

© Н.В. Самосудова, В.П. Реутов, Н.П. Ларионова, 2011
УДК 611.817.1:616.831-005.1:597.82

Н.В. Самосудова¹, В.П. Реутов² и Н.П. Ларионова¹

СЛИЯНИЕ КЛЕТОК-ЗЕРЕН МОЗЖЕЧКА ЛЯГУШКИ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ГЛУТАМАТА И NO-ГЕНЕРИРУЮЩЕГО СОЕДИНЕНИЯ

¹ Лаборатория изучения информационных процессов на клеточном и молекулярном уровнях (зав. — д-р биол. наук Ю.В. Панчин), Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН; ² лаборатория функциональной нейробиологии (зав. — канд. биол. наук М.М. Свинов), Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

В условиях моделирования инсульта изучали ультраструктурные изменения в клетках-зернах мозжечка после токсического воздействия глутамата (Glu) и NO-генерирующего соединения. Показано, что в хроматине ядер под воздействием токсических доз Glu происходят изменения двух типов. В одних случаях отмечено появление клеток с практически полностью деконденсированным хроматином в ядре, а в других — с частично деконденсированным хроматином. Патологическое слияние клеток-зерен наблюдали в обоих случаях. Токсическое воздействие NO-генерирующего соединения на клетки-зерна также вызывало появление клеток с практически полностью и частично деконденсированным (хлопьевидным) хроматином в ядрах. Клетки-зерна с разным типом хроматина были способны сливаться друг с другом. Таким образом, Glu и NO, вызывая изменения хроматина ядер, активируют процессы формирования кластеров из клеток-зерен, которые способны к слиянию цитоплазмы и образованию многоядерных конгломератов. Обсуждается возможная физиологическая роль слияния клеток-зерен мозжечка под воздействием высоких концентраций Glu и NO-генерирующего соединения. Этот процесс рассматривается как реализация компенсаторно-приспособительных реакций в экстремальных условиях, наблюдающихся при инсультах и окислительных стрессах.

Ключевые слова: *мозжечок, клетки-зерна, хроматин, слияние клеток*

В настоящее время имеются данные, свидетельствующие о том, что в нервной системе кроме синаптической и контактной электрической связи (щелевые и плотные контакты) возможно образование цитоплазматической межнейронной связи [3, 8–10, 12, 13]. Считается, что характерными особенностями образования последней являются так называемые синцитиальные перфорации, которые формируются с участием поврежденных плазмолемм, имеющих закругленные края и в просвете между ними — остаточные мембранные структуры [3]. При образовании межнейронной связи в норме процессу слияния нейронов может способствовать отсутствие глиальных прослоек между клетками [3].

Ранее было показано, что глутамат (Glu) и нитроксид (NO)-генерирующее соединение в высокой концентрации (1 ммоль) способны приводить к гибели нервных и глиальных клеток, вызывая повреждение плазмолеммы и внутриклеточных мембран, а также отёк нервной ткани [1, 6], который влечет за собой набухание клеток и гибель большинства органелл. В таких условиях под действием Glu хроматин ядер клеток-зерен мозжечка становится деконденсированным, а клетки приобретают способность формировать кластеры и сливаться друг с другом [2].

Слиянию предшествуют мембранные перестройки, включающие несколько стадий: 1) тес-

ное сближение мембран (плазмолемм); 2) формирование септального, а затем плотного контакта; 3) инвагинации общей мембраны с образованием пузырьков и их отпочкованием; 4) появление цитоплазматической непрерывности [7]. Остается невыясненным, является ли слияние нервных клеток компенсаторно-приспособительной реакцией или эти явления ведут к дальнейшей деградации клеток-зерен мозжечка.

