

УДК 576.32 : 577. 52.5

ВОЛНА ЛОКАЛЬНОГО УКОРОЧЕНИЯ И УДЛИНЕНИЯ ОДИНОЧНОГО АКСОНА КРАБА ПРИ ПОТЕНЦИАЛЕ ДЕЙСТВИЯ

С. В. Левин, К. А. Гольфанд, В. В. Малев

Институт цитологии АН СССР, Ленинград

На одиночном гигантском аксоне краба обнаружена волна укорочения (на 2—4 нм) и последующего удлинения (на 3—6 нм), распространяющаяся по волокну вместе с потенциалом действия. Укорочение начинается на 0.2—0.5 мс раньше деполяризации, а удлинение происходит во время нисходящей ветви потенциала действия — реполяризации мембраны — и длится 2—3 мс после ее окончания. Удлинение уменьшается и исчезает при затянутых за счет замедления скорости реполяризации потенциалах действия. Предполагается, что релаксация укорочения и удлинение сопряжены с инактивацией натриевых каналов и (или) с калиевым током. Местное медленно релаксирующее укорочение вызывается деполяризацией мембраны и на аксонах, утративших возбудимость при действии новокаина или в результате переживания в морской воде. Скорость укорочения меньше скорости деполяризации волокна. Последняя, по-видимому, и вызывает начальное укорочение при потенциале действия. Обнаруженная продольная деформация может изменяться под влиянием механических нагрузок на волокно: продольное сжатие уменьшает амплитуду укорочения, а растяжение — уменьшает удлинение. Продольная деформация преобразуется в поперечное движение аксона, описанное нами ранее, по-видимому, ввиду того, что нервные волокна имеют микровызгибы, распределенные по длине волокна. Микродвижение исчезает при обработке волокна коллемеидом. Это указывает на участие цитоскелета аксоплазмы в описываемых быстрых движениях при потенциале действия.

Ранее нами (Левин и др., 1980, 1983; Левин, Гольфанд, 1980, 1984а, 1984б) была обнаружена волна поперечного смещения на 0.2—4 нм гигантского аксона и пучка тонких нервных волокон краба при потенциале действия (ПД). Было установлено, что это движение вызывается изменением трансмембранного потенциала. При действии агентов, разрушающих цитоскелет (колхицин, коллемеид, цитохалазин В), движение при ПД ослабляется или исчезает вовсе.

Одновременно и независимо от нас были обнаружены при ПД набухание—отбухание и укорочение—удлинение на волокнах кальмара и краба (Iwasa et al., 1980; Tasaki, Iwasa, 1980, 1981, 1982).

Интересно понять, почему в нервном волокне, рассматриваемом обычно как правильный цилиндр, могут происходить поперечные изгибы или спрямления. Полученные данные о зависимости направления поперечного движения от направления изгиба волокна (Левин, Гольфанд, 1984а), данные о набухании—отбухании аксона при ПД, обнаружение укорочения—удлинения аксона кальмара и пучка тонких нервных волокон (Tasaki, Iwasa, 1980, 1981; Левин, Гольфанд, 1984а, 1984б) позволяют полагать, что основной деформацией при ПД является продольное движение, а поперечное смещение возникает из-за микроизгибов волокна (Левин, Гольфанд, 1984б). В связи с этим важно прямо исследовать продольное движение аксона краба при ПД. Этот материал и представлен в данной работе. Краткое сообщение на эту тему было опубликовано ранее (Левин и др., 1984).

Материал и методика

Опыты ставились на изолированном из нерва ходильной ноги черноморского краба *Carcinus maenas* одиночном аксоне диаметром 40–50 мкм, концы которого перевязывались. Волокно помещалось в плексигласовую камеру и закреплялось в щипчиках—электродах. Аксон располагался между двумя покровными стеклами в черноморской воде или другом сменяемом растворе, которые заземлялись. Применялась трехэлектродная система стимуляции и отведения ПД. Изолирующими мостиками являлась парафин-вазелиновая или силиконовая замазка. В работе применялась плексигласовая камера, позволяющая регистрировать движение и ПД на расстоянии до 5–10 мм или до 20–30 мм от места возникновения ПД (рис. 1).

