

О.С. Сотников¹, Л.Е. Фрумкина², С.А. Новаковская³ и Н.Н. Боголепов²

СЛИЯНИЕ НЕЙРОНОВ МОЗГА У ЭМБРИОНОВ КРЫС

¹ Лаборатория функциональной морфологии и физиологии нейрона (зав. — проф. О.С. Сотников), Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург; ² отдел исследования мозга (зав. — академик РАМН Н.Н. Боголепов), Научный центр неврологии РАМН, Москва; ³ Центр электронной и световой микроскопии (зав. — канд. биол. наук С.А. Новаковская), Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, e-mail: sotnikov@kolt.infran.ru

Исследованы синцитиальные межнейронные связи в сенсомоторной коре и хвостом ядре 20 крыс 14–22 сут внутриутробного развития. Показано, что при крайне слабом развитии глиальных отростков многие тела нейронов и их отростки непосредственно контактируют друг с другом. Контактующие мембраны при этом образуют продолговатые и точечные контакты, напоминающие щелевые и плотные соединения. В результате межклеточная щель испытывает варикозноподобные деформации. В области контактов формируются едва заметные мембранные поры, которые расширяются в крупные перфорации. Края перфораций представляют собой закругленную форму слившихся плазмолемм смежных нейронов. Внутри перфораций образуются остаточные везикулярные мембранные тельца. Отделы спаренных мембран между перфорациями фрагментируются, увеличивая число остаточных телец до тех пор, пока нейроны не сливаются полностью, объединяя нейроплазму контактирующих клеток. Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что слияние нейронов в коре большого мозга и ядрах ствола мозга позвоночных возможно не только при патологии, но и у животных в норме на стадии внутриутробного развития.

Ключевые слова: нейроны, мембранные поры, синцитиальная связь, мембранные контакты

В последнее время появились публикации о формировании в мозгу синцитиального слияния нейронов при патологии. Так при гипоксии слияние нейронов описано в коре большого мозга [4, 5]. Еще ранее при гипоксии появление синцитиальных связей в коре большого мозга отмечено в работах Н.Н. Боголепова и соавт. [1, 2], В.В. Семченко и соавт. [7]. При значительных передозировках L-глутамата обнаружено явление сближения и слияния зернистых нейронов мозжечка [6]. Слияние многих «клеток мозга» с образованием гигантских многоядерных клеток выявлено при СПИДе, бугорчатом склерозе, лейкоэнцефалите и других инфекциях [13, 17]. Слияние пре- и постганглионарных волокон в синапсе обнаружено при валлеровской дегенерации в симпатических узлах [8]. Неоднократно отмечалось также явление слияния цитоплазмы нейронов с глиальными или стромальными костномозговыми стволовыми клетками при разных видах патологии [10, 12, 14, 16].

Таким образом, можно считать установленным, что в нервной системе при патологии возможно синцитиальное слияние нейронов друг с другом и с ненервными клетками.

Перфорации в мембранах смежных клеток, приводящие к образованию синцития (синцитиальные перфорации), в норме у взрослых животных показаны в коре большого мозга, симпатических узлах, гиппокампе, мозжечке [18, 19, 21, 22]. Однако все же есть необходимость в продолжении исследований синцития у животных в норме. Сложилось впечатление, что в раннем онтогенезе

и в культуре ткани это явление встречается чаще, чем во взрослом организме [20]. Поэтому нами были проведены исследования коры большого мозга эмбрионов человека [9], которые выявили множественные межнейронные синцитиальные перфорации. К сожалению, их также следовало отнести к числу патологических изменений, так как эмбрионы были получены во время операций искусственного прерывания беременности. Поэтому целью данного исследования было изучение мозга эмбрионов животных в норме.

Материал и методы. Исследование проведено в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР).

