

ity of the central neuron controlling goldfish behavior. *J. Integr. Neurosci.*, 2009, v. 8, № 4, p. 441–451.

14. Szabo T.M., McCormick C.A. and Faber D.S. Otolith endorgan input to the Mauthner neuron in the goldfish. *J. Comp. Neurol.*, 2007, v. 505, p. 511–525.
15. Zottoli S.J., Hordes A.R. and Faber D.S. Localization of optic tectal input to the ventral dendrite of the goldfish Mauthner cell. *Brain Res.*, 1987, v. 401, № 1, p. 113–121.

Поступила в редакцию 08.04.10

### **CORRELATION BETWEEN THE SIZES OF THE INDIVIDUAL PARTS OF GOLDFISH MAUTHNER NEURON AND ITS INTEGRAL FUNCTION AFTER EYE ENUCLEATION**

*Ye.Ye. Grigoriyeva, R.S. Shtanchayev, G.Z. Mikhailova, N.R. Tiras and D.A. Moshkov*

Using the method of 3D reconstruction, the structural correlates of significantly increased functional activity of denervated

Mauthner neuron (MN) were studied after the unilateral eye enucleation, that resulted in the irreversible shift of the goldfish motor asymmetry to a «blind» side. It was established that in some cases the functional dominance of MN was significantly correlated with the reduction of the volume of its ventral dendrite, while in the other cases it was correlated with the increase in sizes of its soma and the lateral dendrite. Both structural features, probably, were caused by local redistribution of the neurotransmitters due to the stress of sensory inputs that remained undamaged. Thus, it was demonstrated that the prolonged adaptive changes in goldfish behavior could be regulated by means of specific morphological reorganizations of MN at the level of their individual dendrites by the principle of feedback or feedforward mechanisms.

**Key words:** *Mauthner neurons, dendrites, soma, structure, eye enucleation*

Laboratory of Neuron Ultrastructure, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the RAS, Pushchino; “Biomedical Sciences” Master’s Educational Program, Pushchino State University

© Коллектив авторов, 2010  
УДК 612.823.5.001.57

*О.С. Сотников, Н.М. Парамонова, А.А. Лактионова и И.А. Соловьева*

### **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И ДИСКУССИЯ О СИНЦИТИАЛЬНЫХ СВЯЗЯХ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ**

Лаборатория функциональной морфологии и физиологии нейрона (зав. — проф. О.С. Сотников), Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

В статье для разрешения вопроса о возможности синцитиальной связи в нервной системе впервые приводятся данные об экспериментальном синцитиальном слиянии нейронов. Нейроны, выделенные из ганглиев моллюска *Lymnaea stagnalis* и лишённые окружающей их глии с помощью проназы, сближали между собой путем центрифугирования и оставляли в агрегированном состоянии на 2 сут в культуральной среде. При этом нейроны сохраняли способность образовывать нормальные отростки. На границах смежных клеток возникали контактирующие взаимные выпячивания (ножки), отделенные друг от друга вакуолеподобными расширениями межклеточных щелей. Под электронным микроскопом было видно, что в местах контактов ножек наружные клеточные мембраны разрушены. Выявляются только остаточные фрагменты разрушенных мембран. Цитоплазма же одной смежной клетки непрерывно переходит в цитоплазму другой. Таким образом, эксперименты еще раз подтверждают справедливость клеточной теории относительно общности основных свойств всех клеток и расширяют представления нейронной теории положением о том, что в нервной системе, помимо химических синапсов и электрических мембранных контактов, возможна еще и синцитиальная межнейронная связь.