На боковую поверхность аксона прикреплялись метки-частицы водонерастворимого пигмента фталоцианина меди размером приблизительно 10×10 мкм так, чтобы фотометрическая щель проецировалась вне аксона, располагаясь выше или ниже метки (по длине аксона). Продольное перемещение исследуемого участка аксона регистрировалось на описанной ранее (Левин, Гольфанд, 1980) цитофотометрической установке по изменению степени перекрытия меткой фотометрической щели длиной 10–30 мкм, шириной 5–10 мкм. Щель конденсором-микрообъективом фокусировалась на край метки так, чтобы продольное перемещение аксона и прикрепленной к нему метки изменяло длину щели и соответственно интенсивность светового потока через нее. Регистрируемое фотодиодом изменение фототока при потенциале действия ΔF , отнесенное к исходной величине фототока F ($\Delta F/F$), пропорционально относительному изменению длины фотометрической щели из-за движения метки. Абсолютное значение продоль-

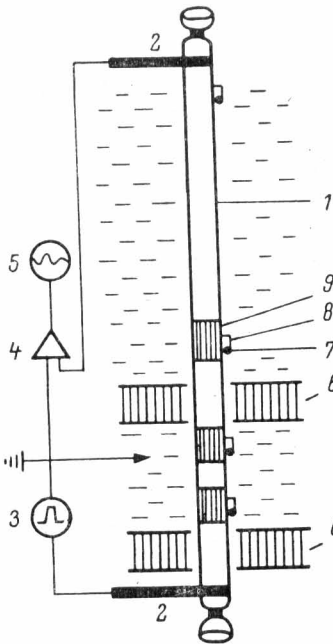


Рис. 1. Схема расположения одиночного аксона в плексигласовой камере и расположения зонда относительно непрозрачной метки на поверхности волокна.

1 — аксон, закрепленный в щипчиках-электродах (2); 3 — стимулятор; 4 — усилитель; 5 — осциллограф; 6 — изолирующие парафин-вазелиновые или силиконовые мостики; 7 — одна из меток, прикрепленных к волокну; 8 — фотометрическая щель для регистрации движения, частично перекрытая меткой; 9 — фотометрическая щель для оптической регистрации изменений мембранного потенциала (иштриховка).

ного перемещения метки получали путем умножения $\Delta F/F$ на длину фотометрической щели.

Обычно на поверхность аксона наносились 2–4 частицы пигмента и последовательно измеряли движение в различных участках по длине волокна. В большинстве случаев изменения фототока из-за движения волокна при ПД были меньше или равны шуму фотометрической установки. Поэтому для обнаружения и регистрации сигнала использовали метод выделения сигнала из шума путем накопления по методике, описанной ранее (Левин, Гольфанд, 1980). В качестве накопителя применялся анализатор электрических сигналов (ART-1000, SAIP, Paris). Полученные результаты выводились на графопроектор.

Изменение мембранного потенциала в исследуемом участке волокна при распространении ПД или при электротоническом потенциале регистрировали оптическим методом при помощи потенциалзависимых красителей NK2495 или NK2367, любезно предоставленных нам проф. Л. Б. Коэнном (Йельский университет, США), по методике, описанной Россом и соавторами (Ross et al., 1977) и нами (Левин и др., 1984а). Опыты ставились при комнатной температуре (18–22 °C).

Результаты и обсуждение

Движение аксона при ПД. Во всех случаях (181 измерение на 26 аксонах из 20 крабов) при ПД наблюдалось изменение в $0.2 \cdot 10^{-4}$ – $1.0 \cdot 10^{-4}$ раза интенсивности света, проходящего через фотометрическую щель (рис. 2). Так как щель обычно располагалась вне аксона на краю частицы, то тем самым можно исключить изменение оптических характеристик самого волокна как причину регистрируемого нами оптического сигнала при ПД. Знак изменений интенсивности света при ПД противоположный при расположении щели на противоположных (относительно поперечного сечения волокна) краях метки (рис. 2). Это свидетельствует о продольном перемещении частицы и того участка волокна, к которому она прикреплена на $(1.0 \cdot 10^{-4}$ – $1.2 \cdot 10^{-4}) \times \times 30$ мкм ≈ 3 нм.

Механический ответ при ПД двухфазен: сначала метка движется навстречу волне возбуждения — возбужденная область укорачивается, а затем за ней — исследуемый участок удлиняется.

Подпороговое раздражение, равное 90—98 % от величины порогового напряжения, не вызывает движения нервного волокна (рис. 3). Аналогичная картина наблюдается при обработке аксона 0.05—0.1 %-ным раствором новокаина, разведенного в морской воде, — при потере возбудимости исчезает распространяющийся механический ответ. Следовательно, проведенный от

