжечка малых доз

внкДНК оказывает нейропротекторное действие в условиях глутаматной эксайтотоксичности, способствует подавлению в нейронах продукции активных форм кислорода и активирует астроциты [1].

Приведенные выше данные побудили нас исследовать воздействие внкДНК на ультраструктуру нервных клеток, предполагая, что ее пластические изменения могут лежать в основе индукции репаративных и компенсаторно-восстановительных процессов при введении внкДНК в условиях церебральной ишемии.

Материал и методы. Самцам крыс линии Вистар массой 250–300 г внутрибрюшинно болюсно (n=3) или внутривенно со скоростью 0,06 мл/мин (n=3) однократно вводили раствор гомологичной ДНК, выделенной из ткани мозга, в дозе $7,7 \times 10^{-5}$ г/кг, а контрольным животным (n=6) — равный объем изотонического (0,9%) раствора хлорида натрия. Через 1 сут под хлоралгидратным наркозом осуществляли прижизненную фиксацию мозга внутрисердечным введением раствора 2,5% глутаральдегида с 2% параформальдегида на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4). После декапитации из мозга выделяли образцы теменно-височной области коры, которые дополнительно фиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия, проводили по общепринятой для электронной микро-

Сведения об авторах:

Фрумкина Лидия Ефимовна, Боголепов Николай Николаевич, лаборатория ультраструктуры и цитохимии мозга;
Конорова Ирина Львовна (e-mail: konorova.irina@yandex.ru), Александрова Ольга Петровна (e-mail: molka-molka@yandex.ru),
Хаспекоев Леонид Георгиевич (e-mail: khaspekleon@mail.ru), лаборатория экспериментальной нейроцитологии, отдел исследований мозга, Научный центр неврологии, 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80

скопии схеме и заливали в эпон-812. Исследовали нейроны III–V слоев коры в микроскопе Н-600 (Хитачи, Япония).

Результаты исследования. При внутривенном введении внкДНК в ядрах нейронов, в отличие от контроля (*рис. 1, а*), хроматин, локализованный в нуклеоплазме и вдоль внутренней ядерной мембраны, приобретает глыбчатую структуру (*см. рис. 1, б*). Гипертрофированное ядрышко (иногда с 1–2 сателлитами) напрямую или опосредованно, через скопления хроматина, контактирует с внутренней мембраной (*см. рис. 1, в*) ядерной оболочки, которая имеет глубокие инвагинации. В цитоплазме обнаруживаются крупные полирибосомальные розетки, хорошо развитый комплекс Гольджи (*см. рис. 1, б*), электронно-плотные энергезированные митохондрии, тесно прилежащие к наружной ядерной мембране, обычно в зоне скопления глыбчатого хроматина (*см. рис. 1, г*), а также многочисленные удлиненные цистерны гранулярной эндоплазматической сети, расположенные упорядоченными рядами (*см. рис. 1, д*). Нейроны окружены просветленными отростками астроцитов (*см. рис. 1, б, г*), а на их соме обнаруживаются перфорированные синапсы (*см. рис. 1, д*).

В цитоплазме и отростках нейронов довольно часто, по сравнению с контролем, наблюдаются округлые или удлиненные кольцевидные или тубуловезикулярные структуры, похожие на мультивезикулярные тела (*см. рис. 1, е*). Однако, в отличие от последних, они содержат двойную мембрану и заполнены пузырьками, сходными по размеру с синаптическими.

При внутривенном введении внкДНК отличительной особенностью нормохромных нейронов является наличие чрезвычайно глубоких инвагинаций ядерной оболочки (*рис. 2, а*), придающих ядру дольчатую структуру. Инвагинации захватывают вглубь ядра рибосомы и полисомы и создают дополнительную ядерную поверхность, а значит, и условия для усиления ядерно-цитоплазматических взаимоотношений и повышения активности белкового синтеза. Кроме того, из наружной ядерной мембраны формируются цистерны гранулярной эндоплазматической сети, которые, разветвляясь, тесно контактируют с ее выпячиваниями в области инвагинаций (*см. рис. 2, б*). В цитоплазме, богатой разнообразными органеллами, выделяются компоненты комплекса Гольджи, а также гигантские митохондрии, контактирующие с другими органеллами или вплотную прилежащие к ядру (*см. рис. 2, в*). Отдельные нейроны образуют

пары с локальными зонами контакта типа десмосом или щелевые соединения (*см. рис. 2, г*).