**Ключевые слова:** *нейроны, культивирование, синцитиальная связь*

В последние годы ортодоксальная нейронная теория неоднократно подвергалась всестороннему рассмотрению и критике со стороны известных исследователей нервной системы: А. Peters [14], R.W. Guillery [11], Т.Н. Bullock и соавт. [8], L. Kruger и T.S. Otis [13]. Разработанная знаменитым нейробиологом Сантьяго Рамон и Кахалем, в связи с развитием науки, как считают крупней-

шие нейробиологии, она нуждается в расширении и усложнении. Ранее синапс рассматривали как единственный способ межклеточной взаимосвязи. Описание ультраструктуры синапса и синаптической щели [9] утвердило это представление. Однако развитие современной биологии позволило существенно расширить наше представление о нейроне, его функциях и межнейронной

взаимосвязи. Оказалось, что в нервной системе существует и совершенно иная межклеточная коммуникация — с помощью электрических контактов между нейронами и между нейронами и глиоцитами. Обнаружено сетевидное распространение информации между нейронами и глиоцитами, аксо-аксонные и дендро-дендритные синапсы, потенциалы действия, рожденные не в аксонном холмике, а в дендритах. Показаны медленные потенциалы, модуляторное действие на нейроны, экстраинаптическое выделение нейротрансмиттеров и другие факторы, участвующие в межнейронном внесинаптическом информационном процессинге. Догма нейронной теории об исключительно импульсной активности нейронов «все или ничего» была опровергнута многочисленными данными внутриклеточной микрофизиологии и исследованиями ионных каналов с помощью фиксации потенциалов. Новые данные не требуют замены нейронной доктрины на теорию сети по К. Гольджи, однако свидетельствуют о настоятельной потребности в ее модернизации.

Особенно важны исследования электрических контактов. Во-первых, их наличие опровергает догму нейронной теории об исключительно химической синаптической связи нейронов [4]. Во-вторых, известно, что они могут быть проницаемы не только для ионов и мелких молекул, но и для олигопептидов. Контакты представляют собой комплекс пор, размеры которых могут изменяться. Проблема расширения поры билипидных мембран, вплоть до их разрыва («закритическая пора»), широко исследуется в мембранной биологии [1, 10]. Этим данным мы придаем большое значение, так как известно, что межмембранные контакты и закритические синцитиальные поры являются необходимой начальной стадией процесса слияния немышечных клеток. Мембранные контакты и синцитиальные перфорации мембран всегда предшествуют слиянию миогенных клеток в миотубы [3, 6, 12, 15]. Отмечены слияния клеток в местах высокопроницаемых контактов [7, 16]. Эти данные полностью соответствуют нашим данным о том, что синцитиальные межнейронные поры и широкие перфорации в нервной системе

