

О.С. Сотников, М.В. Луковникова, Н.Ю. Васягина, А.А. Лактионова и Н.М. Парамонова

ИЗМЕНЕНИЕ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА ПРИ ДЕЙСТВИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Лаборатория функциональной морфологии и физиологии нейрона (зав. — проф. О.С. Сотников) Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: sotnikov@kolt.infran.ru

Целью работы было исследование структуры нейронов при их обработке протеазами и выяснение возможности возникновения при этом межнейрональных синцитиальных связей. В 1-й серии опытов при фазово-контрастном наблюдении живых диссоциированных нейронов ганглиев моллюска *Lymnaea stagnalis* при воздействии 0,4 % раствора проназы обнаружены ретракция нервных отростков и двухфазное изменение объема тела клеток. На I стадии в среднем в течение 82,5 мин объем тела нейрона уменьшается на 12,1 %, в дальнейшем он увеличивается в среднем на 14,1 %. Признаки жизнедеятельности нейронов в растворе Рингера наблюдались в среднем в течение 828 мин, а в растворе проназы их длительность была в 1,4 раза короче. Во 2-й серии опытов при исследовании ультраструктуры нейронов во многих случаях отмечена сохранность митохондрий, гранулярной и гладкой эндоплазматической сети (ЭПС), комплекса Гольджи, светлых и гранулярных везикул, структуры ядра и оптической плотности нейроплазмы. Контактующие после центрифугирования клетки образуют межклеточные щели равномерной ширины (около 20 нм). Очень редко встречаются точечные сближения мембран. Никаких признаков синцитиальных связей не обнаружено. Удлинение и слияние цистерн гладкой ЭПС отделяет фрагменты тела нейрона от относительно неповрежденных клеток. Часть нейронов повреждены, имеются множественные вакуоли, образовавшиеся из набухших митохондрий и цистерн ЭПС. Отделенные при диссоциации фрагменты нервных отростков окружены нормальной внешней клеточной мембраной.

Ключевые слова: нейрон, диссоциация, проназа, ультраструктура, прижизненное исследование.

Как известно, протеолитические ферменты — это белки, в большом количестве находящиеся и постоянно функционирующие во всех клетках в нормальных условиях [17]. Протеазы являются главным химическим агентом всех морфогенетических процессов в организме, связанных с перестройкой или редукцией клеток, тканей и целых органов в онтогенезе позвоночных и беспозвоночных [18]. Протеазы широко используются при выделении тел нейронов для культивирования [1, 14, 19]. Существенную роль играют протеазы в посттравматической де- и регенерации нервов [8, 15].

По мнению ряда авторов, гидролитическим ферментам принадлежит особая нейротрофическая роль [5, 16]. Они успешно используются во врачебной практике для лечения ран: очищают ее от продуктов распада, снимают проявления воспаления, способствуют быстрому заживлению и эпителизации [3].

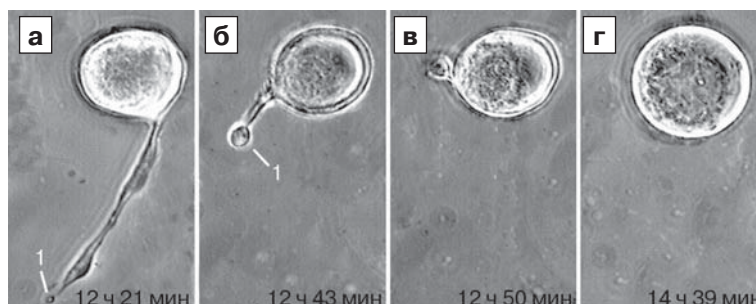
Ранее изучалось влияние проназы на метаболизм, ионный состав, рост нервных отростков, электрические свойства и выживаемость нейронов [2, 5, 11]. Показано, что при неспецифической реакции нейронов на обработку проназой в 5 раз в нейроплазме увеличивается соотношение концентрации ионов Na и K. Однако система активного транспорта ионов остается устойчи-

вой к действию проназы, поэтому эти нарушения полностью обратимы. Оказалось, что в результате обработки проназой формируются такие внутриклеточные ионные соотношения, которые служат сигналом, индуцирующим регенерацию отростков. Кратковременная (около 1 ч) обработка 0,2–0,4% раствором проназы запускает активацию роста нервных отростков [5].