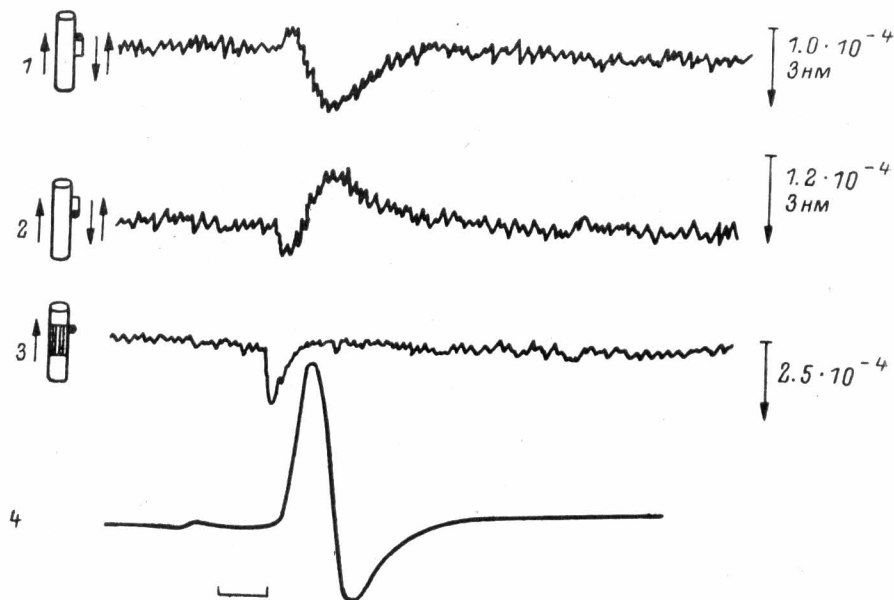


Рис. 2. Изменение интенсивности света вследствие движения прикрепленной к аксону не-прозрачной метки в плоскости фотометрической щели при потенциале действия.

Масштаб по горизонтали — 1 мс; по вертикали — относительные изменения интенсивности света. Фотометрическая щель последовательно проецировалась на ближний (1) и дальний (2) относительно места раздражения края непрозрачной метки. Потенциал действия регистрировался как путем измерения светопропускания при длине волны 750 нм (фотометрическая щель 50×100 мкм) после окрашивания аксона потенциалазависимым мероцианин-роданиновым красителем NK 2495 (0.01 % 30 мин окраски), растворенным в черноморской воде (3), так и внешними электродами (4). Измерения светопропускания проводены в 4 мм от места раздражения аксона. Здесь и на следующих рисунках схема слева от кривой указывает на положение фотометрической щели относительно метки. Стрелка слева от схемы — направление распространения потенциала действия, справа от кривой — направления движения метки относительно щели в 1-ю и 2-ю фазы механического ответа; стрелка справа от кривой указывает направление усиления светопропускания, а длина стрелки — масштабы изменения интенсивности света (в расчете на один потенциал действия) и амплитуды движения, нм, приведенные справа от стрелки. Постоянная времени регистрации измерения светопропускания 0.33 мс. Усреднение по 100 измерениям.

места раздражения механический ответ (продольное движение аксона) вызывается не раздражающим стимулом, а самим ПД.

Механический ответ — локальное укорочение и удлинение распространяется вдоль по волокну вместе с ПД. Это следует из опытов, в которых движение и изменение мембранного потенциала при ПД измерялись последовательно в двух участках волокна. Видно (рис. 4), что движение в дальнем (относительно места раздражения) участке, отстоящем от предыдущего на 2.6 мм, начинается на 0.8 мс, позже, чем в ближнем. Скорость проведения механического ответа равна $3.2 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$. С такой же скоростью распространяется и потенциал действия (рис. 4, кривые 2 и 4). Укорочение начинается на 0.2—0.3 мс раньше деполяризации в данном участке волокна и длится около 0.5 мс. Затем начинается релаксация укорочения (движение метки в противоположном направлении). Начало релаксации приходится еще на восходящую фазу ПД, но основная часть релаксации происходит во время нисходящей фазы ПД — реполяризации мембраны. В это время регистрируется также начало второй фазы механического ответа — удлинения, которое затянато во времени и длится на 2—4 мс дольше, чем ПД. Наличие предспайкового укорочения указывает на то, что волна деформации охватывает большую длину волокна, чем ПД.

