

© Пальцын А.А., Комиссарова С.В., 2016
УДК 616-092

Пальцын А.А.^{1,2}, Комиссарова С.В.¹

Двухъядерные нейроны Пуркинье

¹ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² — ГБОУ дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия последипломного образования», 123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

До конца XX века двухъядерные нейроны Пуркинье у грызунов и человека были предметом случайных находок. Однако уже тогда было замечено, что такие клетки чаще обнаруживаются у старых и больных млекопитающих. Поэтому предполагали, что появление второго ядра имеет регенераторное значение — компенсацию возрастной или патогенной утраты клеток Пуркинье. В 2003 году в исследованиях по трансплантации стволовых клеток были сделаны первые наблюдения, относящиеся к механизму появления второго ядра в нейроне Пуркинье. В трансгендерном исследовании у человека и в трансгенных экспериментах на мышах показано, что костномозговые клетки донора могут сливаться с нейронами Пуркинье реципиента и таким образом передавать нейрону свое ядро. Очень важно то, что двухъядерные нейроны появляются в старости, как у больных людей, так и у грызунов даже без пересадок. Но в таком случае ни донорская клетка, ни механизм появления второго ядра остаются неясными. Актуальность выяснения этого вопроса увеличивается тем обстоятельством, что литература последних лет доказывает: появление второго ядра есть форма физиологической и репаративной регенерации нейронов Пуркинье.

Ключевые слова: нейрон Пуркинье; слияние клеток; регенерация нейронов.

Для цитирования: Пальцын А.А., Комиссарова С.В. Двухъядерные нейроны Пуркинье. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 107–113.

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, доктор биол. наук, проф., лауреат Государственной премии СССР, гл. науч. сотр. Института общей патологии и патофизиологии РАН, проф. каф. общей патологии и патофизиологии РМАПО, e-mail: lrrp@mail.ru

Финансирование. Работа не имела спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.09.2016

Paltsyn A.A.^{1,2}, Komissarova S.V.¹

Binuclear Purkinje neurons

¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow 125315, Russia

² — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow 125315, Russia

Until the end of the XX century binuclear neurons of Purkinje in rodents and the humans were a subject of casual finds. However already then it was noticed that such cells are in old and sick mammals more often. It is therefore assumed that the appearance of the second nucleus has a regenerative value — compensation age-related or pathogenic loss of Purkinje cells. In 2003, in research on stem cell transplantation was made the first observations related to the mechanism of the appearance of the second nucleus in Purkinje neurons. The transgender studies in humans and in transgenic experiments on mice have shown that bone marrow derived donor cells can fuse with Purkinje neurons of the recipient, thus transfer to neuron its nucleus. It is very important that the binuclear neurons can appear in old and sick people and rodents without transplantation. But in that case neither the donor cell, nor the mechanism of origin of the second nucleus remain not clear. Relevance of clarification of this question increases of the fact that literature of the last years proves: emergence of the second nucleus is a form of physiological and reparative regeneration of neurons of Purkinje.

Keywords: neuron of Purkinje; cell fusion; regeneration of neurons.

For citation: Paltsyn A.A., Komissarova S.V. Binuclear Purkinje neurons. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2016; 60 (4): 107–113. (in Russ.).

For correspondence: Paltsyn A.A., Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow 125315, Russia, e-mail: lrrp@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 10.09.2016

