

О.С. Сотников, А.А. Лактионова, И.А. Соловьева и Т.В. Краснова

ДЕЛЕНИЕ ИЛИ ЭНУКЛЕАЦИЯ НЕЙРОНОВ

Лаборатория функциональной морфологии и физиологии нейрона (зав. — проф. О.С. Сотников) Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

С помощью классической нейрогистологической методики Бильшовского — Грос воспроизведены все морфологические феномены, трактуемые ранее многими авторами как признаки деления, почкования, перешнуровывания нейронов. Высказано предположение о том, что эти явления связаны с эффектом энуклеации, полученным у многих клеток других тканевых типов при различных химических и физических воздействиях. С помощью изолированных нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis* в культуре ткани проведены эксперименты с воздействием на нервные клетки ингибитора актиновых микрофиламентов цитохалазина В. Фазово-контрастная центрифужная видеосъемка в течение 4–8 ч выявила эффект смещения, эктопии ядра и его выпячивания, вплоть до почти полного перешнуровывания тела нейрона. Это повторяет картины, получаемые на статичных фиксированных препаратах в «норме» и различных экспериментальных условиях. Иногда на ранних стадиях опытов отмечались и выпячивания цитоплазмы. Контрольные опыты с воздействием на нейроны культуральной среды с растворителем цитохалазина В диметилсульфоксидом (ДМСО) не выявили никаких изменений нейронов в течение 8 ч. Высказано мнение о том, что картины, трактуемые ранее как деление, перешнуровывание нейронов, объясняются ингибированием актиновых микрофиламентов, развивающимся иногда спонтанно, у клеток, переживающих индивидуальные метаболические сдвиги, препятствующие поддержанию стабильности цитоскелета.

Ключевые слова: нейрон, энуклеация, эктопия ядра, клеточное деление, цитохалазин В.

В настоящее время вопрос о невозможности деления дифференцированных нейронов у взрослых организмов может считаться решенным. Хотя существует реальность появления популяции новых нейронов в гиппокампе, субэпендимной области и некоторых других участках мозга [23, 27], это не нарушает твердо установленного факта невозможности деления дифференцированных нейронов. Однако нейрогистологические факты, на которых базировалась гипотеза об амитотическом делении, почковании нейронов, остались необъясненными до сих пор. Это не может считаться корректным. Нам представилась возможность дать объяснение одному из «феноменов деления» нейрона.

Представления об амитотическом делении клеток, видимо, берут начало от учения Р. Ремака «О делении клеток перетяжкой» [11]. В нейрогистологии они базировались на находках в гистологических препаратах, где тело нейрона было как бы разделено на две половины (рис. 1), хотя и сохраняло связь (мостик) между разделившимися частями [1, 2, 9, 14]. На других препаратах демонстрировались два вплотную прилегающих друг к другу нейрона, похожие на разделившиеся. В доказательство неполного разделения клеток приводились и картины многоядерных нейронов [5, 16, 17] и с ядрами, резко смещенными к их периферии и даже «выходящими» из клетки — эктопированными ядрами (см. рис. 1). Такое «самоубийство ядра» первым продемонстрировал Н. Hertwig [9]. Сдвиг ядра на периферию клетки впервые описал

F. Nissl [29] в качестве одного из компонентов реактивных, обратимых изменений («первичное раздражение»), развивающееся в теле нейрона при перерезках аксона. Такой феномен отмечен при многих экспериментальных условиях, а также у некоторых нейронов в норме [3, 6, 30].

Все эти наблюдения позволили нам [10] высказать предположение о том, что описанные факты смещения ядра могли быть стадиями единого процесса частичной энуклеации, уже описанного в норме и под влиянием ингибиторов цитоскелета у клеток многих разных тканевых типов, кроме нервного [7, 15, 20].

Целью настоящей работы явилась экспериментальная проверка этого предположения на изолированных нейронах.

Материал и методы. Проведено 3 группы исследований. В 1-й группе анализировали нейроны, имеющие в норме в интрамуральном сплетении кишки кошки ($n=10$) необычную форму. Кусочки тонкой кишки ($0,5 \text{ см}^3$) фиксировали в 12% нейтральном формалине, срезы, полученные на замораживающем микротоме, импрегнировали нитратом серебра по Бильшовскому — Грос в модификации по прописи Б.А. Долго-Сабунова [3].