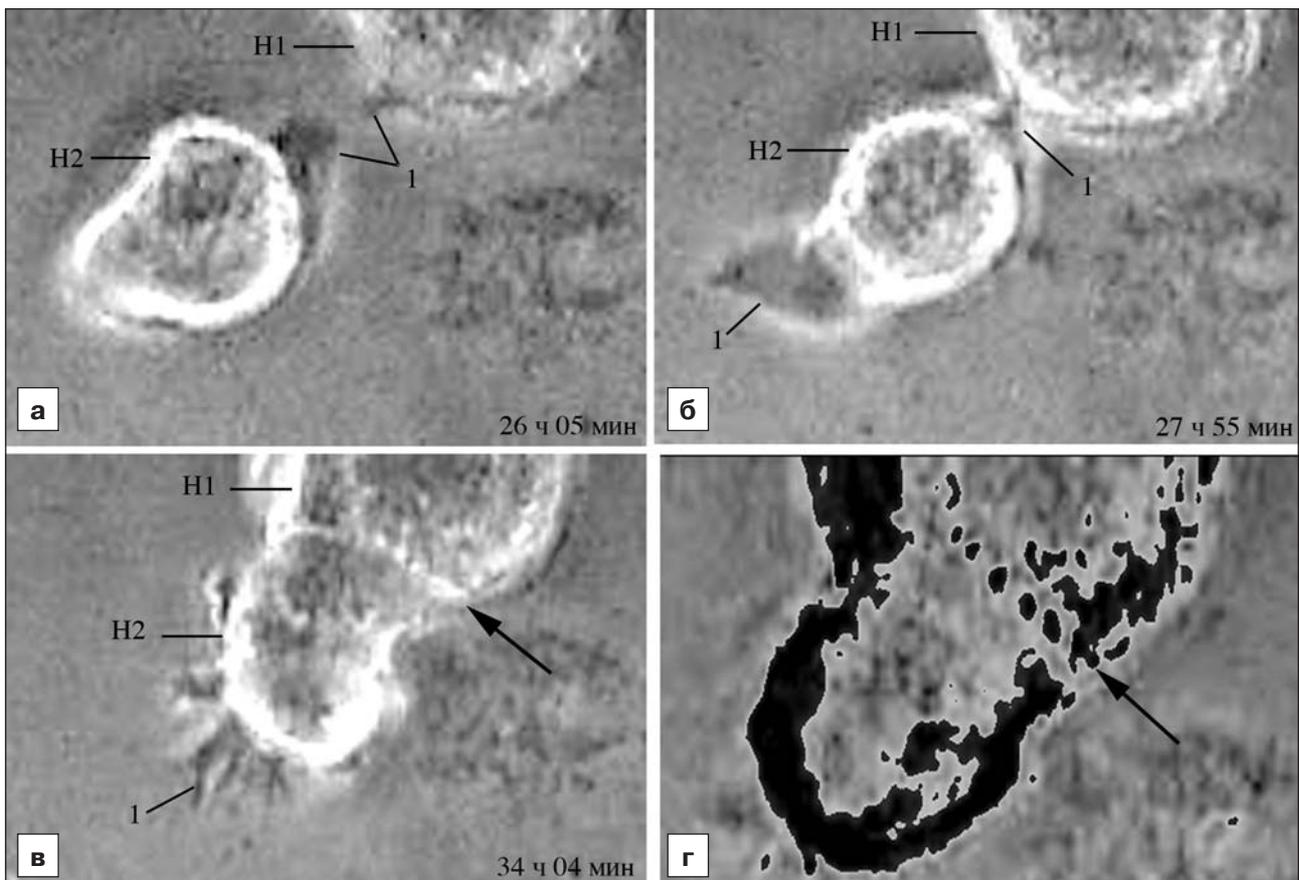


Рис. 1. Формирование синцитиальной связи двух изолированных нейронов в культуре ткани ганглия моллюска *Lymnaea stagnalis*.

а–в — сближение и слияние нейронов, выявленных в фазовом контрасте; г — вакуолеподобные структуры, выявленные с помощью компьютерного эффекта Solarise (те же нейроны, что на рис. 1, в). 1 — нервные отростки; Н1, Н2 — нейроны; стрелки — вакуолеподобные структуры. Время — от начала съемки. Об. 40Ф, ок. 10.

появляются только на основе плотных контактов [5]. Фактически проблема синцитиальных пор и перфораций может быть представлена как проблема изменения плотных контактов.

Таким образом, высказанное нами на основании электронно-микроскопических исследований положение о наличии в нервной системе, кроме химических синапсов и электрических контактов, еще и синцитиальных связей кажется вполне корректным, хотя оно принимается не всеми.

Высказывая принципиальные соображения против возможности нейронов формировать синцитий, некоторые исследователи предлагали нам использовать методику замораживания–скальвания. К сожалению, нам до сих пор трудно понять, что может дать нового эта методика в решении вопроса: есть межклеточная перфорация или ее нет. Замораживание–скальвание отверстия нам кажется неперспективным занятием, которое только увеличит количество вопросов. Однако замечание о слишком малых отличиях по размеру искусственных дефектов мембран и естественных синцитиальных перфораций в ряде случаев может быть существенным. Поэтому мы сочли необходимым провести эксперимент, который бы бесспорно доказал способность нейронов, так же, как и всех других клеток, осуществлять синцитиальное слияние, т.е. получить абсолютное доказательство принципиальной возможности нейронов вступить в синцитиальные взаимоотношения.

**Материал и методы.** Так как ранее экспериментальное слияние нейронов никем не проводилось, нами был разработан специальный метод для слияния клеток, имеющих сателлитные глиоциты, окружающие нейроны. В отличие от обычных методов, применявшихся для слияния других клеток, наш способ исключает использование веществ, способствующих слиянию, электрических разрядов или средств, дополнительно повреждающих клетки. Он не требует повышения температуры среды.

