

УДК 591.882 : 576.321 : 591.044.2

БЫСТРОЕ ПОПЕРЕЧНОЕ ДВИЖЕНИЕ АКСОНА КРАБА ПРИ ПОТЕНЦИАЛЕ ДЕЙСТВИЯ

С. В. Левин, К. А. Гольфанд

Институт цитологии АН СССР, Ленинград

Исследовали обнаруженное ранее (Левин, Гольфанд, 1980) поперечное движение аксона краба при потенциале действия. Амплитуда движения составляла 2—4 нм. Путем регистрации изменений мембранного потенциала мероцианин-роданиновым красителем НК-2495 установлено, что движение возбужденного участка начинается одновременно с изменением мембранного потенциала. Волна поперечного движения распространяется по аксону вместе с потенциалом действия. Поперечное движение при потенциале действия стремится спрямить исходно изогнутый участок, по-видимому, путем его укорочения. В области раздражения поперечное движение происходит при изменении трансмембранного потенциала и на невозбужденном аксоне (обработанном 0.1%-ным новокаином или переживающем в морской воде). При деполяризации мембраны движение аксона направлено в ту же сторону, в какую оно направлено при потенциале действия, а при гиперполяризации — в противоположную. Движение аксона при изменении мембранного потенциала ингибируется колхицином. Это указывает на участие цитоскелета в потенциал-зависимом движении аксона.

В 1980 г. были опубликованы данные о том, что при потенциале действия (ПД) происходит поперечное смещение возбужденного участка аксона краба (Левин, Гольфанд, 1980; Левин и др., 1980). Аналогичное явление было обнаружено в работах Тасаки и соавторов на нерве краба (Iwasa et al., 1980) и на одиночном гигантском аксоне кальмара (Tasaki, Iwasa, 1981). Однако регистрируемое в опытах этих авторов поперечное смещение одного края аксона трактуется ими как набухание волокна при ПД.

В настоящей работе было детально исследовано поперечное движение аксона краба *Carcinus maenas* при ПД: определена связь этого явления с изменением мембранного потенциала, установлена причина поперечного движения.

Методика

Гигантские аксоны диаметром 35—40 мкм выделялись из нерва ноги травяного краба *Carcinus maenas*. Поперечное движение аксона при ПД регистрировали на цитофотометрической установке по противоположно направленным изменениям светопропускания двух симметричных краев аксона. Оптически плотная оболочка аксона толщиной 4—7 мкм служила как заслонка, закрывающая или открывающая фотометрическую щель шириной 5—10 и длиной 100—200 мкм. Для проекции щели на край оболочки аксона параллельно его длине использовали микрообъектив. Для измерения движения использовали белый свет от вольфрамовой лампы накаливания, проходящий через тепловой фильтр.

Изменения трансмембранного потенциала в исследуемом участке аксона определили, как это делалось в работе Росса и соавторов (Ross et al., 1977), путем измерения абсорбции света в исследуемом участке волокна, окрашенного потенциал-чувствительным красителем НК-2495. Интенсивность света измеряли при помощи кремниевое фотоэлемента ФД-9. Переменная составляющая фототока после усиления подавалась на анализатор электрических сигналов ART-1000 (SAIP, Франция). Изменения интенсивности света ΔF при одном ПД относили к исходному значению интенсивности света F .

Концы горизонтально расположенного аксона закрепляли в стимулирующем и регистрирующем электродах-щипчиках, а среднюю часть аксона длиной 5—10 мм закрепляли в плоском заземленном капилляре, заполненном морской водой. Капилляр герметизировали вазелино-парафиновой смесью.

Результаты и обсуждение

Для определения поперечного движения аксона при потенциале действия производились две пары замеров изменений светопропускания на одном и том же участке аксона на двух симметричных относительно продольной оси аксона краях оболочки волокна: внешних (рис. 1, *кривые 1 и 2*) и внутренних (рис. 1, *кривые 3 и 4*). На рис. 1 видно, что при ПД (*кривые 5 и 6*) происходят изменения светопропускания, мало различающиеся между собой по амплитуде и форме сигнала. Но знаки изменений противоположны в каждой паре замеров. Знак зависит от того, справа или слева от оболочки (или от аксона) располагается про-