Во 2-й группе в культуре ткани анализировали поведение живых изолированных нейронов ($n=430$) при действии ингибитора актиновых микрофиламентов цитохалазина В. Исследования проводили на нейронах пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* ($n=215$). Нервы, идущие от ганглиев нервного кольца, обрезали. Кольцо переносили в физиологический раствор для моллюсков комнатной температуры, который содержал (мм): 90 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1,5 MgCl₂, а также 50 мкг/мл гентамицина сульфата. Затем

из нервного кольца выделяли ганглии, которые переносили в 0,4% раствор проназы с температурой 22 °С. Использовали лиофилизированную проназу из *Streptomyces griseus* (Serva, Великобритания). Проназу готовили на физиологическом растворе для моллюсков.

Ганглии выдерживали в проназе 50 мин, затем отмывали от фермента в растворе Рингера для моллюсков. Далее снимали с ганглиев соединительнотканную капсулу, затем проводили пипетирование. Суспензию выделенных нейронов промывали раствором Рингера. При этом погибшие глиоциты и соединительную ткань удаляли. Исследования нейронов проводили в питательной минимальной среде Игла (Sigma, США) без глутамина и бикарбоната. Для энуклеации нейронов использовали цитохалазин В (Sigma, США), который растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (1 мг/мл) и затем разводили в культуральной среде до концентрации 10 мкг/мл. С помощью бикарбоната натрия устанавливали рН среды 7,8. Культивирование в течение 8–10 ч проводили в цилиндрической микрокамере объемом 0,8 см³. Микроскопию осуществляли в течение 5–24 ч с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа МБИ-13 (ЛОМО, Россия). Регистрацию изображения проводили путем компьютерной цейтраферной видеосъемки с интервалом 1 кадр в 15 мин.

3-я группа исследований (n=30) была контрольной, в ней проверяли, не вызывает ли энуклеацию ядра растворитель цитохалазина В ДМСО. Для этого в таких же опытах в среду добавляли только ДМСО без цитохалазина В.

Результаты исследования. В исследованиях интрамуральной нервной системы здоровых животных (1-я серия) получены все известные морфологические феномены, трактованные рядом исследователей как признаки «почкования», перешнуровывания нейронов или их amitotic деления. Обнаружены мощные выпячивания тела нейронов, которые содержат ядро либо его не имеют (рис. 2, а, б). Такие выпячивания встречаются редко и обычно у биполярных клеток. При импрегнации нитратом серебра эти нейроны имеют черный цвет, и распределения в них цитоскелетных нейрофибрилл выявить не удастся. Отмечены также спаренные нейроны с отростками и самостоятельными ядрами (см. рис. 2, в), что создает впечатление их субстанциональной взаимосвязи, которая может свидетельствовать об их цитоплазматических синцитиальных взаимоотношениях, но никаких признаков деления этих дифференцированных нейронов обнаружить не удалось. Наконец, иногда встречаются нейроны с двумя ядрами. На рис. 2, г представлен высокодифференцированный нейрон с хорошо развитыми отростками, конусом роста и двумя ядрами. Представить себе деление этого нейрона, так же как и слияние двух нейронов на основании подобных статичных фиксированных препаратов, невозможно.

При диссоциации ганглиев моллюска (2-я серия) обнаружены изолированные нейроны разного диаметра, чаще всего без отростков, хорошо

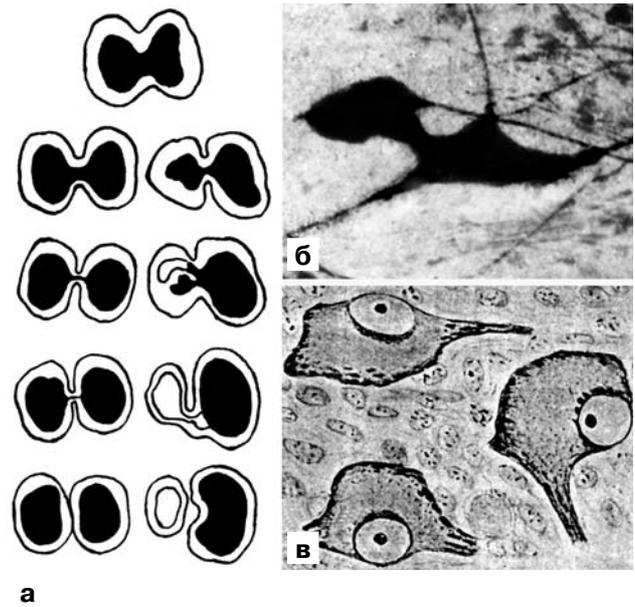


Рис. 1. Транслокация ядер и цитоплазмы в представлениях прежних исследователей.