При развитии инсультов основными действующими факторами повреждения являются Glu-нейротоксичность, стойкое повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , вызываемое токсическим воздействием Glu, и повышенное образование активных форм азота (NO, NO_2 и др.), которое связано с увеличением концентрации ионов Ca^{2+} . Цель настоящей работы — при моделировании условий, характерных для инсульта, провести сравнительное исследование возможности слияния клеток-зерен мозжечка лягушки при токсическом воздействии как Glu, так и NO-генерирующего соединения, а также способности этих веществ влиять на изменение структуры хроматина ядер клеток-зерен.

Материал и методы. Исследован мозжечок взрослой лягушки — *Rana temporaria* (n=15), молекулярный слой коры которого представляет собой зону синаптического контакта аксонов клеток-зерен — параллельных волокон (ПВ) и ден-

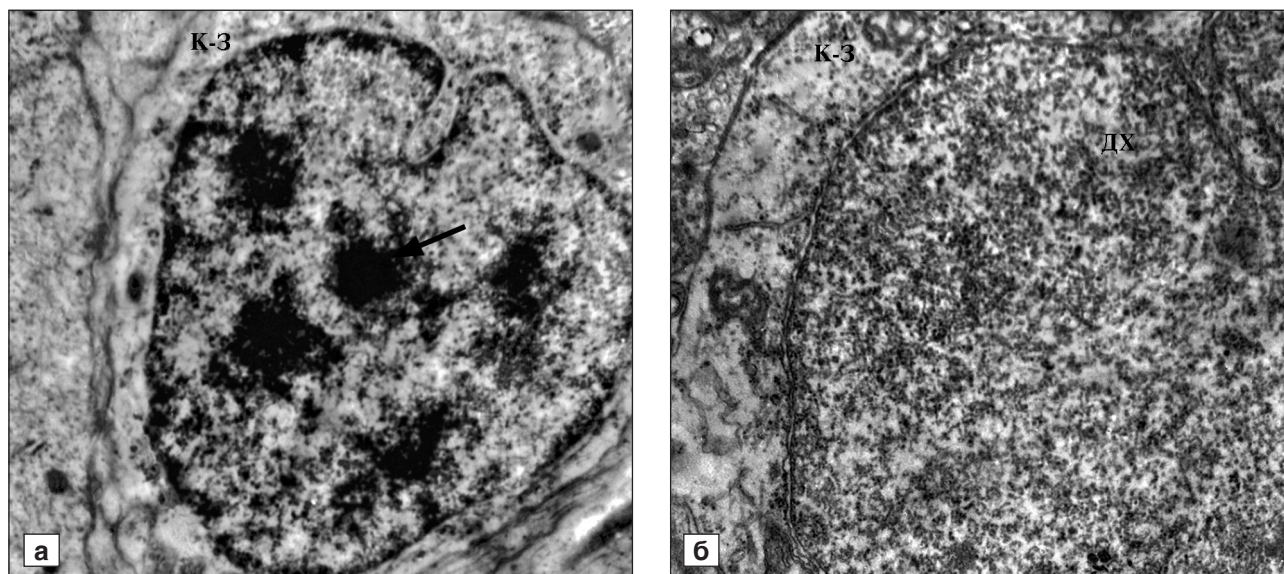


Рис. 1. Ядра клеток-зерен (К-3) мозжечка лягушки в норме (а) и после воздействия глутамата (1 ммоль, 2 ч) (б).

а — ядро с плотными глыбками хроматина (стрелка); б — ядро с деконденсированным хроматином (ДХ). Ув.: а — 12 600; б — 21 000.