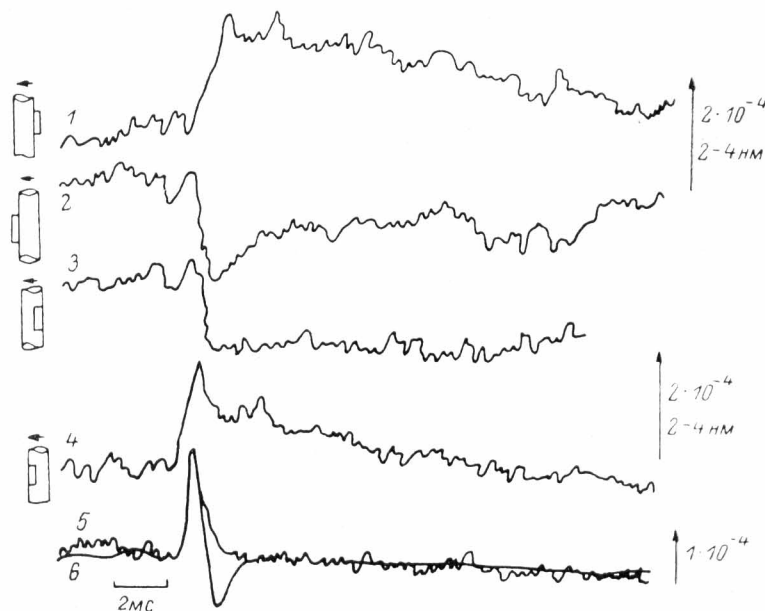


Рис. 1. Изменение светопропускания на симметричных краях оболочки аксона краба при потенциале действия.

По горизонтали — время, мс; по вертикали — изменения светопропускания и потенциала. Фотометрическую щель (10×200 мкм) проецировали последовательно на внешних, правом (1) и левом (2), краях оболочки, захватывая область, лежащую снаружи от аксона, и на внутренних, правом (3) и левом (4), краях оболочки, захватывая прозрачную аксоплазму. Потенциал действия регистрировали как путем измерения светопропускания при длине волны 750 нм (фотометрическая щель 50×400 мкм) после окрашивания аксона красителем НК-2495 (0.01%), растворенным в морской воде (5), так и внешними электродами (6). Измерения проведены в 4 мм от места раздражения аксона. Здесь и на следующих рисунках схема слева от кривой указывает на положение фотометрической щели относительно оболочки аксона, а стрелка на схеме — направление движения аксона; стрелка справа от кривой указывает направление усиления светопропускания, а длина стрелки — величину изменения светопропускания в расчете на один потенциал действия и амплитуду движения (нм), приведенные справа от стрелки. Постоянная времени 0.67 мс. Усреднение по 150—400 измерениям.

зрачная часть фотометрической щели. Эти результаты однозначно говорят о том, что аксон на измеряемой длине (200 мкм) смещается в поперечном направлении, в данном случае влево.

Амплитуда сигнала во время одного ПД $\Delta F/F$ пропорциональна изменению ширины фотометрической щели. Это проверялось в отдельных экспериментах, в которых аксон, соединенный с осью вибратора, двигался ритмично за счет калиброванных перемещений оси вибратора. При этом оказалось, что перемещение оболочки изменяет интенсивность проходящего света пропорционально изменению ширины щели: $\Delta F/F = K \Delta l/l$, где Δl — амплитуда движения оболочки в просвете щели, l — ширина щели, K — коэффициент пропорциональности. Для непрозрачной оболочки $K=1$. Для оболочек живого аксона, относительно прозрачных для белого света, $F/F_0 = 0.5-0.8$, где F_0 — интенсивность падающего на оболочку света, а F — интенсивность проходящего света; значение K находится в пределах 0.5—0.25. Таким образом, сигнал $\Delta F/F$, равный для одного ПД $1 \cdot 10^{-4}$, соответствует изменению ширины щели, равному $2-4 \cdot 10^{-4}$. Для щели шириной 10 мкм (рис. 1) это составляет 2—4 нм.

Кривая 5 (рис. 1) показывает изменение мембранного потенциала при ПД в исследуемом участке аксона. Видно, что движение (кривые 1—4) начинается одновременно с деполяризацией мембраны при ПД (кривая 5). Скорость отклонения аксона от исходного положения приблизительно равна $10 \text{ нм} \cdot \text{мс}^{-1}$, а время отклонения соответствует времени восходящей фазы ПД — 1 мс. Релаксация поперечного смещения длится много дольше, 10—20 мс (рис. 1), чем изменение мембранного потенциала (рис. 1, кривая 5). Следует отметить, что длительность и характер релаксации весьма переменны. Так, на другом аксоне релаксация не столь затянута (рис. 2); часто встречаются ответы, в которых волокно релаксирует с «отдачей» (рис. 5).

