

А.А. Кубатиев, А.А. Пальцын

ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН, Москва

Внутриклеточная регенерация мозга: НОВЫЙ ВЗГЛЯД

Открыт способ регенерации корковых нейронов мозга. Нейроны сливаются с олигодендроцитами. Образуется клетка с двумя различными ядрами — гетерокарион. Представлены доказательства того, что ядро олигодендроцита в гетерокарионе подвергается нейрон-специфическому репрограммированию. Ядро олигодендроцита становится похожим, а в результате репрограммирования — неотличимым от ядра нейрона по морфологии: величине, форме, строению хроматина. Репрограммируемые ядра олигодендроцитов начинают экспрессировать специфические нейрональные маркеры NeuN и MAP2. В ядрах олигодендроцитов, как и в нейронах, увеличивается скорость транскрипции. С завершением репрограммирования в нейроне появляется второе нейрональное ядро, увеличивающее функциональные способности клетки. Приводятся доказательства того, что описанный процесс выражает физиологическую и репаративную регенерацию мозга.

Ключевые слова: гетерокарион, мозг, нейрон, олигодендроцит, регенерация мозга, репрограммирование.

В 2012 г. исполнилось 20 лет со дня открытия нейрональной стволовой клетки [1]. Стимулированная этим событием исследовательская активность дала в итоге много новых знаний о процессе регенерации мозга. Обнаружен и подробно изучен нейрогенез в субгранулярном слое зубчатой извилины грызунов [2, 3], обезьян [4, 5] и человека [6], а также в субвентрикулярном слое боковых желудочков [7, 8]. Факт новообразования нейронов в остальных отделах мозга доказан не был [9–11]. Этот результат реабилитировал забытую после открытия стволовой клетки печальную поговорку о том, что «нервные клетки не восстанавливаются». Однако поговорка противоречит реальности. Способность мозга взрослых млекопитающих восстанавливаться после повреждений известна, и философское объяснение этому дал акад. Д.С. Саркисов. Он понял, что регенерация — это одна из составляющих движущей силы живой материи, которая есть взаимодействие восстановления и разрушения, поэтому утверждал: «Все живые объекты регенерируют, но различно, соответственно их структурно-функциональному своеобразию» [12]. Настоящая работа является иллюстрацией и подтверждением этой идеи.

В комплексе своеобразий нейрона наиболее заметны две особенности: сверхсложная структурная организация и сверхпродолжительная функция пожизненного хранителя памяти. Этим уникальным особенностям соответствует способ регенерации нейронов, принципиально отличающийся от известных до настоящего времени схем. Нейроны сливаются с олигодендроцитами, в результате чего образуется клетка с двумя разными ядрами — гетерокарион. Гетерокарионы, созданные в пробирке, давно и успешно применяют в исследованиях, но о естественном образовании гетерокарионов нормальных клеток в организме не было известно до публикаций Института общей патологии и патофизиологии [13–15]. Это не имеющее аналогий явление воспринимается учеными с недоверием, поэтому главная цель настоящего сообщения состоит в приведении доказательств реального существования данного феномена. Гетерокарионы присутствуют в каждом срезе и обнаруживаются всеми методами микроскопии. На рис. 1 и 2 представлены 2 изображения и 2 гистограммы, полученные при сканировании гетерокариона в конфокальном микроскопе. Результат этого наблюдения подтвержден компьютерным анализом и свидетельствует о том, что исследованный образец

А.А. Kubatiev, A.A. Paltsyn

Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Intracellular brain regeneration: a new view

Mechanism of neuron regeneration in the cortex was discovered. Heterokaryon, a cell with two distinct nuclei, is formed by the fusion of neuron with oligodendrocyte. We showed that oligodendrocyte nucleus in heterokaryons is exposed to neuron-specific reprogramming. Oligodendrocyte nucleus becomes similar to neuron nucleus and in result of reprogramming is undefined from it according to morphology (size, shape, chromatin structure). Reprogrammed oligodendrocyte nuclei begin to express the neural specific markers NeuN and MAP2. Rate of transcription in the oligodendrocyte nuclei increases as in neurons. After completion of neuron-specific reprogramming, second nucleus appears in neuron which increases the functional capacity of the cell. We present evidence that this process is the basis of physiological and reparative regeneration of the brain.