а — amitotic деление клеток в представлениях W. Alberti и A. Politzer (по Г.А. Коблову [9]); б — «делящийся» нейрон (по А.С. Альтушль [1]); в — смещение ядра нейрона на периферию («эктопия ядра», «первичное раздражение», по S. Ramon y Cajal [30]).

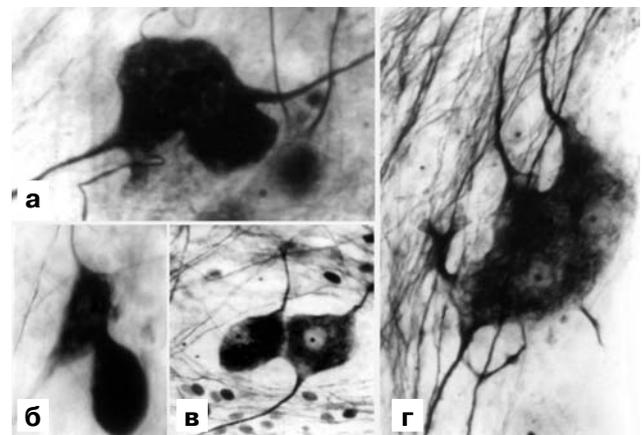


Рис. 2. Морфологические феномены, имитирующие деление или слияние дифференцированных интрамуральных нейронов кишечника.

а, б — разновидности крупных выпячиваний двухотростчатых нейронов, имитирующие «перетяжки» нейронов перед их предполагаемым «делением»; в — два плотно прилегающих нейрона, имитирующих их субстанциональную связь после «деления» или слияние; г — двуядерный дифференцированный нейрон — результат неполного кариокинеза или полного слияния клеток. Импрегнация нитратом серебра по Бильшовскому — Грос. Об. 40, ок. 10.

виден контрастный контур клетки (рис. 3). Ядро просматривается с трудом. Оно обычно несколько смещено от центра, ему противостоит часть клетки, содержащая пигмент оранжевого цвета. В ред-

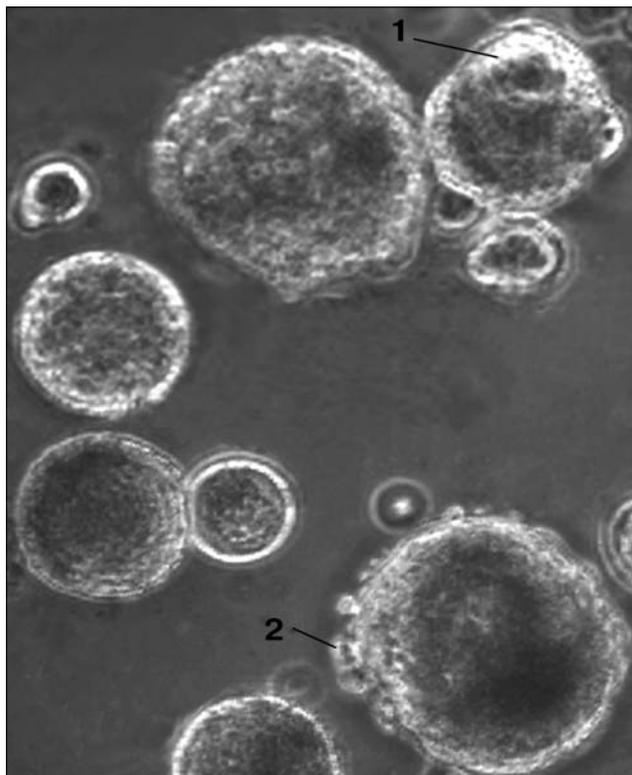


Рис. 3. Живые изолированные нейроны, выделенные из ганглиев моллюска с помощью протеолитической диссоциации.

1 — эктопия ядра; 2 — нейрон с разрушенной глиальной оболочкой. Фазовый контраст. Об. 20, ок. 10.

ких случаях ядро несколько выступает наружу, напоминающая эктопированные ядра при «первичной реакции». В начале действия цитохалазина В, примерно в течение 15 мин, закономерно отмечается смещение ядра на периферию клетки (рис. 4, а, б). Затем происходит его значительное выпячивание. В дальнейшем выпячивание постепенно увеличивается (см. рис. 4, в), и через 4–5 ч формируется

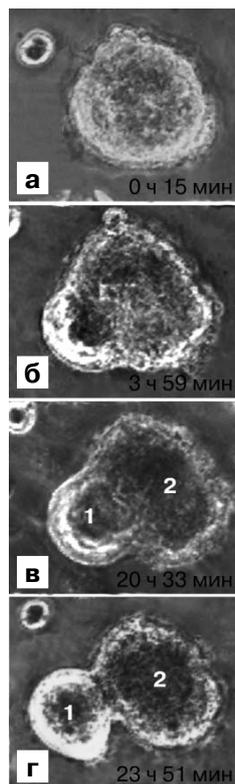


Рис. 4. Энуклеация нейрона с сохранением цитоплазматического мостика между кардио- (1) и цитопластом (2) (сравни рис. 4, г и 2, в).