О присутствии в мозжечке одиночных клеток Пуркинье с двумя ядрами известно давно. Наиболее раннее сообщение, найденное нами в оригинале, относится к 1928 году [1]. У крыс в возрасте 730 дней и более автор нередко, находил двух- и даже, как он пишет, трехъядерные клетки. У крыс среднего возраста (200 дней) такие клетки не встречались. В 1937 году Andrew [2] описал находки у старых мышей (более 740 дней) двухъядерных нейронов Пуркинье. У животных меньшего возраста таких клеток автор не обнаруживал. Ранние сообщения о двухъядерных клетках Пуркинье у человека связывались авторами этих сообщений с различными патологическими состояниями. Так, Schroder в 1911 г. (цит. по [3]) сообщил о присутствии таких клеток в двух случаях шизофрении. Сам Andrew в 1939 г. при исследовании 40 мозжечков, полученных от людей различного возраста (в том числе от 5 стариков в возрасте 69—80 лет), обнаружил двухъядерные нейроны Пуркинье только у одного: 22-летнего негра, умершего от цереброспинального сифилиса, причем содержание таких клеток составляло «от 3 до 4 процентов» [3]. В проведенном сравнительно недавно исследовании мозжечков людей без невропатологии на присутствие двухъядерных нейронов Пуркинье [4] авторы, просмотрев более 50 000 клеток, обнаружили единственный нейрон с двумя морфологически неразличимыми ядрами. К сожалению, в статье не указывается возраст людей, от которых был получен секционный материал, что снижает информационную значимость наблюдения. Возвращаясь к работе Andrew [3], упоминаем, что, помимо числа ядер, другие морфологические характеристики перикарионов двухъядерных нейронов не отличались от перикарионов одноядерных нейронов. В нескольких случаях автор наблюдал в двухъядерных клетках на близком расстоянии от перикариона раздвоение ствола главного дендрита. Автор указывает на сходство этой особенности с наблюдавшимися им изменениями нейронов Пуркинье у старых мышей [2]. Он объясняет появление двухъядерных клеток амитозом, но цитирует Roussy and Mosinger (цит. по [3]), которые предполагали, что многоядерные нейроны вегетативных ядер гипоталамуса могут возникать путем слияния одноядерных клеток. Уже по этим находкам двухъядерных нейронов у старых и больных млекопитающих можно было предположить, что появление второго ядра может быть выражением регенераторного процесса. Однако тогда ещё не пришло время массового, серьезного и систематического обращения ученых к проблеме регенерации мозга и эти наблюдения были по существу забыты, точнее, не стали развиваться дальнейшими исследованиями.

Возврат к теме двухъядерных нейронов Пуркинье произошел на рубеже XX—XXI веков в связи с неожиданными находками, сделанными в широко развернувшихся тогда исследованиях дифференцировки (трансдифференцировки) стволовых клеток. В очень популярной статье Mezey с сотр. [5] изложили результаты трансплантации костного мозга мышей от доноров — самцов реципиентам — самкам. Авторы описали появление в коре, гипоталамусе, гиппокампе, амигдале клеток, содержащих Y хромосому и меченых нейрональными маркерами. Делается вывод о дифференцировке костномозговых клеток донора в нейроны реципиента. Через 3 года Mezey с другими сотрудниками [6] опубликовала статью, описывающую наблюдения, сделанные на людях, но сходную по схеме исследования (терапевтическая пересадка костного мозга от мужчин женщинам) и по трактовке результатов (дифференцировка костномозговых клеток в нейроны). Наблюдали совмещение нейронального маркера (NeuN) и Y хромосомы в клетках коры реципиентов. Такую далеко зашедшую дифференцировку стали называть трансдифференцировкой, имея в виду, что в своем развитии мезодермальная клетка костного мозга превратилась в эктодермальный нейрон. Клетка в развитии «пересекла границу» зародышевых листков. Принцип описанных трансгендерных пересадок, основанный на опознании в организме самок клеток или потомков клеток самца, был использован для создания метода трансгенных пересадок. Одновременно со статьей Mezey с сотрудниками 2000 года (в том же номере журнала Science) была опубликована работа Brazelton et al. [7], в которой трансгенным методом доказывается трансдифференцировка костномозговой клетки в нейрон

Эксперименты производятся чаще на мышах и называются трансгенными потому, что все клетки мышей-доноров содержат трансген: метаболически инертное, но легко обнаруживаемое вещество, присутствие которого выдает донорское происхождение любой исследуемой клетки в теле реципиента. Чаще всего в качестве трансгена используется белок с зеленой флуоресценцией (green fluorescent protein — GFP). Это природный белок, обеспечивающий зеленую биолюминесценцию одного из видов медуз. После перенесения его генно-инженерным методом в яйцеклетку мыши [8] все клетки родившегося мышонка, кроме эритроцитов и волос, светятся зеленым цветом под лучом возбуждения. Казалось, что какие бы превращения не претерпела донорская клетка в организме реципиента, её всегда можно будет узнать по зеленой флуоресценции «зеленые клетки».