Keywords: heterokaryon, brain, neuron, oligodendrocyte, brain regeneration, reprogramming.

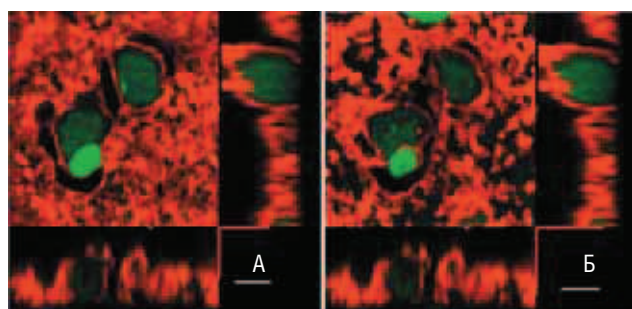


Рис. 1. Начальный этап слияния олигодендроцита с нейроном. Конфокальная, лазерная, сканирующая микроскопия. Флуоресцентные зонды: Dil (мембранный, красный); SybrGreen (ядра, зеленый); $\times 1000$.

(А) Маленькое светлое ядро олигодендроцита рядом с большим темным ядром нейрона. Между ядрами нет красного материала, значит, они в общей цитоплазме, и поскольку ядра разные — это гетерокарион. (Б) Другой кадр, полученный при сканировании гетерокариона. В нем между ядрами появился мембранный материал. Префронтальная кора интактной крысы.

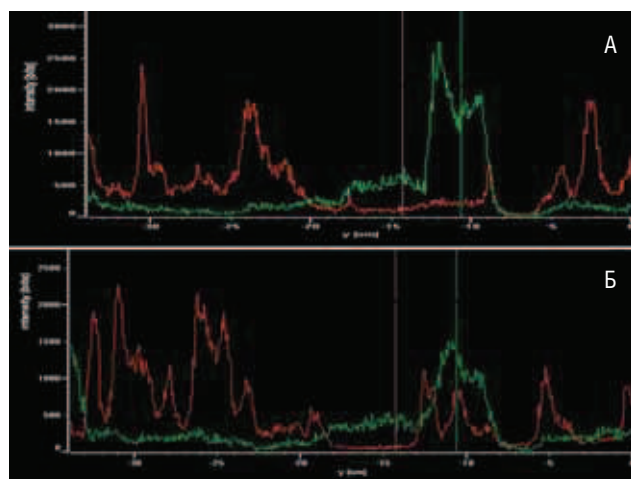


Рис. 2. Гистограммы по красному и зеленому каналу к кадрам (А) и (Б) рис. 1.

Участок сближения ядер на гистограммах выделен сиреневой и зеленой вертикалями. В гистограмме к (А) в выделенном участке кривая красного канала на фоновом уровне, усиления сигнала нет. Компьютер мембраны не обнаружил. В гистограмме к (Б) в красном канале высокий пик. Компьютер обнаружил мембрану.

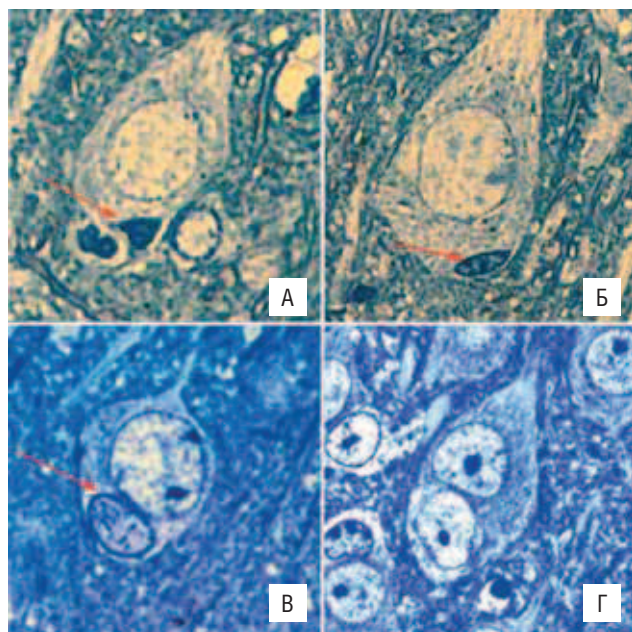


Рис. 3. Изменение структуры хроматина и величины ядра олигодендроцита после слияния с нейроном. Префронтальная кора крысы с инсультом; $\times 1000$.