Изучены сенсомоторная кора и хвостатое ядро 20 крыс Вистар 14–22 сут внутриутробного развития. Время зачатия определяли по ежедневному анализу вагинальных мазков. Зародышей извлекали из матки путем кесарева сечения, проводимого под эфирным наркозом. Через 10 мин мозг животных погружали в 6,25% раствор глутаральдегида на фосфатном буфере (0,01 М; pH 7,2–7,4) и помещали на ночь в холодильник при 4 °С. Из фронтальных срезов мозга выделяли кусочки сенсомоторной коры и хвостатое ядро. Затем материал на 30–60 мин опускали в свежий раствор глутаральдегида той же концентрации и промывали фосфатным буфером. Далее кусочки погружали в 2% раствор OsO₄ на 2 ч, обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и заливали в эпон-812. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-5 (Швеция) и контрастировали по Рейнольдсу. Просмотр срезов и фотосъемку производили в электронном микроскопе Hitachi (Япония). Негативы сканировали в просвечивающем режиме с помощью сканера UMAX Astra 4 000V (Тайвань).

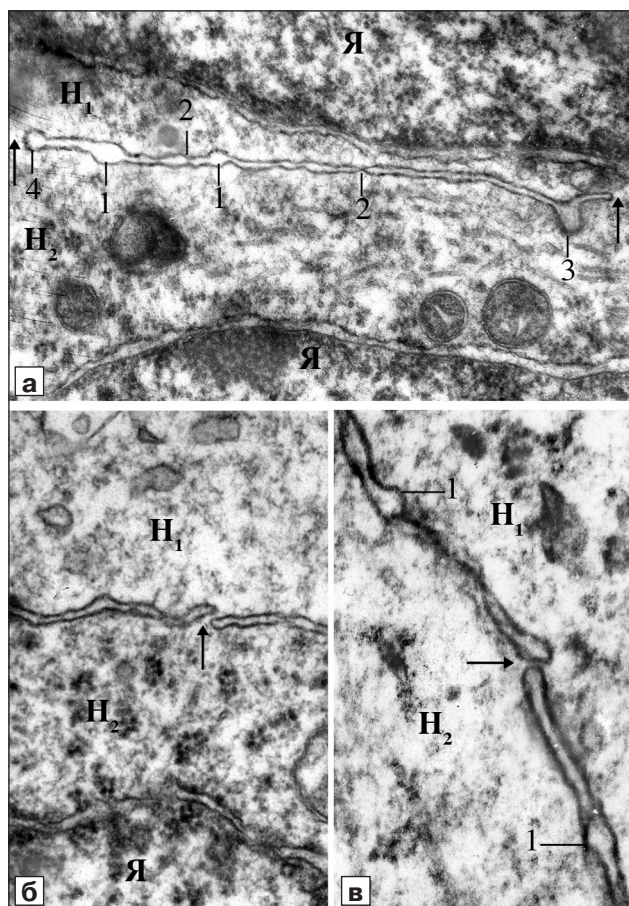


Рис. 1. Варикозные деформации межклеточной щели (а) и порообразные межнейрональные перфорации контактирующих плазмолемм (б, в).

а, в — сенсомоторная кора эмбриона 18 сут развития; б — хвостатое ядро эмбриона 18 сут развития. 1 — варикозности межклеточной щели; 2 — точечные мембранные контакты; 3 — эндоцитоз; 4 — закругленный конец прерванных мембран. Стрелки — мембранные перфорации смежных нейронов. H_1 , H_2 — нейроны; Я — ядро. Ув.: а — 10 000; б — 11 000; в — 20 000.

Результаты исследования. Нейроны в исследуемый период имеют сравнительно тонкий слой нейроплазмы, окружающий ядро. Слаборазвитые отростки глиоцитов редко отделяют тела нейронов, благодаря чему они вплотную прилежат друг к другу и нередко образуют мембранные контакты. В ряде случаев между смежными клетками обычно ровная межклеточная щель имеет множественные чередующиеся локальные сужения и расширения. Возникает своеобразная картина варикозноподобных деформаций щели (рис. 1, а). Часто в области сужений, напоминающих точечные щелевые или плотные контакты, возникают перфорации, сообщающие нейроплазму контактирующих клеток (см. рис. 1, б, в).

