

УДК 576.522

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНЫХ И НЕВОЗБУДИМЫХ СМЕЖНЫХ НЕРВНЫХ МЕМБРАН ПОСЛЕ ЭЛЕКТРОАКТИВАЦИИ

© 2023 г. О. С. Сотников*

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: ossotnikov@mail.ru

Поступила в редакцию 24.06.2022 г.

После доработки 22.07.2022 г.

Принята к публикации 15.09.2022 г.

Давно признано, что парабиоз и паранекроз – это две близкие цитологические теории, с различных научных позиций продемонстрировавшие промежуточное состояние клетки между жизнью и смертью. Целью нашей электронно-микроскопической работы было исследование активных и невозбудимых мембран нервных и глиальных клеток при пессимальном торможении. Главным признаком паранекроза считалась денатурация и агрегация белка мембран, проявившаяся в уменьшении его степени дисперсии и дегидратации. Парабиоз вызывался пессимальной частотой электроактивации симпатического ганглия белых крыс. В результате аксолема превращалась в толстую мембрану, усиленную бахромой и появлением десмосом. Возникали налипания белка с внутренней стороны нейролеммы в виде пирамид, которые ретрагируя, искривляли мембрану. В ее изгибах образовывались пирамидоподобные рыхлые агрегаты межмембранного белка с наружных сторон глиальной и аксолеммной мембран, которые, сливаясь, превращались в подобие песочных часов и септ. Септы локализовались в межклеточных щелях аксонов и глии и часто пересекали обе мембраны. Процесс агрегации и ретракции белка локально сужает межклеточную аксо-аксональную и аксо-глиальную щели. Образуются щелевые и плотные контакты. Таким способом мы впервые получили экспериментальное образование межклеточных мембранных контактов, отвечающих всем морфологическим признакам. Все реактивные изменения, возникающие *de novo*, рассматриваются как один развившийся под воздействием частотной электростимуляции обратимый процесс денатурации и агрегации околосмембранных белков. Импульсация препарата восстанавливается в течение минут. Предполагается, что выявленные изменения, паранекроз, являются морфологическим проявлением парабиоза.

Ключевые слова: морфология парабиоза, паранекроз нервной ткани, толстые мембраны, септы при электростимуляции, щелевые нейронно-глиальные контакты, плотные контакты

DOI: 10.31857/S004213242301009X, **EDN:** HLNJCO

ВВЕДЕНИЕ

Мембрана рассматривается как тонкий липидный бислой (70 нм) с собственными встроенными в мембрану и периферическими протеинами, которые образуют единое неразрывное сплетение молекул белка. Активная нейрональная и глиальная невозбудимая мембраны взаимосвязаны. Их разделяют только для научных и учебных целей. Мембраны очень динамичны. Белки мембран могут перемещаться между липидами, вращаться и диффундировать между слоями. Связующую роль липидов в мембране играет закон взаимодействия внутри гидрофобных жирных кислот. Основная вода мембран связана с белками. Половину веса мембран составляет белок. Морфологию построения и изучение роли денатурации и агрегации околосмембранных протеинов при электростимуляции до пессимального торможения являются целью

настоящего исследования. Предполагается выявить структурные изменения нервной системы (паранекроз) при парабиозе.

Известно, что электрическая активность усиливает регенерацию поврежденных ядер мозга (Nekhendzy et al., 2006; Jiang et al., 2012). Подпороговая стимуляция волоконных сетей из примоторных отделов применяется для изучения кортико-подкорковых связей (Herbet et al., 2013; Schucht et al., 2013). Широко используются различные модификации электростимуляции при лечении эпилепсии (Xu et al., 2016; Mardani et al., 2018) и восстановлении спинного мозга после травм (Rath et al., 2018; Calvert et al., 2019; Gerashenko et al., 2019). К сожалению, никаких данных о морфологии нервной системы при обычной или пессимальной электроактивации нам найти не удалось. Большинство исследований влияния электростимуляции на

нервную систему состоит в изучении химических синапсов, размеров бутонов и сом, распространения синаптических пузырьков, теории синаптического кругооборота медиаторных пузырьков.

В организме, как известно, почти все тканевые клетки контактируют друг с другом. Смежные мембраны обязательно взаимосвязаны химически и физически. Следовательно, множественные детальные описания одиночных клеточных мембран во многом неполноценны или даже ущербны (Финкельштейн, Птицын, 2012). Существует явная потребность в изучении смежных нейронно-глиальных мембранных взаимодействий в различных жизненных условиях. Целью исследования было выяснить, имеет ли нервная и глиальная системы какие-то морфологические эквиваленты при электрической стимуляции и чем отличаются реакции активных мембран аксонов и невозбудимых глиальных мембран на воздействие частотной импульсации. Данные о белковом окружении и реакциях смежных нейронно-глиальных мембран недостаточны. Нет полных данных о межклеточных структурных отношениях между нейронами и глиоцитами. Хотя такие структуры, как дополнительные рыхлые пирамидальные выпячивания, мостики, септы и бахромы могут повлиять на возбудимость нейрона (Ogawa, Rasband, 2008).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были *truncus sympathicus* 10 белых крыс линии Wistar. Эксперименты проводились в соответствии с требованиями Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) 1986 г. и рекомендациям этического комитета Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол №02/02 от 02 февраля 2022 года). После препарирования *truncus sympathicus* выделялся одиночный поясничный ганглий. Его межганглионарные ветви помещали в закрепленные стеклянные пипетки, заполненные раствором Рингера. Раздражение осуществляли электростимулятором ЭСУ-1 (СССР). Отведение тока проводилось от коннективов с помощью изолированных неполяризуемых хлорсеребряных электродов и усилителя. Ответ регистрировали на осциллографе. Препарат стимулировали, добиваясь пессимума частоты. Стимуляция препарата осуществлялась с частотой 150 имп./с (1–2 В, 0,2 мс). Импульсация после опыта появлялась у ганглия через 9–12 мин. После прекращения стимуляции потенциалы действия (ПД) восстанавливались в течение минут. После электрофизиологического эксперимента поясничный ганглий фиксировали в течение 1 ч в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида (Acros Organics, США) и 4%-ном – параформальдегида, приготовленного на 0,1 М какодилатном буфере рН 7,4 (Sigma, Израиль) при 4°C. Далее фиксацию проводили в 1%-ном растворе охлажденной четы-