Однако структурные процессы в нейронах при действии протеолитических ферментов ганглиев остаются неисследованными. Не ясно также, почему при обработке проназой первыми разрушаются глиоциты при сохранении нейронов. В нашей лаборатории была обнаружена способность нейрона формировать синцитиальные межнейрональные связи в культуре ткани [9]. Высказано предположение о том, что этому способствует обработка нейронов протеазами во время их диссоциации: происходит удаление глии, разрушение белков гликокаликса. Однако, по мнению ряда авторов, именно гликопротеиды и гликолипиды гликокаликса являются основными агентами сближения мембран [4], следовательно, их удаление при протеолизе не должно способствовать образованию синцитиальных связей. Отношение исследователей к роли протеаз при слиянии клеток остается двояким и противоречивым [12, 13].

Рис. 1. Сокращение нервного отростка и округление тела переживающего нейрона в 0,4% растворе проназы.

а—г — стадии процесса. Время — от начала опыта. 1 — колба ретракции. Фазовый контраст. Об. 20, ок. 10.



В связи с этим целью настоящей работы было исследование структуры нейронов при их обработке протеазами и выяснение возможности возникновения синцитиальных связей в результате такой обработки.

Материал и методы. Проведено 2 серии экспериментов. В 1-й серии опытов нейроны ганглиев легочного моллюска *Lymnaea stagnalis* обрабатывали проназой, которая представляет собой комплекс 11–14 протеолитических ферментов, обладающих значительной стабильностью и способностью кооперативно и быстро осуществлять глубокий гидролиз чрезвычайно широкого спектра белков [7]. Всего было исследовано 60 живых нейронов 47 моллюсков. В ходе приготовления препарата моллюска освобождали от раковины и растягивали на резиновой подложке. Под лупой МБС-10 выделяли ганглии окологлоточного кольца, которые помещали при температуре 25° С на 40 мин в 0,4% раствор проназы, приготовленный на растворе Рингера для моллюска, затем переносили в раствор Рингера для их очистки от оболочек и пипетировали путем неоднократного всасывания в 2 пипетки разного диаметра. Диссоциированные нейроны помещали в 0,4 % раствор проназы. Это время отмечали как время начала экспериментального воздействия. Клетки исследовали в импровизированной микрокамере, изготовленной на предметном стекле с помощью вазелинового масла и покровного стекла. Подробнее методика описана ранее [8].

Серийную микрофотосъемку переживающих диссоциированных клеток вели с помощью фазово-контрастного микроскопа МБР-3 (ЛОМО, Россия) и цифрового фотоаппарата Canon Power Shot A85 (Canon, Япония) каждые 15 мин. Опыт прекращали при первых признаках смерти: округлении клеток, появлении периферического слоя жидкой фракции нейроплазмы, субмембранных конгломератов и агрегации гранулярного компонента тела нейрона. Полученные фотографии обрабатывали с помощью компьютера в программе Adobe Photoshop. Для суждения об изменении объема нейрона измеряли площади его изображения на срединном оптическом срезе, используя морфометрическую программу ImageJ. Результаты измерений заносили в таблицы и строили графики изменения нервных клеток во времени. В контроле клетки выделяли таким же способом, но затем они постоянно находились в растворе Рингера.

Во 2-й серии опытов исследовали ультраструктурные изменения нейронов под действием проназы, возникающие при диссоциации ганглиев. Нейроны, выделенные из ганглиев с помощью проназы, как в 1-й серии, затем центрифугировали в растворе Рингера при 6000 оборотах в течение 10 мин. Далее надосадочную жидкость дважды заменяли 2,5% раствором глутарового альдегида, приготовленного на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,2–7,4) и фиксирова-