а–г — стадии процесса. Время — от начала съемки. Фазовый контраст. Об. 20, ок. 10.

перешнуровывание клетки (см. рис. 4, г) с ее разделением на цитопласт (цитосому) и кариопласт (кариосому). При этом между ними в течение многих часов может сохраняться цитоплазматический мостик (см. рис. 4, г).

После эктопии ядра могут отмечаться множественные выпячивания цитоплазмы (рис. 5), нивелирующие эктопию ядра. Наряду с равномерным постепенным делением тела клетки на цитопласт и кариопласт, нередки случаи, когда при четком выделении шарообразного кариопласта цитопласт представляется в виде множественных выпячиваний (см. рис. 5, в, г).

Известно, что чаще всего между карио- и цитопластом остается цитоплазматический мостик, поэтому для отделения кариопласта применяется дополнительное центрифугирование в градиенте Перколла. В наших экспериментах у отдельных клеток было отмечено полное расщепление цито- и кариосом (рис. 6).

Нередко удается наблюдать, что одновременно с выпячиваем (экструзией) ядра происходит сокращение рядом лежащих изолированных нервных волокон даже через 3 ч после начала действия цитохалазина (рис. 7, а). Сокращение изолированного волокна — это обычный процесс, который также протекает в культуральной среде без цитохалазина В, в растворе Рингера и связан с активностью актиновых микрофиламентов. В данном случае это наблюдение имеет принципиальный характер, так как происходит в среде цитохалазина и может свидетельствовать не об ингибировании актина нейрона в цитохалазине, как принято считать, а наоборот, о его активации. То же самое имеет место и с волокнами, сохранившими связь с телом клеток. Округление клетки, а значит, расслабление ее цитоскелета происходит гораздо позднее (через 8–24 ч), при этом ядро снова оказывается внутри клетки, но это характерно для претерминальных стадий жизни клетки (рис. 8).

Жизнеспособность цито- и кариопластов определяется обычно введением красителя акридинового оранжевого или нейтрального красного. Мы использовали метиленовый синий. При этом в цитоплазме обнаруживалось массовое гранулообразование, что свидетельствует о жизнеспособности фрагментов нейрона.

В 3-й серии опытов после помещения изолированных нейронов в культуральную среду RPMI с 1% ДМСО в течение 8 ч никаких существенных изменений по сравнению с поведением в культуральной среде без ДМСО не отмечалось. Энуклеация не наблюдалась ни у одного нейрона. Как и в норме, в среде, содержащей ДМСО, происходит сокращение нервных отростков. Некоторые

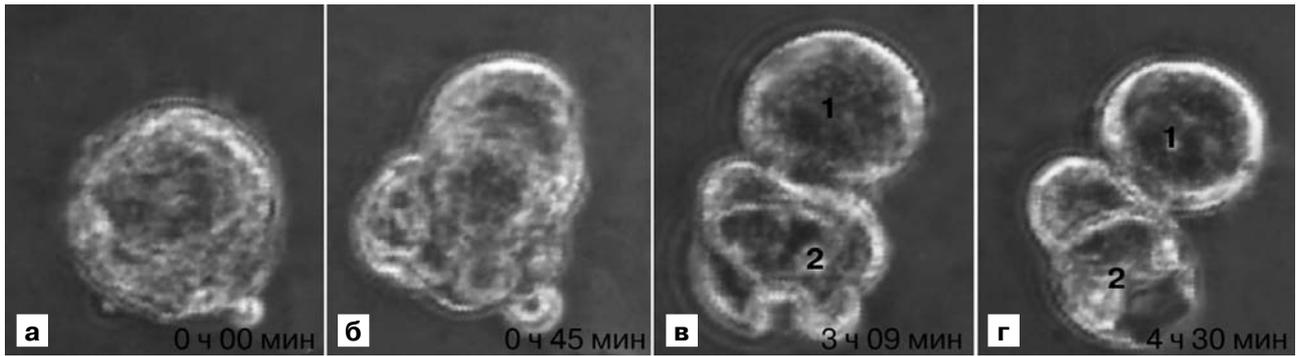


Рис. 5. Фрагментация цитопласта при энуклеации нейрона.