Нейроны ганглия моллюска *Limnaea stagnalis*, вначале освобождали от соединительнотканной капсулы ганглия и сателлитных глиоцитов с помощью протеолитической обработки. Затем их исследовали в культуральной среде Игла MEM (Sigma, Англия) в течение 5 сут [2]. Часть клеток с помощью центрифугирования (3000 g, 15 мин) агрегировали и сохраняли в таком виде в питательной культуральной среде в течение 2 сут, позволяя нейронам восстановить их естественные способности к адгезии и слиянию. Затем с помощью светового фазово-контрастного микроскопа анализировали полутонкие срезы, а с помощью стандартной трансмиссионной электронной микроскопии [5] исследовали ультраструктуру границ контактирующих нейронов.

**Результаты исследования.** В условиях проведенного эксперимента живые нейроны очень часто образуют парные или многоклеточные агрегаты. В культуре ткани на 2-е сутки культивирования у нейронов начинают расти отростки, с

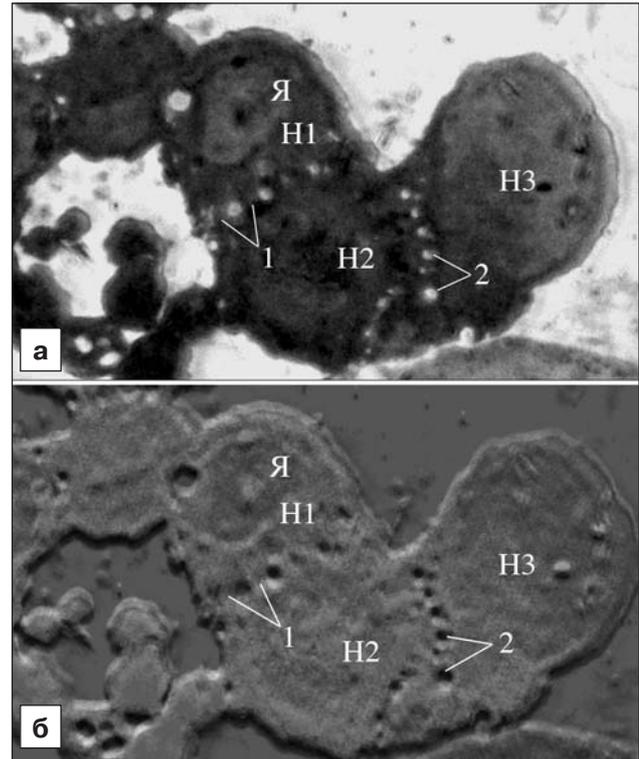


Рис. 2. Формирование цитоплазматических ножек при синцитиальном слиянии нейронов ганглия моллюска *Limnaea stagnalis*.

а — полутонкий срез, докраска толуидиновым синим, фазовый контраст; б — компьютерный эффект Emboss (те же нейроны). 1 — цитоплазматические ножки; 2 — вакуолеподобные расширения межклеточной щели; Н1–Н3 — смежные нейроны; Я — ядро. Об. 40Ф, ок. 10.

помощью которых последние контактируют, и сокращаясь, сближают тела клеток друг с другом. Контактующие тела нейронов формируют 8-образные структуры, которые отделяются вакуолеподобными образованиями (рис. 1). Они плохо видны даже в фазовом контрасте, но с помощью компьютерной обработки изображения вакуолеподобные структуры на границе клеток видны отчетливо.

На полутонких срезах агрегатов клеток различить, образуют ли они простые контакты (соприкосновения) или создают цитоплазматическую непрерывность (синцитий), практически невозможно. Однако, как оказалось, на полутонких срезах с помощью фазово-контрастного микроскопа удается обнаружить образование вдоль контактирующих краев нейронов множественных выпячиваний (цитоплазматические ножки), которые плотно прилегают к исходным «ножкам» смежной клетки. Спаренные ножки отделены друг от друга крупными вакуолеподобными образованиями, которые представляют собой локально резко расширенные фрагменты межклеточного