дритов клеток Пуркинье (КП). Glu, как основной нейромедиатор, осуществляет взаимодействие в синаптическом контакте ПВ — КП. Работа проведена в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 775 от 12.08. 1977 г. МЗ СССР). Исследовали клетки зернистого слоя мозжечка, выделенного из мозга и помещенного в раствор Рингера. Выполнены следующие варианты эксперимента: I — фиксация мозжечка сразу после выделения из мозга (норма); II — фиксация после инкубации мозжечка (2 ч) в растворе Рингера с Glu (1 ммоль); III — фиксация после электрической стимуляции мозжечка в растворе Рингера с Glu (1 ммоль, 1 ч), с последующей инкубацией в том же растворе (1 ч). Поверхность молекулярного слоя, т.е. преимущественно ПВ, раздражали с помощью биполярных электродов с частотой 0,1 Гц и силой тока 10^{-4} – 10^{-5} А; IV — фиксация после инкубации в растворе Рингера с NaNO_2 (2 ч) и V — фиксация после стимуляции мозжечка в растворе Рингера с NaNO_2 (1 ммоль, 1 ч) с последующим пребыванием в том же растворе (1 ч). Стимуляция мозжечка в присутствии Glu или NO служила источником дополнительного их накопления в мозжечке помимо содержания в инкубирующем растворе. Нитрит натрия использовали как вещество, способное генерировать NO в результате восстановления ионов NO_2^- в NO [4]. Состав оксигенированного раствора Рингера: Na^+ — 115 ммоль, K^+ — 2,5 ммоль, Ca^{2+} — 1,2 ммоль, NaHCO_3 — 6,0 ммоль, 2 г глюкозы на 1 л раствора, pH 7,2–7,4. Фиксацию осуществляли 2,5% раствором глutarового альдегида, приготовленного на 0,1 М Na-каодилатном буфере (pH 7,2), содержащем 0,5% танниновой кислоты и 3% сахарозы (1,5 ч при 4 °C). Далее материал фиксировали в 1% OsO_4 (pH 7,2) в том же буфере, в течение 1 ч при 4 °C. Материал обезжизивали в этиловом спирте возрастающей концентрации, абсолютном спирте и ацетоне, с последующим заключением в смесь эпона—аралдита. Срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Срезы просматривали в электронном микроскопе JEM 100 SX (Япония) при ускоряющем напряжении 90 кВ.

Результаты исследования. При сравнении действия высоких концентраций (1 ммоль) Glu (рис. 1, 2) и NO-генерирующего соединения (рис. 3, а) на структуру клеток-зерен мозжечка обнаружено, что не только Glu (см. рис. 1, а, б), но и NO-генерирующее соединение может вызывать деконденсацию хроматина ядер этих клеток (см. рис. 3, а). Однако было выявлено, что в присутствии Glu и NO-генерирующего соединения встречаются клетки с хроматином, отличающимся от деконденсированного (см. рис. 2 а, б). Этот хроматин содержал мелкие и менее плотные, чем в норме, глыбки. Такой хроматин мы назвали «частично деконденсированным» (см. рис. 2, а).

При воздействии NO-генерирующего соединения были выявлены клетки с полностью деконденсированным хроматином (см. рис. 3 а), которые имеют общую плазмолемму, поврежденную в отдельных ее участках.

На рис. 3, а представлен разрыв общей (для двух клеток, находящихся в процессе слияния) плазмолеммы и образование цитоплазматической непрерывности между ними. Имеются также клетки с хроматином, который отличается как от конденсированного, так и от деконденсированного хроматина. Это особый «хлопьевидный» хроматин, который можно охарактеризовать как частично деконденсированный. Встречаются конгломераты с практически полным слиянием клеток, внутри таких образований видны обрывки плазмолемм составляющих их клеток (см. рис. 3, б).