ли 1 ч при температуре 4° С. Центрифугат отмывали тем же буфером троекратно, затем в течение 1 ч проводили дополнительную фиксацию в 1 % растворе четырехоксида осмия. После троекратного споласкивания материала какодилатным буфером проводили его дегидратацию этанолом возрастающей концентрации (от 50° до 100°), а затем абсолютным ацетоном. После этого конгломерат клеток 1 сут пропитывали смесью аралдитов при комнатной температуре и, залив в свежую порцию эпоксидной смолы, помещали материал для полимеризации в термостат. Срезы толщиной 400–500 нм изготавливали на ультратоме ЛКВ-3 (Швеция). Контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу. Ультраструктурный анализ и фотосъемку проводили с помощью электронного микроскопа Leo 10 (Leo, Германия). Электронные микрофотографии сканировали с помощью Epsion Perfection 2480 PHOTO (Epson, Япония) и обрабатывали в программе Adobe PhotoShop. В качестве контроля для электронно-микроскопических исследований использовали ганглии *Lymnaea stagnalis*, не подвергнутые обработке проназой.

Результаты исследования. Наблюдения за живыми одиночными нейронами в 0,4% растворе проназы показали, что тела многих нейронов малого и большого диаметра имеют четкие контуры, хорошо прослеживающиеся в фазово-контрастном микроскопе. Ядра и ядрышки не просматриваются, периферическая субмембранная агрегация цитоплазматических структур отсутствует. Отростки клеток образуют колбы ретракции, выпрямляются и сокращаются в течение разного времени — от 30 мин до 2 ч (рис. 1, а). Этот период активной жизнедеятельности можно рассматривать как время переживания клетки. Вокруг тела клетки часто образуются ламеллы и нередко формируются шипикоподобные филоподии в области колбы ретракции отростка, что свидетельствует о попытке регенерации нейрона в растворе проназы (рис. 2). В некоторых случаях происходит аутоампутация сокращающегося отростка, имеющего варикозности (рис. 3). Затем тело нейрона округляется, а отросток разрушается.

Нейроны разной величины, отличающиеся по своим функциональным особенностям и имеющие различную степень повреждения, в опыте ведут себя крайне разнообразно. Однако все они претерпевают два противоположно направленных про-

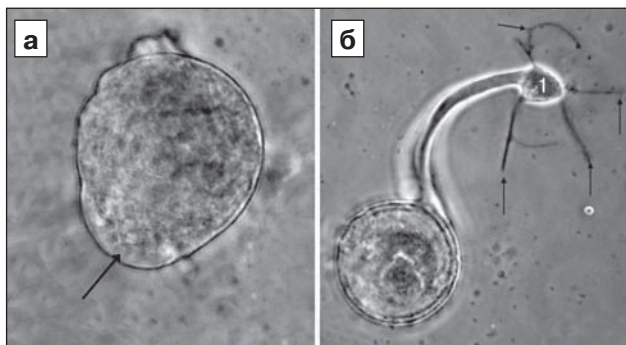


Рис. 2. Попытки регенерации живых изолированных нейронов моллюска в среде 0,4% проназы в растворе Рингера.

а — попытка формирования ламеллы (стрелка); б — формирование филоподий (стрелки) в области колбы ретракции (1). Фазовый контраст. Об. 20, ок. 10.