Обсуждение полученных данных. Полученные данные свидетельствуют о том, что введение внкДНК, особенно внутривенное, приводит к гетерогенности ультраструктуры нейронов, которая проявляется как изменениями ядра, так и цитоплазмы. В ядрах нейронов обнаруживаются отчетливо выраженная глыбчатость ядерного хроматина, особенно на внутренней ядерной мембране, гипертрофия ядрышка и эксцентричное его расположение, появляются ядрышковые сателлиты, многочисленные ядерные поры, глубокие инвагинации ядерной оболочки, что указывает на усиление ядерно-цитоплазматических взаимоотношений и гиперсинтез белка. Одновременно происходит пластическая ультраструктурная реорганизация в цитоплазме, о чем свидетельствует появление крупных полисомальных частиц, энергезированных митохондрий, большого числа цистерн гранулярной эндоплазматической сети, формирующихся из наружной ядерной мембраны, контакт органелл между собой и их тесное прилегание к наружной ядерной мембране [3]. Наличие в цитоплазме нейронов многочисленных тубуловезикулярных структур является косвенным доказательством усиления нейротрансмиссии. Не исключено, что такие структуры являются морфологическими разновидностями эндосомальных органелл, имеющих сферическую или тубулярную форму и выполняющих функцию переносчиков синаптических пузырьков [6, 9, 10, 13]. Тубуловезикулярные структуры, локализованные в цитоплазме нейронов, могут путем аксонального транспорта поступать из нее в зону синаптического контакта. Наличие контактов типа десмосом или щелевых соединений между парными нейронами может обеспечивать значительный эффект спонтанной синхронизации через электрические синапсы [5].

Таким образом, введение внкДНК вызывает пластические перестройки в нейронах головного мозга, направленные на активацию синтеза белка в нейронах и повышение эффективности синаптической передачи, что может способствовать репаративным и компенсаторно-восстановительным процессам при ишемической патологии.

Авторы благодарят канд. биол. наук К.В.Глебову, ст. науч. сотр. лаборатории молекулярной биологии Медико-генетического научного центра (руков. — д-р биол. наук Н.Н.Вейко) за предоставленную внкДНК.