Эксперимент осуществляется следующим образом. Взрослых мышей реципиентов облучают в смертельной дозе. Затем вводят им костный мозг — bone

marrow-derived cells (BMDC) от взрослых GFP-положительных доноров. Для подавления реакции трансплантат — против хозяина реципиенты получают большие дозы иммунодепрессантов. Естественно после таких манипуляций у реципиентов находят много зеленых клеток крови. Не так естественно и очевидно, но, тем не менее, встречались зеленые дифференцированные клетки других тканей. Чтобы не отвлекаться от темы, скажем только о мозге. Первые известия о том, что BMDC, развиваясь в теле реципиента могут пересекать рубежи зародышевых листков и из мезодермальных превращаться в эктодермальные клетки мозга появились на рубеже веков в 2000 году [5, 7].

В 2001 году опубликована статья Priller et al. [9], обнаруживших в мозжечке реципиентов через год после трансгенной пересадки зеленые нейроны Пуркинье. Объяснение Priller et al. полностью соответствовало представлениям 2001 года. Они сочли, что мезодермальная BMDC стала эктодермальным нейроном. Иными словами, BMDC прошла столь большой и сложный путь развития, что превратилась в клетку другого зародышевого листка — трансдифференцировалась. Объяснение казалось обоснованным: ведь нейрон зеленый, следовательно, он — ставшая нейроном BMDC. Авторы не смутило то, что чудесное превращение произошло не с эмбриональной клеткой, отличающейся повышенной пластичностью, а с клеткой взрослого животного и в организме взрослого животного с давно (в эмбриональном периоде) сформированным мозжечком. Но, повторяем, эта трактовка не была плодом пылкого воображения маленькой группы людей — авторов статьи. В то время так думала большая часть научного сообщества. Конечно, до сих пор не изжитому, а в то время безудержному, стремлению всеместно пересаживать стволовые клетки, Priller с соавторами рекомендуют трансплантацию BMDC для лечения в клинике двигательных расстройств. Рекомендация смелая, если не сказать легкомысленная. Во-первых, потому, что при исследовании целого мозжечка находили всего несколько зеленых нейронов Пуркинье, а во-вторых, — условия трансгенного эксперимента бесконечно далеки от реальных условий развития болезней человека.

Серьезный удар по идее постнатального нейрогенеза, а заодно и по популярным и слишком оптимистично оцениваемым представлениям о трансдифференцировке нанесла серия публикаций появившаяся в 2002—2003 гг. [10—16]. В этих статьях было заявлено, что стволовая клетка может сливаться с дифференцированной клеткой различных тканей. По этой причине «классическое» доказательство пластичности вообще и, в частности, пластическое появление во взрослом мозге нейрона, «трансдиффе-

ренцировавшегося» из BMDC оказались артефактом. Открытая возможность слияния BMDC дает другое, не столь фантастичное объяснение результатов, якобы демонстрирующих трансдифференцировку. BMDC не превратилась в дефинитивную клетку. У Priller с сотрудниками — это нейрон Пуркинье, отличавшийся не только характерной топографией и морфологией, но и экспрессировавший маркеры дифференцированного нейрона Пуркинье: декарбоксилазу глутаминовой кислоты, калбиндин. Все эти специфические особенности «взрослого» нейрона Пуркинье не были созданы самостоятельно BMDC. Она просто слилась с дифференцированным нейроном и передала ему свой маркер — зеленый цвет. Следует оговориться, что выше излагались результаты экспериментов *in vivo*. *In vitro* можно изменением условий культивирования добиться трансдифференцировки и превращения мезенхимальной стволовой клетки костного мозга в клетку любого зародышевого листка [17].