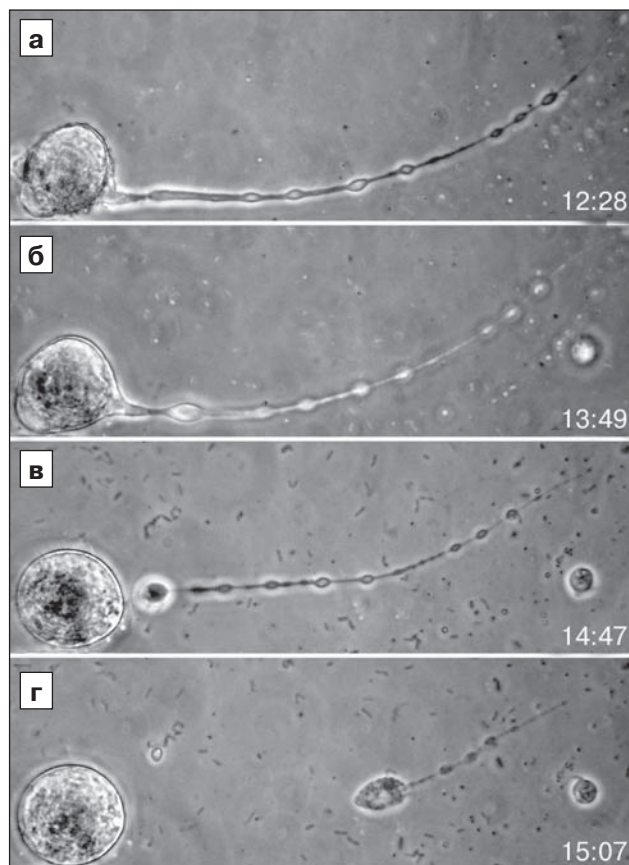


Рис. 3. Аутоампутация отростка нейрона, имеющего варикозности и его сокращение в 0,4% растворе проназы.

а–г — стадии процесса. Цифры — время от начала опыта. Фазовый контраст. Об. 20, ок. 10.

цесса. На I стадии действия проназы объем тела нейрона уменьшается в среднем на 12,1% в течение 82,5 мин (рис. 4, а). В контроле же эта стадия длится в среднем в 1,8 раза дольше (148,8 мин), и объем тел клеток уменьшается значительно (в среднем на 16,1%) (см. рис. 4, б).

На II стадии изменений нейронов в опыте происходит увеличение объема тела в среднем на 14,8%, а в контроле — на 22,7%. Процесс завершается округлением клетки. Максимальное время до округления тела нейрона в контроле оказалось больше в среднем в 1,4 раза (598 мин — в опыте, 828 мин — в контроле). Все это свидетельствует о большем времени активной жизнедеятельности клетки в растворе Рингера. Полная деструкция клеток наступает в среднем через 3 ч, но может происходить и через 7 ч. Имелись одиночные клетки с устойчивой структурой, объем которых мало изменялся в течение 5 ч. В контроле нами отмечены несколько случаев, когда нейроны, возможно механически травмированные при выделении, увеличивались в объеме на начальных стадиях переживания. Таким образом, в опыте и контроле отмечаются сходные процессы переживания нейрона, но в растворе Рингера клетка более устойчива.

Во 2-й серии опытов были изучены ультраструктурные изменения нейронов под действием 0,4% раствора проназы во время их выделения из ганглиев. Исследования показали, что в препаратах встречаются тела нейронов с различной степенью сохранности нейроплазмы и органелл, а также фрагменты нейронов и их отростков. Цитоплазма хорошо сохранившихся нейронов ничем не отличается от цитоплазмы нормальных клеток, хотя некоторые из них (рис. 5, а, б) имеют более темную цитоплазму. Нейроны содержат неповрежденную гладкую и гранулярную эндоплазматическую сеть (ЭПС) (см. рис. 5, б), комплекс Гольджи, свободные рибосомы, многочисленные синаптические пузырьки различного размера, светлые и с плотной сердцевиной, митохондрии, одиночные лизосомы, хорошо сохранившиеся ядра. Сближенные после центрифугирования клетки, несмотря на наличие сравнительно нормальных внешних клеточных мембран, не вступают друг с другом в контакты, никогда не формируют специализированных соединений и синцитиальных связей. Между большинством контактирующих клеток сохраняется межклеточная щель шириной около 20 нм. На некоторых участках имеются локальные сближения мембран.

У измененных клеток (см. рис. 5, в) имеются множественные вакуоли, образовавшиеся, по-видимому, из митохондрий, лишенных крист, и набухшей ЭПС. Встречаются везикулоподобные структуры ЭПС, расположенные в виде длинных цепочек. У таких клеток часть вакуолей сливаются между собой или с внешней клеточной мембраной (рис. 6, а). В наборе пузырьков появляются крупные, лишенные плотной сердцевины (см.

Рис. 4. Изменения площадей оптических срезов нейронов моллюска в 0,4% растворе проназы (а) и в растворе Рингера (б).

По оси абсцисс — время опыта (мин); по оси ординат — площадь нейронов (мкм^2).