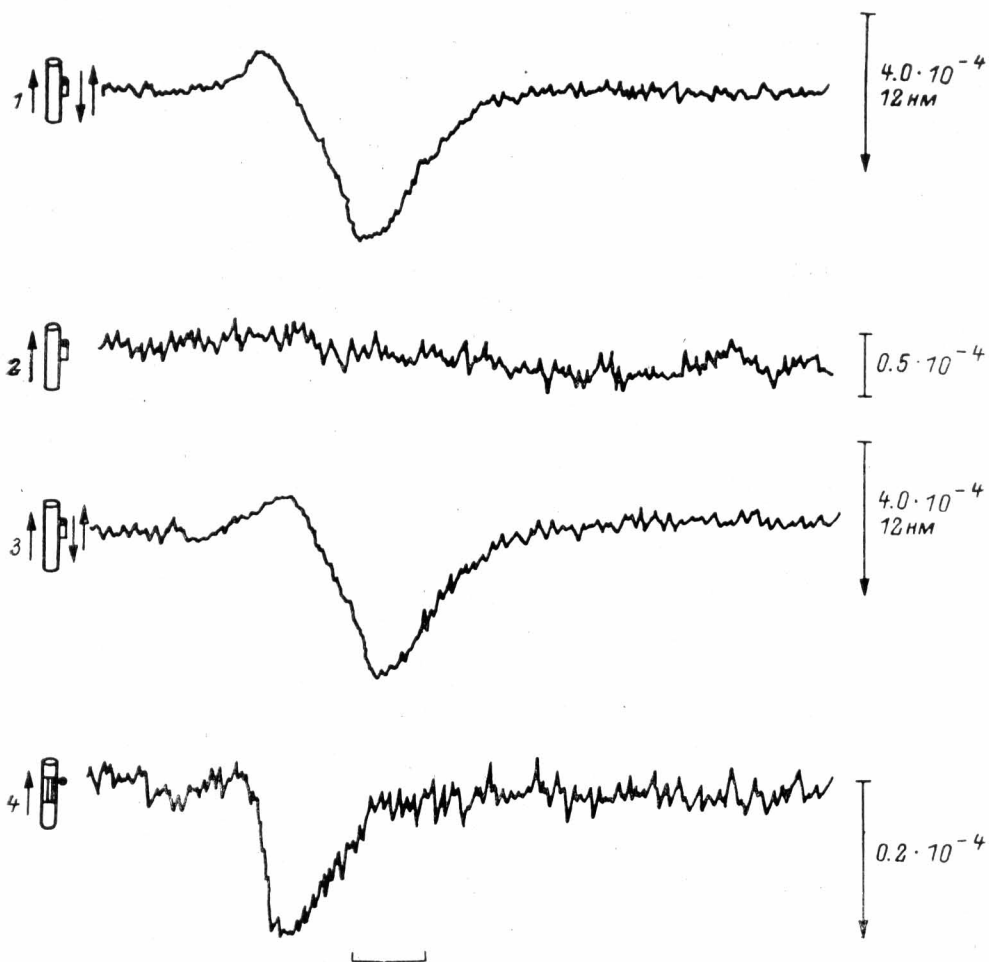


Рис. 3.

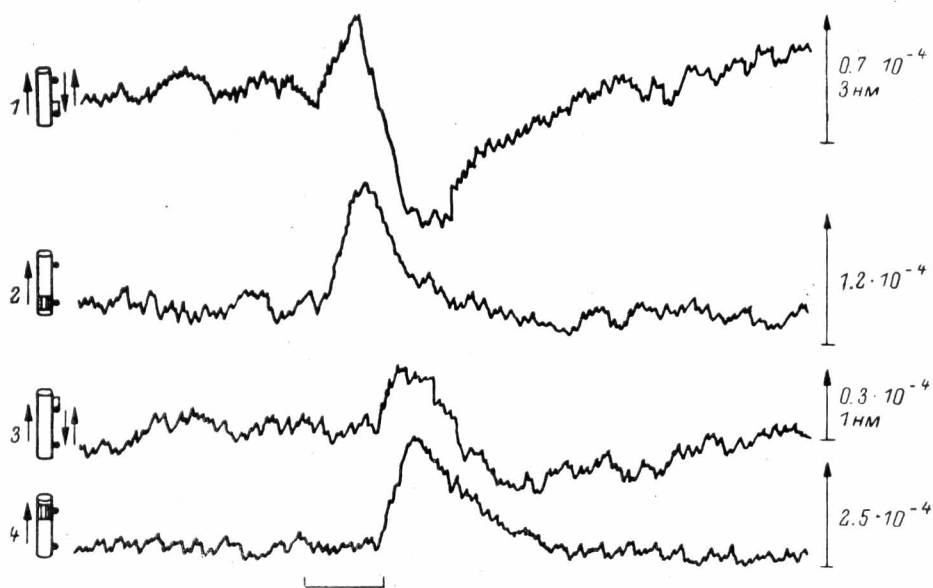


Рис. 4.

Амплитуда укорочения равна в среднем 2—4 нм. Удлинение, как правило, больше, чем укорочение. В среднем из 45 измерений оно равно 3—6 нм. Можно предположить равенство работ деформаций, совершаемых в фазах укорочения и удлинения волокна. При одинаковой временной протяженности этих фаз равенство работ деформаций должно выражаться в равенстве их амплитуд. Такая ситуация не реализуется в опыте, что может говорить о наличии некой исходной деформации волокна. В этом случае укорочение при деполяризации отражает увеличение, а удлинение при реполяризации — уменьшение исходной деформации. Что представляет собою сама исходная деформация, сказать пока с определенностью трудно. Прежние наши данные о поперечном движении аксона при ПД (Левин, Гольфанд, 1980, 1984а; Левин и др., 1983) говорят о том, что волокно имеет микроизгибы, где продольное движение преобразуется в поперечное. Возможно, что продольное укорочение и удлинение связаны с увеличением и уменьшением микроизгибов и микроскладчатости мембраны волокна.