Указанные работы 2002—2003 гг. имеют принципиальное значение не только в учении о стволовых клетках. Эти статьи привлекли внимание научного сообщества к двум важным для нашей темы о нейронах Пуркинье моментам: способности этих нейронов сливаться с другими клетками и влиянии второго ядра на функцию клетки. Оказалось, что BMDC могут участвовать в регенерации и развитии не только путем дифференцировки и трансдифференцировки в зрелые клетки, но и путем слияния, с дифференцированными клетками поврежденного или развивающегося органа.

Уже первая группа исследователей, обнаружившая слияние BMDC с нейронами Пуркинье [10], предположила, что добавление генетического материала — второго ядра может иметь поддерживающее или восстанавливающее значение для этих нейронов. Принципиальная возможность регенерации путем слияния с иными (гетеротипическими) клетками была убедительно доказана уже упоминавшейся нами работой [13], в которой сохранение жизни и здоровья животных при смертельной генетической болезни достигалось слиянием BMDC с гепатоцитами.

Мыши с мутацией гена фумарилацетоацетат гидролазы (*Fah*^{-/-}) страдают тирозинемией и погибают, если им не вводить лекарство (НТВС — нитизинон). Таким мышам после облучения вводили BMDC от диких (*Fah*^{+/+}) мышей. Через 4—5 мес. после трансплантации реципиенты выглядели здоровыми (без введения нитизинона), билирубин сыворотки снижался практически до нормы. В печени макроскопически были видны множественные узлы, микроскопически сходные с нормальной печеночной тканью. Гистохимическое исследование показало, что большинство гепатоцитов имели нормальное строение

и экспрессировали Fah. Отсутствующий ген Fah гепатоциты могли получить только в результате слияния с несущей этот ген клеткой донора. Все собственные клетки реципиента, в том числе и стволовые, были Fah^{-/-}. После слияния под влиянием цитоплазмы гепатоцита происходило репрограммирование генома слившейся с гепатоцитом клетки. Гемопоэтический донорский геном перестраивался на гепатоцит-специфическую экспрессию. «Молчащий» в BMDC ген Fah начинал экспрессироваться, а экспрессия пан-гемопоэтического маркера CD45 прекращалась. Кроме репрограммирования в этом эксперименте и морфологически, и по состоянию животных был доказан четко выраженный, спасающий жизнь репаративный эффект слияния клеток. Механизм репарации был следующий. Болезнь обуславливалась недостатком структур (генов Fah), необходимых для обеспечения функции органа. Слившиеся стволовые или прогениторные клетки внесли недостающие структуры (гены) в специфические клетки органа — гепатоциты. Под влиянием специализированной цитоплазмы произошло репрограммирование внесенных ядер, соответствующее функции резидентных специализированных партнеров по слиянию. Репрессированные до слияния гены Fah стволовых клеток после слияния дерепрессировались и тем довели в органе число ранее отсутствующих структур до уровня, обеспечивающего сохранение жизни и выздоровление животного.

Регенераторная роль слияний клеток с нейронами Пуркинье может быть не так эффективно установлена, как в цитированной выше работе Vassilopoulos et al. [13], но, тем не менее, имеет в настоящее время немало поводов для доверия. В исследовании Weimann et al. [15] показано, что в гетерокарионе: нейрон Пуркинье — BMDC происходит репрограммирование ядра BMDC. Оно увеличивается в размере, в нем становится больше дисперсного хроматина и активируется специфичный для нейронов Пуркинье ген. Иными словами, появляется дополнительная структура, идентичная или, по крайней мере, неотличимая по какому-то геному от ядра нейрона Пуркинье. Увеличение числа структур — классический признак регенерации. Число гетерокарионов увеличивалось по мере старения животных, а также при развитии у них мышинной модели множественного склероза — аутоиммунного энцефаломиелимита [18]. Увеличение у старых и больных животных числа двухъядерных, способных к большей функциональной нагрузке [19] нейронов — серьёзное указание на регенераторную роль слияния клеток.