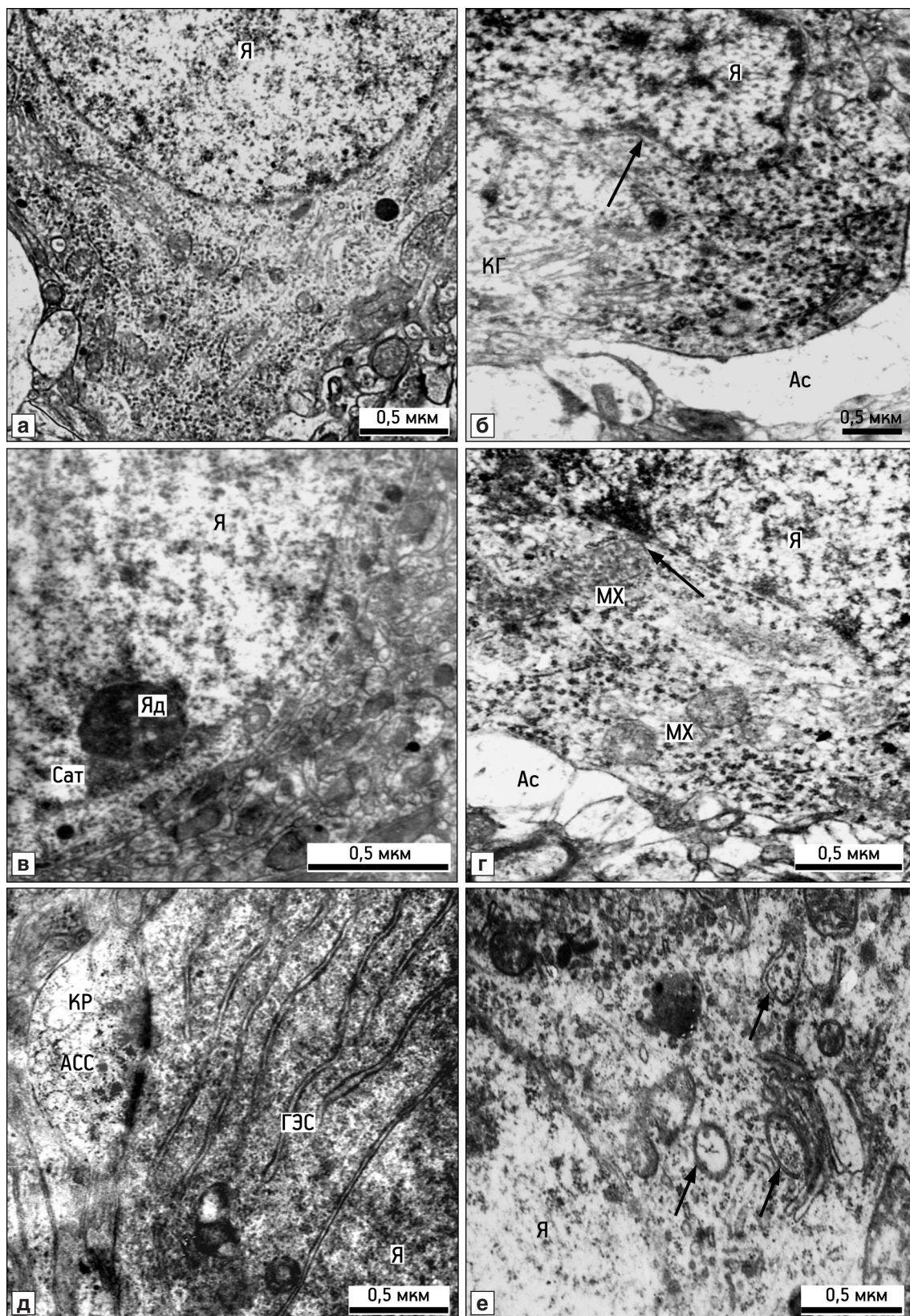


Рис. 1. Ультраструктура нейронов у контрольных крыс (а) и при внутрибрюшинном введении внеклеточной ДНК (б–е).

б — глыбчатая структура ядерного хроматина и глубокая инвагинация ядерной оболочки (стрелка); в — контакт гипертрофированного ядрышка через сателлит с ядерной оболочкой; г — тесное прилегание митохондрии к наружной ядерной мембране в зоне скопления глыбчатого хроматина (стрелка); д — упорядоченные ряды удлиненных цистерн гранулярной эндоплазматической сети; е — тубуловезикулярные структуры в цитоплазме нейрона (стрелки). Ас — отростки астроцитов; АСС — аксосоматический перфорированный синапс с конусом роста (КР); ГЭС — гранулярная эндоплазматическая сеть; КГ — комплекс Гольджи; МХ — митохондрии; Сат — сателлит; Я — ядро; Яд — ядрышко