(А) Указанное стрелкой ядро олигодендроцита расположено в цитоплазме нейрона, т.е. слияние произошло, но ядро пока не изменилось. Оно маленькое, структура хроматина не определяется. (Б) Начало репрограммирования. Размер ядра (стрелка) не увеличился, но хроматин разделился на темный гетеро- (вдоль ядерной мембраны и 3 глыбки в центре) и светлый эухроматин в центре ядра. (В) Размер ядра олигодендроцита (стрелка) значительно увеличился, но еще не сравнялся с ядром нейрона. Пояс гетерохроматина по ядерной мембране шире, чем в ядре нейрона. (Г) Завершение репрограммирования. Гетерокарион превратился в клетку с двумя одинаковыми ядрами — дикарион.

является гетерокарионом на раннем этапе своего формирования. В центре двухъядерной клетки плазматическая мембрана растворилась, но на периферии сохранились ее остатки.

Ядро олигодендроцита в гетерокарионе постепенно становится похожим на ядро нейрона по величине, форме и строению хроматина. Происходит нейрон-специфическое репрограммирование ядра олигодендроцита. Этапы возрастания морфологического сходства ядра олигодендроцита с ядром нейрона представлены на рис. 3. Результаты электронно-микроскопического исследования гетерокарионов показаны на рис. 4. На рис. 4А — мембраны и ядра нейрона, ядра олигодендроцита гладкие, оба ядра круглые. На рис. 4Б — мембрана ядра нейрона, как и ядра олигодендроцита, складчатая. Оба ядра неправильной формы. Таким образом, ядро олигодендроцита при репрограммировании точно копирует свой образец — то ядро нейрона, с которым оно слилось.

При репрограммировании ядра олигодендроцитов приобретают не только внешнее сходство с ядрами нейронов, в них также начинают экспрессироваться специфические маркеры нейронов. На рис. 5 продемонстрирована экспрессия в ядрах олигодендроцитов специфического маркера нейронов — белка NeuN, — который в нашем эксперименте помечали зеленой меткой. Уровень экспрессии его нарастал с увеличением срока репрограммирования.

Нейрон отличается максимальной скоростью транскрипции по сравнению с другими клетками организма. Этой особенностью мы воспользовались для проверки наличия процесса репрограммирования. Методика радиоавтографического исследования скорости синтеза РНК была подобрана так, чтобы все нейроны были мечеными, а все олигодендроциты — немечеными. Результаты эксперимента, представленные на рис. 6, показали, что ядро олигодендроцита с пронеурональным изме-

нением структуры (разделением хроматина) изменило в пронеурональном направлении и функцию, т.е. оказалось меченым, как и ядра нейронов. В нем, подобно нейрону, ускорена транскрипция.

В гетерокарионах исследовали экспрессию еще одного маркера нейронов — MAP2 (рис. 7). В нашем эксперименте MAP2 был мечен зеленым флуорохромом. MAP2 представляет собой белок микротрубочек, поэтому иммунореактивность на него проявилась в гетерокарионе кольцом ярко-зеленого свечения материала вокруг ядра нейрона и в начальном участке дендрита, соответственно расположению в клетке микротрубочек. Менее яркое зеленое кольцо MAP2-положительного материала охватывает репрограммируемое ядро олигодендроглиота. В предыдущих демонстрациях о репрограммировании судили по изменениям ядра, однако микротрубочки располагаются в цитоплазме. Иными словами, появилась возможность оценить выраженность нейрон-специфических изменений в ядре олигодендроглиота по реакции и на это ядро цитоплазмы нейрона. Из рис. 7 видно, что ядро олигодендроглиота, еще не закончившее репрограммирование, уже воспринимается цитоплазмой нейрона как нейрональное. Оно охватывается, как и эндогенное ядро нейрона, сферой микротрубочек