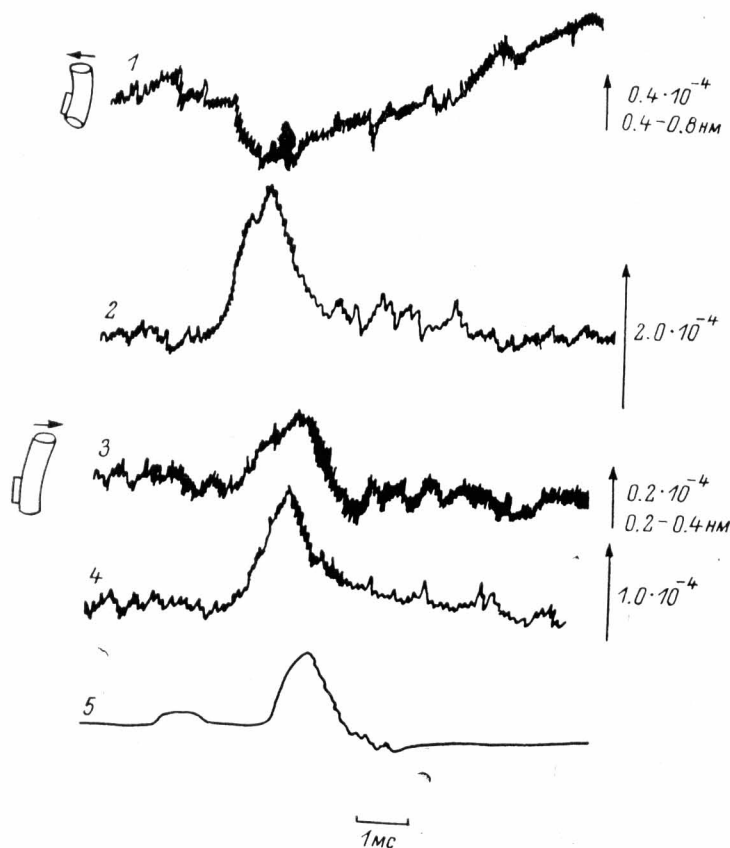


Рис. 2. Изменение светопропускания при потенциале действия на одном и том же краю аксона для двух участков волокна, различающихся направлением изгиба.

Фотометрическую щель ($10 \times 75 \text{ мкм}$) располагали на вогнутом внешнем краю оболочки в 5 мм от места раздражения (1) и на выпуклом внешнем краю оболочки в 7 мм от места раздражения (2) и на выпуклом внешнем краю оболочки в 7 мм от места раздражения (3). 2 и 4 — потенциал действия в этих участках окрашенного НК-2495 аксона, регистрируемый путем изменения светопропускания при 750 нм. 5 — потенциал действия, регистрируемый внешними электродами. Усредненные результаты для 100 (1, 2) и 200 (3, 4) измерений. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

На рис. 2 представлены данные, свидетельствующие о том, что волна поперечной деформации аксона — это бегущая волна, распространяющаяся вдоль по аксону со скоростью проведения ПД. На этом рисунке приведены результаты измерения только на внешних краях оболочки аксона. Видно, что смещение аксона и изменение мембранного потенциала происходят одновременно. В пределах временного разрешения, равного 0.2 мс, смещение начинается одновременно с изменением мембранного потенциала в данной области волокна. Регистрация движения и ПД в разных участках одного и того же волокна позволила выявить распространение поперечного движения по аксону. Так, на рис. 2 кривые 1 и 2 получены для участка, расположенного на 2 мм ближе к месту раздражения, чем участок, для которого получены кривые 3 и 4. Видно, что ПД и движение в первом участке начинаются на 0.5 мс раньше, чем во втором. Следовательно, волна поперечного движения распространяется вдоль по аксону со ско-

ростью, близкой к скорости проведения. Для данного аксона это соответствует $4 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$. В среднем для 9 аксонов скорость распространения вдоль аксона поперечного движения равна $5 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$, а скорость проведения ПД $4 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$ (данные для 12 аксонов).

