

УДК 576.314 : 576.32 : 595.384.2

ВЛИЯНИЕ УПРУГИХ СВОЙСТВ ОБОЛОЧКИ АКСОНА КРАБА НА ДВИЖЕНИЕ НЕРВНОГО ВОЛОКНА ПРИ ПОТЕНЦИАЛЕ ДЕЙСТВИЯ

С. В. Левин, В. В. Малев

Институт цитологии АН СССР, Ленинград

В целях изучения деформации аксона краба при потенциале действия определен модуль упругости линейного растяжения волокна, на основании чего рассчитан модуль сдвига его оболочки. Значения последнего оказались на 4—6 порядков большими модуля сдвига оболочки эритроцитов. Протеолиз оболочки аксона сильно (до 8—10 раз) увеличивает амплитуды укорочения и последующего удлинения волокна при потенциале действия. Приведенные данные свидетельствуют о том, что двигательный импульс при потенциале действия генерируется на мембране (и субмембранном слое) волокна, а оболочка является инертным элементом, «сшитым» с цитоплазматической мембраной.

Обнаруженное в последние годы микродвижение нервного волокна при потенциале действия (ПД; Левин и др., 1980, 1983, 1984; Iwasa et al., 1980) трактуется нами как потенциал- и токозависимая деформация мембраны и цитоскелета, распространяющаяся по волокну вместе с ПД (Левин, Гольфанд, 1984а; Малев и др., 1985). В связи с этим для исследования механизма микродвижения волокна важно знать механические характеристики последнего, в частности модули упругости его оболочки. Данные по модулям упругости оболочки эритроцита (Ивенс, Скейлак, 1982) вряд ли приложимы для оболочки аксона. Действительно, в отличие от эритроцитов в оболочку аксона, помимо аксолеммы, мембранного и, возможно, субмембранного скелета, следует включать шванновские и соединительнотканые клетки, пучки коллагена. Поэтому в данной работе проведено определение модуля сдвига одиночного аксона и исследовано влияние протеолиза его оболочки на деформацию волокна при ПД.

Материал и методика

Опыты ставили на одиночном гигантском аксоне (диаметром 40—50 мкм, длиной 2—3 см) черноморского краба *Squilla maenas*, выделенном из нерва ходильной ноги.

Модуль сдвига оболочки аксона рассчитывали из экспериментально определяемого модуля продольного растяжения ϵ , который измеряли на вертикально расположенном в морской воде волокне. Верхний конец волокна был жестко закреплен, а на нижний прикладывали нагрузку (F) 1—10 дин. Измеряли расстояние l между метками — частицами пигмента (фталоцианина меди), прикрепленными к оболочке аксона и отстоящими друг от друга на расстоянии 8—10 мм. Нагрузку на волокно сохраняли в течение 5—8 мин до установления постоянной длины l_n между метками. После этого нагрузку снимали и измеряли расстояние l_0 между метками, соответствующее ненагруженному состоянию волокна. Удлинение $\Delta l = l_n - l_0$, отнесенное к l_0 , давало упругую компоненту относительного растяжения волокна при данной нагрузке. Остаточную, пластическую компоненту растяжения определяли как отношение $(l_0 - l_n)/l_n$, где l_n — расстояние между метками, измеренное до приложения к волокну первой нагрузки. Обычно опыт повторялся дважды для каждой нагрузки, при этом измерялась длина двух участков волокна, расположенных между тремя метками. По усредненным данным строили график зависимости упругого растяжения аксона $\Delta l/l_0$ от величины приложенной силы $F = mg$. Значение отношения $F/(\Delta l/l_0)$, найденное из наклона соответствующей прямой, после деления на площадь поперечного сечения аксона (или на длину окружности) давало модуль продольного растяжения волокна ϵ или его оболочки ϵ_0 .

В ряде опытов после определения растяжения аксона в камеру вводили 5 или 10 мМ колхицина (Serva) и через 20—30 мин инкубации вновь определяли зависимость $\Delta l/l_0$ от F .