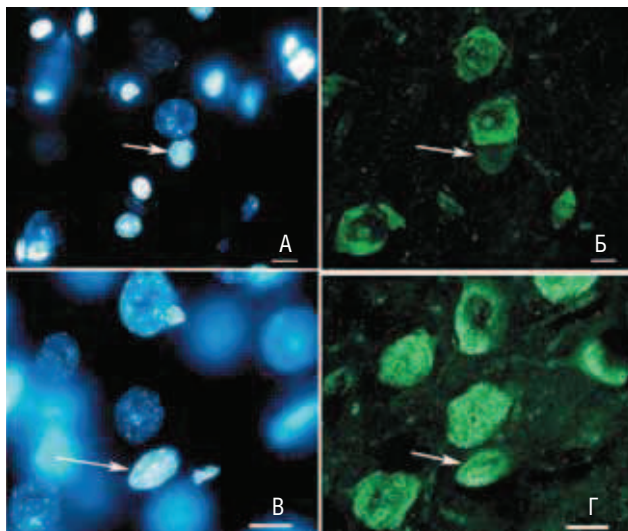


Рис. 5. Экспрессия NeuN в репрограммируемых ядрах олигодендроглиотов. Префронтальная кора интактной крысы. (А), (В) — окраска флуоресцентным красителем DAPI. (Б), (Г) — иммуноцитохимия с NeuN, меченным Alexa 488; $\times 1000$.

(А) В центре кадра крупное темное (эухроматин) ядро нейрона. Под ним маленькое яркое (гетерохроматин) ядро олигодендроглиота (стрелка). Кроме указанного стрелкой в кадре, имеется еще 10 ядер олигодендроглиотов: справа сверху от указанного — 4; слева сверху — 4; ниже — 2. (Б) Тот же кадр под зеленым фильтром. Ядра нейронов зеленые. Все 10 посторонних олигодендроглиотов исчезли (они не содержат нейронального маркера), но олигодендроглиот под нейроном (стрелка) остался заметным. Он тоже иммунореактивен на NeuN, хотя в гораздо меньшей степени, чем нейрон над ним. (В), (Г) — более поздний этап репрограммирования. (В) В центре кадра на небольшом расстоянии друг от друга круглое темное ядро нейрона, а под ним — почти такой же величины светлое ядро олигодендроглиота (стрелка). Большой размер ядра — свидетельство большей продолжительности репрограммирования. (Г) Уровень экспрессии нейронального маркера NeuN в ядре олигодендроглиота (стрелка) не отличается от такового в ядре нейрона.

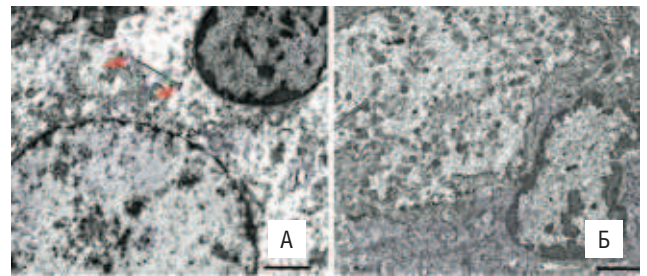


Рис. 4. Электронно-микроскопическая картина репрограммирования. Префронтальная кора интактной крысы; $\times 12\,000$.

(А) Ядра олигодендроглиота (справа) и нейрона (слева) расположены в общей цитоплазме, а некогда разделявшая их клеточная мембрана осталась в виде фрагмента (стрелки). В ядре олигодендроглиота наблюдается ранняя стадия репрограммирования: хроматин разделен на гетеро- (темные массивы по ядерной мембране и в центре ядра) и эухроматин (гранулярный материал на большей части пространства ядра). Эухроматин пока гораздо темнее, чем эухроматин в ядре нейрона. (Б) Эухроматин в ядре олигодендроглиота такой же светлый, как в ядре нейрона.