а-г — стадии процесса. 1 — кариопласт; 2 — цитопласт. Время — от начала съемки. Фазовый контраст. Об. 20, ок. 10.

клетки мигрируют, сближаются и контактируют друг с другом, при этом многие из них постоянно вращаются. Изредка у одиночных клеток можно выявить эктопию ядра, однако обычно клетки остаются шарообразными, и эктопии не наблю-

дается. ДМСО не препятствует началу роста отростков у отдельных нейронов.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что выпячивание ядра нейронов, «перешнуровывание» нейронов и другие нейро-

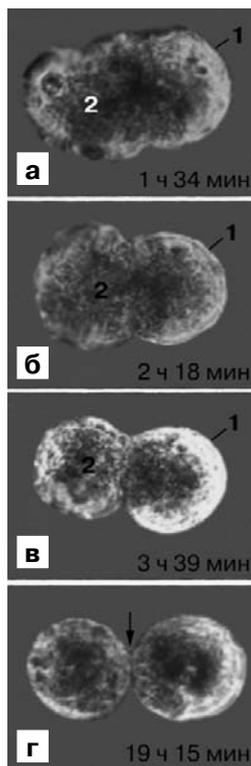


Рис. 6. Энуклеация тела нейрона при полной цитотомии.

а-г — стадии процесса. 1 — кариопласт; 2 — цитопласт. Стрелка — граница их разделения. Время — от начала съемки. Фазовый контраст. Об. 20, ок. 10.

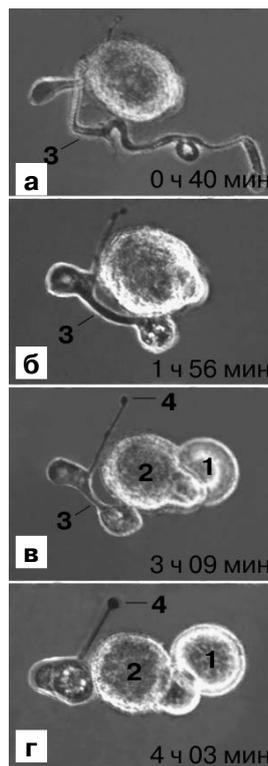


Рис. 7. Процесс энуклеации нейрона в цитохалазине В, сопровождающийся ретракцией изолированного нервного волокна.

а-г — стадии процесса. 1 — кариопласт; 2 — цитопласт; 3 — сокращающееся нервное волокно; 4 — колба ретракции сокращающейся ветви нервного волокна. Время — от начала эксперимента. Фазовый контраст. Об. 20, ок. 10.

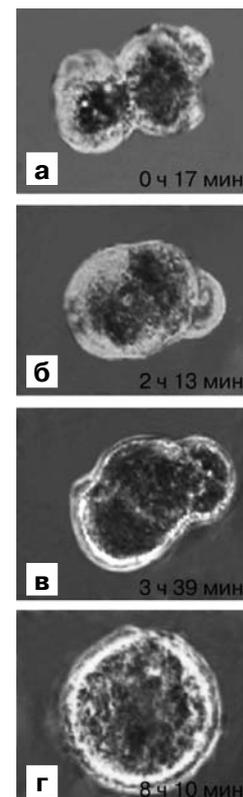


Рис. 8. Округление энуклеированного нейрона при длительном воздействии (в течение 8 ч) цитохалазином В.

а-г — стадии процесса. Время — от начала эксперимента. Фазовый контраст. Об. 20, ок. 10.

морфологические феномены «деления нейронов», наблюдаемые при патологии и в «норме», могут быть воспроизведены на живых нейронах в эксперименте с цитохалазином В, изменяющим состояние цитоскелета. Эти феномены не являются истинным делением нейронов, а представляют собой естественный процесс эктопии ядра, заканчивающийся энуклеацией нейронов.

Обсуждение полученных данных. Несмотря на сказанное выше, некоторое отношение к процессу деления описанный феномен энуклеации все-таки имеет. Исключая деление ядра удается воспроизвести циркулярное сдавление клетки (борозда деления), расхождение двух компонентов клетки с образованием цитоплазматического мостика.