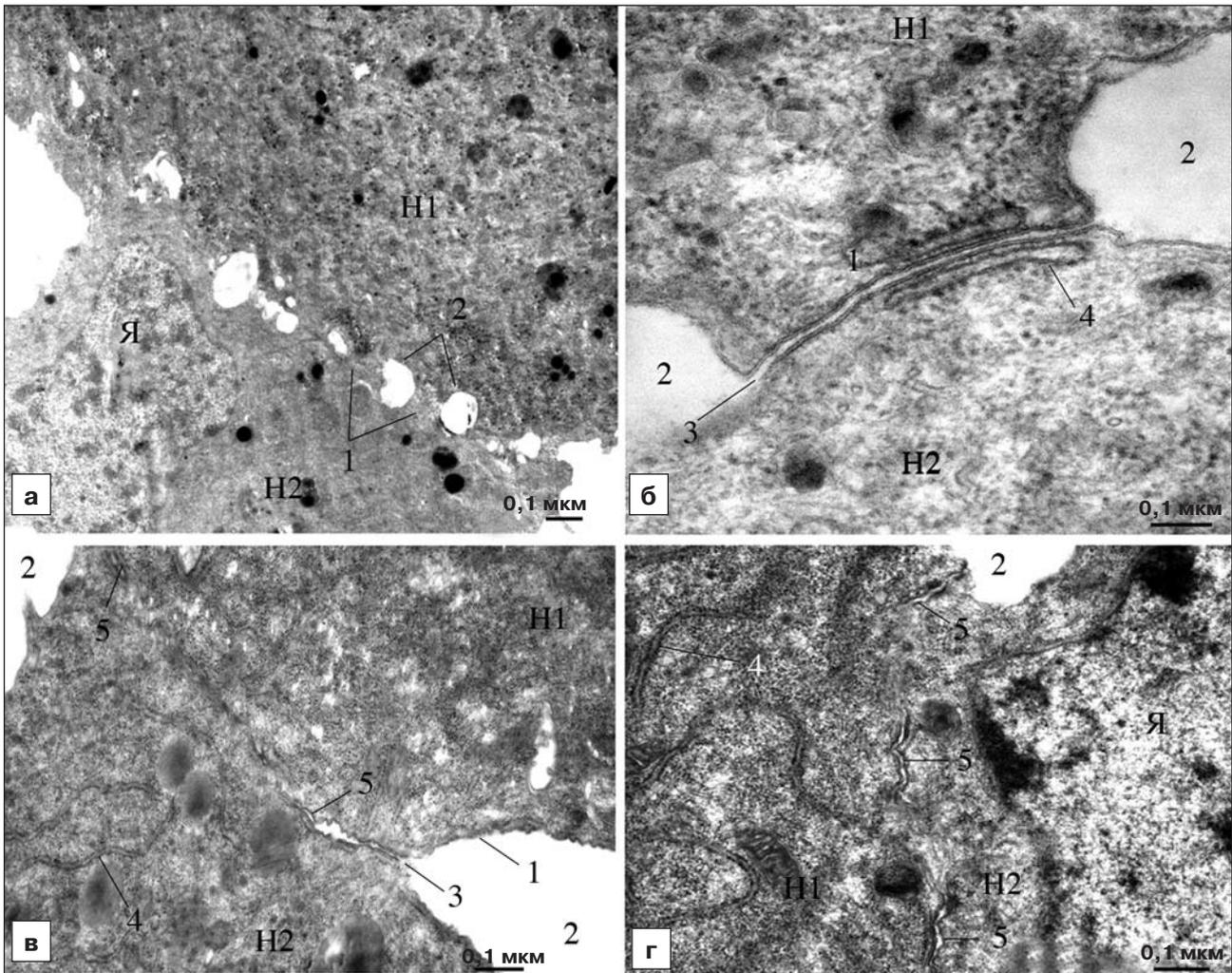


Рис. 3. Границы сливающихся нейронов ганглия моллюска *Lymnaea stagnalis*.

а — множественные образования цитоплазматических ножек и вакуолеподобных расширений межклеточной щели между двумя контактирующими нейронами; б — сохранившиеся наружные клеточные мембраны на границе цитоплазматических ножек двух нейронов; в, г — варианты разрушенных границ между сливающимися двумя нейронами в области цитоплазматического мостика. 1 — цитоплазматические ножки контактирующих нейронов; 2 — вакуолеподобные расширения межклеточной щели; 3 — межклеточная щель; 4 — цистерна эндоплазматической сети; 5 — остаточные фрагменты разрушающихся мембран на границе двух нейронов; Н1, Н2 — смежные нейроны; Я — ядро.