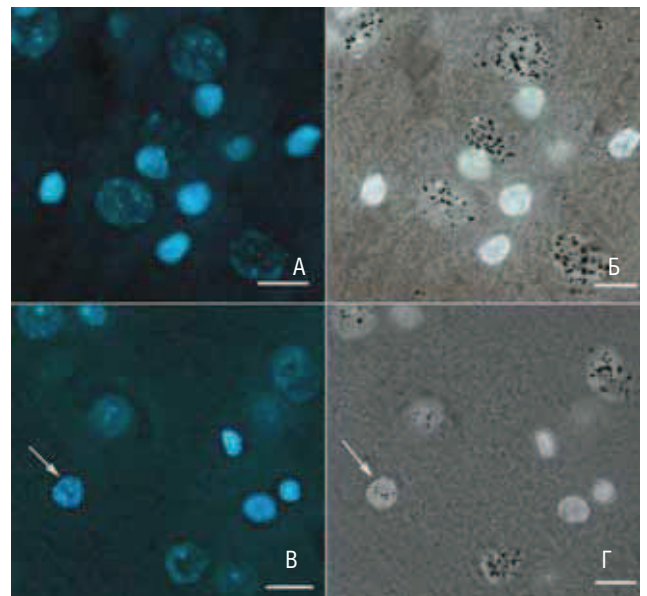


Рис. 6. Радиоавтографический анализ скорости синтеза РНК в репрограммируемом ядре олигодендроглиота. Префронтальная кора интактной крысы. (А) и (Б) — окраска DAPI. (Б) и (Г) — проявление метки путем подсвечивания препарата через конденсор; $\times 1000$.

(А) В кадре находятся 5 ядер нейронов и 6 ядер олигодендроглиотов. (Б) При подсветке снизу через конденсор становится видимой метка — черные зерна серебра. Все 5 ядер нейронов интенсивно мечены, а все 6 ядер олигодендроглиотов метки не содержат. (В) Другой участок препарата. В кадре 4 ядра олигодендроглиотов. В одном из ядер (стрелка) пронеурональное изменение структуры: оно самое большое и самое неравномерно окрашенное — с темными зонами эухроматина. (Г) Подсветка показывает, что пронеурональное изменение структуры имеет функциональное выражение: появление метки над этим олигодендроглиотом (стрелка) свидетельствует об увеличении скорости синтеза РНК.

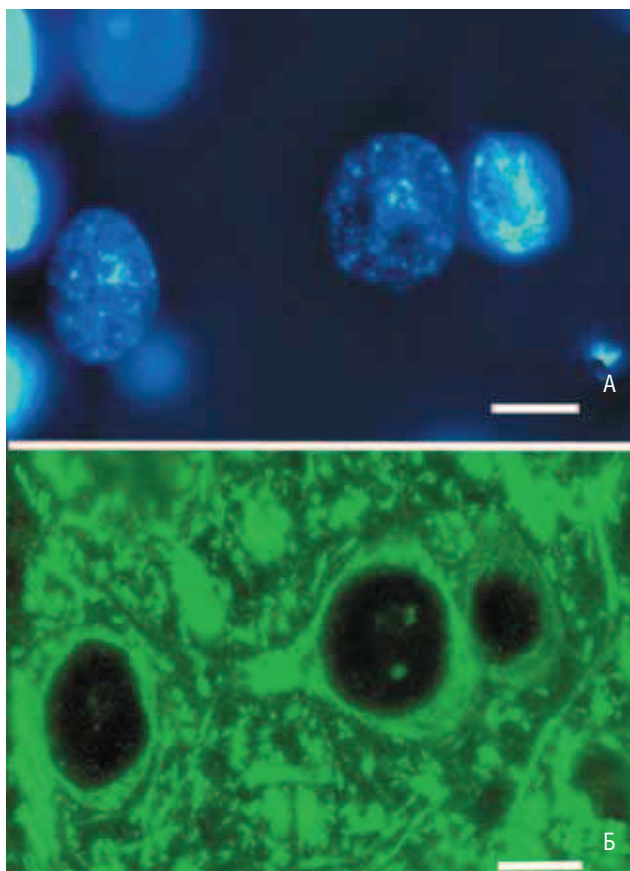


Рис. 7. Экспрессия MAP2 репрограммируемым ядром олигодендроцита. Префронтальная кора интактной крысы. (А) — окраска DAPI. (Б) — иммуноцитохимическое выявление MAP2, меченого Alexa 488; $\times 1000$.

(А) Ядро нейрона (более крупное и темное) и рядом — ядро репрограммируемого олигодендроцита (меньше по размеру, но более яркое). (Б) Тот же участок снят с зеленым фильтром. Пояс зеленого (иммунореактивного на MAP2) материала окружает не только ядро нейрона, но и ядро олигодендроцита.

и начинает обеспечивать внутриклеточный транспорт в нейроне.