Продольное движение возбужденного участка аксона измеряли, как и ранее (Левин и др., 1984), по изменению интенсивности света, проходящего через фотометрическую щель, которую проецировали на край метки (пигмента фталоцианина меди), прикрепленной к оболочке волокна. ПД в области метки регистрировали по изменению светопропускания аксона, окрашенного потенциальнозависимыми красителями NK 2367 или NK 2495 в концентрации $\sim 0.01\%$ при длине волны падающего света 725 и 750 нм соответственно. Измерение ПД проводили на участке аксона протяженностью 50—100 мкм. Окрашивание обычно проводили до начала измерений, а после замеров в камеру вводили растворы проназы (Serva) или коллагеназы (Fluka). Концентрация ферментов была равна 2 мг/мл. После 3—20 мин инкубации вновь проводили замеры движения и ПД, затем осторожно отмывали растворы ферментов морской водой и вновь измеряли ПД и микродвижение волокна. Все растворы готовили на морской воде, опыты проводили при комнатной температуре (18—22 °C).

Результаты и обсуждение

Измерение модуля упругости продольного растяжения аксона. В 10 опытах на 10 аксонах, к которым прикладывалась возрастающая (или убывающая) нагрузка в пределах 1—10 дин, регистрировалось обратимое упругое удлинение $\Delta l/l_0$, пропорциональное приложенной силе, а также пластическое, необратимое удлинение аксона (рис. 1). Среднее значение модуля продольного растяжения ϵ и квадратичная ошибка среднего арифметического оказались равными $(2.0 \pm 0.2) \cdot 10^7$ дин·см⁻². Обработка аксонов колхицином (5 и 10 мМ) заметно повышала величины остаточ-

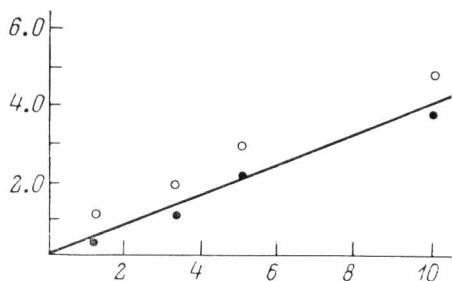


Рис. 1. Упругое удлинение аксона $\Delta l/l_0$ в зависимости от растягивающей силы F .

По оси абсцисс — сила, дин, прилагаемая к концу волокна; по оси ординат — обратимый прирост длины волокна, % относительно длины «покоя» $\Delta l/l_0$. Крестиками обозначено пластическое удлинение аксона, % относительно начальной длины волокна. Приведены данные характерного эксперимента. Диаметр аксона 40 мкм.

ных, пластических удлинений по сравнению с аксонами, не подвергшимися такой обработке. При нагрузке 2—3.3 дин необратимое удлинение до введения колхицина было равно $1.6 \pm 0.4\%$, а при добавке последнего увеличивалось в 3.2 ± 1.3 раза ($n=5$). Вместе с тем величина модуля упругого продольного растяжения ϵ в колхицине заметно не изменялась; отношение величины ϵ аксонов в колхицине к ϵ волокон без его добавки равно 0.86 ± 0.23 ($n=5$).

Можно думать, что основными упругими компонентами аксона являются структуры его оболочки. Поэтому определяемый модуль растяжения правильнее относить не к площади поперечного сечения волокна, а к длине окружности этого сечения. Тогда для аксонов диаметром 40 мкм $\epsilon_0 = (2.0 \pm 0.2) \cdot 10^4$ дин·см⁻¹. Модуль продольного растяжения волокна ϵ (или его оболочки ϵ_0) является эффективной величиной, включающей в себя модули изотермического сжатия k и сдвига γ . Связь указанных характеристик волокна может быть легко установлена в рамках модели гиперупругой изотропной оболочки волокна. В частности, условия равновесия сил, действующих на цилиндрическую оболочку, имеют вид (Ивенс, Скейлак, 1982)

$$F = 2\pi R_0 T_m, \quad T_\varphi = 0, \quad (1)$$

где $F = mg$ — нагрузка, R_0 — радиус волокна в покое, T_m и T_φ — меридиональное и азимутальное натяжения. Полагая развивающиеся деформации малыми, можно переписать (1) как

$$k \left(\frac{\partial dz}{\partial z_0} + \frac{\partial dr}{\partial r_0} \right) + \gamma \left| \frac{\partial dz}{\partial z_0} - \frac{\partial dr}{\partial r_0} \right| = \frac{mg}{2\pi R_0}, \quad (2)$$

$$k \left(\frac{\partial dz}{\partial z_0} + \frac{\partial dr}{\partial r_0} \right) - \gamma \left| \frac{\partial dz}{\partial z_0} - \frac{\partial dr}{\partial r_0} \right| = 0,$$