рехокси осмия (Sigma-Aldrich, Германия). После дегидратации в растворах этилового спирта материал заливали в смесь аралдитов (Fluka, Швейцария). Ультратонкие срезы готовили на ультратоме Leica Microsystems (Австрия). Просмотр и фотосъемку проводили в электронном микроскопе FEI Tecnaï G2 Spirit BioTWIN (Нидерланды) при напряжении 80 кВ. Общеизвестно, что при электронно-микроскопическом исследовании нервной системы обычно импрегнируются и хорошо контрастируются только фосфолипидные двухслойные мембраны и денатурированные протеины, образующие внутренние и околосмембранные структуры (Гайер, 1974; Миронов и др., 1994). Это позволяет, даже в отсутствии гистохимии, интерпретировать некоторые морфологические изменения, такие как денатурация и агрегация белков в процессе электростимуляции.

Гистологические методы фиксации предназначены для исследования нормального строения органов, тканей и клеток. При изменении структур предполагается регистрировать эффект по конечному результату. Гистологическая фиксация при этом не предназначена для исследования процессов и динамики структур. При денатурации и агрегации учитываются известные естественные свойства протеинов, такие как: ретракция агрегатов и увеличение оптической плотности (видимости белка) при его скоплении и фиксации. Морфологическое исследование известного физиологического процесса предполагает гипотетическую связь вариантов структур как их динамику.

В разделе “Материалы и методы” необходимо оговориться, что все представленные в статье четкие и твердые фиксированные в препарате структуры являются полужидкими, гелеподобными образованиями в динамике. Околосмембранные скопления протеинов, формирующие в экспериментах новые дополнительные морфологические структуры, впредь будут именоваться авторами “бахромой”. Используя термин “парабиоз”, Н.Е. Введенский имел в виду существенные прижизненные изменения нейрона (пара – греч. – “около”). В англоязычных же журналах авторы единодушно используют термин “парабиоз” как экспериментальное хирургическое соединение сосудистых систем двух животных (Conese et al., 2017).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При реакции на электростимуляцию изменяются обе мембраны ганглия *truncus sympathicus*: и активная, и невозбудимая, но не одновременно. Аксоны после пессимальной частотной стимуляции оказались шире (толстые мембраны), чем мембраны глиоцитов (рис. 1). Общее расширение аксолеммы касается больших площадей, но это не тотальное утолщение. Примечательно, что такое наблюдение соответствует известному поло-

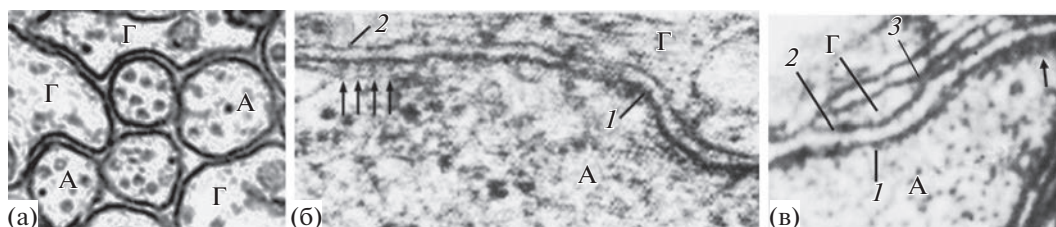


Рис. 1. Сравнения активных и невозбудимых мембран ганглия симпатического ствола крыс после активации. (а) – активные и невозбудимые мембраны в норме; (б) – толстая активная мембрана; (в) – бахрома расширяет аксолемму; 1 – толстая аксолема; 2 – тонкая глиолема; 3 – соединения внутренних листков глиолемм; стрелки – конусовидные и другие налипания бахромы под мембраной аксона; А – аксон; Г – глия, здесь и на рис. 2–5, 7. Электронная микроскопия. Ув. 26000.