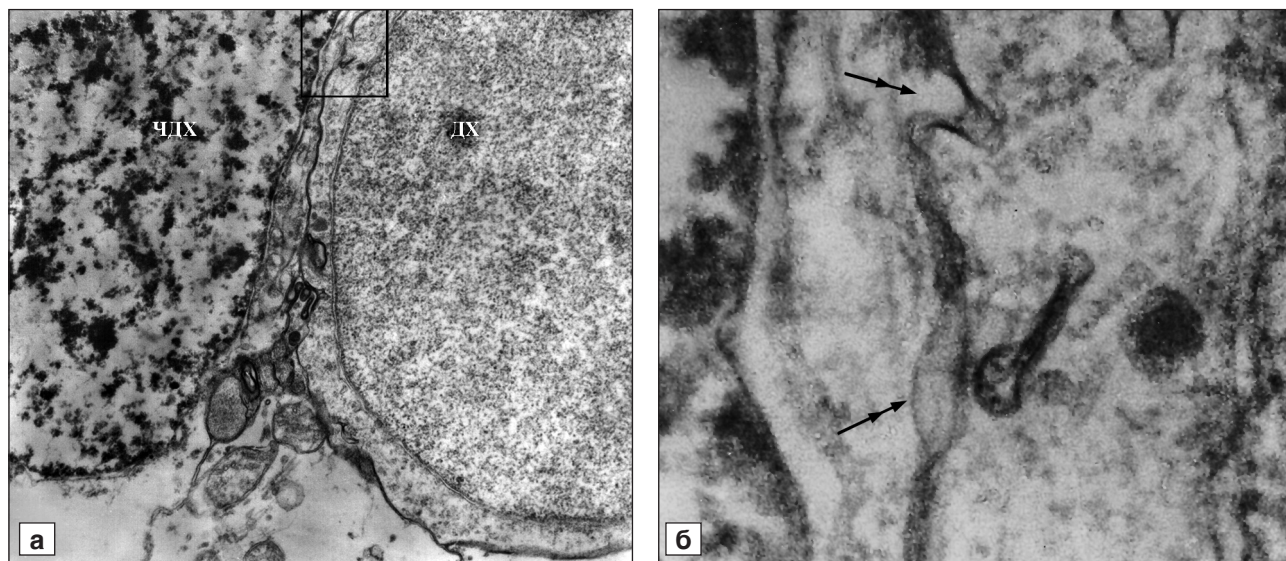


Рис. 2. Структура ядер клеток-зерен (К-З), тесное соприкосновение и перфорация их плазмолемм после стимуляции мозжечка в присутствии глутамата (1 ммоль).

а — две К-З, в одной из которых присутствует ядро с частично деконденсированным хроматином (ЧДХ), в другой — ядро с полностью деконденсированным хроматином (ДХ). Обе клетки соединены общей плазмолеммой, которая, по-видимому, находится на стадии плотного контакта, и включает измененные участки (рамка); б — фрагмент, очерченный рамкой на рис. 2, а; инвагинация плазмолеммы (стрелка) в сторону клетки с деконденсированным хроматином ядра и повреждение плазмолеммы ниже инвагинации (двойная стрелка). Ув.: а — 18 000; б — 90 000.

Следует подчеркнуть, что в кластерах клеток мы не наблюдали ядер с нормальной структурой.

Клетки-зерна при использовании метода электронной микроскопии не отличаются друг от друга по структуре ядра, если они зафиксированы в нормальных физиологических условиях. Однако под влиянием токсических доз Glu и NO выявляются клетки-зерна с разным строением ядер. Одни клетки-зерна реагируют и на Glu, и на NO полной деконденсацией хроматина, другие — только частичной его деконденсацией. Разная структура хроматина клеток-зерен, возможно, свидетельствует об их функциональном различии.

Обсуждение полученных данных. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что под влиянием повреждающих факторов (токсических доз Glu и NO) структура ядер клеток-зерен резко изменяется, а именно, хроматин деконденсируется либо полностью, либо частично. В обоих случаях проявляется тенденция к образованию кластеров, приводящая, в конечном итоге, к перфорации плазмолемм и слиянию клеток.

Деконденсированным (по сравнению с нормальной) хроматином мы называем распавшиеся глыбки хроматина. Как известно, структура хроматина зависит от степени «закрученности» (упаковки) хроматиновых фибрилл; по-видимому, под влиянием Glu и NO, фибриллы могут раскручиваться. Известно, что активные формы азота и кислорода

да вызывают повреждение нуклеиновых кислот, в частности, гуаниновых оснований ДНК [11]. Результаты наших исследований показали, что могут сливаться клетки, как с одинаковой, так и с разной структурой ядер (имеется в виду полностью и частично деконденсированный хроматин). Ранее проведенные нами подсчеты клеток с разной структурой ядер показали, что под влиянием Glu соотношение клеток с частично деконденсированным хроматином и с полностью деконденсированным хроматином составляет 1:9, а при действии NO-генерирующего соединения — 3:1 [5]. Это свидетельствует о преобладании клеток с деконденсированным хроматином в присутствии больших доз Glu, и, в меньшей степени — в присутствии NO.