Все вышеупомянутые исследования слияний клеток с нейронами Пуркинье были выполнены методом трансгенных пересадок. При многих достоинствах этого метода, он имеет и существенные недостатки.

1. Все результаты получены в трансгенных экспериментах, резко меняющих состояние животных (облучение в летальной дозе, большие дозы иммунодепрессантов).

2. Низкое число слияний (1—2 на миллион просмотренных клеток). Маловероятно, чтобы столь редкое событие оказывало репаративное действие.

3. В слияниях участвуют только донорские костномозговые клетки. Роль стволовых клеток мозга или любых других эндогенных клеток невыяснена. Наверняка стволовые клетки реципиента репрессированы, если не уничтожены.

4. Облучение нарушает гематоэнцефалический барьер [20, 21], поэтому нельзя отвергнуть предположение, что костномозговые клетки проникли в мозг благодаря облучению, а у интактных животных проникновение невозможно.

Всё это делает трансгенный эксперимент далеким от реальных патологических состояний у людей и животных и совсем непригодным для суждения о закономерностях нормального онтогенеза.

В 2007 году Wiersema с соавторами [22] помимо трансгенного эксперимента, обнаружившего увеличение числа слияний BMDC с нейронами Пуркинье после облучения, исследовали мозжечки интактных мышей разного возраста. У молодых животных авторы не нашли двухъядерных нейронов, в мозжечках 12-месячных мышей содержание двухъядерных нейронов составило 1,44%.

Группа итальянских исследователей [23] сочетала возможности трансгенного эксперимента с изучением нейронов Пуркинье в онтогенезе интактных мышей и в условиях репаративной регенерации при селективном повреждении этих нейронов. Каждый из этих экспериментальных подходов позволил авторам получить ценные данные. В трансгенном эксперименте они наблюдали уже известный факт: появление зеленых нейронов Пуркинье у реципиентов в результате слияния с GFP-мечеными донорскими BMDC. После вторичного облучения реципиентов содержание в их крови GFP-меченных BMDC снижалось почти до нуля, следовательно, образование новых зеленых нейронов Пуркинье становилось невозможным. Однако и через 7 мес. содержание зеленых нейронов Пуркинье в мозжечках реципиентов было не ниже, чем перед вторичным облучением. Этим экспериментом Magrassi с соавторами доказали, что в результате слияния образуются стабильные, длительно живущие нейроны. При селективном повреждении нейронов Пуркинье количество двухъядерных клеток среди них увеличивалось. В этой работе анализировали в конфокальном микроскопе вибраторные срезы мозжечка мышей в возрасте 2 и 18 мес., не подвергавшихся каким-либо воздействиям. У старых живот-

ных обнаружили в среднем 4,97% двухъядерных клеток Пуркинье. Клетки — доноры второго ядра остались неизвестны. У интактных двухмесячных животных двухъядерных нейронов не нашли. Однако при избирательном повреждении нейронов Пуркинье и стимуляции микроглии двухъядерные нейроны появлялись и у молодых животных.

Авторы почему-то заключают свою статью фразой, что физиологическое значение этих наблюдений неизвестно. Формально они правы. Но, если иметь в виду, что каждый эксперимент, тем более с такими новыми и интересными результатами, должен способствовать развитию науки, систематизации вновь полученных сведений, появлению обобщающих идей, то нельзя не обратить внимания на следующее. Второе ядро в нейроне — это новая дополнительная структура, позволяющая выполнять дополнительную функцию, т.е. не что иное, как регенерация. Физиологическая регенерация, если гибель ранее существовавших структур не превышает норму или репаративная регенерация, если гибель структур ускорена патологическим процессом. На наш взгляд, данные Magrassi с сотрудниками полностью соответствуют понятиям о физиологической (появление двухъядерных клеток только в позднем онтогенезе) и репаративной (появление уже в раннем онтогенезе двухъядерных нейронов Пуркинье при их избирательном разрушении) регенерации. Конечно, для доказательства регенераторного значения обсуждаемых фактов нужны дополнительные исследования, однако предположение о таком значении представляется очевидным.

Большинство находок двухъядерных нейронов Пуркинье сделано в трансгенных экспериментах, который, наряду с внесением генетически меченых клеток, предусматривает облучение реципиента, т.е. повреждение и поэтому резонным представляется предположение о репаративном значении слияния клеток, появления в нейроне второго ядра [24]. Регенераторную суть слияний изучали в трансгенном эксперименте с дополнительным, помимо обусловленного самой схемой эксперимента (иммуносупрессия), повреждением мозга [25]. Мышам внутривенно вводили мезенхимальные стволовые клетки человека и вызывали аутоиммунный энцефаломиелит. Нейроны Пуркинье слившиеся с мезенхимальными клетками обнаруживали иммуноцитохимической меткой по присутствию человеческого антигена. В контроле, без энцефалита содержание таких клеток было $0,147 \pm 0,046\%$. У мышей с энцефалитом наблюдали почти десятикратное увеличение содержания меченых нейронов Пуркинье: $1,454 \pm 0,629\%$ ($P < 0,01$).

В следующем году было опубликовано исследование феномена слияний нейронов Пуркинье с VMDC в условиях избирательной недостаточности (без вос-

паления и реактивного глиоза) этих клеток [26]. У мышей существует рецессивная мутация выражающаяся дегенерацией клеток Пуркинье. Гомозиготные по этой мутации животные умирают рано. У гетерозиготных потеря клеток Пуркинье проявляется в значительно более позднем возрасте. Авторы обнаружили многократное увеличение числа слившихся с VMDC нейронов Пуркинье у гетерозигот на 150-й и 300-й день сравнительно с животными, не содержащими мутантного гена.

Одним из дополнительных исследований, вновь указавшим на регенераторное значение появление двухъядерных нейронов Пуркинье и уже на клиническом материале стала работа Kemp с сотрудниками [27]. Авторы провели сравнительное исследование 6 мозжечков, полученных от умерших больных множественным склерозом (диагноз установлен клинически и подтвержден аутопсией) и пяти мозжечков людей, умерших не от неврологических болезней. При множественном склерозе содержание двухъядерных нейронов Пуркинье составило 0,376%, в контроле 0,024%. При множественном склерозе 90,87% двухъядерных нейронов имели различные ядра: одно — типичное ядро нейрона Пуркинье большое с дисперсным хроматином, другое — маленькое с конденсированным хроматином. В остальных двухъядерных клетках оба ядра были нейронального типа. Увеличение числа двухъядерных нейронов Пуркинье при множественном склерозе авторы рассматривают как признак регенерации и даже как перспективу улучшения функции мозжечка *in vivo*. Перспектива видится в том, что пересадками VMDC можно превращать какую-то долю нейронов в Пуркинье в двухъядерные и тем увеличивать функциональные возможности популяции этих клеток, пострадавшей в результате возрастных или патогенных повреждений. Принципиально сходное направление клеточной терапии, но ориентированное на внесение в нейрон Пуркинье не просто второго ядра, но ядра с геном, исправляющим патологическое состояние было испытано Chen с сотр. [28]. Таким приемом авторам удалось добиться меньших морфологических повреждений в нейронах Пуркинье и большее сохранение их числа при врожденной спино-церебральной атаксии у мышей.