Как показывают результаты экспериментов [8], при действии цитохалазина В на митотически делящиеся клетки можно получить и стадию возврата 8-образной её формы в шаровидную. При этом процесс деления собственно ядра оказывается независимым от изменений формы клетки, и в результате разделившееся ядро оказывается в неразделившейся клетке, т.е. образуется двуядерная шаровидная клетка. Из этого следует, что отмеченные на гистологических препаратах такие феномены, как эктопия и энуклеация ядра (см. рис. 1, б, в; 2, а, б), при модуляции актинового цитоскелета могут происходить и у дифференцированных нейронов. Такие нарушения у делящихся нейронов заканчиваются неполным делением клетки с образованием двуядерного нейрона (см. рис. 2, в, г).

Как было показано с помощью электронного микроскопа, кариопласты и цитопласты сохраняют после энуклеации сравнительно нормальную ультраструктуру [7, 12]. Интактное ядро окружено тонким слоем цитоплазмы с рибосомами, митохондриями, эндоплазматической сетью, но без микротрубочек. Внешняя клеточная мембрана сохранена. Однако кариопласты не способны двигаться. Цитопласты же сохраняют микротрубочки и имеют ультраструктуру интактной клетки. Они обладают некоторой подвижностью. Следовательно, механизмы движения клеток могут функционировать без ядерного участия [13, 32].

Полученные нами данные вполне согласуются с результатами экспериментов, выполненных на других клетках. Эксперименты по энуклеации клеток, имеющие чисто фундаментально-научное направление, производились давно [19]. Затем деление клеток на ядерные и цитоплазматические составляющие использовали для определе-

ния локализации различных веществ, бактерий, вирусов и зависимости клеточных процессов от ядра и цитоплазмы [21, 34, 35]. Для этих целей были использованы клетки практически всех тканевых типов: куриные фибробласты, фагоциты, гепатоциты, клетки почек и др. Предприняты подобные опыты и с нейробластомными перевируемыми клетками типа феохромоцитомы РС 12 [26, 28]. Однако энуклеация нейронов взрослых животных в первичных культурах, по-видимому, нами предпринята впервые.

Значительное развитие и важное практическое применение нашли методики энуклеации и пересадки ядер в связи с развитием способов реконструирования, гибридизации клеток и клонирования животных [20, 24]. В 1997 г. клонированная овца Долли была создана искусственным переносом ядра соматической клетки, а через год появились клонированные мыши, полученные с использованием ядерной пересадки [22].

Несмотря на широкое применение цитохалазина В в экспериментах и практике, механизм его действия не во всем окончательно ясен. Обычно действие цитохалазина рассматривается как специфическое влияние, ингибирующее образование актиновых микрофиламентов клетки [7, 33]. Это нарушает превращение G-актина в F-актин, ингибируя полимеризацию, повреждает целостность субплазмолеммного сплетения цитоскелетных филаментов и повышает возможность «выброса» ядра из клетки [4].

Так как в большинстве работ используется совместное действие цитохалазина В с центрифугированием, то силой, «выталкивающей» ядро, естественно, считается центробежная сила [15]. В наших экспериментах центрифугирование не применялось, но экструзия ядра все равно закономерно наступала. Это затрудняет объяснение механизма энуклеации, но во всяком случае свидетельствует о том, что «выталкивающая» сила находится в теле клетки, и именно действие цитохалазина В запускает этот процесс.

На примере ооцитов, обработанных цитохалазином В и стимулированных электрически, показано превращение гомогенного распределения актиновых микрофиламентов в прерывистое [24]. Возможно, это свидетельствует о разрежении цитоскелетной сети, обеспечивающей в норме расположение ядра в центре клетки. Однако все это еще не указывает на силы, которые «выталкивают» ядро, как отмечают некоторые авторы [31].

Анализируя наши данные, нельзя не отметить двухфазность действия цитохалазина на нейроны: в течение 4–6 ч развивается энуклеация («выдав-

ливание» ядра из тела клетки), но затем (примерно через 7 ч) при отсутствии деления цитопластов наблюдается восстановление шаровидной формы клетки. Первая фаза обычно сопровождается ретракцией нервных отростков, что должно быть связано с активностью нейрофиламентов, а не с их расслаблением. Может быть, о разрушении актиновых микрофиламентов свидетельствует только вторая фаза обработки нейронов цитохалазином В, а собственно начальная экструзия состоит в активации сократительной способности цитоскелета и одновременном его разрыхлении. Теперь ясно, что в процессе энуклеации могут быть задействованы и другие структуры цитоскелета и иные биохимические механизмы. Сходные процессы могут быть использованы и в явлении множественных выпячиваний цитоплазмы под влиянием цитохалазинов, описанном нами и отмеченном другими авторами [25]. В процессе энуклеации могут быть задействованы и другие структуры цитоскелета и иные механизмы.