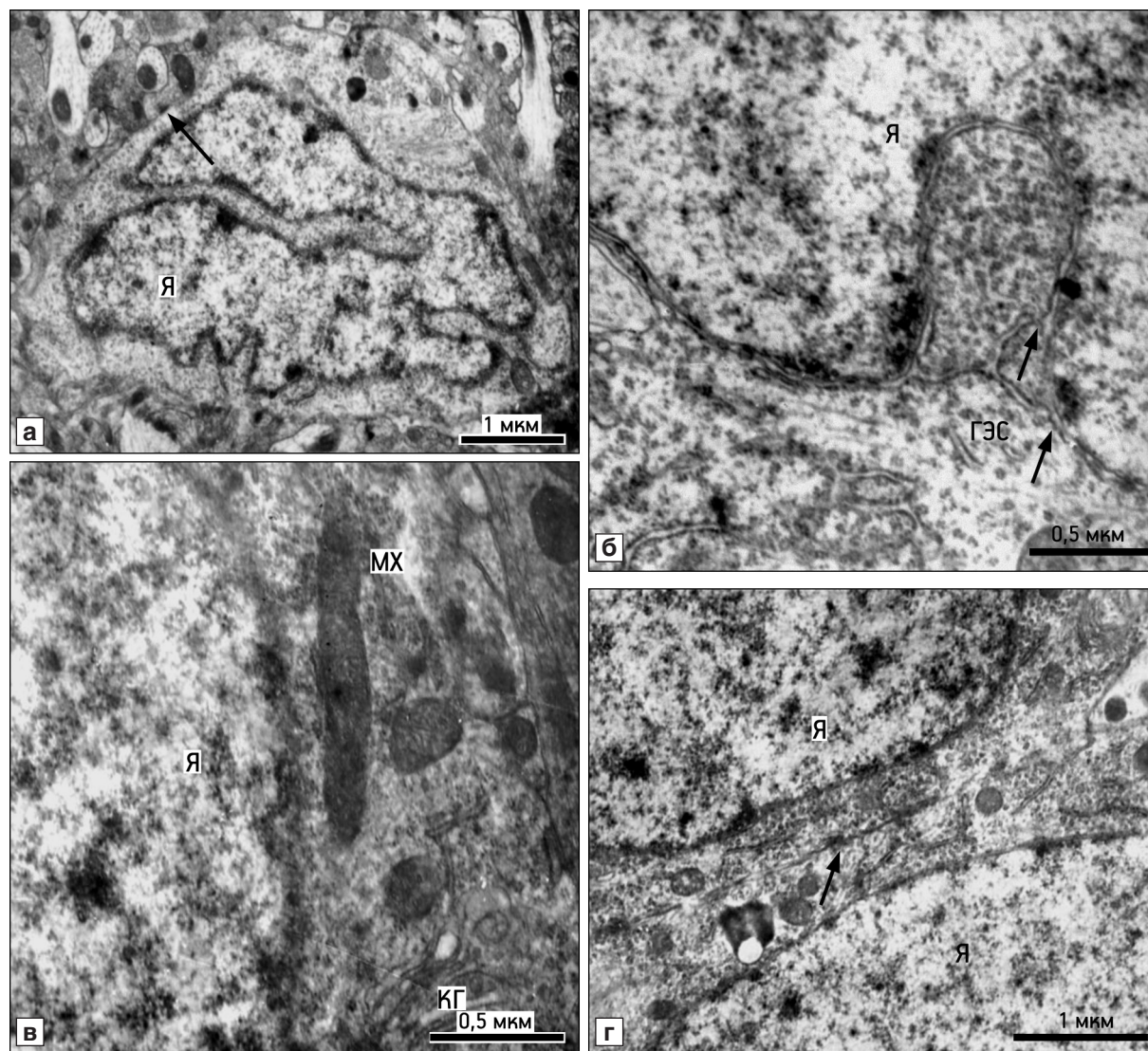


Рис. 2. Ультраструктура нейронов при внутривенном введении внеклеточной ДНК.

а — глубокие инвагинации ядерной оболочки, захватывающие элементы белоксинтезирующего аппарата, аксосоматический синапс (стрелка); б — de novo сформированные цистерны гранулярной эндоплазматической сети из наружной ядерной мембраны и их контакты с ней в зоне инвагинации ядерной оболочки (стрелки); в — контакты митохондрий между собой, с ядром и другими органеллами цитоплазмы нейрона; г — парные нейроны, объединенные между собой контактом типа десмосомы или щелевого соединения (стрелка). Обозначения те же, что на рис. 1