пространства (рис. 2). Чередующиеся «ножки» и вакуолеподобные образования располагаются четко по границам клеток и могут служить ориентиром этих границ под световым микроскопом, особенно при использовании компьютерной программы ACDSee (см. рис. 2, б). Создается впечатление, что именно «ножки» представляют собой цитоплазматические мостики, объединяющие смежные клетки.

С помощью электронного микроскопа это действительно подтверждается (рис. 3). Хотя на некоторых электронных микрофотографиях ножки двух контактирующих нейронов могут быть разделены их наружными мембранами (см. рис. 3, б), большинство мембран, разграничивающих цитоплазму соседних клеток в области ножек, оказы-

ваются разрушенными (см. рис. 3, в, г). Вместо наружных клеточных мембран, разграничивающих цитоплазму нейронов, обнаруживаются только их короткие остаточные фрагменты, местами, сохранившие межклеточные щели шириной около 20 нм. В остальных местах нейроплазма клетки непосредственно переходит в нейроплазму смежной клетки (рис. 4).

**Обсуждение полученных данных.** Таким образом, в проведенных опытах впервые удалось смоделировать синцитиальную связь между нейронами *in vitro*, доказать их слияние и, тем самым, подтвердить принципиальное сходство межклеточных взаимоотношений нейронов с другими клетками. Кроме того, результаты этих экспериментов, по нашему мнению, решают главный

вопрос дискуссии о принципиальной возможности или невозможности синцитиальной связи нейронов. Продемонстрированы не начальные мелкие мембранные поры и перфорации, а показано почти полное разрушение мембран спаренных нейронов и слияние их цитоплазмы.

Однако следует отметить, что как полученные нами ранее данные [5] и результаты настоящего исследования, так и многочисленные замечания по поводу нейронной теории, высказанные Т.Н. Bullock и соавт. [8], R.W. Guillery [11], A. Peters [14] и др., никак не отменяют нейронной теории. Они только ее дополняют и расширяют. Так что эмоциональная составляющая дискуссии может быть снята, и можно сосредоточиться на получении новых данных об участии синцитиальной связи в патологии нейронов, взаимосвязи образования высокопроницаемых межклеточных контактов и синцития и физиологическом значении последнего.

*Исследование поддержано Российским фондом фундаментальных исследований, заявки № 10-04-90000-Бел\_а и № 09-01-00473.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гасс Г.В. и Черномордик Л.В. Обратимые крупномасштабные деформации клеточных мембран при электрической обработке клеток: электроиндуцируемое образование бляшек. Биол. мембр., 1989, т. 6, № 3, с. 318–330.
2. Костенко М.А., Сотников О.С., Чистякова И.А. и Сергеева С.С. Методические и методологические подходы к исследованию нейронов мозга взрослого животного (*Lymnaea stagnalis*) в культуре ткани. Морфология, 1998, т. 114, вып. 4, с. 102–106.
3. Самосудова Н.В., Шунганская В.Е. и Ларин Ю.С. Межклеточные взаимодействия, предшествующие слиянию мышечных клеток. Цитология, 1985, т. 27, № 12, с. 1404–1407.
4. Сотников О.С. Образование нейроно-глиальных контактов в автономном ганглии при пессимуме Введенского. Нейронауки: теоретичні та клінічні аспекти. 2005, т. 1, № 1, с. 47–52.
5. Сотников О.С., Парамонова Н.М., Лактионова А.А. и Соловьева И.А. Цитоплазматическая связь — одна из трех форм межнейронной связи. Успехи физиол. наук, 2010, т. 41, № 1, с. 45–57.
6. Чернышев В.И., Смехова Т.Р., Тараковский Ю.С. и Боровягин В.Л. Структурные изменения мембран эритроцитов человека при взаимодействии с положительно заряженными липосомами. Биол. мембр., 1989, т. 6, № 5, с. 516–528.
7. Bennett M.V.L., Spira M. and Pappas G.D. Effects of fixatives for electron microscopy on properties of electrotonic junctions between embryonic cells. J. Cell Biol., 1972, v. 55, p. 17a.
8. Bullock T.H., Bennett M.V.L., Johnston D. et al. Neuroscience. The neuron doctrine, redux. Science, 2005, v. 310, № 5749, p. 791–793.
9. De Robertis E. and Bennett H.S. Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. J. Biophys. Biochem. Cytol., 1955, v. 1, p. 47–58.