Таким образом, с завершением процесса репрограммирования в нейроне появляется второе нейрон-специфическое ядро, второй геном. Слияние с олигодендроцитами увеличивает число нейрональных геномов, хотя и не приводит к увеличению числа нейронов в коре. Нейрональный геном обеспечивает нейрональную функцию, поэтому при неизменном числе нейронов возрастает суммарный объем их функции вследствие присутствия в популяции некоторого числа двухъядерных клеток. Так может компенсироваться гибель части нейронов в нормальном онтогенезе и при болезнях. При регенерации слиянием сохраняются как сами нейроны, так и тысячи их связей с соседними нейронами. Более того, создается геномное обеспечение — второе ядро для дополнительного формирования тысяч новых синапсов. Трудный для ученых вопрос о возможности новообразованного пирамидного нейрона интегрироваться в местную сеть и принимать «эстафету памяти» погибшей клетки природа решила как всегда просто: дала взамен новообразования второе ядро. Стратегия природы в регенерации коры представ-

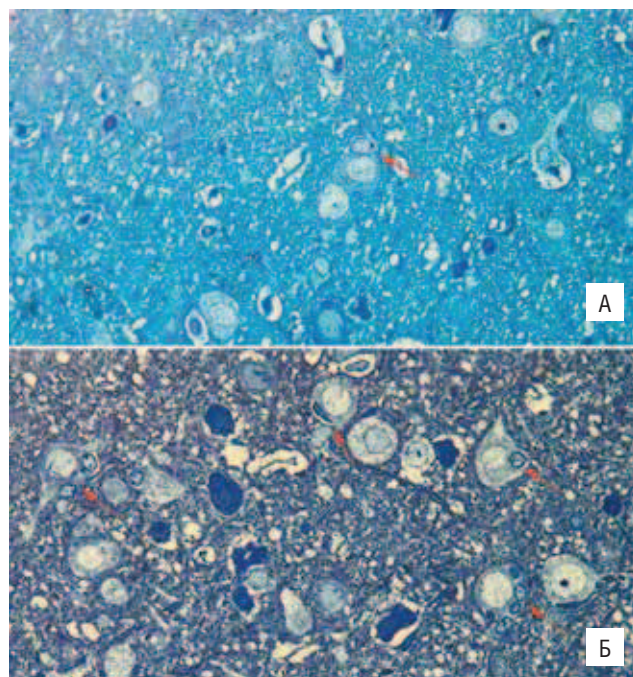


Рис. 8. Увеличение частоты слияний при более тяжелом патологическом процессе. Зона префронтальной коры крысы, сохранившая жизнеспособность через 7 сут после геморрагического инсульта; $\times 600$.

(А) Неосложненный геморрагический инсульт. В кадре один гетерокарион (стрелка). (Б) Инсульт, осложненный последующей антиортостатической гипокинезией. В кадре 4 гетерокариона (стрелки).

ляет собой не смену поколений нейронов, а поддержание функциональной достаточности единственного поколения.

Экспериментальные доказательства регенераторной роли слияний

Физиологическую регенерацию пока исследовали только на раннем этапе онтогенеза. Сравнили частоту слияний в двух группах крыс в возрасте 2 ($n=15$) и 4 ($n=12$) мес. Обнаружили увеличение числа слияний в старшей группе. У животных младшей группы средняя площадь среза, на которой встречался один гетеро- или дикарион, составила $0,510 \pm 0,295$ мм²; у животных старшей группы — $0,274 \pm 0,188$ мм²; $p < 0,01$ (по критерию Вилкоксона).

Репаративную регенерацию изучали на модели геморрагического инсульта в двигательной зоне коры головного мозга. После создания искусственным образом инсульта крыс помещали в обычные клетки (неосложненный инсульт) или оставляли без опоры на задние конечности в состоянии антиортостатической гипокинезии (АНОГ). АНОГ затрудняет циркуляцию крови в голове (осложненный инсульт). Исследовали сохранившуюся в окружающей среде инсульта кору. Усиление повреждающего воздействия усиливало ответную регенераторную реакцию. При неосложненном инсульте ($n=8$) определялась одна двухъядерная клетка на площади $0,357 \pm 0,099$ мм² (рис. 8А), при осложненном ($n=14$) — одна двухъядерная клетка на площади $0,201 \pm 0,040$ мм² (рис. 8Б); $p < 0,01$ (по критерию Вилкоксона).