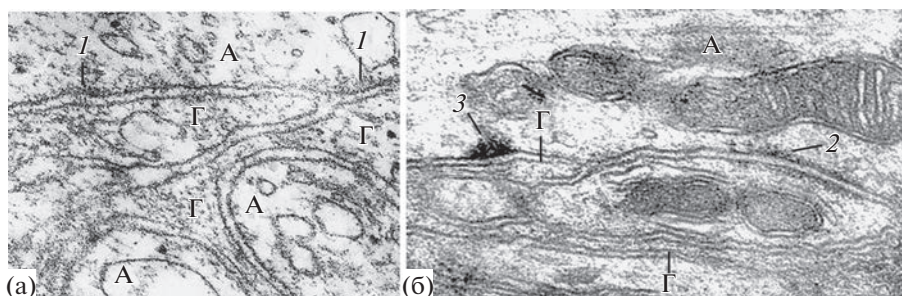


Рис. 2. Увеличение аксолеммы в ширину за счет нарастания бахромы. (а) – бахрома толстой мембраны; (б) – одно- и двухсторонние десмосомы; 1 – рыхлая бахрома, увеличенная переходная форма десмосомы; 2 – двухсторонняя десмосома; 3 – односторонняя десмосома. Электронная микроскопия. Ув. 34000.

жению о накоплении натриевых ионов с внутренней стороны аксолеммы во время активации. Толщина аксолеммы увеличивается за счет примембранных отделов аксоплазмы (бахромы). Такая мембрана – характерный признак и первого отдела аксона нейрона – генератора спайков. Можно сделать вывод, что эти морфологические и физиологические явления, возможно, взаимосвязаны. Такое появление толстых мембран в норме действительно соответствует тем аксолемам, которые часто имеют дело с электрическим ПД. Иногда этот слой бахромы формирует структуры, подобные мелким белковым пирамидкам, направленным вершиной внутрь к аксоплазме и напоминают толстую аксоплазму перехватов Ранвье, одностороннюю десмосому, мембрану специализаций химических синапсов и десмосому границ сердечных миоцитов, то есть тех мембран, которые действительно часто имеют дело с электрическими импульсами. Видимо, вслед за утолщением мембран аксона в нашем опыте появляется локальная, более интенсивная белковая мембрана – десмосома (рис. 2). Такие структуры на толстой мембране могут быть односторонними и двусторонними. При этом межмембранная щель может иметь поперечные рыхлые скопления белка (рис. 2а). Важно отметить, что в нашем эксперименте речь идет об одном и том же морфологиче-

ском процессе при активации препарата. Во время пессимума частоты развивается денатурация протеинов мембран, что согласуется с увеличением их адгезии и появлением аксональных около-мембранных агрегатов белка.

Агрегация подвижных масс белка – это всегда их ретракция. Поэтому, когда на толстой аксолемме одиночная десмосома резко выражена, она начинает изгибать мембрану, формируя инвагинацию на подобие эндоцитоза (рис. 3а). Это часто происходит при наличии адгезионной связи аксолеммы и глиолеммы или при отсутствии последней. От эндоцитоза его отличает только прикрепление уплотненной бахромы к аксолемме не снаружи, а изнутри мембраны. Но постепенно белковые агрегаты появляются в виде треугольных теней и внутри межлеточных глио-аксональных промежутков (рис. 3а, 2) снаружи глиолеммы. Они начинают, видимо, расти от глиальной мембраны. Причем локально увеличивается и толщина глиолеммы. Это сочетается с проявлением в межклеточной щели агрегатов, полных поперечных перемычек (рис. 4), мостиков, септ (septate junction) денатурированного белка. Очевидно, глия тоже участвует в процессе лабильности аксоплазмы. Видны разные формы этих мостиков от едва заметных темных структур глиолеммы и межклеточных конусовидных агрегатов с противополож-

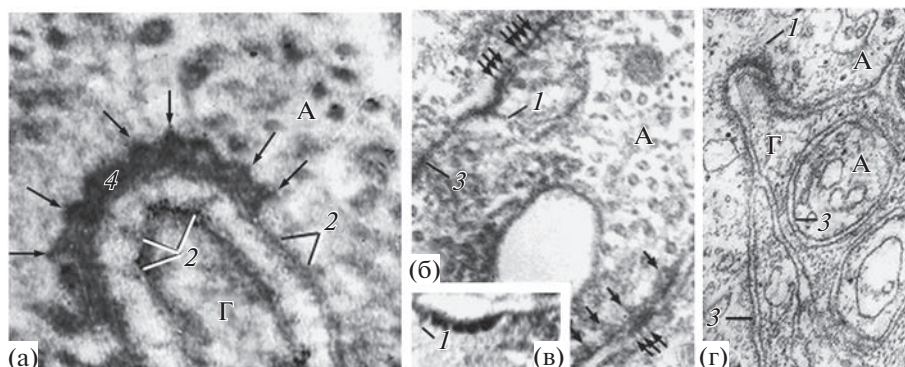


Рис. 3. Эндоцитоз с глией внутри и без нее. (а, г) – конусовидная бахрома с эндоцитозом; (б, в) – искривление аксолеммы в области односторонней десмосомы; 1 – конусовидные агрегаты белка на внутренней стороне аксолеммы; 2 – развивающаяся конусовидная агрегация внутри и вне межклеточной глио-аксональной щели; 3 – толстая мембрана; 4 – пирамидальные конусовидные искривления аксоплазмы; стрелки – конусовидная бахрома на цитоплазматической стороне аксолеммы. Электронная микроскопия. Ув.: (а) – 35000; (б, в) – 100000.