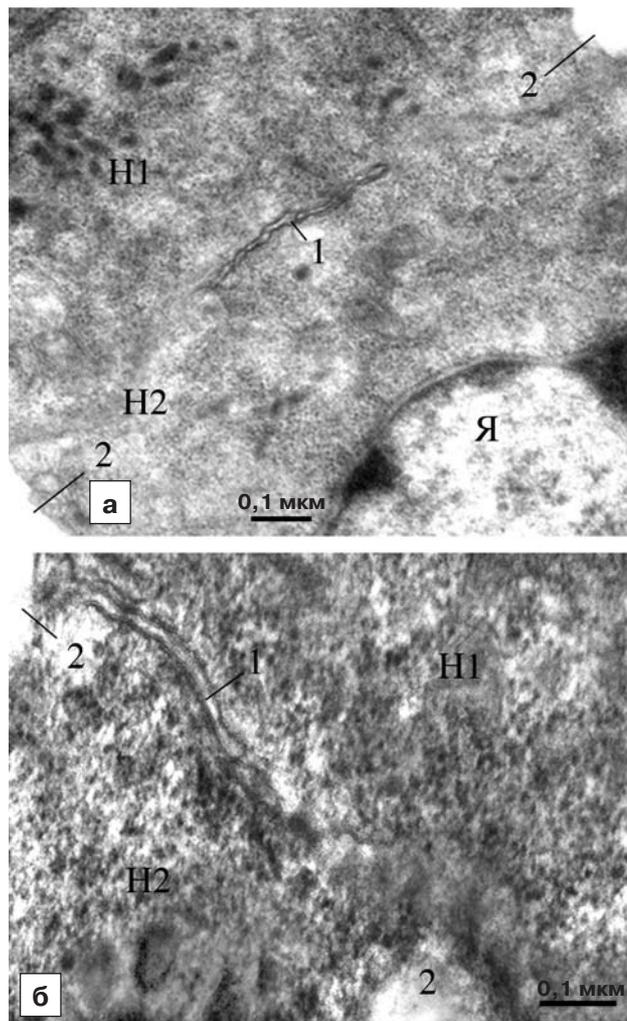


Рис. 4. Остаточные фрагменты разрушающихся наружных клеточных мембран в области ножек смежных нейронов ганглия моллюска *Lymnaea stagnalis*.

а, б — варианты фрагментов. 1 — остатки смежных мембран с закругленными концами; 2 — вакуолеподобные расширения на месте межклеточной щели. Остальные обозначения те же, что на рис. 3.

10. Evans E. and Rawicz W. Entropy — driven tension and bending elasticity in condensed — fluid membranes. Phys. Rev. Letters, 2003, v. 64, p. 2094–2097.
11. Guillery R.W. Roating the neuron doctrine to the cell theory. Should contemporary knowledge change our view of the neuron doctrine? Brain Res. Rev., 2007, v 5, № 2, p. 411–421.
12. Kalderon N., Epstein M. L. and Gilula N.B. Cell-to-cell communication and myogenesis. J. Cell Biol., 1977, v. 75, p. 788–806.
13. Kruger L. and 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.
14. Peters A. Golgi, Cajal and the fine structure of the nervous system. Brain Res. Rev., 2007, v. 55, № 2, p. 256–263.
15. Rash J.E. and Fambrough D. Ultrastructural and electrophysiological correlates of cell coupling and cytoplasmic fusion during myogenesis in vitro. Dev. Biol., 1973, v. 30, p. 166–186.

16. Robinson J.M., Roos D.S., Davidson R.L. and Karnovsky M.J. Membrane alterations and other morphological features associated with polyethylene glycol induced cell fusion. *J. Cell Sci.*, 1979, v. 40, p. 63–75.