Вначале в мембранах смежных клеток появляются едва заметные поры, которые постепенно расширяются, и при этом образуются цитоплазматические мостики, соединяющие соседние ней-

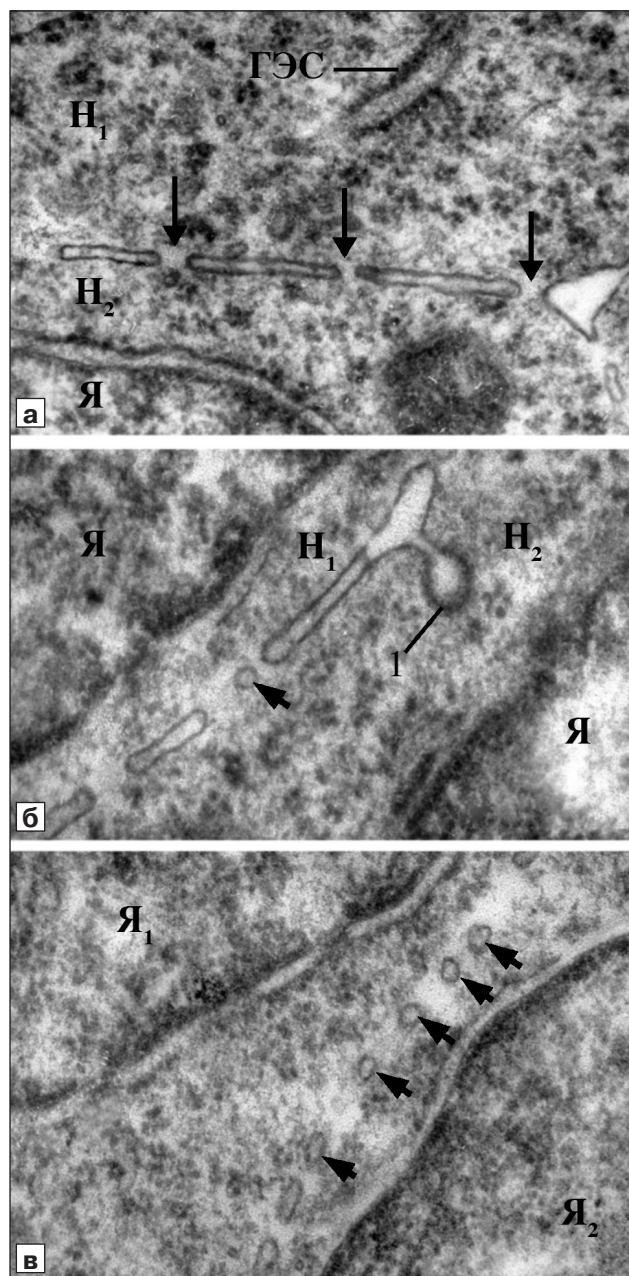


Рис. 2. Фрагментация контактирующих плазмолемм смежных нейронов в сенсомоторной коре эмбриона 14 сут развития.

а — множественные межнейронные перфорации (тонкие стрелки); б — везикулярное остаточное тельце (толстая стрелка) в межнейрональной синцитиальной перфорации; в — множественные везикулярные остаточные тельца (толстые стрелки) на месте бывших контактирующих плазмолемм слившихся смежных нейронов. 1 — эндоцитоз; ГЭС — гранулярная эндоплазматическая сеть; H_1 , H_2 — нейроны; $Я_1$, $Я_2$ — ядра. Ув.: а — 11 000; б, в — 19 000.

роны. Обращает на себя внимание то, что края перфораций — это не простые разрывы мембран, а округлые образования слившихся плазмолемм смежных клеток (см. рис. 1, б, в), как это всегда происходит с липидными структурами. Возможно образование нескольких перфораций, которые располагаются в один ряд (рис. 2, а).