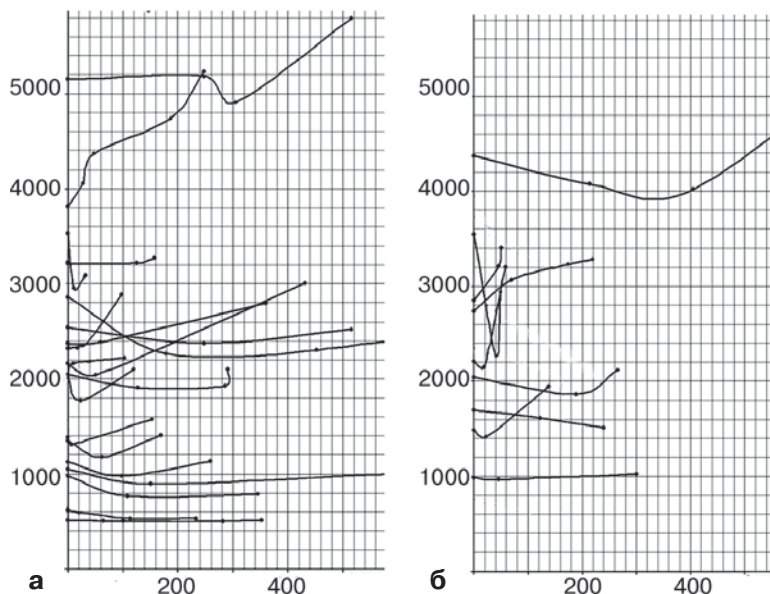


рис. 6, б). Встречаются экзоцитозные пузырьки.

Цистерны ЭПС у некоторых клеток, не набухая, удлиняются, соединяясь друг с другом, и формируют внутрицитоплазматические щели, отделяющие крупные фрагменты клеток (рис. 7, а). В этих фрагментах имеется нормальная гладкая ЭПС. Внешняя клеточная мембрана ряда нейронов оказывается размытой. Цистерны ЭПС могут контактировать с клеточной мембраной и вскрываться во внешнюю среду по типу экзоцитоза. Таким образом, внешняя клеточная мембрана тел нейронов местами оказывается образованной внутренней поверхностью набухших вакуолей или измененной ЭПС. В случае субмембранного расположения удлиняющихся цистерн ЭПС (см. рис. 7, а) и их вскрытия во внешнюю среду от тела клетки отсекаются узкие фрагменты (цитопласты).

Тела нейронов отличаются друг от друга также оптической плотностью нейроплазмы (см. рис. 5, а; 6, б). У измененных клеток ядра нередко имеют значительный субмембранный слой гетерохроматина. В контакте с телами нейронов располагаются фрагменты диссоциированных нервных отростков, которые частично принимают эллипсоидную форму цитосом (см. рис. 6, б). Все они покрыты внешней клеточной мембраной. Многие из них заполнены синаптическими пузырьками или плотнорасположенными микротрубочками. Пузырьки часто располагаются ровными рядами вдоль микротрубочек.

Обсуждение полученных данных. Таким образом, прижизненные светооптические и электронно-микроскопические исследования нейронов после обработки проназой свидетельствуют об их значительной структурной устойчивости. Глиocyты погибают при этом первыми, вероятно, в связи с тем, что они занимают наиболее поверхностное положение и первыми встречаются с ферментом. К тому же большинство их отростков имеют ламеллярную форму с высоким отношением площади поверхности к объему и, следовательно, крайне низкую по сравнению с телом нейрона, термодинамическую устойчивость. Переживание