Постоянные времени деполяризации и реполяризации мембраны, укорочения и его релаксации при потенциале действия и при электротонической деполяризации аксона краба

Наименование процесса и число опытов (<i>n</i>)	Постоянные времена (мс) и их отношение					
	деполяри- зация, τ_1	реполяри- зация, τ_2	(τ_2/τ_1)	укороче- ние, τ_3	релаксация укороче- ния, τ_4	(τ_4/τ_3)
Потенциал действия (<i>n</i> = 18) и двухфазное движение (<i>n</i> = 45)	0.35	0.90	2.7	0.55	0.45	1.0
Потенциал действия (<i>n</i> = 10) и однофазное движение (<i>n</i> = 29)	0.30	1.20	4.0	0.75	1.00	1.5
Деполяризация (<i>n</i> = 11) и местное укорочение (<i>n</i> = 13)	0.55	1.50	2.6	0.80	3.00	3.2

Примечание. Достоверно различающиеся сравниваемые величины ($P < 0.01$ для 1-й и 2-й строк и $P < 0.05$ для 3-й строки) соединены стрелками.

Данные о кинетике укорочения и его релаксации, а также о кинетике деполяризации и реполяризации при ПД приведены в таблице. Средние значения постоянных времени τ , для двухфазного движения и соответствующих ПД (среднее из 45 и 18 замеров соответственно) приведены в верхней строке таблицы. Постоянная времени (мс) определена как время, необходимое для реализации 2/3 амплитуды характеризуемого процесса. В таблице приведены также средние отношения τ реполяризации и деполяризации (τ_2/τ_1) , релаксации и укорочения (τ_4/τ_3) , характеризующие форму ПД и механического ответа. Видно, что скорость деполяризации больше скорости укорочения (τ_1 на 0.2 мс

Рис. 3. Влияние подпорогового раздражения, равного 97 % от величины порога, на продольное движение аксона краба.

Регистрация движения метки в 5 мм от места раздражения при пороговом (1, 3) и подпороговом (2) раздражении; 4 — потенциал действия, регистрируемый по изменению светопропускания при длине волны 725 нм аксона, окрашенного потенциалзависимым меропианин-оксазоновым красителем НК 2367 (0.05 %, 30 мин окраски). Постоянная времени 0.16 мс. Усреднение по 229 (1), 221 (3), 600 (2, 4) измерениям. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

Рис. 4. Двухфазное продольное движение при потенциале действия в двух участках аксона краба, отстоящих друг от друга на 2.6 мм.

1, 3 — запись движения ближней и дальней по отношению к месту раздражения меток соответственно; потенциал действия у ближней (2) и дальней (4) меток. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

меньше τ_3). Это, видимо, отражает тот факт, что укорочение складывается из предспайкового и деполяризационного укорочения. В то же время скорость реполяризации меньше скорости релаксации (τ_2 на 0.45 мс больше τ_4). Соответственно отличается и форма импульса укорочения и релаксации ($\tau_4/\tau_3=1.0$) от формы ПД ($\tau_2/\tau_1=2.7$). Это указывает на то, что релаксация укорочения опережает во времени реполяризацию (подобно тому, как начало укорочения опережает начало деполяризации).

Примерно в 40 % случаев при ПД регистрируется лишь первая фаза движения — укорочение и его релаксация. Результаты одного из опытов приведены на рис. 5. В этих опытах сохраняются основные черты укорочения: оно имеет ту же амплитуду, начинается на 0.2—0.4 мс раньше ПД, скорость его распространения по волокну совпадает со скоростью проведения ПД для дан-

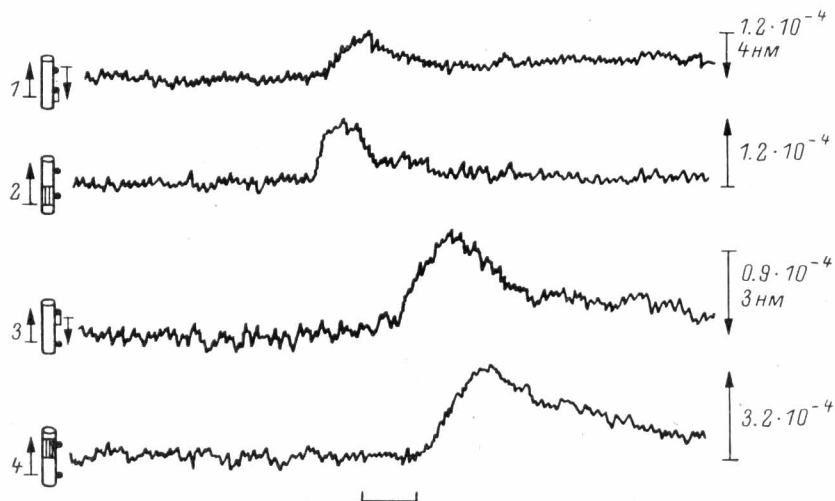


Рис. 5. Продольное однофазное движение — укорочение аксона краба при потенциале действия в двух участках, отстоящих друг от друга по длине волокна на 5 мм.