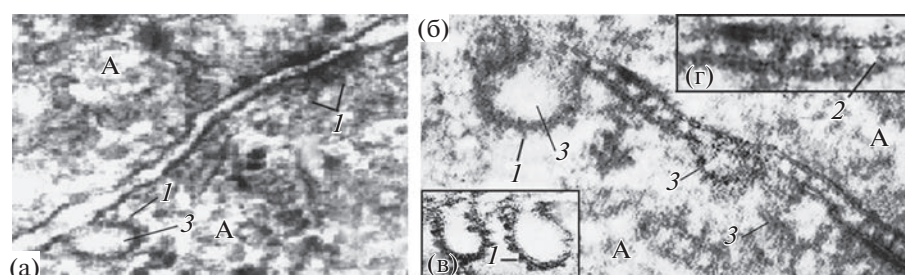


Рис. 4. Нейроэндоцитоз и мембранные септы при частотной электроактивации. (а) – десмосома и нейроэндоцитоз появляются одновременно на одной аксолемме; (б) – межмембранные септы при электростимуляции; (в) – конусовидные агрегаты впячиваний аксолеммы внутрь тела клетки; (г) – перемычки на разных стадиях формирования от конусов до песочных часов и прямоугольных межмембранных мостиков; 1 – конусовидные внутрицитоплазматические выпячивания бахромы; 2 – тень формирующейся септы; 3 – нейроэндоцитоз. Электронная микроскопия. Ув.: (а) – 18000; (б) – 35000; (в) – 28000; (г) – 40000.

ных сторон мембран (песочные часы) до их соединения и формирования четких прямоугольных септ (рис. 4г). Рядом с группами септ находятся множественные, подобные эндоцитозу, впячивания аксолеммы, которые свидетельствуют о продолжении одного и того же процесса изменения аксолеммы, несмотря на множество проявлений агрегации белка.

Некоторые септы имеют определенную упорядоченность (рис. 5). Белковые осмиофильные агрегаты четко сочетаются с просветлениями, контрастными белыми промежутками, лишенными белка. Возможно, это разрыв длинного плотного белкового импрегнированного межмембранного тяжа на одиночные фрагменты с ретракцией. Но так построены только некоторые септы, а большинство из них обладает неровностями длины промежутков между септами и разной плотностью импрегнации OsO₄ (рис. 5). Это отличает их от естественных, “нормальных”, описанных другими авторами, постоянных септ. Наш эксперимент позволяет предположить, что септы, посто-

янно встречающиеся у беспозвоночных и у позвоночных в других отделах мозга, у перехватов Ранвье также, возможно, являются временно приходящими структурами, а не постоянными, как предполагают многие авторы. По форме, видимо, можно выявить динамику их построения. Важно отметить, что скопления белков способны не только соединять глиальную и аксональную мембраны нервных волокон, они в состоянии пронизывать обе смежные мембраны, нейрональную и глиальную, насквозь (рис. 5в). То есть глия тоже участвует в этом процессе формирования пессимума частоты.

В едином процессе денатурации и агрегации белков следует отметить также структурные изменения мембран химических синапсов. Они так же интенсивно соединяются с глией такими же мостиками при частотной электростимуляции. Особенно заметны пирамидоподобные аксональные скопления белка у пресинаптических специализаций (рис. 6), хотя до стимуляции в контроле преобладала бахрома в специализации дендрита.

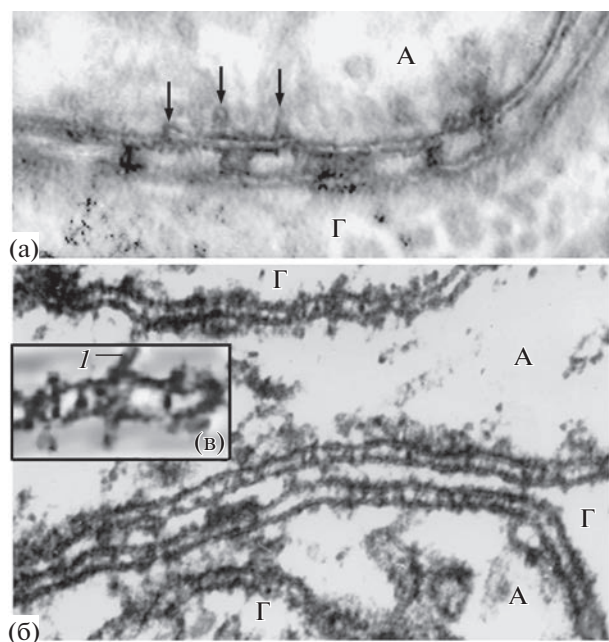


Рис. 5. Межклеточные септы после пессимальной стимуляции по Введенскому. (а) – мембранные септы разной длины и глиолемма равной толщины с аксолеммой; (б) – септы разнообразной формы; (в) – септы, пересекающие нейрональную и глиальную мембраны; 1 – глио-аксональная сверхдлинная септа; стрелки – треугольные агрегаты. Электронная микроскопия. Ув.: (а) – 40000; (б) – 24000; (в) – 30000.

Постсинаптические дендриты имеют большую толщину мембраны, как и аксоны. Синаптическая специализация дендрита очень плотная. Межклеточная щель сужена в связи с накоплением множества белковых перемычек. Септы здесь очень тонкие, но их множество.