Поступила в редакцию 11.03.10  
Получена после доработки 26.04.10

#### EXPERIMENTAL MODELING AND THE DISCUSSION ON THE SYNCYTIAL CONNECTIONS IN THE NERVOUS SYSTEM

*O.S. Sotnikov, N.M. Paramonova, A.A. Loktionova and  
I.A. Solovyova*

To solve the problem of the possibility of syncytial connection in the nervous system, this paper for the first time presents the evidence of experimental syncytial fusion of neurons. Neurons, isolated from the ganglia of the mollusc *Lymnaea stagnalis* and freed from the surrounding glia by pronase treatment, were drawn together by centrifugation and were kept in the culture

medium for two days in the aggregated state. The neurons preserved the ability to generate normal processes. At the borders of adjacent cells, contacting mutual protrusions (feet) were formed that were separated from each other by vacuole-like enlargements of the intercellular clefts. Using the electron microscope, it was shown that at the borders of contacting feet the external cell membranes were destroyed. Only residual fragments of the destroyed membranes were detected. The cytoplasm of one adjacent cell was continuous with the cytoplasm of the other. Thus, the experiments confirm once more the correctness of the cell theory concerning the common main properties of all the cells and expand the concepts of the neuronal theory by the statement that in the nervous system, along with chemical synapses and electrical membrane contacts, the syncytial interneuronal connections are also possible.

**Key words:** *neurons, culture, syncytial connections*

Laboratory of Neuron Functional Morphology and Physiology, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg

© Н.С. Меркульева, Ф.Н. Макаров, 2010  
УДК 612.823.5:612.65:636.8

*Н.С. Меркульева и Ф.Н. Макаров*

## РАЗВИТИЕ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ УПОРЯДОЧЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ КОРКОВО-КОРКОВЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ЗРИТЕЛЬНЫМ ПОЛЕМ 17 И ЗАДНЕМЕДИАЛЬНОЙ СТЕНКОЙ ЛАТЕРАЛЬНОЙ СУПРАСИЛЬВИЕВОЙ БОРОЗДЫ У КОШКИ

Лаборатория нейроморфологии (зав. — проф. Ф.Н. Макаров), Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: mer-natalia@yandex.ru

Проведено исследование развития кластерной организации корково-корковых связей между зрительным полем 17 и заднемедиальной стенкой латеральной супрасильвиевой борозды (поле PMLS) у кошки. Ретроградный аксональный маркер пероксидазу хрена микроинъекцировали в область PMLS. Распределение меченых инициальных нейронов анализировали в поле 17 у котят в возрасте 5 и 12 нед. Показано значимое увеличение площади участка коры, содержащего меченые нейроны, и снижение плотности их расположения в период между 5-й и 12-й неделями. Анализ амплитудного и фазового спектров Фурье демонстрирует различия характера распределения меченых нейронов у котят разных возрастных групп и свидетельствует о незавершенности формирования у них кластерной организации связей. Обсуждаются временные морфофункциональные особенности развития межкорковых связей зоны PMLS по сравнению с другими зрительными корковыми областями.

**Ключевые слова:** *корково-корковые связи, поле 17, заднемедиальная стенка латеральной супрасильвиевой борозды, кошка, ранний онтогенез*

Изучение структуры межнейронных отношений неокортекса привело к созданию теории колончатой (модульной) организации [12, 13]. Модульность первичной зрительной коры (поле 17) у высших млекопитающих прослеживается на всех уровнях организации её межнейронных связей: в строении горизонтальных [5, 14], корково-корковых связей [1, 6] и проявляется упорядоченностью расположения групп (кластеров) нейронов, формирующих эти контакты. Известно, что формирование кластеров, как и других корковых

колонок, происходит во время критического периода раннего постнатального онтогенеза, который характеризуется высоким уровнем нейрональной и синаптической пластичности [8, 16].

Для указанного периода характерны не только развитие основных (простых) зрительных функций (например остроты зрения), но и формирование таких сложных актов зрительного восприятия, как способность оценивать пространственные отношения между объектами, движение в трехмерном зрительном пространстве [7,