ЛИТЕРАТУРА

1. Конорова И.Л., Глебова К.В., Барсков И.В. и др. Внеклеточная ДНК — потенциальный участник нейропластичности // Функциональная межполушарная асимметрия и пластичность мозга. Материалы Всерос. конф. М., 2012. С. 296–301.
2. Конорова И.Л., Максимова М.Ю., Смирнова И.Н. и др. Циркулирующая в плазме крови внеклеточная ДНК в патогенезе ишемического инсульта: роль транскрибируемой области рибосомного повтора // Пат. физиол. 2014. № 4. С. 13–23.
3. Семченко В.В., Степанов С.С., Боголепов Н.Н. Синаптическая пластичность головного мозга (фундаментальные и прикладные аспекты). М.: Директ-Медиа, 2014.
4. Aravalli R.N., Peterson P.K., Lokensgard J.R. Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system // J. Neuroimmune Pharmacol. 2007. Vol. 2. P. 297–312.
5. Azanza M.J., del Moral A., Calvo A.C. et al. Synchronization dynamics induced on pairs of neurons under applied weak alternating magnetic fields // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 2013. Vol. 166. P. 603–618.
6. Bonanomi D., Benfenati F., Valtorta F. Protein sorting in synaptic vesicles life cycle // Progr. Neurobiol. 2006. Vol. 80. P. 177–217.
7. Efremova L.V., Kostyuk S.V., Khaspekov L.G., Veiko N.N. Accumulating fragments of extracellular DNA (ecDNA) influence rat primary cerebellum granule cell culture. Dordrecht, Heidelberg, London, N.Y. Circulating nucleic acids in plasma and serum // Springer Science+Business Media B.V. 2010. P. 213–218.

8. Gahan P.B. Current developments in circulating nucleic acids in plasma and serum. Circulating nucleic acids in plasma and serum. Dordrecht, Heidelberg, London, N.Y. Springer science+business media B.V. 2010. P. 3–14.
9. Korber C., Horstmann H., Satzler K., Kuner T. Endocytic structures and synaptic vesicle recycling at a central synapse in awake rats // *Traffic*. 2012. Vol. 13. P. 1601–1611.
10. Matteoli M., Coco S., Schenk U., Verderio K. Vesicle turnover in developing neurons: how to build a presynaptic terminal // *Trends Cell. Biology*. 2004. Vol. 14. P. 133–140.
11. Shintani Y., Kapoor A., Kaneko M. et al. TLR9 mediates cellular protection by modulating energy metabolism in cardiomyocytes and neurons // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. Vol. 110. P. 5109–5114.
12. Tang S-C., Arumugam T.V., Xu X. et al. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. Vol. 104. P. 13798–13803.
13. Waites C.L., Leal-Ortiz S.A., Okerlund N. et al. Bassoon and Piccolo maintain synapse integrity by regulating protein ubiquitination and degradation // *EMBO J*. 2013. Vol. 32. P. 954–969.

Поступила в редакцию 03.02.2015

REORGANIZATION OF THE ULTRA-STRUCTURE OF NEOCORTICAL NEURONS IN RATS TREATED WITH CELL-FREE DNA

L.Ye.Frumkina¹, I.L.Konorova², O.P. Aleksandrova², N.N.Bogolepov¹, L.G.Khaspekov²

Neuron ultrastructure was studied in layers III–V of rat brain neocortex 24 hours after intraperitoneal (n=3) or intravenous (n=3) injection of cell-free DNA (7.7×10^{-5} g/kg body weight). A plastic restructuring of nuclear chromatin, nucleolar hypertrophy, deep invaginations of nuclear envelope, hyperplasia of mitochondria and their close contact with other organelles and the nucleus, formation of cytoplasmic tubulovesicular bodies which may promote enhanced synaptic vesicle transport to presynaptic axonal terminals, activation of astrocyte glia were found. The data obtained suggest that injection of cell-free DNA lead to pronounced ultrastructural reorganization in neocortical neurons directed to protein synthesis activation, enhancement of synaptic transmission efficiency, as well as intensification of energy metabolism, that may contribute to reparative and compensatory restorative processes in cerebral ischemic pathology.

Key words: *cerebral cortex, neurons, ultrastructure, plasticity, extracellular DNA*

¹ Laboratory of Brain Ultrastructure and Cytochemistry,

² Laboratory of Experimental Neurocytology, RAS Research Center of Neurology, Moscow