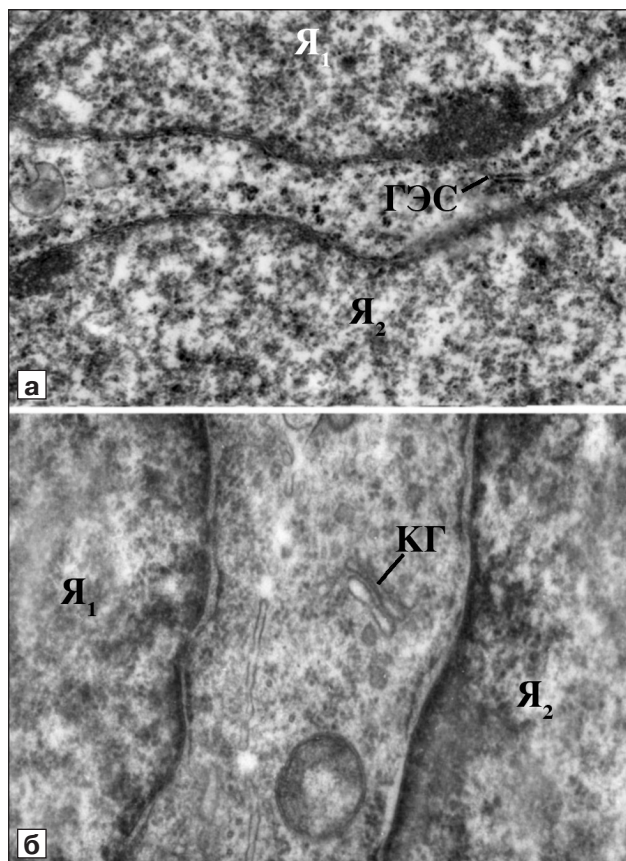


Рис. 3. Варианты слившихся двуядерных нейронов (а, б).

Я₁, Я₂ — ядра нейрона; КГ — комплекс Гольджи; ГЭС — гранулярная эндоплазматическая сеть. Ув.: а — 5800, б — 11 000.

Между фрагментами перфорированных плазмолемм образуются везикулярные остаточные тельца. Они могут быть одиночными (см. рис. 2, б) или множественными (см. рис. 2, в).

Выявление таких картин фактически свидетельствует о полном слиянии нейронов. Везикулярные остаточные тельца со временем, видимо, лизируются, а на препаратах выявляются двуядерные клетки уже без остатков плазмолемм между ними (рис. 3). Встречается слияние трех нейронов (рис. 4, а). Примечательно, что во многих случаях слияния нейронов отмечено явление эндоцитоза (см. рис. 1, а; 2, б). Возможно слияние тел с отростками нейронов и параллельно расположенных отростков между собой (см. рис. 4, а), а также отростков, имеющих перпендикулярное направление по отношению друг к другу (см. рис. 4, б), судя по расположению микротрубочек.

Следует подчеркнуть, что у сливающихся нейронов ядра имеют нормальное строение, нет признаков повреждения органелл, отмечается значительная концентрация свободных рибосом (см. рис. 1, б; 2, 3, а), хорошо выражена гранулярная эндоплазматическая сеть (см. рис. 2, а; 3, а), комплекс Гольджи (см. рис. 3, б), митохондрии (см. рис. 1, а; 4, б), микротрубочки (см. рис. 1, а;

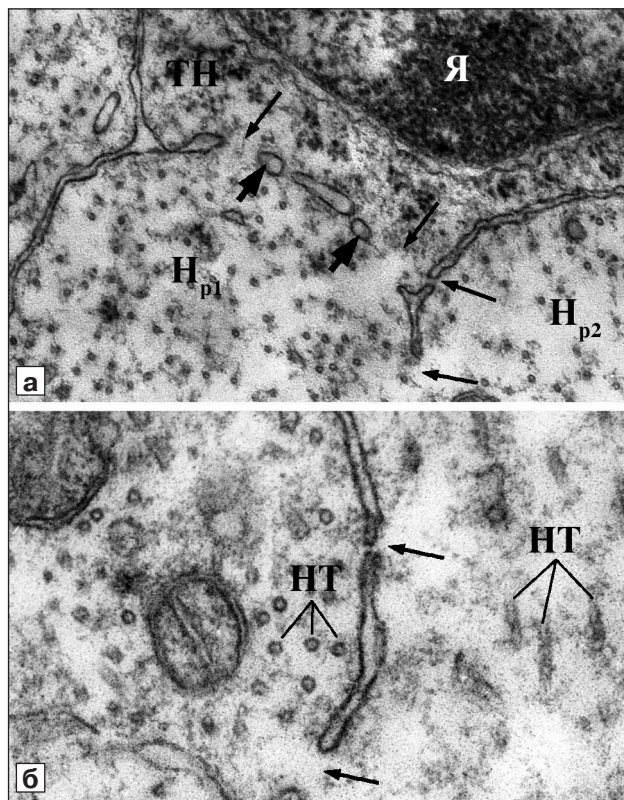


Рис. 4. Варианты слияния отростков нейронов, сенсомоторная кора эмбриона 22 сут развития.