Кроме локальных септ на препаратах видны и межклеточные щели, занятые осмиофильной чернью (рис. 7), или просто удлинненные большие межклеточные пространства. У одних из этих структур обе смежные мембраны сужены и имеют одинаковую толщину. Они ничем не отличаются от щелевых контактов (ЩК) или плотных контактов (ПК): 7 четких линий (рис. 7г) или 5, если бахрома маскирует мембраны (рис. 7в), или 3 линии, если осмиевой чернью заняты обе мембраны, а также водные межмембранные расширения (рис. 7а). При агрегации и денатурации белки, как известно, выделяют значительное количество “свободной воды”. Дегидратация – это неперемное условие паранекроза. Расширение щели после формирования ЩК – это признак выделившейся воды белка по бокам контакта.

Аксонально-глиальные контакты могут быть заняты сплошной импрегнационной белковой массой и некоторым сближением соседних стянутых мембран при активации. Следует отметить,

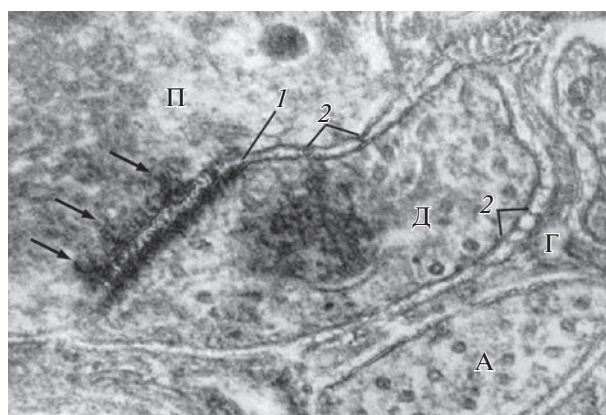


Рис. 6. Межклеточные денатурационные белковые агрегаты в области медиаторного синапса. 1 – межмембранная щель; 2 – тонкие глио-аксональные септы; стрелки – пирамидальная бахрома аксолеммы; А – аксон; Г – глиоцит; Д – дендрит; П – пресинапс. Электронная микроскопия. Ув. 38000.

что на рис. 7 межклеточные аксо-глиальные ЩК или ПК обнаружены нами при пессимальной стимуляции вегетативных ганглиев впервые. В наших экспериментах они занимают небольшие участки мембран, но гораздо большие, чем септы. Межклеточные щели сужаются, образуя ЩК и ПК. Это первое экспериментальное получение щелевых аксо-глиальных межмембранных контактов при сохранении глии, то есть между активной и невозбудимой мембранами. Если сужение не происходит, такие заполненные осмиевой чернью межклеточные щели морфологами обычно называются непрерывными, сплошными контактами (continuous junction). По-видимому, они представляют собой стадии формирования ЩК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Описывая гистологическую фиксацию как чрезмерное паранекротическое раздражение белков, приводящее к смерти, Д.Н. Насонов и Л.Я. Александров (1940) не предполагали, что при фиксации эти два состояния можно разделить, что реально получить и зафиксировать только паранекротические изменения. Не исключено, что это было одной из причин отсутствия морфологических исследований парабиоза до сих пор. Но оказалось, что ряд фиксаторов, например OsO₄, глутаральдегид и некоторые другие вещества, благодаря своим физическим способностям, способны создавать “тонкий осадок” и быстрое затверждение препарата, препятствующее перераспределению белков, опережающее коллоидные изменения в протоплазме (Гайер, 1974; Миронов и др., 1994). Так электронная микроскопия получила доступ к паранекрозу и парабиозу, хотя это конечно не исключает появления при фиксации

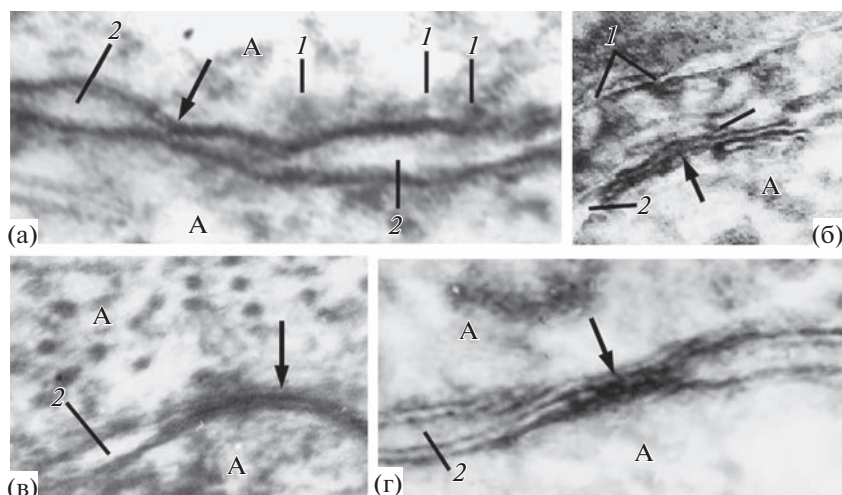


Рис. 7. Суженные межклеточные щели, заполненные агрегированными белками (ЩК и ПК) и расширения по бокам контактов. (а) – ЩК и водное расширение межклеточной щели по бокам от gap junction; (б) – аксо-глиальный ЩК; (в) – аксо-аксональный ПК; (г) – аксо-аксональный ЩК; 1 – треугольные межклеточные белковые агрегаты; 2 – водные расширения межмембранной щели; стрелки – ЩК и ПК; А – аксон; Г – глия. Электронная микроскопия. Ув.: (а, г) – 38000; (б, в) – 24000.

мелких артефактов в препаратах и за пределами разрешения ультрамикроскопов.