Как было показано ранее, слиянию клеток предшествует их кластеризация [2]. Так, инкубация мозжечка в растворе Рингера с Glu по сравнению с нормой вызвала усиление кластеризации клеток-зерен и уменьшение числа одиночных клеток на 16%. Стимуляция ПВ на фоне Glu вызвала дальнейшее усиление кластеризации, так как число кластеров, содержащих 4–5 клеток, превышало норму более чем в 3 раза.

Помимо сказанного выше, не исключено, что на слияние клеток может также влиять повреждающее действие Glu и NO непосредственно на плазмолемму клеток [12], так как высокие концентрации NO и продуктов его превращения (NO_2) могут вступать во взаимодействие с ненасыщенными

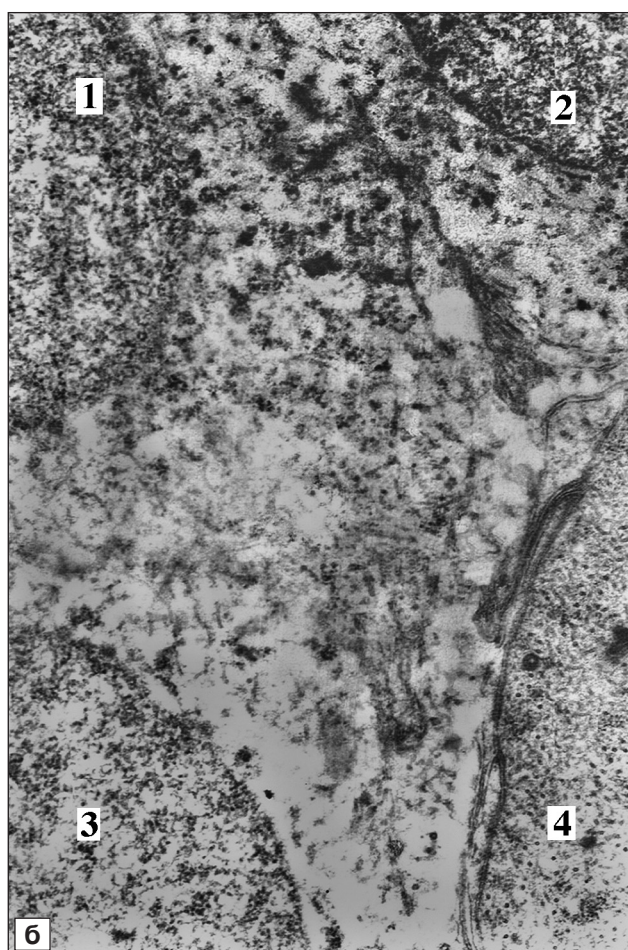
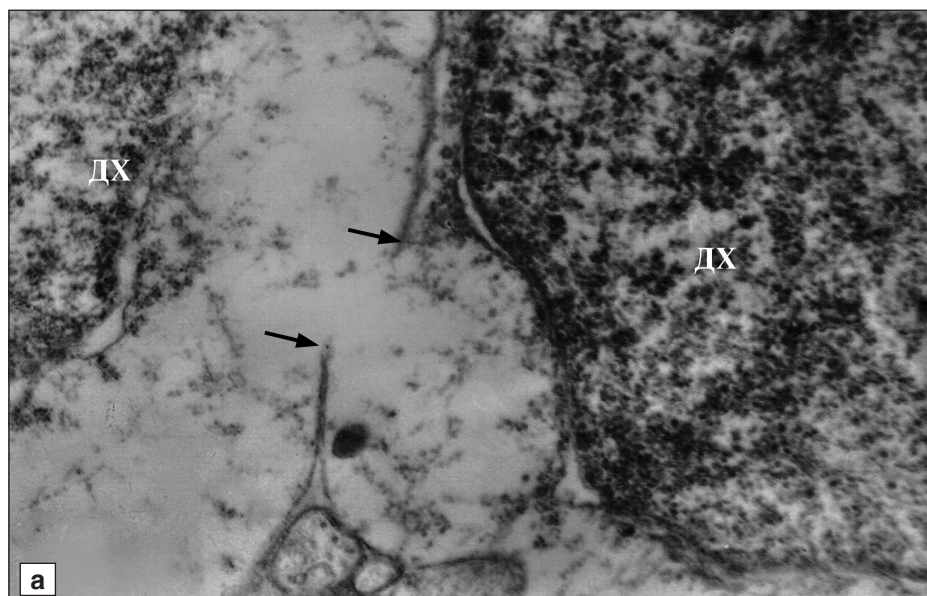