Ближняя метка расположена в 10 мм от места раздражения. Записи движения у ближней (1) и дальней (2) меток относительно места раздражения. Постоянная времени 0.08 мс. Усреднение по 200 (1, 2, 4) и 400 (3) измерениям. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

ного аксона и равна $2.3 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$. Различия состоят в меньшей скорости проведения ПД на $0.9 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$ и в замедлении реполяризации, в связи с чем изменена форма ПД (см. таблицу): (τ_2/τ_1) равно 4.0, а не 2.7. При этом затянута в 2 раза релаксация укорочения и не регистрируется фаза удлинения.

По-видимому, отсутствие удлинения и замедление релаксации укорочения связано с уменьшением скорости реполяризации мембраны при ПД.

Движение в области раздражения происходит и на волокнах, потерявших возбудимость (под влиянием новокаина или вследствие переживания) при электротоническом изменении мембранного потенциала (рис. 6): деполяризация вызывает укорочение, а гиперполяризация — удлинение исследуемого участка аксона. Эти движения всегда однофазны и происходят одновременно с изменением мембранного потенциала. Данные о постоянных времени деполяризации, реполяризации, укорочения и его релаксации приведены в третьей строке таблицы ($n=11$ и 13). Видно, что скорость нарастания деполяризации больше скорости укорочения ($\tau_1 < \tau_3$), подобно тому, что наблюдается для деполяризации и укорочения при ПД. В то же время скорость реполяризации превышает скорость релаксации укорочения ($\tau_2 < \tau_4$), тогда как для ПД наблюдается обратное отношение: $\tau_2 > \tau_4$. Таким образом, кинетика укорочения при электротонической деполяризации близка к кинетике укорочения при ПД, кинетика же релаксации существенно иная. При ПД релаксация происходит быстрее, чем при электротонической деполяризации. Вероятно, это отражает некий активный процесс в свежем волокне, перерастающий в фазу удлинения.

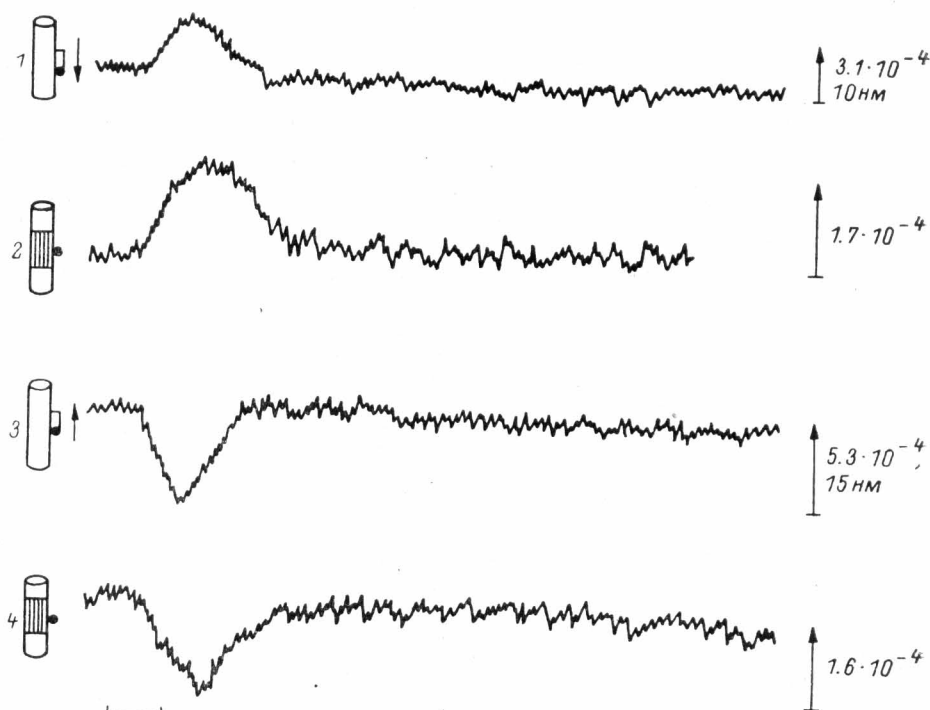


Рис. 6. Продольное однофазное движение аксона краба при электротоническом потенциале.