Оказывается энуклеацию клетки можно вызвать многими агентами: такими пуриновыми соединениями, как гуанин, аденозин, гуанозин, демикальцин, колхицин, колцемид, винбластин, латрункулин [12, 18, 25] и даже центрифугированием в градиенте плотности фиколла или перколла без использования каких-либо специальных веществ [4], т.е. этот процесс нередко может развиваться как неспецифическая реакция клетки на внешнее воздействие.

Как следует из приведенного обсуждения, интерес к проблеме энуклеации клеток состоит не только в том, что при этом в прижизненных экспериментах решается вопрос дискуссии о делении нейронов, не только обнаруживается еще один неизвестный ранее морфологический феномен реактивной перестройки нейрона, открываются также широкие возможности для реконструирования нейронов и для экспериментального синцитиального связывания прерванных нервных структур.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ, заявка № 08-04-90033-Бел_а.

ЛИТЕРАТУРА

- Альтшуль А.С. Изменение нервных узлов пищеварительного тракта при экспериментальной непроходимости кишок. *Арх. биол. наук*, 1940, т. 58, вып. 1, с. 124–129.
- Войно-Ясенецкий М.В. и Жаботинский Ю.М. Источники ошибки при морфологических исследованиях. Л., Медицина, 1970.
- Долго-Сабуров Б.А. Иннервация вен. Л., Медгиз, 1958.
- Егоров Е.Е., Прудовский И.А. и Зеленин А.В. Сравнительное исследование цитопластов L-клеток, полученных с использованием цитохалазина В и без него. *Докл. АН СССР*, 1982, т. 264, № 4, с. 969–973.
- Жаботинский Ю.М. Нормальная и патологическая морфология вегетативных ганглиев. М., Изд-во АМН СССР, 1953.
- Жаботинский Ю.М. Нормальная и патологическая морфология нейрона. Л., Медицина, 1965.
- Зеленин А.В., Куца А.А. и Прудовский И.А. Реконструированная клетка. М., Наука, 1982.
- Иванова О.Ю., Смирнова Е.А. и Комм С.Г. Механизмы образования многоядерных клеток под действием цитохалазина В в культуре трансформированных фибробластов. *Цитология*, 1985, т. 27, № 7, с. 780–784.
- Коблов Г.А. Деление нервных клеток, Саратов, Изд-во Саратовск. ун-та, 1974.
- Лактионова А.А. и Сотников О.С. Прижизненные исследования феномена «деления нейронов». *Морфология*, 2009, т. 136, вып. 4, с. 87.
- Ломинский Ф. Исследовать путем опыта у взрослых животных и кроме того у зародыша — могут ли размножаться нервные клетки делением. *Университетские известия*, 1882, № 3, с. 1–30 (приложение).
- Морозова К.М. и Киселева Е.В. Изменение организации ядра и цитоплазмы ооцитов ксенопуса после разрушения актиновых филаментов латрункулином. *Цитология*, 2008, т. 50, № 5, с. 394–405.
- Прудовский И.А., Керкис А.Ю., Байборodin С.И. и др. Применение энуклеации клеток для изучения стабильности цитоплазматических органелл и организации цитоплазмы. *Цитология*, 1985, т. 27, № 7, с. 792–795.
- Радостина Т.Н. К вопросу о размножении нейронов вегетативной нервной системы. В. кн.: Влияние высших отделов нервной системы на процессы воспаления и регенерации. *Труды I Московск. мед. ин-та*, 1957, с. 241–249.
- Рингерц Н. и Севидж Р. Гибридные клетки. М., Мир, 1979.
- Серов В.В. и Пауков В.С. Ультраструктурная патология. М., Медицина, 1975.
- Ярыгин Н.Е. и Ярыгин В. Н. Патологические и приспособительные изменения нейрона. М., Медицина, 1973.
- Bohnsack M.T., Stuvén T., Kuhn C. et al. Aselective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes. *Nat. Cell Biol.*, 2006, v. 8, p. 257–263.
- Carter S.B. Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature*, 1967, v. 213, p. 261–266.
- Chen N., Liow S.L., Yip W.Y. et al. Early development of reconstructed embryos after somatic cell nuclear transfer in a non-human primate. *Theriogenology*, 2006, v. 66, № 5, p. 1300–1306.
- Coimbra V.C., Yamamoto D., Khusal K.G. et al. Enucleated L 929 cells support invasion, differentiation, and multiplication of *Trypanosoma cruzi* parasites. *Ynfect. Ymmun.*, 2007, v. 75, № 8, p. 3700–3706.
- Hosaka K., Ohi S., Ando A. et al. Cloned mice derived from somatic cell nuclei. *Hum. Cell*, 2000, v. 13, № 4, p. 237–242.
- Iwai T. Temporal profile of neural stem cell proliferation in the sub-ventricular zone after ischemia/hypoxia in the neonatal rat brain. *Neurol. Res.*, 2006, v.28, № 4, p.461–468.
- Kawahara M., Mori T., Tanaka H. and Shimizu H. The suppression of fragmentation by stabilization of actin filament in