Известно, что во время частотного электрического раздражения по Введенскому и наступившей пессимальной частоты, симпатический ганглий крысы претерпевает волну всесторонней деполяризации. Возбудимая мембрана выполняет роль носителя ПД, а глиолема как бы неактивна, но наши эксперименты показывают и ее участие в пессимуме частоты. Прежде всего, обращают на себя внимание денатурация и агрегация подвижных протеинов. Околосмембранные белки аксолеммы постепенно формируют ее толщину и пирамидоподобные агрегаты на цитоплазматической стороне мембраны нейритов, на той же внутренней стороне мембраны, где и скапливаются ионы Na^+ при частотной активации. Появляются дополнительные структуры. Агрегаты белка у аксона так же, как у глии, заканчиваются соединениями мембранных налипаний в форме прямоугольных септ, прободающих обе мембраны. Появление новых структур – это, пожалуй, первый случай, когда морфологически удается получить не изменение в эксперименте, а построение *de novo* протеиновых образований.

Значение фундаментальных исследований Н.Е. Введенского, несомненно, играет важную роль в современной нейрофизиологии. Еще в первых исследованиях профессора М.А. Массона (Masson, 1837) в автоэкспериментах болевых ощущений при частотной стимуляции было обнаружено удивительное явление – прекращение боли при высоких частотах активации. Это явление широко используется в настоящее время в практической медицине на человеке и животных (Fisher et al., 2015;

Ling et al., 2019; Janjua et al., 2021). Но его исследования не были остановлены на этом. В продолжение активации, точнее после нее, Н.Е. Введенский обнаружил неотчетливые и непонятные шумы в стетоскопе (Введенский, 1952). Он понимал, что это нервная импульсация, но объяснить ее при развивающейся пессимальной частоте в XIX в. было невозможно. В наше время с помощью осциллографов удается показать эту уникальную, таинственную импульсацию после блокирования нервного проведения. Появление новых, обнаруженных нами при электростимуляции электрических синапсов (рис. 7), – есть возможное объяснение этого явления. Инновационное исследование пессимума частоты еще может принести дополнительные результаты.

Полученные морфологические данные имеют и общебиологическое значение. Это касается неожиданного появления в нервной системе при электростимуляции третичной и четвертичной структур белков (септ, ЩК и др.). Септы – давно описанные в цитологии органеллы. Сейчас они признаны самостоятельными и постоянными клеточными структурами, происхождение и природа которых неизвестны (Rice et al., 2021). Они описаны у беспозвоночных и позвоночных между эпителиальными клетками, в нервной системе, а также у человека при патологии. Септы даже рассматриваются многими как исключительный признак некоторых видов беспозвоночных. Они описаны у дафний, тараканов, раков, жуков, термитов, гусениц, червей, в основном, между эпителиоцитами и кутикулой животного. Или у эпителиев органов, например, слюнных желез. Мы проанализировали 52 работы авторов и все они считают эти

структуры постоянными образованиями нормальной клетки, но наш опыт свидетельствует об их временном, возможно альтерационном, образовании.

У этих септ есть одна общая особенность. Они встречаются обязательно совместно с другими клеточными органеллами, такими как десмосомы, ЩК, ПК и continuous junction, как будто они возникли по одной причине, одновременно, то есть, так же, как у нас, после электростимуляции. Единственное, чего мы не встречали в статьях других авторов, это структуры подобные эндоцитозу, которые в большом количестве встречаются при пессимальной электростимуляции. В последнее время появилось большое количество статей о функции паранодальных септ перехвата Ранвье (Vallat et al., 2017; Manso et al., 2019; Faivre-Sargailh, 2020). К сожалению, все изложенные в статьях идеи о функции этих септ высказываются в виде необоснованных предположений. На основании прижизненных исследований перехватов мы считаем, что непостоянство и значительная изменчивость септ перехватов также являются показателем их временного появления, связанного с условиями эксперимента (Сотников, Ревенко, 2022).

Проницаемость фосфолипидных искусственных мембран вообще появляется только тогда, когда в мембрану из внешнего раствора вводятся пептиды и белки (Ходоров, 1975). Давно известно, что белки дестабилизируют мембраны, образуя мелкие и крупные поры. Формирование в наших препаратах новообразованных щелевых контактов позволяет по-новому обсудить порообразование белков при электростимуляции. Порообразующие белки происходят из многих не связанных семейств. Они относятся к ионным порам и ионным каналам. Известно, что они имеют свойство изменять величину перфораций от 0.7 до 40 нм (Omersa et al., 2019). Недавно показано, что такие белки способны пропускать бактерии (Cosentino, García-Sáez, 2018) и внутриклеточных паразитов (Marchioretto et al., 2013; Guerra, Carruthers, 2017). Не исключено, что изменение конформации белков, как мы видели при электростимуляции, происходит и с другими белками мембран. Переменный диаметр пор (каналов) достигается либо за счет включения разного количества белковых субъединиц, либо за счет растяжения области жидкой мембраны по периметру каналов. То есть поры могут быть не только ионными, но и более крупными, визуализированными (Laube et al., 1996). При агрегации во время электростимуляции волокон и тел нейронов, новый контакт подвижных белков вполне реален, а значит, возможно и увеличение проницаемости мембран. Молекулярное моделирование предполагает, что амилоидные субъединицы пор могут собираться в 24-мерные порообразующие структуры (Kagan, 2012).

Калиевые каналы с двумя порами широко распространены среди нейронов и глии (Luo et al., 2021).