Поперечное движение при ПД на различных аксонах, а также в разных участках одного и того же аксона имеет часто разную направленность. Оказалось, что направленность поперечного движения определяется направлением микроизгиба исследуемого участка аксона. Это следует из опытов, в которых аксоны были специально изогнуты в камере, причем направления изгибов были противо-

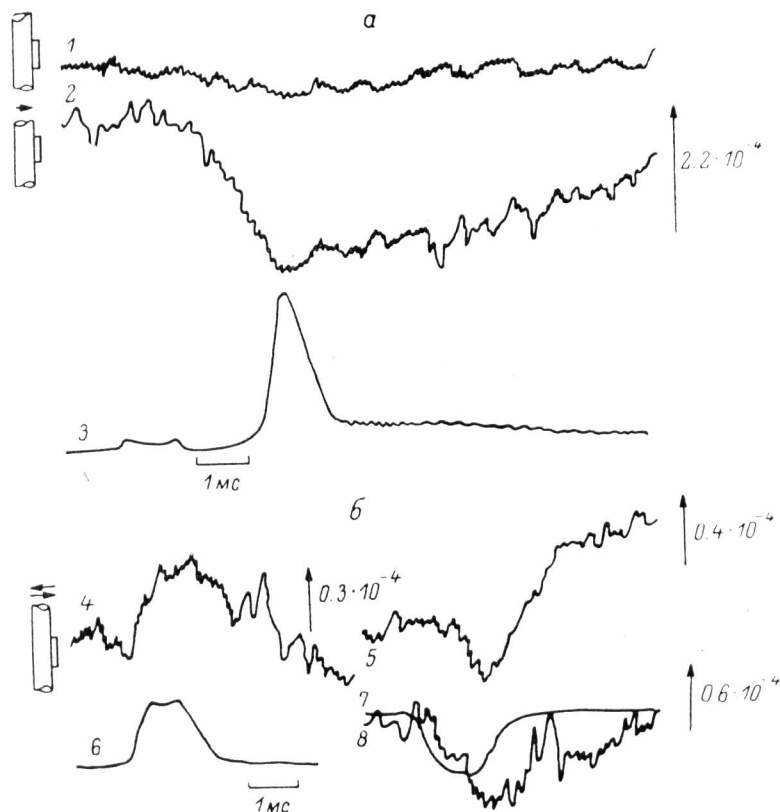


Рис. 3. Изменение светопропускания на внешнем краю возбуждимого (а) и невозбудимого, обработанного 0.1%-ным раствором новокаина (б) аксона краба у места раздражения.

1 — светопропускание при подпороговом раздражении, равном 90% пороговой величины стимула; 2 — изменение светопропускания при пороговом раздражении; 3 — потенциал действия; 4 — изменение светопропускания на краю аксона при деполаризующих стимулах величиной, равной 2.5 порогового значения; 5 — то же при гиперполаризующих стимулах той же силы; 6, 7 — регистрация деполаризующих и гиперполаризующих стимулов внешними электродами; 8 — изменение мембранного потенциала, регистрируемое путем измерения светопропускания при 750 нм аксона, окрашенного НК-2495. Усредненные результаты для 200—270 измерений. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

положны в двух участках. Видно (рис. 2), что направления движения противоположны в этих двух участках. В каждом из них аксон движется в сторону уменьшения кривизны, стремясь выпрямиться. Волна смещения аксона, регистрируемая на расстоянии 3—5 мм от места раздражения, наблюдается лишь в случае распространяющегося ПД. Подпороговое раздражение (на 10% ниже порога) не вызывает движения (рис. 3, кривая 1). При усилении силы раздражения на 10%, когда возникает распространяющийся ответ (рис. 3, кривая 2), регистрируется и движение (рис. 3, кривая 2).