Рис. 3. Структура клеток-зерен (К-З) мозжечка лягушки после его стимуляции в присутствии NO-генерирующего соединения (а) и глутамата (б) (1 ммоль).

а — две К-З с деконденсированным хроматином (ДХ) ядер и одной общей плазмолеммой, виден ее значительный разрыв с образованием цитоплазматической непрерывности (слияние, стрелки); б — конгломерат из четырех слившихся К-З (1–4). Ув. 27 000.

жирными кислотами, входящими в состав липидов плазмолеммы [4]. Возможно также прямое воздействие NO и NO₂ на отдельные аминокислоты, входящие в состав мембранных белков, так как NO способен взаимодействовать с SH-группами серосодержащих аминокислот, а NO₂ участвует в нитрировании тирозиновых остатков белков [4].

Недавно [3] было высказано предположение, что в интактном мозжечке тесное сближение клеток-зерен и образование меж-

нейронной цитоплазматической связи обусловлены отсутствием глиальных прослоек между клетками. При слиянии клеток, вызванном воздействием Glu и NO, эти глиальные прослойки, по-видимому, существенной роли не играют. Таким образом, избыток Glu и NO, вызывая изменения хроматина ядер клеток-зерен и их плазмолеммы, активируют процессы, последовательно приводящие к формированию кластеров, затем к перфорации плазмолеммы клеток и, в конечном итоге, к их слиянию с образованием многоядерных конгломератов (см. рис. 3, б), по механизму, напоминающему таковой при естественном слиянии клеток, например мышечных (миобластов) [7].

Синтез ДНК, как известно, происходит на одноцепочечной матрице. Ему предшествует разделение двух цепей ДНК, т. е. деконденсация хроматина. В нашем случае (условия, моделирующие инсульт) появление ядер с полностью и частично деконденсированным хроматином может явиться логическим следствием сложных репаративных процессов, идущих в связи с таким явлением, как расплетение двойной спирали ДНК.

Функциональная роль наблюдаемых нами изменений хроматина ядер и слияния клеток пока не совсем ясна. Однако можно предположить, что нарушение целостности плазмолеммы в условиях, моделирующих инсульт, ставит перед клетками дилемму: либо погибнуть, либо приспособиться к новым условиям существования. Появляющиеся конгломераты из трех или более поврежденных клеток представляют собой новую структуру, способную выполнять функцию, которая, возможно, будет протекать с другой, измененной интенсивностью. Однако без образования подобных структур