а — слияние двух отростков и тела нейрона; б — слияние двух отростков, имеющих приблизительно перпендикулярное направление по отношению друг к другу. Тонкие стрелки — синцитиальные перфорации; толстые стрелки — остаточные тельца. Н_{р1}, Н_{р2} — отростки нейронов; НТ — нейротрубочки; ТН — тело нейрона; Я — ядро. Ув.: а — 11 000; б — 14 000.

4, б). Обычную структуру сохраняют митохондрии, находящиеся рядом с перфорациями контактирующих мембран. У нейронов сохранена и способность к эндоцитозу.

Обсуждение полученных данных. Таким образом, на основании электронно-микроскопических исследований мозга эмбрионов крыс 14–22 сут развития, извлеченных со всеми возможными предосторожностями из самок, имевших нормальную беременность, можно сделать следующие заключения. Во-первых, синцитиальные связи и слияния нейронов не являются характерной чертой только патологии нервной системы, но имеются закономерно на определенных стадиях онтогенеза. Эти данные делают понятными находки синцития в нервной системе в норме у взрослых животных [15, 18, 22]. Двуядерные и многоядерные клетки в нервной системе у позвоночных описывали неоднократно [3, 11], и теперь появляется убеждение в том, что часть из них образованы путем слияния нейронов в норме. Во-вторых, тот факт, что синцитиальная связь и слияние клеток нередко встречаются в

мозгу животных на ранних стадиях онтогенеза, наряду с отсутствием в исследуемый период у эмбрионов химических синапсов и наличием значительного числа авезикулярных контактов [2], свидетельствует об ином по сравнению со взрослыми особями способе межнейронных взаимосвязей у них. В ЦНС в это время преобладают электрические межклеточные взаимодействия [2]. Примечательно, что при патологии в организме снова превалирует электрическая форма межнейронного общения. Полученные данные фактически затрагивают принципиально новый класс нейрофизиологических явлений и поэтому заслуживают дальнейшего углубленного исследования.

Работа поддержана грантами РФФИ № 10-04-90000-Bel_a и № 09-01-00473.