Фотометрия в области раздражения: 1, 3 — записи движения метки при электротоническом изменении мембранного потенциала, деполяризации и гиперполяризации соответственно; изменения мембранного потенциала при деполяризующем (2) и гиперполяризующем (4) стимулах, регистрируемые по светопропусканию аксона, окрашенного НК 2367, при длине волны 725 нм. Постоянная времени 0.08 мс. Усреднение по 200 измерениям. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2. Аксон утратил возбудимость при переживании в морской воде в экспериментальной камере.

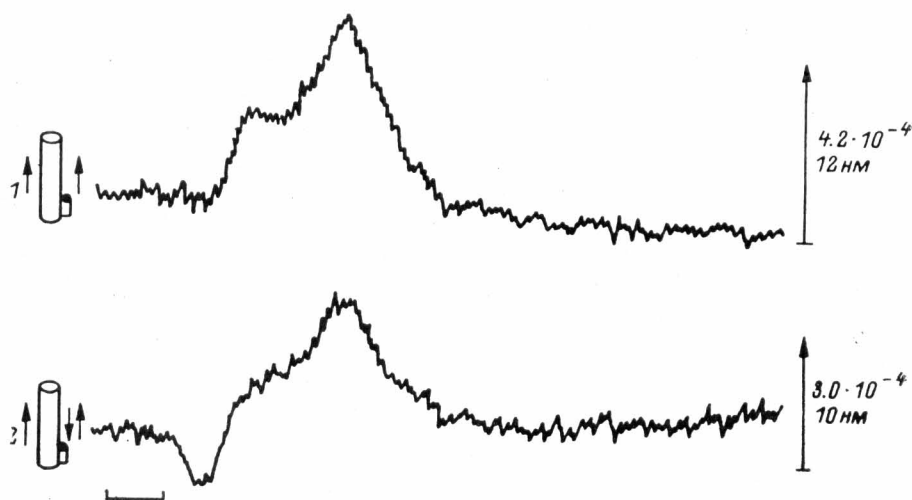


Рис. 7. Влияние продольного сжатия и растяжения аксона краба на движение при потенциале действия.

Регистрация движения в 10 мм от места раздражения. 1 — движение на продольно сжатом аксоне, 2 — то же после растяжения волокна. Постоянная времени 0.08 мс. Усреднение по 600 (1) и 194 (2) измерениям. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

Форма импульса движения при ПД и его амплитуда зависят не только от мембранного потенциала и тока, но и от механических нагрузок на волокно. При регистрации движения на продольно сжатом аксоне (рис. 7) регистрируется только 2-я фаза — удлинение. При устранении сжатия аксона и небольшом растяжении появляется фаза укорочения. При этом амплитуда удлинения уменьшается.

Сильное (в 30 раз) снижение амплитуды механического ответа при ПД наблюдается также при регистрации поперечного движения на растянутом пучке тонких волокон из нерва краба (Левин, Гольфанд, 1984б). В прежних работах, когда регистрировалось поперечное движение при ПД, ответ был всегда однофазным и сильно растянутым сравнительно с ПД (Левин, Гольфанд, 1980, 1984а; Левин и др., 1983). По-видимому, кратковременный импульс сокращения не реализовывался в поперечное движение; его вызывал, вероятно, более длительный и более выраженный импульс удлинения при ПД. Поэтому и начало