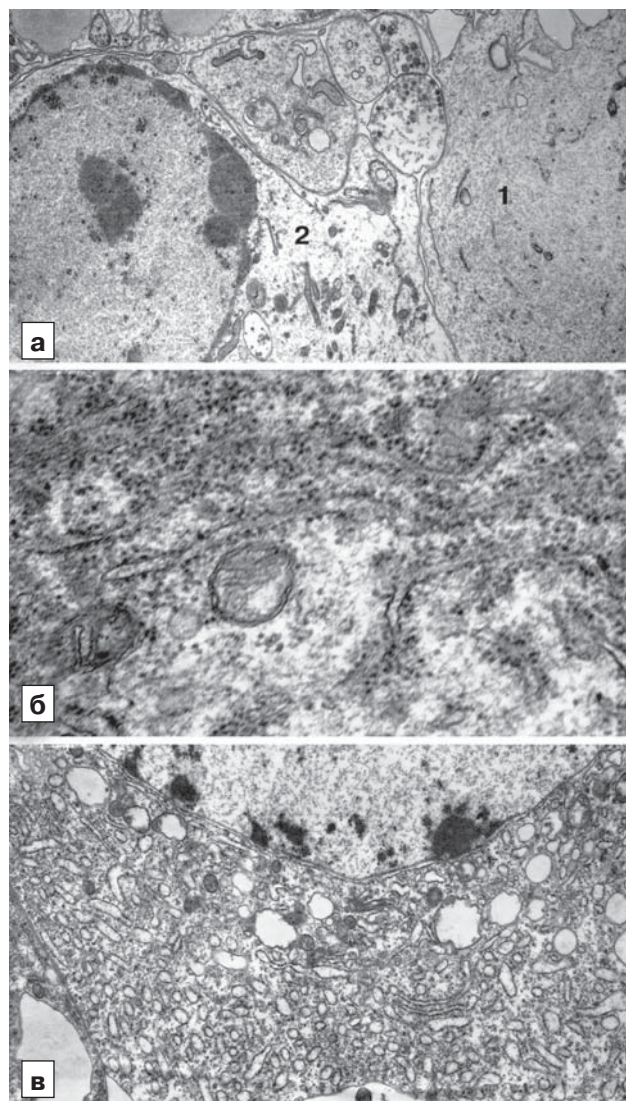


Рис. 5. Ультраструктура intactных (а, б) и измененных (в) нейронов моллюска, обработанных 0,4% проназой при их выделении.

1 — «темная» клетка; 2 — светлая клетка. Ув.: а — 20 000; б — 40 000; в — 25 000.

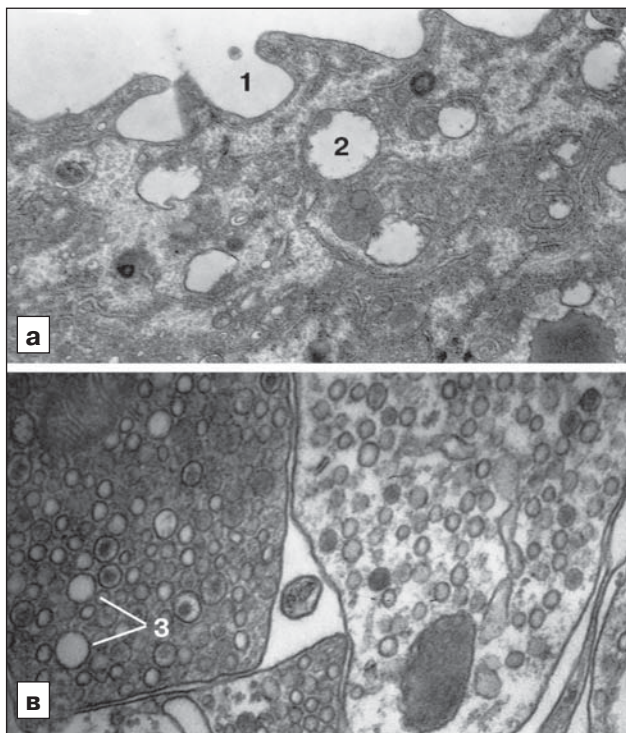


Рис. 6. Слияние вакуолей с внешней клеточной мембраной, их вскрытия наружу (а) и изменения везикулярного аппарата нервных отростков (б) при воздействии 0,4% раствора проназы.

1 — вскрывшаяся вакуоль; 2 — сформированная вакуоль; 3 — опорожненные крупные пузырьки в «темном» отростке. Ув.: а — 30 000; б — 40 000.