ЛИТЕРАТУРА

- Боголепов Н.Н., Павловская Н.И. и Яковлева Н.И. Ультраструктура контактов парных нейронов в постгипоксическом периоде. *Арх. анат.*, 1980, т. 79, вып. 9, с. 15–24.
- Боголепов Н.Н., Яковлева Н.И., Фрумкина Л.Е. и Королева С.К. Различные виды неспецифических межклеточных контактов в развивающемся мозге крысы. *Арх. анат.*, 1986, т. 40, вып. 2, с. 45–53.
- Иванова В.Ф. Многоядерные клетки (образование, строение, биологическое значение). *Арх. анат.*, 1984, т. 87, вып. 12, с. 80 – 86
- Пальцын А.А., Колокольчикова Е.Г., Константинова Н.Б. и др. Образование гетерокарионов как способ регенерации нейронов при посттравматическом повреждении коры мозга у крыс. *Бюл. экспер. биол.*, 2008, т. 146, № 10, с. 407–410.
- Пальцын А.А., Константинова Н.Б., Романова Г.А. и др. Роль слияния клеток в физиологической и репаративной регенерации коры головного мозга. *Бюл. экспер. биол.*, 2009, т. 148, № 11, с. 580–583.
- Самосудова Н.В., Ларионова Н.П. и Чайлахян Л.М. Патологическое слияние зернистых клеток мозжечка лягушки под влиянием L-глутамата *in vitro*. *Докл. РАН*, 1994, т. 336, № 3, с. 406–409.
- Семченко В.В., Боголепов Н.Н. и Степанов С.С. Синаптическая пластичность неокортекста белых крыс при диффузно-очаговых повреждениях головного мозга. *Морфология*, 2005, т. 128, вып. 4, с. 76–81.
- Сотников О.С., Арчакова Л.И., Новаковская С.А. и Соловьева И.А. Проблема синцитиальной связи нейронов при патологии. *Бюл. экспер. биол.*, 2009, т. 147, № 2, с. 207–210.
- Сотников О.С., Новаковская С.А. и Соловьева И.А. Синцитиальные перфорации нейрональных мембран эмбриона человека. *Онтогенез*, 2011, т. 42, № 1, с. 42–52.
- Узденский А.Б. Управляемый некроз. Биологические мембраны, 2010, т. 27, № 1, с. 7–17.
- Ярыгин Н.Е. и Ярыгин В.Н. Патологические и приспособительные изменения нейрона. М., Медицина, 1973.
- Ackman J.B., Siddigi F., Walikonis R.S. and LoTurco J.J. Fusion of microglia with pyramidal neurons after retroviral infection. *J. Neurosci.*, 2006, v. 26, № 44, p. 11413–11422.
- Aguzzi A., Wagner E.F., Netzer K.O. et al. Human foamy virus proteins accumulate in neurons and induce multinucleated giant cells in the brain of transgenic mice. *Am. J. Pathol.*, 1993, v. 142, № 4, p. 1061–1071.
- Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M. et al. Fusion of bone marrow – derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 2003, v. 425, № 6961, p. 968–973.
- Archakova L.I., Sotnikov O.S., Novakovskaya S.A. et al. Syncytial cytoplasmic anastomoses between neurites in caudal mesenteric ganglion cells in adult cats. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2010, v. 40, № 4, p. 447–450.
- Bae J.S., Han H.S., Youn D.H. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration. *Stem Cells*, 2007, v. 25, № 5, p. 1307–1316.
- Marotti J.D., Savitz S.L., Kim W.K. et al. Cerebral amyloid angiitis processing to generalized angiitis and leucoencephalitis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2007, v. 33, № 4, p. 474–479.
- Paramonova N.M. and Sotnikov O.S. Cytoplasmic syncytial connections between neuron bodies in the CNS of adult animals. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2010, v. 40, № 1, p. 73–77.
- Santander R.S., Cuadrado G.M. and Sáez M.R. Exceptions to Cajal's neuron theory: communicating synapses. *Acta Anat.*, 1988, v. 132, p. 74–76.
- Sotnikov O.S., Malashko V.V. and Rybakova G.I. Fusion of nerve fibers. *Dokl. Biol. Sci.*, 2006, v. 410, p. 361–363.
- Sotnikov O.S., Malashko V.V. and Rybakova G.I. Syncytial coupling of neurons in tissue culture and early ontogenesis. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2008, v. 38, № 4, p. 323–331.
- Sotnikov O.S., Paramonova N.M. and Archakova L.I. Ultrastructural analysis of interneuronal syncytial perforations. *Cell Biol. Int.*, 2009, v. 34, № 4, p. 361–364.

Поступила в редакцию 07.07.10
Получена после доработки 13.02.11

FUSION OF BRAIN NEURONS IN RAT EMBRYOS

*O.S. Sotnikov, L.Ye. Frumkina, S.A. Novakovskaya
and N.N. Bogolepov*

Syncytial interneuronal connections were studied in the sensorimotor cortex and caudate nucleus of twenty 14–22 day rat embryos. It was shown that with the extremely weak development of glial processes, many neuronal bodies and their processes were in the direct contact with each other. The contacting membranes in these areas formed oblong and dot-like contacts resembling gap and tight junctions. As a result, the intercellular cleft experienced varicose-like deformations. In the area of contacts, barely visible membrane pores were formed that broadened to form large perforations. The perforation margins presented the rounded shape of fused plasma membranes of adjacent neurons. Inside the perforations, residual vesicular membranous bodies were formed. The areas of the paired membranes between perforations were fragmented, thus increasing the number of residual vesicles, until the neurons fused with each other completely by unifying the neuroplasm of contacting cells. The results of these studies suggest that the fusion of neurons in vertebrate brain cortex and brainstem nuclei could occur not only in pathology, but also in normal animals at the stage of embryonic development.

Key words: *neurons, membrane pores, syncytial connection, membrane contacts*

Laboratory of Neuron Functional Morphology and Physiology, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg; Department of Brain Research, RAMS Scientific Center of Neurology, Moscow; Center of Electron and Light Microscopy, National Academy of Sciences Institute of Physiology, Minsk, Belarus