где $\delta dr/dz_0$ и $\delta dr/dr_0$ — относительные деформации длины и радиуса волокна. Из (2) после простых преобразований следует

$$\frac{mg}{2\pi R_0} = \frac{4k\nu}{k + \nu} \cdot \frac{\delta dz}{dz_0}.$$

Отсюда видно, что модулем продольного растяжения оболочки следует считать величину

$$\varepsilon_0 = \frac{4k\nu}{k + \nu} = \frac{mg}{2\pi R_0 \delta dz/dz_0} = \frac{mgl_0}{2\pi R_0 \Delta l}.$$

В предельных случаях поверхностно-несжимаемый ($k \gg \nu$) и объемно-несжимаемой ($k=3\nu$) оболочек (Ивенс, Скейлак, 1982) для ε_0 получаем

$$\varepsilon_0 = \begin{cases} 4\nu & \text{при } k \gg \nu, \\ 3\nu & \text{при } k = 3\nu. \end{cases}$$

Таким образом, исходя из экспериментального значения ε_0 , модуль сдвига оболочки ν определяется с погрешностью, не превышающей 25 %. Поэтому для модуля сдвига оболочки аксона краба находим $\nu \approx (5-7) \cdot 10^3$ дин·см⁻¹, что на 6 порядков превосходит соответствующую характеристику эритроцитарной мембраны млекопитающих и на 4 порядка — модуль сдвига эритроцитов рептилий (Ивенс, Скейлак, 1982). Таким образом, оболочка аксона по своим механическим свойствам существенно отличается от эритроцитарных. По-видимому, это различие определяется слоем шванновских и соединительнотканых клеток и коллагеном. Можно предположить, что разрушение этих структур, в частности, при воздействии протеаз приведет к увеличению амплитуды движения волокна при ПД. Для качественной проверки этого предположения мы обрабатывали аксоны растворами коллагеназы и (или) проназы. После обработки проназой аксон легко механически повреждался, а его растяжимость сильно возрастала, что указывало на уменьшение его модулей упругости (k и ν).

Движение при ПД на аксонах, обработанных коллагеназой и проназой. Обработка аксона раствором коллагеназы (2 мг/мл) не влияет на движение при ПД. Лишь на одном аксоне из 5 наблюдалось усиление амплитуды укорочения и удлинения при ПД.

В отличие от коллагеназы обработка аксона раствором проназы (2 мг/мл) практически всегда (в 80 случаях из 81) увеличивала амплитуду движения волокна при ПД. Эти результаты получены на 19 аксонах из 10 крабов. Проназа начинает усиливать движение уже спустя 3—5 мин после ее введения. В течение 1 ч до момента исчезновения ПД амплитуда движения волокна остается увеличенной по сравнению со случаем не обработанных проназой аксонов.

Приблизительно в одной трети опытов механический ответ волокон при ПД до введения проназы не наблюдался. Он был, по-видимому, ниже уровня шума (рис. 2, кривая 1). Через 3—5 мин после введения проназы регистрировался ответ — укорочение на 10 нм (рис. 2, кривая 3). Усредненные данные по таким исходно «молчащим» аксонам представлены в табл. 1 (1-я строка), где приведены изменения светопропускания волокна при ПД, пропорциональные амплитуде перемещения метки. Видно, что амплитуды движения увеличиваются не менее, чем в 2.7—5 раз при обработке аксонов проназой.

На рис. 3 приведены результаты одного из опытов, в котором до введения проназы регистрировалось смещение метки при ПД на 1 нм (кривая 2). После обработки проназой в течение 20 мин амплитуда укорочения возросла приблизительно в 10 раз, а амплитуда удлинения составила 23 нм (кривая 3). Усиленный механический ответ сохраняется и после отмывки проназы морской водой (кривая 4). Усредненные данные по амплитудам движения, регистрируемого до введения проназы, и влияние проназы на эти характеристики движения волокна приведены в табл. 1 (2-я строка). Из этих данных видно, что проназа статистически достоверно увеличивает амплитуду укорочения в 2.2 раза, а амплитуду удлинения — в 3 раза.

Скорости распространения деформаций и проведения ПД практически не различались между собой, хотя в случае волокон, обработанных проназой,

наблюдалась тенденция к увеличению этих скоростей по сравнению с интактными волокнами (табл. 2).