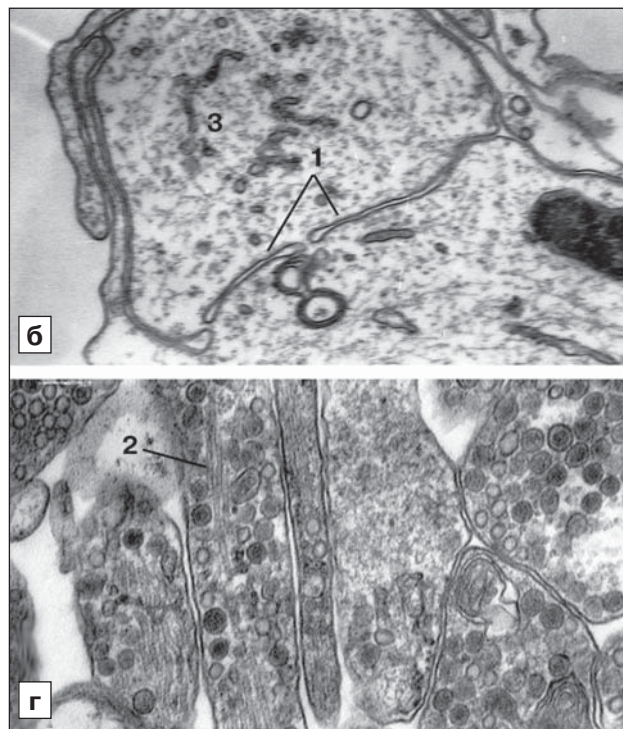


Рис. 7. Отделение фрагмента нейрона путем удлинения и слияния цистерн гладкой эндоплазматической сети (ЭПС) (а) и нервные отростки, заполненные медиаторными пузырьками (б) при воздействии 0,4% раствора проназы.

1 — удлиненные сливающиеся цистерны ЭПС; 2 — микротрубочки; 3 — формирующийся цитопласт, отделенный от тела нейрона цистернами ЭПС. Ув.: а — 30 000; б — 40 000.

клеток в растворе Рингера продолжается дольше, чем в альтерирующем растворе проназы. В опыте, так же как и в контроле, изменение объема нейрона в процессе его переживания происходит в две стадии. Вначале объем тела нейрона уменьшается. Возможно, это связано с понижением концентрации аминокислот и снижением количества белка [1, 2].

На II стадии отмечается закономерное увеличение объема тела нейрона, что, по-видимому, зависит от роста осмотического давления в результате внутриклеточного протеолиза и набухания цитоплазмы. Процесс завершается округлением и распадом нейронов.

Электронно-микроскопические исследования также демонстрируют значительную устойчивость ультраструктуры тел нейронов и диссоциированных фрагментов нервных отростков при обработке проназой. Во время диссоциации ганглиев клетки сохраняют органеллы, внешние клеточные мембраны и формируют сплошные мембраны вокруг фрагментированных отростков цитопластов. Как было показано, нейраминидаза, отщепляющая углеводные цепи от гликопротеи-

дов, полностью блокирует образование синцития и слияние клеток [6]. Наши исследования также убедительно показывают невозможность образования синцитиальных связей между телами и отростками нейронов под влиянием кратковременной обработки проназой. Следовательно, синцитиальные связи, обнаруженные ранее в культуре ткани [10], не могут быть искусственными образованиями, связанными с обработкой нейронов протеолитическими ферментами.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 08-04-90033-Бел_а и 09-01-00473.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вепринцев Б.Н., Гелетюк В.И. и Костенко М.А. Культивирование нервных тканей моллюсков *Limnaea stagnalis* и *Helix pomatia*. В кн.: Руководство по культивированию нервной ткани. М., Наука, 1976, с. 190–210.
2. Гелетюк В.И. Электрические и морфологические характеристики нейронов изолированного мозга моллюска *Limnaea stagnalis* в условиях культуры ткани. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пушино, 1973.
3. Гончар А.М., Коган А.С. и Салганик Р.И. Раневой процесс и иммобилизованные протеолитические ферменты. Новосибирск, Наука, 1986.