- porcine enucleated oocytes. *Theriogenology*, 2002, v. 58, № 6, p. 1081–1095.
25. Lan G.C., Wu Y.C., Han D. et al. Demecolcine – assisted enucleation of goat oocytes: protocol optimization, mechanism investigation, and application to improve the developmental potential of cloned embryos. *Cloning Stem Cells*, 2008, v. 10, № 2, p. 189–202.
 26. Liberman D. and Sachs L. Nuclear control of neurite induction in neuroblastoma cells. *Exp. Cell Res.*, 1978. v. 113, № 2, p. 383–390.
 27. Mirescu C., Peters J.D. and Gould E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat. Neurosci.*, 2004, v.7, № 8, p.841–846.
 28. Nichols R.A., Chandler C.E. and Shooter E.M. Enucleation of the rat pheochromocytoma clonal cell line, PC 12: effect on neurite outgrowth. *J. Cell Physiol.*, 1989, v. 141. № 2, p. 301–309.
 29. Nissl F. Über die Veränderungen der Ganglienzellen am Fascialisnerv der Kaninchen nach Ausreissung der Nerven. *Allg. Zschr. Psych.*, 1892, Bd. 48, № 197, S. 675–689.
 30. Ramon y Cajal S. *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. N. Y., Hafner publishing Co, 1959.
 31. Repasky E.A. and Eckert B.S. The effect of cytochalasins B on the enucleation of erythroid cells in vitro. *Cell Tissue Res.*, 1981, v. 221, № 1, p. 85–91.
 32. Shay J.W., Porter K.R. and Prescott D.M. The surface morphology and fine structure of CHO (Chinese hamster ovary) cells following enucleation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, v. 71, № 8, p. 3059–3063.
 33. Tesarik J., Martinez F., Rienzi L. et al. Microfilament disruption is required for enucleation and nuclear transfer in germinal vesicle but not meta phase II human oocytes. *Fertil. Steril.*, 2003, v. 79, Suppl. 1, p. 677–681.
 34. Volloch V., Schweitzer B. and Rits S. Synthesis of globin RNA in enucleated differentiating murine erythroleukemia cells. *J. Cell Biol.*, 1987, v. 105, № 1, p. 137–143.
 35. Yamamoto D.L., Coimbra V.C., Okuda K. and Rabinovitch M. Enucleated L 929 mouse fibroblasts support invasion and multi-

plication of *Shigella flexneri* 5a. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2006, v. 39, № 6, p. 749–758.

Поступила в редакцию 27.04.09
Получена после доработки 04.07.09

NEURONAL DIVISION OR ENUCLEATION

O.S. Sotnikov, A.A. Laktionova, I.A. Solovyova and T.V. Krasnova

In this work, using the classical neurohistological Bielschowsky-Gros method, all the morphological phenomena were reproduced that were earlier interpreted by many authors as the signs of neuron division, budding and fission. It is suggested that these phenomena are associated with the effect of enucleation demonstrated in many cells of other tissue types exposed to different physical and chemical factors. The experiments were conducted in tissue culture, using the isolated neurons of the mollusk *Lymnaea stagnalis*, in which the neural cells were treated with actin microfilament inhibitor cytochalasin B. Phase-contrast time-lapse video recording during 4–8 hours demonstrated the effects of nucleus displacement, ectopy and bulging up to almost complete fission of neuronal body. These effects reproduce the images obtained in static fixed preparations under “normal” and various experimental conditions. Sometimes, at the early experimental stages, the bulging of cytoplasm was also detected. Control experiments in which the neurons were treated with the culture medium containing cytochalasin B solvent dimethyl sulfoxide, showed no changes in neurons during 8-hour period. It is suggested that the images, interpreted earlier as neuron division or fission, could be explained by inhibition of actin microfilaments, which sometimes may develop spontaneously in cells experiencing individual metabolic changes compromising the cytoskeleton stability maintenance.

Key words: *neuron, enucleation, nuclear ectopy, cell division, cytochalasin B.*

Laboratory of Neuron Functional Morphology and Physiology, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg.