——— БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ ——

УДК 611.018

# РЕТИКУЛЯРНАЯ ТЕОРИЯ КАМИЛЛО ГОЛЬДЖИ И ПЕРЕСТРОЙКА ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СИНАПСОВ В СИНЦИТИАЛЬНЫЕ ПЕРФОРАЦИИ

© 2019 г. О. С. Сотников<sup>@</sup>

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Россия, 199034 Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

<sup>@</sup>E-mail: ossotnikov@mail.ru Поступила в редакцию 16.08.2016 г. После доработки 08.06.2018 г. Принята к публикации 08.06.2018 г.

Проанализированы опубликованные ранее современные экспериментальные данные, подтверждающие представления ретикулярной теории организации нервной системы. Отмечено, что доказательства Шеррингтона опровергли главную концепцию нейронной теории Рамон и Кахаля — закон динамической поляризации нейронов. После выявления щелевых контактов (ЩК) обнаружены адгезионная связь нейритов, их высокая электрическая и метаболическая проницаемость и кумулятивное взаимодействие. Приведены данные, демонстрирующие, что ЩК способны превращаться в синцитиальные перфорации, а соматические ЩК при благоприятных условиях могут преобразовывать нейроны в дикарионы. Предположено, что все описанные феномены — последовательные стадии единого процесса перестройки наружной клеточной мембраны нейрона.

DOI: 10.1134/S0002332919020140

Открытие электрических синапсов (Furshpan. Potter, 1957) и их идентификация с щелевыми контактами (ЩК) существенно изменили представления о взаимосвязи нейронов и. следовательно, о когнитивных функциях мозга (Okun et al., 2015). Возникла необходимость в дополнении нейронной теории Сантьяго Рамон и Кахаля (Ramon y Cajal, 1906) идеями ретикулярной теории Камилло Гольджи (Golgi, 1906). Заглавие своей знаменитой книги "Neuron Theory or Reticular Theory?" великий Рамон и Кахаль (Ramon y Cajal, 1954) завершил вопросительным знаком не случайно. Настоящий исследователь, возглавив дискуссию века, победил, но оставил вопрос для будущих поколений мыслителей и их теорий. О дискуссии нейронистов и ретикуляристов опубликовано много обзоров (Jones, 1999; Mazzarelo, 1999; Kruger, Otis, 2007; Ferreira et al., 2014 и др.). Однако современные исследования рождают новые идеи и позволяют снова вернуться к рассмотрению нейронной и ретикулярной теории.

## РЕТИКУЛЯРНАЯ ТЕОРИЯ КАК ПРЕДТЕЧА ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ СВЯЗИ НЕЙРОНОВ

Исполнилось 110 лет со дня одновременного присуждения единой Нобелевской премии двум великим нейрогистологам Рамон и Кахалю и Гольджи. Анализ дискуссии знаменитых исследователей нейронов, к сожалению, проведен недостаточно. Этого не сделано и в упомянутой книге Кахаля. Им представлены блестящие собственные гистологические препараты центральной и периферической нервных систем, кстати, полученные с помощью методики, изобретенной ретикуляристом Гольджи (Golgi, 1873). Однако в отмеченной работе Кахаля нет анализа объективных причин и морфологических предпосылок, позволяющих оппонентам так долго и упорно отстаивать свои гистологические и физиологические данные. Автор отмечает только субъективные причины: ошибки фиксации и недостаточно успешные методики окрашивания препаратов. Обращает на себя внимание тот факт, что основные данные нейронной теории (Ramon y Cajal, 1995) были получены при исследовании гистологических препаратов, на которых хорошо выявляются контрастно окрашенные тела одиночных нейронов и четкие аксосоматические терминали (рис. 1а). Сторонники же ретикулярной теории нередко ссылались на препараты с преобладанием нейропиля, на которых доминировали сплетения нервных отростков (рис. 1б), запутанные незримо тонкие фибриллы "теряются в диффузной сети серого вещества" в "филиале бесконечности" (Golgi, 1903). А связь нейронов в бесконечности, как известно, трудно доказать. Поэтому, естественно, Гольджи не мог не стать ретикуляристом (Jones, 1999). Рамон и Кахаль никогда не



**Рис. 1.** Препараты, отражающие представления нейронной и ретикулярной теорий о межклеточных отношениях в нервной системе. а – аксосоматические синапсы на иллюстрациях Рамон и Кахаля (Ramon y Cajal, 1906); б – предполагаемые межнейронные связи в нервной сети на иллюстрации Гольджи (Golgi, 1906); в – синцитиальные связи нервных клеток у полихет на рисунках нейрониста Ретциуса (Retzius, 1884); г – синцитии нейронов у аллигатора, изображенные Ретциусом (Retzius, 1892); *1* – синцитиальные слияния тел нейронов; *2* – синцитиальное слияние нервных волокон; *3* – миелиновые волокна, доказывающие цитоплазматическое слияние нескольких нейритов.

пытался "распутать" "запутанные сети нейропиля". Возможно, это одна из первых объективных причин рождения противоречивых идей знаменитых исследователей. Естественно, основная идея сторонников Гольджи о цитоплазматической непрерывности волокон в сплетениях не могла быть ни абсолютно доказана ретикуляристами, ни уверенно опровергнута нейронной доктриной. Видимо, основными логическими и эмоциональными причинами дискуссии были исторически обусловленные ограничения научных методов биологических исследований.

Нейронная теория Рамон и Кахаля предполагает следующее: самостоятельность одиночных нейронов, связанных между собой с помощью химических синапсов; одностороннее проведение нервного импульса через синапс; отсутствие метаболической, синцитиальной связи волокон; электрическое проведение волокон только в одном направлении, от дендритов к аксонам; двуядерные нейроны — результат случайного амитоза или уродства.

Ретикулярная теория Гольджи считает реальными массовую адгезию нервных волокон (нервную сеть); метаболическую, синцитиальную связь нервных отростков; электрическое взаимодействие проводников в противоположных направлениях; совместную, объединенную функцию нейронов; связь основной деятельности мозга не с телами нейронов, а с нервными сплетениями.

Убедительным объективным доказательством правоты нейронной доктрины, как известно, была "теория динамической поляризации нейрона", авторами которой считались Ван Гегухтэн (Van Gehuchten, 1891) и Рамон и Кахаль (Ramon y Cajal, 1891). Эта теория предполагала, что распространение импульсов в нервной системе происходит только в одном направлении: от дендритов чувствительного нейрона к окончаниям двигательного нейрона, но не наоборот. Кахаль подтвердил свою приверженность этой идее в Нобелевской лекции (Ramon y Cajal, 1906).

Однако Чарльз Шеррингтон (Sherrington, 1897) вскоре опубликовал работу о двунаправленном (антидромном) проведении нервного импульса в ЦНС. В своей статье он упоминает и исследования А.И. Бабухина который, экспериментируя на электрическом органе нильского сома, заложил основу двунаправленной проводимости периферических нервов (Бабухин, 2007). Рамон и Кахаль был лично знаком с Шеррингтоном, однако о концепции Шеррингтона в своих трудах он никогда не упоминал (Berlucchi, 1999). Экспериментальные данные Шеррингтона могли бы стать основой, опровергающей ортодоксальные убеждения нейронистов. Для ретикулярной теории эти убедительные данные важнейшие и в настоящее время (Berlucchi, 1999; Krüger, Otis, 2007). Абсолютно очевидно, что еще при жизни Кахаля и Гольджи можно было бы детальнее изучить и некоторые реальные морфологические данные, свидетельствующие о возможности синцитиальной связи нервных волокон у целых видов животных.

Соратником Рамон и Кахаля Густавом Ретциусом в его огромных многотомных фолиантах приведены прекрасные изображения, во множестве воспроизводящие сенсорные нейроны полихет (рис. 1в) со слившимися отростками, образующими рыхлую синцитиальную сеть (Retzius, 1892). Он также на препаратах (рис. 1г) четко продемонстрировал слияние нейритов, соединяющихся в одно волокно с миелиновой оболочкой и перехватом Ранвье у аллигатора (Retzius, 1884). Это – абсолютное доказательство слияния нейритов (Sotnikov, Laktionova, 2016).

Позднее синцитиальная связь нейронов у беспозвоночных (рис. 2) была доказана неоднократно (Young, 1936; Nicol, 1948; Hagiwara et al., 1964; Günter, 1975; Friedlander, Levinthal, 1982). Сторонники Кахаля (1985) игнорируют и твердо доказанный закон клеточной теории Шванна и Шлейдена о единстве общих свойств всех клеток. Отвергается свойство отростков и тел нервных клеток образовывать синцитий подобно другим клеткам. Видимо, уже давно можно было признать правомочность синцитиальных связей в нервной системе, т.е. в обеих теориях отстаивать не представления "или-или", а искать общее "и-и". Нам впервые удалось в культуре живых изолированных нейронов окологлоточных ганглиев моллюсков продемонстрировать динамику и механизм синцитиального слияния нейритов (~7 ч), т.е. главного недостающего доказательства ретикулярной теории (рис. 3).

Кахаль (Ramon y Cajal, 1906), а также Догель (Dogiel, 1893) опубликовали удивительные картины крупных и мелких, кольцевидных, бесспорно синцитиально анастомозирующих, групп волокон, которые синцитиально сливались в одно волокно или сеть отростков вблизи тела нейрона (рис. 4a, б). Это – убедительный пример ячеек локальной синцитиальной сети, выявленной на гистологических препаратах.

Великий Кахаль был не в состоянии дать другое описание явным анастомозам и назвал их "странными образованиями". Кольцевидные синцитиальные анастомозы постоянно обнаруживаются у одиночных нервных волокон автономной нервной системы позвоночных (рис. 4г) при импрегнации их по Бильшовскому–Грос.

Сенсорные терминали способны формировать настоящие обширные синцитиальные сети. Нам удалось в течение 48 ч воспроизвести кольцевидные ячейки прижизненно в культуре ткани центральных ганглиев моллюска (рис. 5а-в) и исследовать кинетику их формирования (рис. 5г-е). Полученные данные позволяют сформулировать новое положение о естественном закономерном биологическом явлении – обязательном одновременном ветвлении (бифуркации) растущих волокон и их слиянии, с формированием циклических ячеек нервной сети.

Таким образом, в принципе удается подтвердить основные положения ретикулярной теории Гольджи — возможность цитоплазматической синцитиальной связи нервных волокон — и продемонстрировать механизм формирования нервной сети. У регенерирующих отростков, по-види-



**Рис. 2.** Синцитиальные цитоплазматические связи в нервных системах беспозвоночных. а – общий вид нервных синцитиев у Loligo; б, в – увеличенные детали рис. 2а; г – нейросинцитии у Sepia; д, е – цитоплазматические анастомозы у Mormiride и у Myxicola.

мому, существует определенный аффинитет нейроплазмы, который вызывает поворот соседних отростков на 90° навстречу друг другу и образует их слияние. Важно отметить, что в точке синцитиального слияния конусы роста исчезают, а регенерация нейритов ингибируется. Избирательные отношения, видимо, имеются не только у волокон одной и той же клетки, но и у отростков разных нейронов. Открытие ШК в нервной системе, по нашему мнению, лишило дискуссию "Нейронная теория или ретикулярная теория" объективных противоречий. Теперь множественные электрические синапсы подтверждают идеи ретикуляристов о морфологическом и физиологическом объединении нервных сетей. Как говорил Кахаль в своей нобелевской лекции, "...будущая наука оставит большие сюрпризы и замечательные завоевания для нас" (Ramon y Cajal, 1906, c. 241).

## ЩЕЛЕВЫЕ КОНТАКТЫ – НОВАЯ ЭПОХА РЕТИКУЛЯРИЗМА. РЕАБИЛИТАЦИЯ КАМИЛЛО ГОЛЬДЖИ

После доказательства межнейронной передачи импульсов с помощью электрических синапсов (Furshpun, Potter, 1957) "триумфальная фигура Кахаля" потускнела (Krüger, Otis, 2007). Исчез главный недостаток теории ретикуляристов - невозможность продемонстрировать механическую связь многочисленных смежных волокон внутри нервных сплетений. Доказано их электрическое взаимодействие без химических медиаторов. Показано, что аксон участвует в обработке импульса. Через ЩК спайк способен проникать беспрепятственно с обеих сторон в отличие от клапанообразного действия химического синапса. Также важнейшим достижением ретикуляризма является утверждение общности взаимодействия нейронов в мозге. "...Я никогда не имел до сих пор



**Рис. 3.** Динамика и механизм слияния растущих волокон различных нейронов в культуре ткани. а–в – процесс образования цитоплазматического синцития; *1* – отросток нижней клетки; *2* – отросток верхней клетки; *3* – варикозность, которая перемещается через место слияния двух отростков; *4* – тело верхней клетки. Указано время от начала съемки; для рис. 3 и 5. Культура ткани. Фазовый контраст. Об. 40Ph, ок. 10.



**Рис. 4.** Кольцевидные ячейки синцитиальной сети анастомозов вблизи тел нейритов позвоночных. а – препарат Рамон и Кахаля (Ramon y Cajal, 1891); б – рисунки Догеля (Dogiel, 1893); в – рецепторное окончание тощей кишки; г – увеличенный фрагмент сети на рис. 4в. Импрегнация по Бильшовскому–Грос. Об. 40, ок. 10.



**Рис. 5.** Кинетика формирования кальцевидных синцитиальных ячеек сети одиночных нейронов в культуре ткани. а – первичные ячейки у основания тела нейрона; б – вторичные ячейки сети в области ветвления отростков; в – большое увеличение рис. 56; г–е – динамика формирования кольцевидного синцитиального анастомоза регенерирующего отростка; *1* – первичные ячейки; *2* – вторичные ячейки. Культура ткани. Фазовый контраст. Об. 40Ph, ок. 20.

причину, чтобы отказаться от концепции, которую я всегда подчеркивал, что нервные клетки вместо того, чтобы работать индивидуально, действуют вместе так, что мы должны думать, что несколько групп элементов осуществляют кумулятивный эффект на периферические органы с помощью всего пучка волокон" — отмечал Гольджи (Golgi, 1906, с. 216).

В нейрофизиологии уже давно подробно исследуются так называемые смешанные синапсы (рис. 6), у которых морфологические признаки химических синапсов обнаруживаются вместе с электрическими синапсами (Шаповалов, Ширяев, 1987; Rash *et al.*, 2015). Об одном случайном препарате локального объединения химического синапса и синцитиальных перфораций сообщили сторонники Кахаля из Мадрида (Santander *et al.*, 1988). Примечательно то, что ЩК в смешанных синапсах закономерно локализуются по бокам плотной синаптической специализации химических синапсов и что именно на этом месте образуются синцитиальные перфорации. Идеальное совпадение топографии этих структур - убедительное свидетельство прободения ШК и их превращения в синцитии. Нам удавалось при стандартной трансмиссионной электронной микроскопии обнаружить немало таких синцитиальных перфораций на месте ЩК (рис. 6). В других участках волокон синцитиальные перфорации также встречаются часто. Их размеры могут быть едва заметными или очень крупными. Мембраны либо сливаются (рис. 7а, б), либо перфорируются (рис. 7в, г). Увеличение дефектов мембран может привести к слиянию волокон (рис. 7д). Синцитиально связанными могут быть и тела нейронов. При предельном расширении перфораций они, видимо, как и волокна, могут сливаться и рассматриваются как клетки с двумя ядрами (рис. 8а, б).

Возможно слияние трех (рис. 8в) и более нейронов. Нам впервые удалось разработать методику получения живых симпластов нескольких слившихся нервных клеток (рис. 8г). Однако механизм возникновения этих клеток и их свойства до сих пор оставались малопонятными (DiLorenzo, 2010; Kawataki *et al.*, 2010; Sotnikov, Laktionova, 2016). Необходимо выделить три феномена, характерных для сдвоенных клеточных мембран: ЩК, синцитиальные перфорации и мембранные слияния тел нейронов (дикарионы). Естественно, возникает вопрос: не могут ли в их основе находиться одни и те же свойства спаренных нейролемм клеток?

#### МЕХАНИЗМ ПРЕВРАЩЕНИЯ ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ В СИНЦИТИАЛЬНЫЕ ПЕРФОРАЦИИ

Сейчас уже нельзя без представлений ретикуляризма объяснить с помощью только нейронной доктрины возможность преврашения хаотической нервной импульсации в ритмическую частоту пачек или коллективное срабатывание нескольких нейронов с увеличением амплитуды потенциала (Iqbal et al., 2014; Rosa et al., 2015). Оказывается, ретикулярная связь "огромного оркестра" электрически взаимодействующих сетей нейропиля способна влиять на когнитивные процессы – "поведенческие перемены" – всего организма (Okun et al., 2015; Jin, Ribelayga, 2016), как и предполагал Гольджи (Golgi, 1883). Показано, что коэффициент электрического сопротивления в ЩК контактирующих нейронов широко варьирует (Schwemmer, Levis, 2014; Chen et al., 2016). Это зависит от площади, занимаемой коннексиновыми молекулами, от ширины межклеточной щели и от состояния активности электропроводящих коннексиновых каналов (Hanani, 2012; Olesen et al., 2012).

Так, принято считать, что при ишемии коннексиновые полуканалы открываются. При этом увеличивается мембранная проводимость и возможно повреждение мембраны. "Открытие крупных каналов проводимости" (Thompson et al., 2006) равносильно увеличению синцитиальных пор или перфорации, вплоть до разрыва нейролеммы. Таким образом, ЩК - это подвижная система пор, размеры которых зависят от степени их электропроводимости и механического растяжения (Salameh, Dhein, 2013). В экспериментах было показано, что через поры ЩК помимо небольших красителей типа процеонового желтого все-таки в некоторых случаях проникают и Fura-2, и Calcium Green, слишком большие, чтобы преодолеть поры ЩК (Buzsáki, 2001), как будто коннексиновые поры, расширившись, превратились в синцитиальные поры. Показано также, что специфические коннексиновые блокаторы электрических синапсов – октанол, галотан и карбеноксолен (Draguhn et al., 2000) – не могут полностью предотвратить эффекты присутствия ЩК, что, возможно, тоже связано с переходом наноскопи-



Рис. 6. Щелевые контакты (ЩК) и их синцитиальные перфорации в одних и тех же участках смешанных синапсов у симпатических ганглиев кошки. *1* – постсинаптическое уплотнение (специализация) мембраны; *2* – ЩК; стрелка – синцитиальные перфорации на местах бывших миелиновых перфораций. Электронная микроскопия. Ув. 40 000.

ческих коннексиновых пор в более широкие синцитиальные поры. Как известно, главный белок, обеспечивающий связь ЩК — коннексин-36. У позвоночных это — 100%-ный маркер ЩК. Тем не менее при исследовании нокаутных животных, лишенных коннексина-36, а значит ЩК, способность гиппокампа к синхронизации спайков и другие его свойства частично сохраняются (Deans *et al.*, 2001; Traub *et al.*, 2003). Следовательно, помимо пор ЩК в гиппокампе существуют еще синцитиальные поры.

Стараясь избегать упоминания о возможности естественного существования синцития в нервной системе, как предсказывали ретикуляристы, некоторые авторы пытаются вместо слова "синцитий" использовать термины "связь неконнексинового типа" (Stebbings *et al.*, 2002), "временное" частичное слияние (Feierbach *et al.*, 2007), "переходная", "временная" электропорация (Barker *et al.*, 2009), "кратковременный перенос белков" (Niu *et al.*, 2009), "полуслияние" (Poschner *et al.*, 2010) и др. Таким образом, авторы невольно склоняются к представлениям о возможности какой-то естественной перестройки ЩК.



**Рис. 7.** Слияние мембран и перфорация щелевых контактов (ЩК) нервных волокон. а, б – варианты слияния мембран ЩК, их истончение вплоть до образования плотной межволоконной перемычки; в, г – образование пор или перфораций на месте бывших ЩК волокон; д – одновременные стадии процесса слияния контактирующих мембран, их перфорации и слияния цитоплазмы смежных волокон; *1* – истонченные ЩК; *2* – перфорации контактов, *3* – слияние цитоплазм контактирующих нейритов. Электронная микроскопия. Ув. 35 000.

Не вызывает сомнения, что скопление в одном месте нейролеммы значительного количества белков (коннексинов), а также сближение и слияние двух контактирующих липидно-белковых мембран обязательно нарушают их билипидную геометрическую упорядоченность, обусловленную гидрофобными свойствами липидов (рис. 9). Это, соответственно, свидетельствует о том, что ЩК — место наименьшей механической устойчивости мембран, наибольшей ее электрической и химической проницаемости. Данные, приведенные рядом исследователей, доказывают, что именно увеличение числа электрических контактов при ишемии, черепно-мозговой травме и эпилепсии инициирует гибель нейронов (Belousov, Fontes, 2013). Если согласиться с тем, что мембранный комплекс ЩК при патологии — исходный фактор альтерации, то следует признать верным наше предположение о том, что ЩК могут превращаться в синцитиальные поры и пер-





**Рис. 8.** Синцитиальное слияние тел нейронов с увеличением числа их ядер. а – двуядерный нейрон с объединенными отростками; б – живой нейрон – дикарион; в – живой трехъядерный нейрон; г – искусственный симпласт нескольких слившихся нейронов, полученный из отдельных живых нервных клеток моллюска; *1* – ядра слившихся нейронов; *2* – везикулоподобные структуры – остатки межклеточных щелей на границах синцитиального слияния клеток; а – импрегнация по Бильшовскому–Грос. Об. 40Ph, ок. 20; б, в – фазовый контраст, прижизненная микроскопия. Об. 40Ph, ок. 20; г – электронная микроскопия, фазовый контраст и компьютерный контраст. Ув. 10000.

форации. Возможно, это один и тот же процесс частичной демембранизации нейронов при их дегенерации. У ЩК и синцитиальных перфораций много общих свойств. Обе структуры образованы спаренными билипидными мембранами, обладают низким электрическим сопротивлением и высокой проницаемостью конкретных красителей (Schwemmer, Lewis, 2014). Именно эти признаки обычно используются для диагностики ЩК. С открытием ЩК у ретикулярной теории появился ряд недоступных ранее доказательств: множественная морфологическая связь волокон, электрическое и частично метаболическое взаимодействие нейронов, способность разностороннего проведения спайка и кумулятивное взаимодействие сетей мозга. Настала пора реабилитации идей великого Камилло Гольджи.

Ретикулярная теория занимает равноправное место в неврологии наряду с признанными заслугами достойной нейронной доктрины. ЩК – это участки адгезионно-спаренных смежных наружных клеточных нейромембран в области сужения их межнейрональной щели (рис. 10а, б). Ширина щели резко колеблется, вплоть до полного слияния прилежащих мембран и образования тонкой электронно-плотной межнейронной перемычки (рис. 7а, б и 10в). Одна из прилежащих мембран может резко локально изменять свою кривизну и



**Рис. 9.** Схема предполагаемого механизма превращения щелевого контакта (ЩК) в синцитиальную перфорацию. а – молекулярная схема ЩК с сужением межклеточной щели; б – нарушение геометрической молекулярной организации билипидных слоев мембран при их сближении и слиянии; в – нарушение механической прочности и перфорация ЩК (демембранизация); 1 – молекулы мембранных белков; 2 – межмембранная щель; 3 – билипидная организация мембраны; 4 – молекулы коннексиновых протеинов; 5 – конформационные изменения белков и расширение коннексиновых пор; 6 – нарушение упорядоченности организации липидных молекул; 7 – плотный тяж (остаток перемычки перфорированного контакта); 8 – остаточное мембранное тельце; 9 – восстановление билипидных мембран по краям синцитиальной перфорации.

адгезию, смещаться и прилипать в конкретной точке к соседней мембране (рис. 10г). Важная особенность ЩК — их способность группироваться в сети и цепочки (рис. 10д), что неоднократно отмечалось в различных отделах мозга (Fukuda *et al.*, 2006; Baranes *et al.*, 2007).

Истончение перемычки предполагает возможность ее прорыва и образования синцитиальной поры. При значительном увеличении микроскопа это действительно проявляется сначала в виде едва угадываемых пор в перемычке между волокнами. Затем поры, возможно, расширяются, образуя крупные синцитиальные перфорации (рис. 11). Это



**Рис. 10.** Варианты и динамика перестройки щелевых контактов (ЩК) в норме. а – ЩК с суженной межмембранной щелью; б – контакт в начале слияния части межмембранной щели; в – полное слияние мембран ЩК; г – односторонняя локальная адгезия мембран при образовании ЩК; д – цепочка серии ЩК; *1* – слияние наружных слоев контактирующих мембран (перемычка); *2* – одиночные ЩК цепочки; *3* – межмембранная щель; *4* – начало сужения межмембранной щели; *N*<sub>1</sub>, *N*<sub>2</sub> – нейроплазмы контактирующих нейронов. Электронная микроскопия. Ув. 25000 (а–г) и 30000 (д).



**Рис. 11.** Строение синцитиальных перфораций слившихся мембран на месте щелевых контактов (ЩК) при альтерации нейрона. а, 6 – общий вид остаточных фрагментов мембран при перфорации ЩК; в – сформированные во время разрыва ЩК еще не отделившиеся остаточные тельца на границе соседних ЩК и возникшей перфорации; г – чередование ЩК и их перфораций при синцитиальном слиянии двух нейронов; 1 – остаточные мембранные тельца; 2 – слившиеся мембраны ЩК; 3 – картина отщепления остаточных мембранных телец; толстые стрелки – перфорации ЩК; тонкие стрелки – плотные изогнутые остаточные тяжи-перемычки разорванного ЩК;  $N_1$ ,  $N_2$  – нейроплазмы контактирующих нейронов. Электронная микроскопия. Ув. 40000.



**Рис. 12.** Варианты терминалей синцитиальных перфораций бывших щелевых контактов (ЩК). а, б – детали остаточных фрагментов перемычки ЩК при большом увеличении рис. 11а, б; в – сохранившиеся части ЩК после его разрыва и превращения в синцитий; г – округление концов слившихся мембран при расширении перфорации; *1* – плотный, возможно белковый, крючкообразный тяж (остаток перемычки ЩК); *2* – оставшаяся истонченная связь слившихся смежных мембран перемычки и образованного из них останочного тельца; *3* – слияние смежных мембран; *4* – оставшаяся часть межмембранной щели ЩК; *5* – межмембранная щель. Электронная микроскопия. Ув. 40000 (дополнительное увеличение рисунков).

не случайные разрывы спаренных мембран. Об этом свидетельствует тот факт, что дефекты образуются обычно рядом с группой других ЩК и в качестве их продолжения (рис. 11а, б). В области перфораций имеется два вида терминалей. Одна терминаль представляет собой плотную структуру, истончающуюся до разрыва (рис. 12в). На ее конце имеется крючковидное окончание (рис. 12а, б).

Фактически это прямое доказательство перфорации ЩК. Вторая форма терминали — сферические утолщения, которые обычно вычленяются, образуя каплеподобные остаточные тельца (рис. 11в). Эти структуры подобны сферическим образованиям, всегда наблюдаемым при механическом разрушении миелиновой оболочки, волокон, также состоящей из билипидных мембран. Иногда остаточное тельце может иметь следы контуров прежней перемычки (рис. 116, 126). На рис. 12в продемонстрированы все стадии деформации ЩК на одном препарате: сужение межмембранной щели, слияние мембран вплоть до образования плотной перемычки между цитоплазмами нейронов и прободение мембран с образованием синцитиальной перфорации между клетками. Когда перфорации резко увеличиваются, их концы могут принимать форму крупных эллипсоидных окончаний со слившимися мембранами смежных нейронов (рис. 12г). У этих терминалей хорошо видны слившиеся смежные слои оболочки соседних волокон. Все перечисленные признаки (стадии) разрушения ЩК можно наблюдать одновременно на одной и той же группе нервных волокон.

#### ЕДИНЫЙ ПРОЦЕСС ДЕМЕМБРАНИЗАЦИИ НЕЙРОНА ОТ ЩЕЛЕВОГО КОНТАКТА ДО СИНЦИТИАЛЬНОЙ ПЕРФОРАЦИИ И ДВУЯДЕРНОСТИ ПРИ ПАТОЛОГИИ

Эксперименты с использованием электронной микроскопии убедительно демонстрируют увеличение числа ЩК и перфораций при патологии. Поэтому мы считали целесообразным проверить описанный механизм превращения ЩК, проанализировав динамику валлеровской дегенерации химических синапсов, которая всегда отмечается при различных нозологических формах заболеваний. Процесс перерезки преганглионар-



**Рис. 13.** Стадии демиелинизации нейронов при патологии. а – изменение щелевого контакта (ЩК) смежных мембран химического синапса на 3-и сут валлеровской дегенерации; б – превращение ЩК в синцитиальные перфорации в типичном месте их локализации по бокам синаптического уплотнения на 8-е сут перерождения; в – количество ЩК (серые столбики) и синцитиальных перфораций (черные столбики) непосредственно после тяжелой черепно-мозговой травмы; г – те же структуры через 5 сут переживания после легкой травмы мозга; *1* – изменения мембран в области ЩК; *2* – перфорации ЩК.

ных симпатических волокон ганглиев truncus sympathicus у крыс полностью повторяет кинетику ЩК других альтераций. Вначале по бокам от плотной синаптической специализации на 5-е сут появляются истончения и признаки деградации мембран (рис. 13а), свидетельствующие об их повреждении, типичном для ЩК. На этом же месте на 8-е сут образуются (рис. 13б) синцитиальные перфорации. При ишемии, черепно-мозговой травме и эпилепсии другими авторами (Belousov, Fontes, 2013; Paltsyn *et al.*, 2014) также отмечалось значительное увеличение числа ЩК, что вполне соответствует нашей гипотезе о превращении ЩК в синцитиальные перфорации.

Превращение ЩК смежных тел нейронов в синцитиальные перфорации удается проследить и при черепно-мозговой травме кроликов. Наиболее удобным для этого оказался сравнительный диагноз длины ЩК и синцитиальных перфораций у нейронов в гиппокампе, которые часто соприкасаются между собой и не имеют полного глиального покрытия. Исследовались процессы при тяжелой (смертельной) травме и легком повреждении мозга кроликов через 5 сут. Оказалось, что при тяжелой травме средняя длина одного мембранного ЩК существенно увеличилась. Общее число ЩК также резко возрасло (рис. 13в). При легкой травме через 5 сут средняя длина всех ЩК, наоборот, уменьшалась примерно в 3 раза.

Предположить какой-либо лечебный эффект за 5 сут было невозможно, тем более, что у некоторых кроликов появились осложнения в виде судорог. При анализе размеров появившихся одиночных синцитиальных перфораций оказалось, что их длина сильно возрастала. Так, если при смертельной травме средняя длина одиночной перфорации почти не отличалась от нормы, то через 5 сут даже при слабой травме (рис. 13в) отмечалось ее резкое увеличение (в 2.7 раза). Следова-



**Рис. 14.** Единый процесс образования щелевых контактов (ЩК) нейронов в культуре ткани (а). б – перфорация смежных мембран со слиянием нейроплазмы и объединение ядер клеток или деградация комплекса контактирующих нейронов; *1* – сближение клеток и образование ЩК; *2* – появление синцитиальной поры и перфорация ЩК; *3* – ликвидация дефекта мембран и возрождение клеточной организации; *4* – формирование дикариона; *5* – дегенерация спаренных нейронов. а–в – прижизненная микроскопия. Фазовый контакт. Об. 20Ph. ок. 10.

тельно, общий размер ЩК через 5 сут уменьшается не сам по себе, а за счет увеличения размеров перфораций. Через 5 сут общая длина ЩК резко уменьшается, но пропорционально растет общая длина синцитиальных перфораций (рис. 13г). Следовательно, ЩК, прорываясь, превращаются в синцитии, т.е. речь идет о едином процессе образования ЩК и их превращения в синцитиальные перфорации.

При травме на срезах обращает на себя внимание процесс увеличения общей длины области соприкосновения контактирующих мембран. Она из точки, удлиняясь, превращается в линию (рис. 14а). В это же время постепенно нивелируется талия контактирующих смежных тел нейронов (80–125°). 8-образная структура спаренных клеток стремится к О-образной форме (рис. 14б). Другими словами, два тела контактирующих нейронов превращаются в единый дикарион, целлюлярный комплекс, содержащий два ядра. Такую же кинетику процессов можно наблюдать и при ишемии, и в культуре ткани.

Образуется единый мембранный процесс от формирования ШК до их изменения с нарушением гидрофобных липидно-белковых слоев, прободением мембран, образованием синцитиальных пор, дальнейшей демембранизацией и слиянием цитоплазмы. При таком слиянии тел нейронов образуются двуядерные клетки. Слияние клеток не останавливает их регенерацию. Интенсивный процесс демембранизации, связанный с расширением и увеличением синцитиальных пор, обрекает ряд клеток на гибель (рис. 14г). Этим объясняется малое число дикарионов в нормальном мозге. Однако некоторые поврежденные клетки, видимо, способны выживать. Они, бесспорно, свидетельствуют о принципиальной возможности нейронов, как и всех других ненервных клеток, осуществлять слияние мембран, способствуя реставрации нейронов. Именно эти дикарионы, очевидно, и встречаются в различных участках "нормального" мозга после его выздоровления. Уже проведены прямые электрофизиологические эксперименты в культуре ткани (McCarthy et al., 2009), когда одни и те же нейроны в присутствии низкопатогенного вируса псевдоводобоязни начинали пропускать низкомолекулярный краситель проционовый желтый, т.е. образовывали ЩК. Но через некоторое время у них обнаруживалась способность пропускать и более высокомолекулярный краситель декстран техас красный, что означало превращение коннексиновых пор в синцитиальные перфорации. При этом все смежные нейроны с абсолютной точностью воспроизводили и ритм, и амплитуду раздражаемых стимулов. Спаренные клетки вели себя как единый слившийся нейрон.

Так как некоторые слившиеся нейроны при патологии все-таки способны выживать после слияния парных мембран и цитоплазм клеток, можно считать, что этот процесс характеризуется регенеративными и компенсаторными свойствами. Сформированные двуядерные клетки — четкий индикатор устойчивого состояния выздоровевших клеток.

Таким образом, сближение двух нейролемм вплоть до их соприкосновения и образования ШК приводит к уменьшению воды межклеточной щели, к контакту липидов мембраны и по закону гидрофобного взаимодействия к нарушению ее стройной организации. В этом состоит причина снижения механической устойчивости, электрического сопротивления, увеличения проницаемости нейролеммы и образования синцитиальных пор и перфораций. Перфорация, постепенно охватывая цитоплазму обеих сливающихся клеток, превращает их в бинуклеарный нейрон. Так, в процессе демембранизации завершается превращение синцития нейронов в двуядерную клетку. Все три описанные статичные структуры (ЩК, синцитиальная перфорация, дикарион) оказываются последовательными стадиями единого реактивного процесса демембранизации нейрона.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бабухин А.И. Электрические органы у рыб. М.: Ретиноиды, 2007. 87 с.
- Кахаль С.Р. Автобиография (воспоминания о моей жизни). М.: Медицина, 1985. 271 с.
- Шаповалов А.И., Ширяев Б.И. Передача сигналов в межнейронных синапсах. Л.: Наука, 1987. 173 с.
- Baranes D., Cove J., Blinder P., Shany B., Peretz H., Vago R. Interconnected network of ganglion-like neural cell spheres formed on hydrozoan skeleton // Tiss. Eng. 2007. V. 13. № 3. P. 473–482.
- Barker M., Billups B., Hamann M. Focal macromolecule delivery in neuronal tissue using simultaneous pressure ejection and local electroporation // J. Neurosci. Meth. 2009. V. 177. № 2. P. 273–284.

- Belousov A.B., Fontes J.D. Neuronal gap junctions: making and breaking connections during development and injury // Trends Neurosci. 2013. V. 36. № 4. P. 227–236.
- Berlucchi G.I. Some aspects of the history of the law of dynamic polarization of the neuron. From William James to Sherrington, from Cajal and van Gehuchten to Golgi // J. Hist. Neurosci. 1999. V. 8. № 2. P. 191–201.
- Buzsáki G. Electrical wiring of the oscillating brain // Neuron. 2001. V. 31. № 3. P. 342–344.
- Chen Z.Y., Shen F.Y., Jiang L., Zhao X., Shen X.L., Zhong W., Liu S., Wang Z.R., Wang Y.W. Attenuation of neuropathic pain by inhibiting electrical synapses in the anterior cingulate cortex // Anesthesiology. 2016. V. 124. № 1. P. 169–183.
- Deans M.R., Gibson J.R., Selitto C., Connors B.W., Paul D.L. Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing Connexin-36 // Neuron. 2001. V. 31. № 3. P. 477–485.
- DiLorenzo D.J., Jankovic J., Simpson R.K., Takei H., Powell S.Z. Long-term deep brain stimulation for essential tremor: 12-year clinicopathologic follow-up // Mov. Disord. 2010. V. 25. № 2. P. 232–238.
- Dogiel A.S. Zur Frage über den Bau der Nervenzeller und über das Verhältniss ihres Axencylinder-(Nerven) Fortsotzes zu den Protoplasma fortsätzen (Dendriten) // Arch. Mikrosk. Anat. 1893. Bd 41. S. 62–87.
- Draguhn A., Traub R.D., Bibbig A., Schmitz D. Ripple (approximately 200-Hz) oscillations in temporal structures // J. Clin. Neurophysiol. 2000. V. 17. № 4. P. 361–376.
- *Feierbach B., Bisher M., Goodhouse J., Enquist L.W.* In vitro analysis of transneuronal spread of an alphaherpesvirus infection in peripheral nervous system neurons // J. Virol. 2007. V. 81. № 13. P. 6846–6857.
- *Ferreira F.R., Nogueira M.I., Defelipe J.* The influence of James and Darwin on Cajal and his research into the neuron theory and evolution of the nervous system // Front. Neuroanat. 2014. V. 8. P. 1–9.
- Friedlander D.R., Levinthal C. Anomalous anatomy of identified neurons in the larval prawn: spontaneous induced by microlesions // J. Neurosci. 1982. V. 2. № 2. P. 121–142.
- Fukuda T., Kosaka T., Singer W., Galuske R.A. Gap junctions among dendrites of cortical GABAergic neurons establish a dense and widespread intercolumnar network // J. Neurosci. 2006. V. 26. № 13. P. 3434–3443.
- *Furshpan E.J., Potter D.D.* Mechanism of nerve impulse transmission at a crayfish synapse // Nature. 1957. V. 180. P. 342–343.
- Golgi C. Sulla struttura della sostanza grigia del cervello (Comunicazione preventiva) // Gazzetta Med. Ital. 1873. V. 33. S. 244–246.
- *Golgi C.* Morphology and disposition of the nervous cells in the anterior central and the superior – occipital convolutions // Alien. Neurol. 1883. V. 4. P. 401–416.
- *Golgi C*. The neuron doctrine-theory and facts // Nobel lecture. 1906. Dec. 11. P. 189–217.
- Golgi C. Opera Omnia. Milan: U. Hoepli. 1903–1929. V. 1-4.
- *Günter J.* Neuronal syncytia in the giant fibres of earthworms // J. Neurocytol. 1975. V. 4. P. 55–62.

ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ № 2 2019

- Hagiwara S., Morita H., Naka K. Transmission through distributed synapses between the giant axons of a sabellid worm // Comp. Biochem. Physiol. 1964. V. 13. P. 453–460.
- *Hanani M.* Intercellular communication in sensory ganglia by purinergic receptors and gap junctions: implications for chronic pain // Brain Res. 2012. V. 1487. P. 183–191.
- Iqbal M., Rehan M., Khaliq A., Saeed-ur-Rehman, Hong K.S. Synchronization of coupled different chaotic FitzHugh-Nagumo neurons with unknown parameters under communication-direction-dependent coupling // Comput. Math. Meth. Med. 2014. V. 2014. P. 1–12.
- Jin N.G., Ribelayga C.P. Direct evidence for daily plasticity of electrical coupling between rod photoreceptors in the mammalian retina // J. Neurosci. 2016. V. 36. № 1. P. 178–184.
- Jones E.G. Colgi, Cajal and the neuron doctrine // J. Hist. Neurosci. 1999. V. 8. № 2. P. 170–178.
- Kawataki T., Sato E., Sato T., Kinouchi H. Anaplastic ganglioglioma with malignant features in both neuronal and glial components-case report // Neurol. Med. Chir. (Tokyo). 2010. V. 50. № 3. P. 228–231.
- Krüger L., Otis T.S. Whither withered Golgi? A retrospective evaluation of reticularist and synaptic constructs // Brain. Res. Bull. 2007. V. 72. № 4–6. P. 201–207.
- Mazzarello P. Camillo Golgi's scientific biography // J. Hist. Neurosci. 1999. V. 8. № 2. P. 121–131.
- *McCarthy K.M., Tank D.W., Ehquist L.W.* Pseudorabies virus infection alters neuronal activity and connectivity in vitro // PLoS Pathog. 2009. V. 5. № 10. P. 1–20.
- Nicol J.A.C. Giant axon of *Eudistilia* vancouveri (Kinberg) // Transact. Roy. Soc. Can. 1948. V. 42. Ser. 3. Sect. 5. P. 107–124.
- Niu X., Gupta K., Yang J.T., Shamblott M.J., Levchenko A. Physical transfer of membrane and cytoplasmic components as a general mechanism of cell-cell communication // J. Cell Sci. 2009. V. 122. № 5. P. 600–610.
- Okun M., Steinmetz N.A., Cossell L., Iacaruso M.F., Ko H., Barthó P., Moore T., Hofer S.B., Mrsic-Flogel T.D., Carandini M., Harris K.D. Diverse coupling of neurons to populations in sensory cortex // Nature. 2015. V. 521. № 7553. P. 511–515.
- Olesen N.E., Hofgaard J.P., Holstein-Rathlou N.H., Nielsen M.S., Jacobsen J.C. Estimation of the effective intercellular diffusion coefficient in cell monolayers coupled by gap junctions // Eur. J. Pharm. Sci. 2012. V. 46. № 4. P. 222–232.
- Paltsyn A.A., Manukhina E.B., Goryacheva A.V., Downey H.F., Dubrovin I.P., Komissarova S.V., Kubatiev A.A. Intermittent hypoxia stimulates formation of binuclear neurons in brain cortex – a role of cell fusion in neuroprotection? // Exp. Biol. Med. (Maywood). 2014. V. 239. № 5. P. 595–600.
- Poschner B.C., Fischer K., Herrmann J.R., Hofmann M.W., Langosch D. Structural features of fusogenic model transmembrane domains that differentially regulate inner and outer leaflet mixing in membrane fusion // Mol. Membr. Biol. 2010. V. 27. № 1. P. 1–11.
- Ramon y Cajal S. Significación fisiológica de las expansiones protoplásmicas y nerviosas de la sustancia gris // Rev. Cient. Med. Barcel. 1891. V. 22. P. 1–15.

- Ramon y Cajal S. Neurons: structure and connexions // Nobel lecture. 1906. Dec. 12. P. 220–253.
- Ramon y Cajal S. Neuron theory or reticular theory? Objective evidence of the anatomical unity of nerve cells. Madrid: Inst. Ramon y Cajal, 1954. 144 p.
- *Ramon y Cajal S.* Histilogy of the nervous system of man and vertebrates // New York; Oxford: Oxford Univ. Press, 1995. 805 p.
- Rash J.E., Kamasawa N., Vanderpool K.G., Yasumura T., O'Brien J., Nannapaneni S., Pereda A.E., Nagy J.I. Heterotypic gap junctions at glutamatergic mixed synapses are abundant in goldfish brain // Neuroscience. 2015. V. 285. P. 166–193.
- *Retzius G.* Das Gehororgan der Reptilen, der, Vögel und der Saugethiere. Stocrholm: Samson und Wallin, 1884. Bd II. 368 S.
- *Retzius G.* Biologische Untersuchundenn // Neue Folge. Stocrholm: Samson und Wallin, 1892. Bd IV. 418 S.
- Rosa E., Jr., Skilling Q.M., Stein W. Effects of reciprocal inhibitory coupling in model neurons // Biosystems. 2015. V. 127. P. 73–83.
- Salameh A., Dhein S. Effects of mechanical forces and stretch on intercellular gap junction coupling // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1828. № 1. P. 147–156.
- Santander R.S., Cuadrado G.M., Sáez M.R. Exceptions to Cajal's neuron theory: communicating synapses // Acta Anat. 1988. V. 132. № 1. P. 74–76.
- Schwemmer M.A., Lewis T.J. The robustness of phase-locking in neurons with dendro-dendritic electrical coupling // J. Math. Biol. 2014. V. 68. № 1–2. P. 303–340.
- Sherrington C.S. Double (antidrome) conduction in the central nervous system // Proc. Roy. Soc. 1897. V. 61. P. 243–246.
- Sotnikov O.S., Laktionova A.A. Membrane fusion and syncytial cytoplasmic connection. Switzerland: Trans Tech. Publ., 2016. 159 p.
- Stebbings L.A., Todman M.G., Phillips R., Greer C.E., Tam J., Phelan P., Jacobs K., Bacon J.P., Davies J.A. Gap junctions in Drosophila: developmental expression of the entire innexin gene family // Mech. Dev. 2002. V. 113. № 2. P. 197–205.
- Thompson R.J., Zhou N., MacVicar B.A. Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels // Science. 2006. V. 312. № 5775. P. 924–927.
- Traub R.D., Pais I., Bibbig A., LeBeau F.E., Buhl E.H., Hormuzdi S.G., Monyer H., Whittington M.A. Contrasting roles of axonal (pyramidal cell) and dendritic (interneuron) electrical coupling in the generation of neuronal network oscillations // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 3. P. 1370–1374.
- Van Gehuchten A. La structure des centres nerveux: la moelle épinière et le cervelet // La Cellule. 1891. V. 7. P. 79–122.
- *Young J.Z.* Structure of nerve fibres and synapses in some invertebrates // Cold Spring Harbor. Symp. Guant. Biol. 1936. V. 4. P. 1–6.

# Retikular Theory of Camillo Golgi and Restructuring Electrical Synapses in Syncytial Perforations

# O. S. Sotnikov#

I.P. Pavlov Institute of Physiology RAS, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia #e-mail: ossotnikov@mail.ru

The published earlier experimental data, confirming the representations of the reticular theory of the organization of the nervous system, are analyzed. It is noted that Sherrington's evidence has refuted the main concept of the neuronal theory of Ramon y Cajal, the law of dynamic polarization of neurons. After the detection of gap junctions (GJ), adhesion of neurites, their high electrical and metabolic permeability and cumulative interaction were detected. The data demonstrating that the GJ are able to transform into syncytial perforations are given, and somatic GJ, under favorable conditions, can convert neurons into dicaryons. It is assumed that all described phenomena are consecutive stages of a single process of reconstruction of the outer cell membrane of the neuron.