Приведенные данные о стимулирующем действии проназы подтверждают высказанное выше предположение о существенности вклада соединительно-

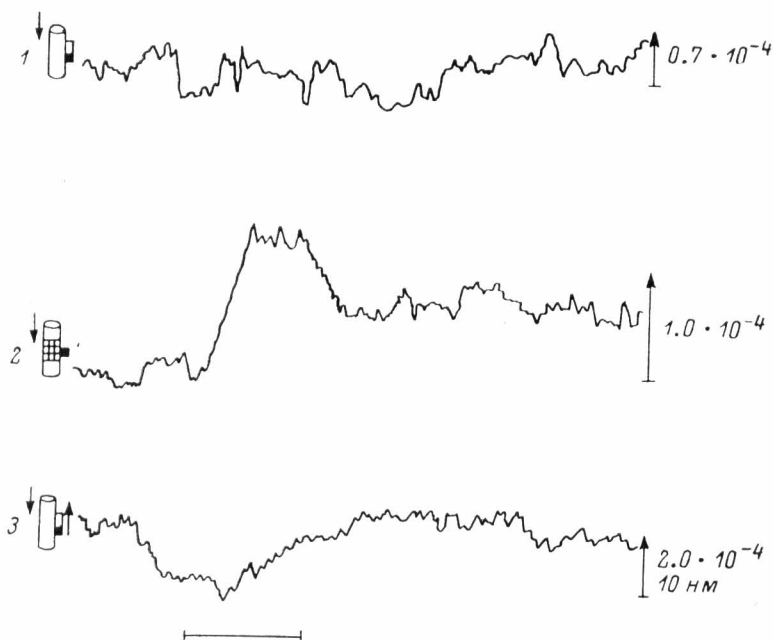


Рис. 2. Появление продольного движения возбужденной области аксона краба при обработке волокна раствором проназы.

По горизонтали — время (масштаб — 1 мс); по вертикали — изменение интенсивности света. Фотометрия в 1—1.5 см от места раздражения. Отсутствие движения (1) при потенциале действия (2), регистрируемом по светопропусканию при длине волны 725 нм волокна, окрашенного НК 2367, до введения в среду проназы. 3 — движение в растворе проназы (2 мг/мл) на морской воде. Здесь и на следующем рисунке схема слева от кривой указывает положение фотометрической щели относительно метки. Стрелка слева от схемы — направление распространения потенциала действия; справа от схемы — направление движения. Справа от кривой стрелка указывает направление усиления светопропускания, а длина стрелки — величину изменения интенсивности света относительно исходной интенсивности $\Delta I/I$ и амплитуду движения, нм, при одном потенциале действия, приведенные справа от стрелки. Постоянная времени измерительной системы — 0.16 мс. Усреднение по 170 (1), 102 (2) и 43 (3) измерениям.

тканных и шванновских клеток и коллагена в упругие характеристики интактных волокон. По-видимому, в смысле двигательной активности аксона при ПД эти структуры можно считать инертными элементами оболочки волокна, «спи-

Таблица 1

Увеличение амплитуд укорочения (1-я фаза) и удлинения (2-я фаза) аксона при потенциале действия под влиянием проназы (2 мг/мл, 20—50 мин)

Номер серии опытов	Изменение светопропускания при потенциале действия ($\Delta I/I$) · 10 ⁴ , пропорциональное амплитуде движения аксона				Разность амплитуд ответа в растворе проназы и морской воде $\Delta(\Delta I/I) \cdot 10^4$		Отношение амплитуд движения в растворе проназы к движению в морской воде	
	в морской воде		в растворе проназы		укорочение	удлинение	укорочение	удлинение
	укорочение	удлинение	укорочение	удлинение				
1	$\leq 0.30 \pm 0.06$ (9)	$\leq 0.20 \pm 0.03$ (14)	0.80 ± 0.10 (20)	1.00 ± 0.25 (17)	$\geq 0.50 \pm 0.10$ $P < 0.001$	$\geq 0.80 \pm 0.25$ $P < 0.001$	≥ 2.7	≥ 5.0
2	0.40 ± 0.04 (19)	0.40 ± 0.15 (7)	0.90 ± 0.10 (54)	1.20 ± 0.20 (34)	0.50 ± 0.10 $P < 0.001$	0.80 ± 0.25 $P < 0.001$	2.2	3.0

Примечание. В скобках приведено число измерений; в столбцах 2—5 приведены средние арифметические и их квадратичные ошибки, в столбцах 6, 7 — разность между средними арифметическими и ошибка разности.