При обработке аксона 0.1%-ным раствором новокаина, разведенным на морской воде, когда обратно подавляется возбудимость, исчезает распространяющийся механический ответ — поперечное движение. На таком аксоне (рис. 3, кривые 4—8) ответ можно вызвать лишь в области раздражения (рис. 3, кривые

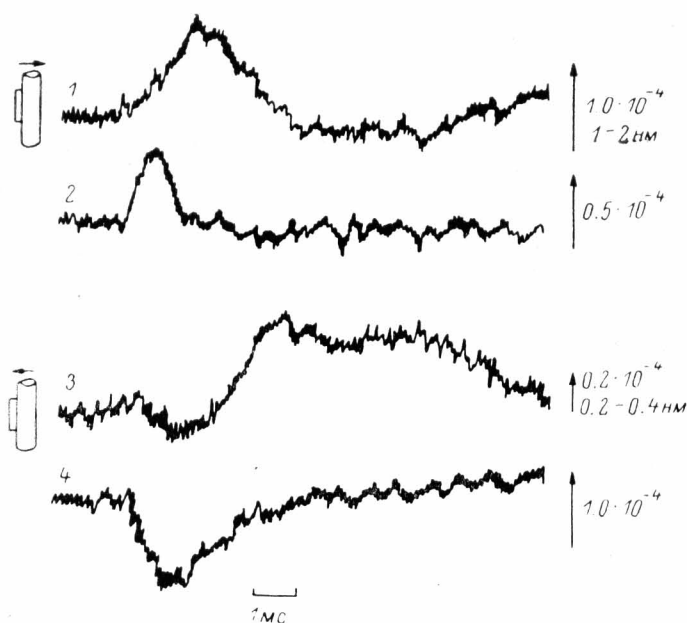


Рис. 4. Изменение светопропускания на внешнем краю аксона при электротоническом изменении трансмембранного потенциала.

Опыт на окрашенном NK-2495 аксоне, потерявшем возбудимость при переживании в морской воде. 1, 3 — изменения светопропускания в области раздражения на краю аксона при деполяризующих и гиперполяризующих стимулах соответственно; 2, 4 — изменение мембранного потенциала, регистрируемое путем измерения светопропускания при 750 нм в области раздражения при деполяризующих и гиперполяризующих стимулах соответственно. Усредненные результаты для 200 и 400 (кривая 3) измерений. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

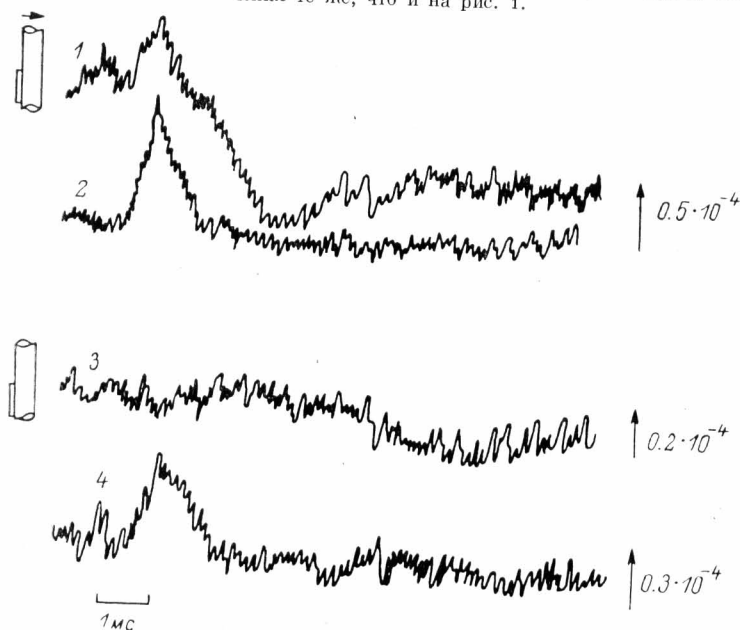


Рис. 5. Влияние колхицина на движение аксона краба при изменении мембранного потенциала.

1 — Изменение светопропускания на внешнем краю аксона; 3 — то же после обработки колхицином, разведенным на морской воде (5 мМ — 1.5 ч, затем 10 мМ — 0.5 ч); 2, 4 — изменение мембранного потенциала, регистрируемое путем измерения светопропускания при 750 нм аксона, окрашенного NK-2495 до и после действия колхицина соответственно. Усредненные результаты для 400 и 200 (2) измерений. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

4—5) при 2—3-кратном увеличении амплитуды стимула (рис. 3, кривые 6—8). При этом направление движения при гиперполяризации аксона (кривая 5) противоположно направлению движения при деполяризующем стимуле (кривая 4).

Сходное явление наблюдается и на волокне, только что потерявшем возбудимость при переживании в морской воде (рис. 4). При этом направления движения (кривые 1, 3) при деполяризации (кривая 2) и при гиперполяризации (кривая 4) противоположны. Следовательно, для запуска механического ответа достаточно изменить трансмембранный потенциал.