Известно, что в процессе слияния внутримембранных белков коннексинов (многочисленные различные Cx (connexin)) образуются каналы ЩК. Мы высказываем предположение, что при агрегации денатурированных белков во время электростимуляции процессы соединения протенинов, всегда обогащенных водными пещерами и каналами с высокой электропроводностью мембран, также возможны. Интересно, исчезают ли септы после восстановления активности препарата? Но это еще предстоит выяснить в будущем. Нейрональные септы, как оказалось, появляются и при обработке ганглиев 0.4%-ной проназой (Сотников, 2019). Это означает, что их появление служит подтверждением неспецифических свойств белка. Характеризуя парабиоз и паранекроз, Д.Н. Насонов, В.Я. Александров и Н.Е. Введенский также подчеркивали неспецифический характер паранекроза и парабиоза этих явлений. Отмеченные в статье структурные белковые построения и выделение воды при парабиозе, по-видимому, могут считаться проявлением паранекроза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты исследований подтверждают, что такой электрофизиологический процесс, как пессимум частоты, сопровождается дегидратацией, денатурацией примембранного белка, а также имеет обильный морфологический эквивалент: плотные мембраны, десмосомы, эндоцитоз, околосмембранные агрегаты белка, септы и щелевые контакты.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность Д.А. Мехиляйнену за помощь в подготовке статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030 гг.), тема № 0134-2019-0001.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Введенский Н.Е.* Полное собрание сочинений. Т. 3. Л.: Изд-во ЛГУ им. А.А. Жданова, 1952. С. 84.
- Гайер Г.* Электронная гистохимия. М.: Мир, 1974. 488 с.
- Мионов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Мионов В.А.* Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб: Наука, 1994. 400 с.
- Насонов Д.Н., Александров В.Я.* Реакция живого вещества на внешние воздействия. М.—Л.: Изд-во АН СССР, 1940. 252 с.
- Сотников О.С.* Объединенная нейронно-ретикулярная теория. СПб: Наука, 2019. 239 с.
- Сотников О.С., Ревенко С.В.* Физиология перехватывающих Ранвье живых миелиновых волокон // Биол. мембраны. 2022. Т. 39. № 4. С. 1–14.
- Финкельштейн А.В., Птицын О.Б.* Физика белка. М.: КДУ, 2012. 456 с.
- Ходоров Б.И.* Общая физиология возбудимых мембран. Руководство по физиологии. М.: Наука, 1975. 408 с.
- Calvert J.S., Grahn P.J., Strommen J.A. et al.* Electrophysiological guidance of epidural electrode array implantation over the human lumbosacral spinal cord to enable motor function after chronic paralysis // J. Neurotrauma. 2019. V. 36. № 9. P. 1451–1460. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5921>
- Conese M., Carbone A., Beccia E., Angiolillo A.* The fountain of youth: a tale of parabiosis, stem cells, and rejuvenation // Open Med. (Wars.). 2017. V. 12. P. 376–383. <https://doi.org/10.1515/med-2017-0053>
- Cosentino K., García-Sáez A.J.* MIM through MOM: the awakening of Bax and Bak pores // EMBO J. 2018. V. 37. № 17. P. e100340. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100340>
- Faivre-Sarrailh C.* Molecular organization and function of vertebrate septate-like junctions // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2020. V. 1862. № 5. P. 183211. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183211>
- Fisher K.M., Jilani N.E., Oluoch G.O., Baker S.N.* Blocking central pathways in the primate motor system using high-frequency sinusoidal current // J. Neurophysiol. 2015. V. 113. № 5. P. 1670–1680. <https://doi.org/10.1152/jn.00347.2014>
- Gerasimenko Y., Preston C., Zhong H. et al.* Rostral lumbar segments are the key controllers of hindlimb locomotor rhythmicity in the adult spinal rat // J. Neurophysiol. 2019. V. 122. № 2. P. 585–600. <https://doi.org/10.1152/jn.00810.2018>
- Guerra A.J., Carruthers V.B.* Structural features of apicomplexan pore-forming proteins and their roles in parasite cell traversal and egress // Toxins (Basel). 2017. V. 9. № 9. P. 265. <https://doi.org/10.3390/toxins9090265>
- Herbet G., Lafargue G., Bonnetblanc F. et al.* Is the right frontal cortex really crucial in the mentalizing network? A longitudinal study in patients with a slow-growing lesion // Cortex. 2013. V. 49. № 10. P. 2711–2727. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2013.08.003>
- Janjua T.A.M., Nielsen T.G.N.D.S., Andreis F.R. et al.* The effect of peripheral high-frequency electrical stimulation on the primary somatosensory cortex in pigs // IBRO Neurosci. Rep. 2021. V. 11. P. 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2021.08.004>
- Jiang F., Yin H., Qin X.* Fastigial nucleus electrostimulation reduces the expression of repulsive guidance molecule, improves axonal growth following focal cerebral ischemia // Neurochem. Res. 2012. V. 37. № 9. P. 1906–1914. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0809-y>
- Kagan B.L.* Membrane pores in the pathogenesis of neurodegenerative disease // Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 2012. V. 107. P. 295–325. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385883-2.00001-1>
- Laube G., Röper J., Pitt J.C. et al.* Ultrastructural localization of Shaker-related potassium channel subunits and synapse-associated protein 90 to septate-like junctions in rat cerebellar Pinceaux // Brain Res. Mol. Brain Res. 1996. V. 42. № 1. P. 51–61. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(96\)00120-9](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(96)00120-9)
- Ling D., Luo J., Wang M. et al.* Kilohertz high-frequency alternating current blocks nerve conduction without causing nerve damage in rats // Ann. Transl. Med. 2019. V. 7. № 22. P. 661. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.10.36>
- Luo Y., Huang L., Liao P., Jiang R.* Contribution of neuronal and glial two-pore-domain potassium channels in health and neurological disorders // Neur. Plast. 2021. V. 2021. P. 8643129. <https://doi.org/10.1155/2021/8643129>
- Manso C., Querol L., Lleixà C. et al.* Anti-Neurofascin-155 IgG4 antibodies prevent paranodal complex formation *in vivo* // J. Clin. Invest. 2019. V. 129. № 6. P. 2222–2236. <https://doi.org/10.1172/JCI124694>
- Marchioretto M., Podobnik M., Dalla Serra M., Anderluh G.* What planar lipid membranes tell us about the pore-forming activity of cholesterol-dependent cytolysins // Biophys. Chem. 2013. V. 182. P. 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.06.015>
- Mardani P., Oryan S., Sarihi A. et al.* ERK activation is required for the antiepileptogenic effect of low frequency electrical stimulation in kindled rats // Brain Res. Bull. 2018. V. 14. P. 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.04.013>
- Masson M.A.* De l'induction d'un courant sur lui-même // Ann. de Chimie et de Physique. 1837. V. 66. P. 5–36.
- Nekhendzy V., Davies M.F., Lemmens H.J., Maze M.* The role of the craniospinal nerves in mediating the antinociceptive effect of transcranial electrostimulation in the rat // Anesth. Analg. 2006. V. 102. № 6. P. 1775–1780. <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000219588.25375.36>
- Ogawa Y., Rasband M.N.* The functional organization and assembly of the axon initial segment // Curr. Opin. Neurobiol. 2008. V. 18. № 3. P. 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.08.008>
- Omersa N., Podobnik M., Anderluh G.* Inhibition of pore-forming proteins // Toxins (Basel). 2019. V. 11. № 9. P. 545. <https://doi.org/10.3390/toxins11090545>
- Rath M., Vette A.H., Ramasubramaniam S. et al.* Trunk stability enabled by noninvasive spinal electrical stimulation after spinal cord injury // J. Neurotrauma. 2018. V. 35. № 21. P. 2540–2553. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5584>