Следует отметить, что клеточной терапии при патологии нейронов Пуркинье, конечно, свойственны «детские болезни», характерные для всего современного направления клеточной терапии. Основная идея направления — получить клетки из одного места и сразу или, нарастив число клеток в культуре, а иногда и добившись определенного уровня дифференцировки «воспитав» в культуре, ввести их в другое место того же или другого организма [29]. Мы вовсе не пытаемся такую стратегию критиковать. Она обусловлена

благородным стремлением уже сегодня, с современным багажом знаний, облегчать болезни людей. Однако не следует забывать, что такое положение медицинской науки и практики вынужденное и есть приспособление к деятельности в условиях недостаточного знания. Понятно, что успех медицинских вмешательств возможен только при условии совпадения их с естественными, сложившимися в эволюции механизмами регенерации. Стволовые клетки есть в любом органе и если в органе развился патологический процесс, значит, деятельность эндогенных стволовых клеток по какой-то причине не обеспечивает нормальную функцию. Истинно этио-патогенетической терапия будет только в том случае, когда врач будет знать, что произошло с эндогенными клетками и как исправить это положение.

Возвращаясь от общих рассуждений к обсуждаемой теме, напоминаем о неоднократно описанном у животных и у людей появлении двухъядерных нейронов в нормальном онтогенезе. Если уж научное сообщество склонно и, по существу, единодушно воспринимать этот факт как проявление регенерации, то он не может быть ничем другим как физиологической регенерацией. Это очень важно. Механизмы этого явления заслуживают самого тщательного изучения, поскольку репаративная регенерация не имеет собственных механизмов и отличается от физиологической только количественно. Однако сегодня при популярности исследований слияния нейронов Пуркинью с VMDC в трансгенных экспериментах остается неизвестным и, по нашим сведениям, не изучаемым вопрос о том, какая клетка отдает своё ядро нейрону Пуркинью в естественных условиях, когда двухъядерные клетки появляются, без специальных воздействий у старых грызунов и людей. А как раз этот аспект исследований представляется наиболее значимым и перспективным, если иметь в виду, что деятельность врача должна соответствовать природным механизмам регенерации. Огромные, одни из самых больших в организме, каждый из которых имеет порядка 200 000 связей с другими нейронами [30], нейроны Пуркинью формируются в эмбриогенезе [31] и не пополняются у взрослых млекопитающих даже из эндогенных нейральных стволовых клеток. Выращивание такой клетки в уже сформированном мозге с установлением всех необходимых связей даже из местных предшественников и по сложившемуся в эмбриогенезе механизму кажется большой фантастикой. Тем более, по-видимому, не стоит пытаться их вырастить «рассудку вопреки, наперекор стихиям» из любых введенных в организм клеток. В этих условиях выяснение механизмов их естественной регенерации захватом второго ядра представляется более реалистичным и более близким к интересам клиници наведением работы.

References

1. Inukai T. On the loss of Purkinje cells, with advancing age, from the cerebellar cortex of the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 1928; 45:1-31.
2. Andrew W. The effects of fatigue due to muscular exercise on the Purkinje cells of the mouse, with special reference to the factor of age. *Ztschr f Zellforschung u Mikr. Anat.* 1937; 27: 534-55.
3. Andrew W. Origin and significance of binucleate Purkinje cells in man. *Arch. Pathol.* 1939; 28: 821-26.
4. Nern C., Wolff I., Macas J., von Randow J., Scharenberg C., Priller J. et al. Fusion of hematopoietic cells with Purkinje neurons does not lead to stable heterokaryon formation under noninvasive conditions. *J. Neurosci.* 2009; 29(12): 3799-807.
5. Mezey E., Chandross K.J., Harta G., Maki R.A., McKercher S.R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science.* 2000; 290(5497): 1779-82.
6. Mezey E., Key S., Vogelsang G., Szalayova I., Lange G.D., Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003; 100(3): 1364-9.
7. Zavelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I., Blau H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science.* 2000; 290: 1775-9.
8. Okabe M., Ikawa M., Kominami K., Nakanishi T., Nishimune Y. Green mice as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters.* 1997; 407: 313-9.
9. Priller J., Persons D.A., Klett F.F., Kempermann G., Kreutzberg G.W., Dirnagl U. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell Biol.* 2001; 155: 733-8.
10. Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M., Fike J.R., Lee H.O., Pfeffer K. et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature.* 2003; 425: 968-73.
11. Gussoni E., Bennett R.R., Muskiewicz K.R., Meyerrose T., Nolte J.A., Gilgoff I. et al. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 807-14.
12. Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Masterlitz D.M., Nakano Y. et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature.* 2002; 416: 542-5.
13. Vassilopoulos G., Wang P.R., Russell D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature.* 2003; 422: 901-4.
14. Wang X., Willenbring H., Akkari Y., Torimaru Y., Foster M., Al-Dhalimy M. et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature.* 2003; 422: 897-901.
15. Weimann J.M., Charlton C.A., Brazelton T.R., Haskman R.C., Blau H.M. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003a; 100: 2088-93.
16. Ying Qi-L., Nichols J., Evans E.P., Smith A.G. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature.* 2002; 416: 545-8.
17. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002; 418: 41-9.