Эти данные, а также совпадение во времени начала движения и изменения мембранного потенциала при ПД говорят о том, что поперечное движение участка аксона вызывается изменением трансмембранного потенциала. При этом деполяризация вызывает спрямление деформированного аксона, а гиперполяризация — увеличение изгиба.

Поперечное движение одного исследуемого края гигантского аксона кальмара при потенциале действия наблюдали также Тасаки и Иваса (Tasaki, Iwasa, 1981, 1982). Оно трактуется как результат набухания аксона при ПД. Однако обнаруженное в их опытах увеличение амплитуды механического ответа при ПД с увеличением прогиба аксона тензодатчиком (Tasaki, Iwasa, 1982; рис. 2А) указывает на то, что регистрируемый механический ответ не набухание, а, по-видимому, поперечное движение аксона, исходно деформированного тензодатчиком.

Поперечное движение аксона при ПД не происходит после инкубации аксона в растворе колхицина, разведенного на морской воде. На рис. 5 видно, что 1.5-часовая обработка аксона колхицином в концентрации 5 мМ, а затем получасовая инкубация в 10 мМ растворе колхицина приводит к тому, что движение (кривая 3) при изменении мембранного потенциала (кривая 4) не происходит. Так как в этих концентрациях колхицин разрушает микротрубочки, можно полагать, что их сохранность необходима для поперечного движения аксона при ПД.

Можно предполагать, что за счет поперечного движения при ПД осуществляется связь между изменениями в поверхностной мембране и цитоплазме клеток. Для нервных клеток волна деформации наряду с электрическим импульсом может иметь сигнальное значение.

Авторы благодарны профессору Л. Б. Коэну за полезное обсуждение результатов работы и предоставление образцов потенциалзависимых красителей и Т. М. Левенберг за большую помощь при обработке экспериментального материала.

Л и т е р а т у р а

Левин С. В., Гольфанд К. А. Поперечное смещение аксона краба при потенциале действия. — Цитология, 1980, т. 22, № 6, с. 717—721. — Левин С. В., Гольфанд К. А., Трошин А. С. Поперечное смещение аксона краба при потенциале действия. — ДАН СССР, 1980, т. 251, № 4, с. 1014—1016. — Iwasa K., Tasaki I., Gibbons R. C. Swelling of nerve fibers associated with action potentials. — Science, 1980, vol. 210, p. 338—339. — Ross W. N., Salzberg B. M., Cohen L. B., Grinvald A., Davila H. V., Waggoner A. S., Wang C. H. Changes in absorption, fluorescence, dichroism and birefringence in stained giant axons: optical measurement of membrane potential. — J. Membrane Biol., 1977, vol. 33, p. 141—184. — Tasaki I., Iwasa K. Rapid mechanical changes in crab nerve and squid axon during action potential. — J. Physiol., Paris, 1981, vol. 77, p. 1055—1059. — Tasaki I., Iwasa K. Rapid pressure changes and surface displacements in the squid giant axon associated with production of action potential. — Japan J. Physiol., 1982, vol. 32, p. 69—81.

Поступила 19 VII 1983

A RAPID TRANSVERSE MOVEMENT OF THE CRAB AXON AT ACTION POTENTIAL

S. V. Levin, K. A. Gelfand

Institute of Cytology of the Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

The transverse movement of the crab axon at action potential observed earlier (Levin, Gelfand, 1980) was investigated more in detail. Fast (1—2 msec) and slow (10—20 msec) components of the movement were discovered. The amplitude of movement was 2—4 nm. By a local

registration of changes in the membrane potential using a merocyanine-rodanine dye NK-2495 it is established that the movement starts simultaneously with changes in the membrane potential, a wave of cross movement spreads along the axon simultaneously with the action potential. The transverse movement depends on the original deformation of the axon and is directed towards straightening of the axon. Transverse movement also occurs on the nonexcitable axon (treated with 0.1% procaine or surviving in sea water) upon alteration of the transmembrane potential by pulses of stimulation current. In the case of membrane depolarization the axon movement is directed in the same side as at action potential, while at hyperpolarization it is directed in the opposite side. Upon changes of the membrane potential the movement is inhibited by colchicine which indicates the participation of the cytoskeleton in potential-dependent movement of the axon.