- Rice C., De O., Alhadyan H. et al. Expanding the junction: new insights into non-occluding roles for septate junction proteins during development // *J. Dev. Biol.* 2021. V. 9. № 1. P. 11.
<https://doi.org/10.3390/jdb9010011>
- Schucht P., Moritz-Gasser S., Herbet G. et al. Subcortical electrostimulation to identify network subserving motor control // *Hum. Brain Mapp.* 2013. V. 34. № 11. P. 3023–3030.
<https://doi.org/10.1002/hbm.22122>
- Vallat J.M., Yuki N., Sekiguchi K. et al. Paranodal lesions in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy associated with anti-Neurofascin 155 antibodies // *Neuromus. Disord.* 2017. V. 27. № 3. P. 290–293.
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.10.008>
- Xu Z., Wang Y., Chen B. et al. Entorhinal principal neurons mediate brain-stimulation treatments for epilepsy // *EBioMedicine.* 2016. V. 14. P. 148–160.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.11.027>

Changes in Active and Non-Excitable Adjacent Nerve Membranes after Electroactivation

O. S. Sotnikov*

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

**e-mail: ossotnikov@mail.ru*

It has long been recognized that parabiosis and paranecrosis are two close cytological theories that have demonstrated the intermediate state of the cell between life and death from various scientific positions. However, they have not previously been shown by anyone at the same time on the same object. This became the goal of our electron microscopic work. Active and non-excitable membranes of nerve and glial cells under pessimal inhibition have been studied. The main sign of paranecrosis was considered denaturation and aggregation of membrane protein, manifested in a decrease in its degree of dispersion and dehydration. Parabiosis was caused by the pessimal frequency of electroactivation of the sympathetic ganglion of white rats. As a result, the axolemma turned into a thick membrane, reinforced with fringe and the appearance of desmosomes. There were protein sticking from the inside of the neurolemma in the form of pyramids, which, by retracting, curved the membrane. In its bends, pyramid-like loose aggregates of intermembrane protein were formed from the outer sides of the glial and axolemma membranes, which, merging, turned into a kind of hourglass and septa. The septa were localized in the intercellular slits of axons and glia and often crossed both membranes. In chemical synapses, the shell of dendrites turned out to be denser than that of presynaptic axons. The process of protein aggregation and retraction locally narrows the intercellular axo-axonal and axo-glial cleft. Gap and tight junctions (GJ and TJ) are formed. So, for the first time we got a way of their experimental education. All reactive changes that occur *de novo* are considered as one reversible process of denaturation and aggregation of the mass of intrinsic and near-membrane proteins developed under the influence of frequency electrical stimulation. The pulse of the drug is restored within minutes. It is assumed that the revealed changes, paranecrosis, are a morphological manifestation of parabiosis.

Keywords: morphology of parabiosis, paranecrosis of nervous tissue, thick membranes, septa during electrical stimulation, gap neural-glial junctions, tight junctions