18. Johansson C.B., Youssef S., Koleckar K., Holbrook C., Doyonnas R., Corbel S.Y. et al. Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nature cell biology*. 2008; 10: 575-83.
19. Gregory T.R., Hebert P.D. The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences. *Genome Res*. 1999; 9: 317-24.
20. Rubin P., Gash D.M., Hansen J.T., Nelson D.F., Williams J.P. Disruption of the blood-brain barrier as the primary effect of CNS irradiation. *Radiother. Oncol*. 1994; 31: 51-60.
21. Davoust N., Vauillat C., Androdias G., Nataf S. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol*. 2008; 29: 227-34.
22. Wiersema A., Dijk F., Dontje B., van der Want J.J., de Haan G. Cerebellar heterokaryon formation increases with age and after irradiation. *Stem Cell Res*. 2007; 1(2): 150-4.
23. Magrassi L., Grimaldi P., Ibatici A., Corselli M., Ciardelli L., Castello S. et al. Induction and survival of binucleated Purkinje neurons by selective damage and aging. *J. Neurosci*. 2007; 27(37): 9885-92.
24. Nygren J.M., Liuba K., Breitbach M., Stott S., Thoren L., Roell W. et al. Myeloid and lymphoid contribution to non-haematopoietic lineages through irradiation-induced heterotypic cell fusion. *Nat. Cell Biol*. 2008; 10: 584-92.
25. Kemp K., Gordon D., Wraith D.C., Mallam E., Harfield E., Uney J. et al. Fusion between human mesenchymal stem cells and rodent cerebellar Purkinje cells. *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. 2011; 37(2): 166-78.
26. Diaz D., Recio J.S., Weruaga E., Alonso J.R. Mild cerebellar neurodegeneration of aged heterozygous PCD mice increases cell fusion of Purkinje and bonemarrow-derived cells. *Cell Transplant*. 2012; 21(7): 1595-602.
27. Kemp K., Gray E., Wilkins A., Scolding N. Purkinje cell fusion and binucleate heterokaryon formation in multiple sclerosis cerebellum. *Brain*. 2012; 135(Pt 10): 2962-72.
28. Chen K.A., Cruz P.E., Lanuto D.J., Flotte T.R., Borchelt D.R., Srivastava A. et al. Cellular fusion for gene delivery to SCA1 affected Purkinje neurons. *Mol. Cell Neurosci*. 2011; 47(1): 61-70.
29. Kolokoltsova T.D., Saburina I.N., Rybakov A.S. Cell culture as a unique model for research in modern biology and medicine. *Patogenez*. 2013; 11(2): 17-25. (in Russian)
30. Tyrrell T., Willshaw D. Cerebellar cortex: its simulation and the relevance of Marr's theory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*. 1992; 336: 239-57.
31. Zecevic N., Rakic P. Differentiation of Purkinje cells and their relationship to other components of developing cerebellar cortex in man. *J. Comp. Neurol*. 1976; 167: 27-47.

Сведения об авторах:

Комиссарова Светлана Владимировна, канд. биол. наук, науч. сотр. НИИОПП РАН