при нарушении целостности плазмолемм, фосфолипазы и протеолитические ферменты, выделяющиеся в межклеточное пространство, могут оказывать сильное повреждающее воздействие на новые клетки. Вот почему мы рассматриваем слияние клеток-зерен мозжечка при токсическом воздействии Glu и NO-генерирующего соединения, как компенсаторно-приспособительную реакцию, позволяющую этим клеткам выживать в условиях сильного повреждения, имеющего место при инсультах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ларионова Н.П., Самосудова Н.В., Реутов В.П. и Чайлахян Л.М. Сравнительное исследование изменения количественных характеристик структуры молекулярного слоя мозжечка лягушки *Rana Temporaria* под влиянием L-глутамата и NO-генерирующего соединения. Докл. РАН, 1999, т. 369, № 6, с. 836–840.
2. Ларионова Н.П., Самосудова Н.В. и Чайлахян Л.М. Влияние L-глутамата на структуру зернистых клеток мозжечка лягушки *in vitro*. Докл. РАН, 1993, т. 333, № 2, с. 260–263.
3. Парамонова Н.М. и Сотников О.С. Цитоплазматическая синцитиальная связь между телами нейронов ЦНС взрослых животных. Морфология, 2008, т. 134, вып. 6, с. 13–17.
4. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е. и Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М., Наука, 1998.
5. Самосудова Н.В., Ларионова Н.П. и Реутов В.П. Об изменениях структуры зернистых клеток мозжечка в ответ на действие повреждающих факторов – избытка глутамата и оксида азота. В кн.: Тезисы докладов III съезда биофизиков России, июнь 2004, Воронеж, т. 1, с. 284–285.
6. Самосудова Н.В., Ларионова Н.П., Реутов В.П. и Чайлахян Л.М. Изменение молекулярного слоя мозжечка лягушки *Rana Temporaria* под влиянием NO-генерирующего соединения. Докл. РАН, 1998, т. 361, № 5, с. 704–708.
7. 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.
8. Сотников О.С. Статика и структурная кинетика живых асимметрических дендритов. Санкт-Петербург, Наука, 2008.
9. Сотников О.С., Малашко В.В. и Рыбакова Г.И. Синцитиальная связь нейронов в культуре ткани и раннем онтогенезе. Морфология, 2007, т. 131, вып. 2, с. 7–15.
10. Chen H. and Chan D.C. Mitochondrial dynamics — fusion, fission, movement, and mitophagy — in neurodegenerative diseases. Hum. Mol. Genet., 2009, v. 15, № 18 (R2), p. 169–176.
11. Cooke MS. and Evans MD. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J., 2003, v. 17, p. 1195–1214.
12. Fadeel B. and Xue D. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 2009, v. 44, № 5, p. 264–267.
13. Wurmser A.E. and Gage F. Stem cells: cell fusion causes confusion. Nature, 2002, v. 416, № 6880, p. 485–487.

Поступила в редакцию 15.03.2010

Получена после доработки 25.03.2011

FUSION OF FROG CEREBELLAR GRANULE CELLS INDUCED BY TOXIC EFFECTS OF GLUTAMATE AND NO-GENERATING COMPOUND

N.V. Samosudova, V.P. Reutov and N.P. Larionova

The ultrastructural changes of cerebellar granule cells were studied under stroke modeling conditions, after the toxic effects of glutamate (Glu) and NO-generating compound. Glu toxic doses were shown to induce two types of nuclear chromatin changes. In some cases, the appearance of practically completely decondensed nuclear chromatin was detected, while in the others the nuclei contained partially decondensed chromatin. Pathological fusion of granule cells was observed in both cases. The toxic effect of NO-generating compound on granule cells also caused the appearance of the cells with both completely and partially decondensed (flocculent) chromatin. Granule cells with different chromatin type were able to fuse with each other. Thus, Glu and NO, causing changes in nuclear chromatin, activate the processes of cell clustering with the following cytoplasmic fusion and the formation of multinuclear conglomerates. The possible physiological role of granule cells fusion induced by high concentrations of Glu and NO-generating compound is discussed. This process is considered as a realization of the compensatory-adaptive reactions under extreme conditions observed in the stroke and oxidative stress.

Key words: *cerebellum, granule cells, chromatin, cell fusion*

Laboratory of Information Processing Study at Cell and Molecular Levels, RAS A.A. Kharkevich Institute of Information Transmission Problems, Moscow; Laboratory of Functional Neurocytology, RAS Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Moscow