4. Керкис А.Ю., Урженко А.В. и Жданова Н.С. Электронно-микроскопическое изучение слияния соматических клеток млекопитающих под действием инактивированного вируса Сендай. Цитология, 1978, т. 20, № 10, с. 1203–1205.
5. Костенко М.А. Внутриклеточная регуляция образования и роста нейрональных отростков: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Пушино, 1985.
6. Ненашев В.А. Слияние клеточных и модельных липидных мембран. В кн.: Взаимодействие и слияние мембран. Серия: Биофизика мембран. Итоги науки и техники. М., ВИНТИ, 1984, с. 87–122.
7. Петрова И.С. Протеолитические ферменты актиномицетов. М., Наука, 1976.
8. Сотников О.С. Динамика структуры живого нейрона. Л., Наука, 1985.
9. Сотников О.С. Статика и структурная кинетика живых асинаптических дендритов. СПб., Наука, 2008.
10. Сотников О.С., Малашко В.В. и Рыбакова Г.И. Синцитиальная связь нейронов в культуре ткани в раннем онтогенезе. Морфология, 2007, т. 131, № 2, с. 7–15.
11. Сотников О.С. и Ястрембски М. Подвижность структур живых миелиновых нервных волокон при действии протеолитических ферментов. Бюл. экспер. биол., 1989, т. 107, № 5, с. 621–624.
12. Фролов В.А., Быченко А.Б., Дунина-Барковская А.Я. и др. Слияние экспрессирующих гемагглютинин клеток NJH 3T3 HAb2 с клетками других линий. Биол. мембраны, 1995, т. 12, № 3, с. 288–293.
13. Curtis A.S. The Cell Surface: Its Molecular Role in Morphogenesis. London, Logos Press, Acad. Press, 1967.
14. Goldberg J., Mills L. and Kater S. Novel effects of serotonin on neurite outgrowth in neurons cultured from embryos of *Helisoma trivolvis*. J. Neurobiol., 1991, v. 22, № 2, p. 82–194.
15. Ishii K. Induction of neurite outgrowth in BIM cells by treatment with a protein kinase inhibitor, H 7. Annu. Rept. Inst. Virus Res. Kyoto Univ., 1990, v. 33, p. 59.
16. Leprince P., Rogister B., Delree P. et al. Proteases et inhibiteurs de proteases: implications multiples dans le developement et le vieillissement cerebral. Rev. ONO, 1991, № 12–13, p. 30–38.
17. Ou W.-J., Ito A., Okazaki H. and Omura T. Purification and characterization of a processing protease from rat liver mitochondria. EMBO J., 1989, v. 8, № 9, p. 2605–2612.
18. Quigley J., Braithwaite S. and Armstrong P. Metalloproteinases of the developing sea urchin embryo. J. Cell Biol., 1990, v. 111, № 5, Pt. 2, p. 14–18.
19. Silani V., Donato M., Villani R. and Scarlato G. Human brain primary cultures. Ital. J. Neurol. Sci., 1991, v. 12, № 5, p. 26–29.

Поступила в редакцию 05.05.09

CHANGES OF MOLLUSCAN NEURONS UNDER THE INFLUENCE OF PROTEOLYTIC ENZYMES

O.S. Sotnikov, M.V. Lukovnikova, N.Yu. Vasyagina, A.A. Laktionova and N.M. Paramonova

The goal of the work was to study the structure of neurons treated with proteases and to elucidate if this could lead to the formation of the interneuronal syncytial connections. In the first series of experiments, phase contrast observation of the living dissociated ganglionic neurons of the mollusc *Lymnaea stagnalis* treated with 0.4% pronase, demonstrated a retraction of nerve processes and a two-phase change of the cell body volume. At the first stage, the soma volume decreased, on the average, for 82.5 min by 12.1%; subsequently, the volume increased, on average, by 14.1 %. Signs of neuronal vital activity in Ringer's solution were observed, on the average, for 828 min, while in pronase solution their duration was 1.4 times shorter. In the second series of experiments, the study of neuronal ultrastructure has demonstrated in many cases the integrity of mitochondria, rough and smooth endoplasmic reticulum (ER), Golgi complex, light and granular vesicles, nuclear structure, and the preservation of the optical density of neuropil. The cells making contacts after centrifugation form uniform intercellular clefts of about 20 nm. Point approaches of membranes were very rare. No signs of syncytial connections were detected. Elongation and fusion of smooth ER cisterns separated the fragments of soma from relatively undamaged cells. Some neurons were damaged, they contained numerous vacuoles formed by swollen mitochondria and ER cisterns. The nerve process fragments, detached during the dissociation, were surrounded by the normal plasma membrane.

Key words: *neuron, dissociation, pronase, ultrastructure, intravital study.*

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