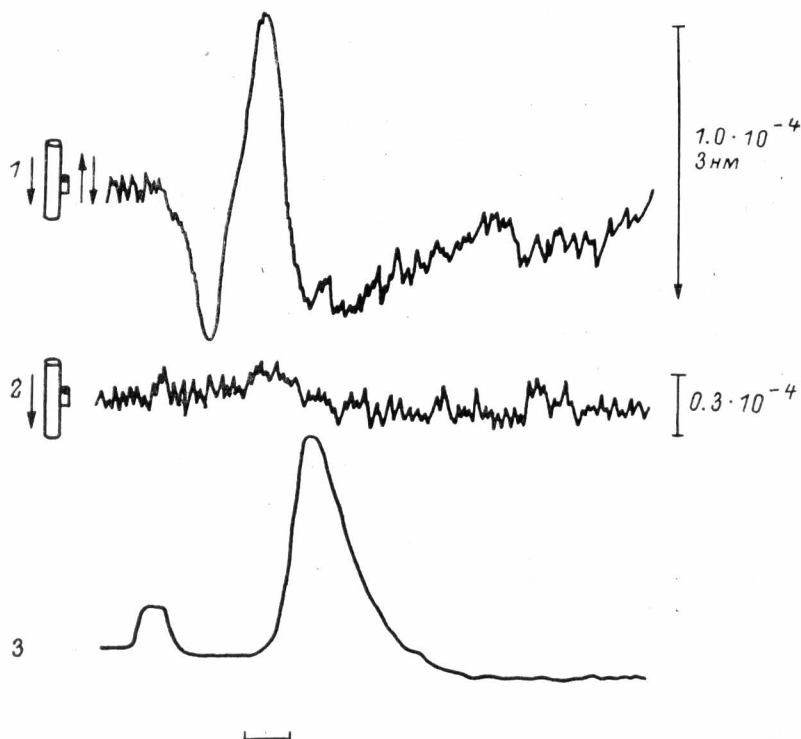


Рис. 8. Влияние колцемиды на продольное движение аксона краба при потенциале действия.

Регистрация движения в 10 мм от места раздражения. 1 — двухфазное движение при потенциале действия (не показан) до обработки аксона колцемидом; регистрация движения (2) и потенциала действия (3) после последовательной инкубации аксона в 0.6 мМ (30 мин) и 0.3 мМ (20 мин) растворах колцемиды, разведенного в морской воде. Постоянная времени 0.66 мс. Усреднение по 400 измерениям. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

поперечного движения совпадало с началом ПД, а не предшествовало ему, как это имеет место для продольного движения.

Продольное движение аксона при ПД ингибируется после обработки волокна раствором колцемиды. Результаты одного из опытов представлены на рис. 8. Видно, что после инкубации волокна в 0.6 и 0.3 мМ растворах колцемиды движение исчезает, хотя ПД не изменяется. Ранее было обнаружено, что на волокнах, обработанных колхицином, колцемидом и цитохалазином Б, ингибируется поперечное движение при ПД (Левин и Гольфанд, 1984а, 1984б). Приведенные данные говорят в пользу того, что для реализации движения возбужденного участка аксона необходима сохранность его цитоскелета.

Авторы искренне благодарны проф. Л. Б. Кoenу (Йельский университет, США) за любезно предоставленные образцы потенциалзависимых красителей и доценту Т. М. Левенберг за помощь в систематизации и статистической 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. Быстрое поперечное движение аксона краба при потенциале действия. — Цитология, 1984а, т. 26, № 8, с. 920—926. — Левин С. В., Гольфанд К. А. Поперечное движение пучка тонких нервных волокон краба при потенциале действия. — Цитология, 1984б, т. 26, № 9, с. 1021—1029. — 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. — Левин С. В., Гольфанд К. А., Трошин А. С. Волна поперечного движения аксона краба, сопровождающая потенциал действия. — ДАН СССР, 1983, т. 272, № 6, с. 1513—1516. — Левин С. В., Малеев В. В., Трошин А. С., Гольфанд К. А. Волна продольной деформации возбужденного участка аксона краба при потенциале действия. — ДАН СССР, 1984, т. 275, № 5, с. 1246—1249. — Iwasa K., Tasaki I., Gibbons R. C. Swelling 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. Membr. Biol., 1977, vol. 33, p. 141—184. — Tasaki I., Iwasa K. Shortening of nerve fibers associated with propagated nerve impulse. — Biochem. Biophys. Res. Commun., 1980, vol. 94, p. 716—720. — 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 squid giant axon associated with production of action potential. — Japan J. Physiol., 1982, vol. 32, p. 69—81.

Поступила 22 I 1986

THE WAVE OF LOCAL SHORTENING AND LENGTHENING OF CRAB AXON DURING ACTION POTENTIAL

S. V. Levin, K. A. Golfand, V. V. Malev

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

Local shortening (by 2—10 nm) and subsequent lengthening (by 3—15 nm) of the excited region of single giant crab axon were detected. This deformation is spread along the axon simultaneously with action potential. The shortening starts 0.2—0.5 ms prior to depolarization. The lengthening occurs during repolarization and completes 2—3 ms after action potential. The lengthening is reduced at prolonged action potentials due to a decrease in repolarization rate. The deformation wave appears in an all-or-none manner and could be suppressed by procain and by cessation of the axon excitability. This excludes physicochemical processes on stimulating electrodes as a source of deformation wave. It is suggested that shortening and lengthening of the axon are induced by depolarization and fast repolarization of axon membrane, respectively. The pattern of mechanical response of the axon during action potential depends also on the mechanical state of the fiber: a longitudinal compression reduces the shortening and increases the amplitude of the lengthening. Mechanical responses during action potential are eliminated by the addition of colcemid (0.3—0.6 mM) after 50 minutes incubation. It indicates the importance of microtubules in deformation of the axon during action potential. During action potential apparently shortening and lengthening of the axon are transformed into its transverse displacement (Levin and Golfand, 1980; Levin et al., 1983) due to local microbendings along the fibre.