Заключение

В открытом механизме регенерации мозга природа, сочетая элементы известных в настоящее время механизмов, приспособивая их к структурно-функциональным особенностям мозга, создала способ регенерации столь же удивительный, сколь удивителен сам мозг. Подтвердилась идея акад. Д.С. Саркисова: в способе регенерации отражается специфика регенерирующего объекта. Свойственная многим органам схема регенерации со стволовыми клетками представлена в описанном способе пожизненным обновлением олигодендроцитов, рекрутируемых нейронами. Специфичную для печени регенерацию полиплоидией, двухъядерностью, мозг видоизменил. Нейрон, неспособный получить второе ядро митозом без цитотомии, получает его цитослиянием. Повсеместно происходящее репрограммирование клеток (дифференцировка) в мозге дополняется ранее неизвестным для соматических клеток репрограммированием ядер. Однако открытый механизм уже сегодня имеет не только фундаментальное значение. Он

может быть применен для решения прикладной задачи: доклинического апробирования профилактических, лечебных, физиотерапевтических, медикаментозных средств с нейротропным действием, которые можно количественно определять по состоянию регенераторного процесса в мозге — содержанию двухъядерных клеток. Этот критерий дает возможность вести поиск средств, селективно влияющих на частоту слияний. Понятно, что тем же способом можно исследовать и влияние патогенных факторов на регенерацию. Современная стратегия клеточной терапии неврологических расстройств ориентирована исключительно на нейрогенез вопреки тому факту, что в большинстве отделов мозга обнаружить его не удалось. Трудно избавиться от мысли, что пока небольшие успехи в этом направлении связаны с его стратегической устремленностью наперекор природе. Мы допускаем, что терапевтические достижения будут значительнее, если в качестве цели усилий и критерия их эффективности будет выбран не фантастический нейрогенез, а реально происходящие (и легко подсчитываемые) слияния.

REFERENCES

1. Reynolds B., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992; 255 (5052): 1707–1710.
2. Kempermann G., Kuhn H.G., Gage F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997; (386): 493–495.
3. Toni N., Laplagne D.A., Zhao Ch. et al. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat. Neurosci.* 2008 11 (8): 901–907.
4. Gould E., Reeves A.J., Fallah M. et al. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1999; 96: 5263–5267.
5. Kornack D.R., Rakic P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96: 5768–5773.
6. Eriksson P., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998; 11: 1313–1317.
7. Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L. et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 1999; 96: 25–34.
8. Doetsch F., Caille L., Lim D.A. et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 1999; 97: 703–716.
9. Ackman J.B., Siddiqi F., Walikonis R.S. et al. Fusion of microglia with pyramidal neurons after retroviral infection. *J. Neurosci.* 2006; 26 (44): 11413–11422.
10. Spalding K.L., Bhardwaj R.D., Buchholz B.A. et al. Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell*. 2005; 122: 133–143.
11. Nakagomi T., Taguchi A., Fujimori Y. et al. Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells from post-stroke cerebral cortex in mice. *European Journal of Neuroscience*. 2009; 29: 1842–1852.
12. Sarkisov D.S. Ocherki istorii obshchei patologii. M., 1993.
13. Pal'tsyn A.A., Kolokol'chikova E.G., Konstantinova N.B. i dr. Obrazovanie geterokarionov kak sposob regeneratsii neuronov pri postishemicheskom povrezhdenii kory mozga krys. M.: *BEBiM*. 2008; (10): 467–470
14. Pal'tsyn A.A., Konstantinova N.B., Romanova G.A. i dr. Rol' sliyaniya kletok v fiziologicheskoi i reparativnoi regeneratsii kory golovnogo mozga. M.: *BEBiM*. 2009; (11): 580–583.
15. Kubatiev A., Palcyn A., Konstantinova N. et al. Cell Fusion and reprogramming nuclei – mechanism of regeneration of brain cortex. 6th *International Congress of Pathophysiology*. 2010. P. 87.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Кубатиев Аслан Амирханович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, директор Института общей патологии и патофизиологии РАМН, руководитель отдела молекулярной и клеточной патофизиологии

Адрес: 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Тел.: (499) 151-17-56

Е-mail: niiopp@mail.ru

Пальцын Александр Александрович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией регуляции репаративных процессов Института общей патологии и патофизиологии РАМН

Адрес: 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Тел.: (499) 151-17-56

Е-mail: lrrp@mail.ru