тыми» с мембраной, а двигательный импульс — генерирующимся на ее активном элементе — мембране, и, возможно, на субмембранном цитоскелете. То, что для возникновения микродвижений волокна необходимым условием является сохранность его цитоскелета, следует из наших более ранних данных о тормо-

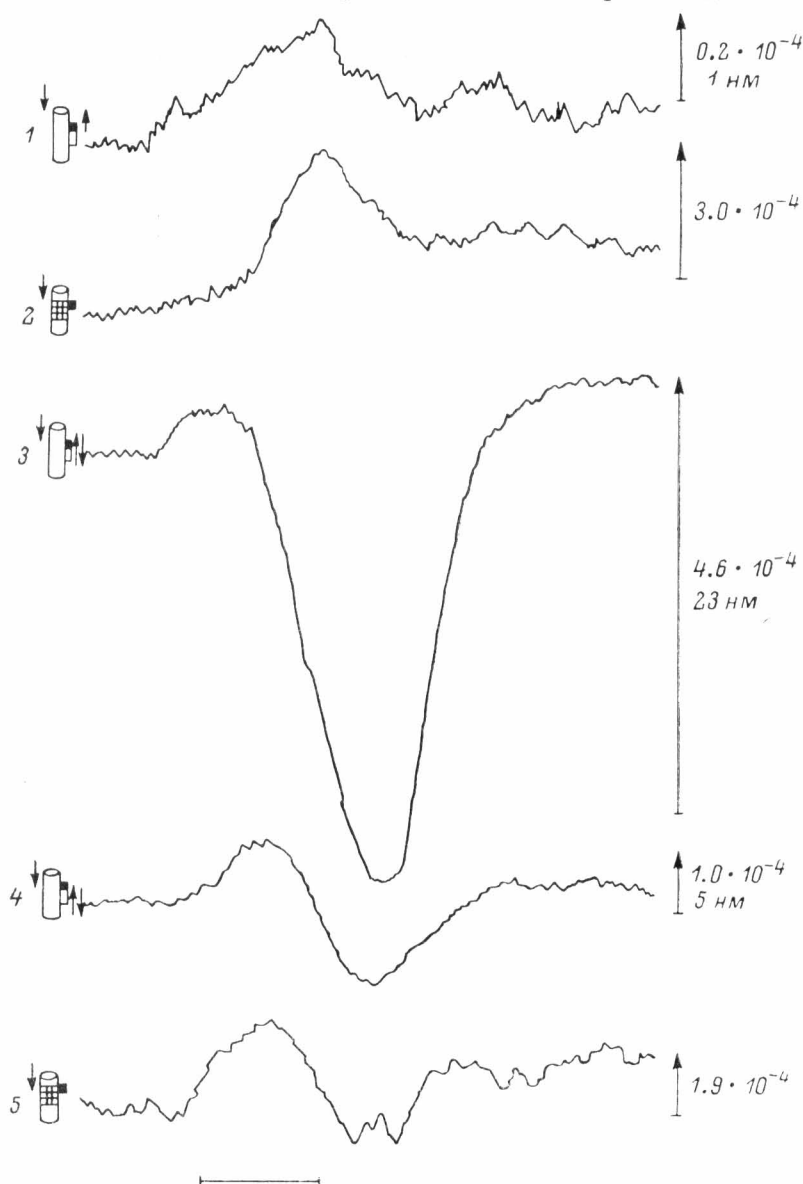


Рис. 3. Увеличение амплитуды продольного движения аксона краба при обработке волокна раствором проназы.

По осям — то же, что и на рис. 2. Фотометрия в 1—1.5 см от места раздражения. 1 — однофазное движение (укорочение) при потенциале действия (2), регистрируемом по светопропусканию при длине волны 700 нм волокна, окрашенного НК 2495, до введения проназы. 3 — двухфазное движение в растворе проназы (2 мг/мл) на морской воде; 4, 5 — двухфазное движение и потенциал действия соответственно, после отмывки проназы. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2. Усреднение по 200 (1), 41 (2), 92 (3), 81 (4) и 152 (5) измерениям.

жении и исчезновении движения при ПД на аксонах, обработанных антитубулинами и цитохалазином Б (Левин, Гольфанд, 1984а, 1984б).

Наши результаты об увеличении амплитуды движения под действием проназы (2 мг/мл) не согласуются с результатами Тасаки и Ивасы (Tasaki, Iwasa, 1982), отмечавших, что трипсин и коллагеназа в концентрации 1 мг/мл при 60 мин инкубации не влияют на амплитуду механического ответа аксона кальмара при ПД. Расхождение может быть объяснено тем, что в наших опытах

Скорости распространения продольного движения и проведения потенциала действия (ПД) по аксону краба, находящемуся в морской воде и в растворе проназы или после ее отмывки морской водой

Среда инкубации аксона	Скорость проведения ПД, м · с ⁻¹ , измеренная			Скорость проведения продольного движения, м · с ⁻¹ , измеренная		
	по началу ПД	по макси- мальной ампли- туде ПД	по 1/2 мак- симальной амплитуды ПД	по началу движения	по макси- мальной ампли- туде дви- жения	по 1/2 мак- симальной амплитуды движения
Морская вода	2.8±0.4 (6)	3.4±0.3 (6)	3.0±0.4 (6)	3.1±0.5 (6)	4.6±2.0 (4)	2.9±0.7 (4)
В растворе проназы (2 мг/мл) или после от- мывки от него в мор- ской воде	4.2±1.0 (5)	3.7±0.4 (6)	3.7±0.3 (6)	4.5±0.5 (13)	4.7±0.7 (14)	4.5±0.5 (13)

Примечание. В скобках приведено число измерений. Различия в скоростях проведения ПД и движения в морской воде и в растворе проназы статистически недостоверны ($P > 0.05$).

происходил больший протеолиз оболочки, нежели в условиях опытов Тасаки и Ивасы, за счет большей концентрации протеолитического фермента. В пользу этого говорит тот факт, что в наших опытах при 30—60-минутной инкубации аксонов в растворах проназы (2 мг/мл) наблюдалось уменьшение амплитуды ПД вплоть до полной утраты возбудимости волокна. В опытах же Тасаки и Ивасы 1-часовая инкубация аксонов в растворах указанных выше ферментов не сопровождалась потерей возбудимости.

В заключение следует добавить, что увеличение амплитуды микродвижения при протеолизе оболочки аксона хорошо согласуется с развиваемой нами точкой зрения, согласно которой причиной движения волокна при ПД является потенциал- и токозависимая деформация мембраны и субмембранного слоя, а не набухание и отбухание мембраны, как полагают Иваса и Тасаки (Iwasa, Tasaki, 1982).

Авторы признательны проф. Л. Б. Козну (Йельский университет, США), любезно предоставившему образцы потенциалзависимых красителей, и К. А. Гольфанд и Т. М. Левенберг за помощь в экспериментальной работе.

Л и т е р а т у р а

- Ивасе И., Скайлап Р. Механика и термодинамика биологических мембран. М.: Мир, 1982. 304 с. — 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., Малев 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. — 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. — Малев В. В., Левин С. В., Трошин А. С. К механике возбужденного нервного волокна. — ДАН СССР, 1985, т. 281, № 3, с. 715—719. — Iwasa K., Tasaki I., Gibbons R. C. Swelling of nerve fibers associated with action potentials. — Science, 1980, vol. 210, p. 338—339. — Iwasa K., Tasaki I. Molecular events that underlie membrane excitation. — J. Theor. Biol., 1982, vol. 99, p. 87—99. — Tasaki I., Iwasa K. Rapid pressure changes and surface displacement in squid giant axon associated with production of action potentials. — Japan. J. Physiol., 1982, vol. 32, p. 69—81.

Поступила 24 IV 1986

THE INFLUENCE OF ELASTIC PROPERTIES OF THE CRAB AXON SHEATH ON ITS MOVEMENT DURING ACTION POTENTIAL

S. V. Levin, V. V. Malev

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

The shear modulus (ν) of single giant axon of the crab *Carcinus maenas* was determined by measuring the axon elastic stretching up to 1—10 %. The value obtained for ν ($5-7 \cdot 10^3$ dn · cm) is more than that for sheaths of reptilian and mammalian red blood cells by 10^4-10^6 times. Proteolysis of the axon sheath by pronase solution (2 mg/ml, 15—20 min) increases the amplitude of axon movement at the action potential by 8—10 times. It is suggested that the collagen fibers, Schwann's and connective cells are passive structures of the axon sheath, and that potential-dependent axon movement at the action potential is due to deformation of the axolemma and submembrane layer.
