

О.С. Сотников, Т.Н. Кокурина, И.А. Соловьёва и С.С. Сергеева

## РАННИЕ РЕАКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОБЛАСТИ УЗЛОВЫХ ПЕРЕХВАТОВ МИЕЛИНОВОЙ ОБОЛОЧКИ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН (ПРИЖИЗНЕННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Лаборатория функциональной морфологии и физиологии нейрона (зав. — проф. О.С. Сотников), Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: sotnikov@kolt.infran.ru

С помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа проведены прижизненные исследования структурной динамики одиночных узловых перехватов (Ранвье) изолированных миелиновых нервных волокон лягушки при механическом воздействии и в среде со сниженной ионной силой, в условиях, при которых в электрофизиологических опытах появляется экспрессия  $K^+$ -каналов аксолеммы в паранодальной области. Видеосъемка показала, что в этой области, возникает расслоение миелиновой оболочки, связанное с набуханием цитоплазмы шванновских клеток, заключенной в концевых мембранных петлях миелина. Увеличение степени расслоения миелиновых пластинчатых комплексов делает их невидимыми под световым микроскопом, поэтому регистрируется не передвижение миелиновой оболочки от узловой щели, как полагают многие авторы, а смещение только видимой границы компактной, не расслоенной еще миелиновой оболочки. Следовательно, удаление миелина (демиелинизация) отсутствует, а электрофизиологический эффект может объясняться существенным падением электрического сопротивления в паранодальной области в результате набухания концевых мембранных петель и расслоения миелиновой оболочки. На препаратах отмечается также уменьшение диаметра аксона, которое пропорционально набуханию концевых отделов миелиновой оболочки. Так как наружный диаметр волокна не изменяется, можно заключить, что наблюдается процесс набухания цитоплазмы шванновской клетки за счет водной фракции аксоплазмы, своеобразный процесс аксоглиальных взаимодействий.

**Ключевые слова:** миелиновое нервное волокно, узловой перехват (Ранвье), демиелинизация,  $K^+$ -каналы узлового перехвата

Известно, что исследование соотношения морфологических и функциональных характеристик одиночных нервных волокон позволяет приблизиться к пониманию некоторых его электрофизиологических параметров [1, 2].

В ранних исследованиях узловых перехватов (*nodus interruptionis myelini*, перехватов Ранвье) с помощью фиксации потенциалов было обнаружено отсутствие в них калиевых ионных каналов ( $K^+$ -каналов) [5, 10]. В дальнейшем оказалось, что через 15–60 мин после растяжения волокна, действия гипотонических растворов Рингера, лизолецитина и других воздействий в паранодальной области появляются калиевые токи [6, 9]. При этом в данной области происходят изменения, напоминающие сдвиг, смещение миелиновой оболочки в сторону от узловой щели (рис. 1). Физиологи под узловыми перехватами часто подразумевают только узловую щель волокна, лишенную миелина [15], морфологически же в узловом перехвате выделяются щель, миелиновые конусы и луковички перехвата (собственная терминология О.С. Сотникова, пояснения см. на рис. 2). Часто указанные изменения именовали локальной демиелинизацией, подразумевая при этом удаление миелина и обнажение аксолеммы в паранодальной области в дополнение к непо-

крытой миелином аксолемме в узловой щели. Высказана гипотеза, что  $K^+$ -каналы исходно располагаются под миелином в аксолемме паранодальной области волокна вне зоны узловой щели [8, 16], а возможно и вдоль всего межузлового сегмента аксона [7].

Расположение  $K^+$ -каналов связывают с аксоглиальными мембранными контактами паранодальной области [11, 12], предполагая, что они укрепляются там адгезионными молекулами аксолеммы (контактин и Caspr) и плазмолеммы глиоцита (нейрофасцин 155), а также молекулами ганглиозидов GM1 и GD1 [14]. Открываются  $K^+$ -каналы и обнажаются при так называемой локальной демиелинизации. К сожалению, подробных прижизненных исследований «локальной демиелинизации» перехвата проведено не было. Понятие «локальной обратимой демиелинизации» было введено в прижизненную нейрогистологию ранее [3, 4]. Учитывая важное значение описанного выше феномена выявления  $K^+$ -каналов, нам представлялось необходимым исследовать локальные изменения узловых перехватов в прижизненном состоянии без использования фиксаторов.

**Материал и методы.** Изучены живые свежeweделенные изолированные миелиновые нервные волокна седалищных нервов 28 лягушек *Rana temporaria*, травмированные растяжением при препарировании или выдержанные в растворе Рингера, разбавленном в 2 раза. Для получения изолированных волокон седалищные нервы содержали в 0,4% растворе проназы (проназа *Streptomyces griseus*, Serva, США) при температуре 21–23 °С в течение 30 мин.

Исследование проводили с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Биомед-3И ФК (БИОМЕД, Россия), путём микровидеосъёмки (с частотой 1 кадр в 7 мин) и компьютерной обработки изображения — эффект Emboss («чеканка»).

**Результаты исследования.** В препаратах, приготовленных указанным выше способом, имеется значительное число неизмененных нервных волокон. Их интактность определяется наличием ряда признаков (рис. 2). Узловые перехваты имеют крайне узкую щель (не более 1 мкм). Иногда узловая щель едва угадывается. Смежные миелиновые конусы перехвата имеют правильную усечённую форму. Луковицы перехвата сохраняют булавовидную форму с продолговатыми складками на поверхности. Насечки миелина (Шмидта – Лантермана) едва заметны и имеют форму ровных косых полосок, пересекающих миелиновую оболочку. Перикарион шванновской клетки обычно не виден или выглядит в виде узкой полоски. Ядро шванновской клетки не просматривается. Аксон ровный, без вдавлений, и по толщине примерно в 3–5 раз превышает размер миелиновой оболочки.

Однако при приготовлении препарата часть волокон невольно подвергаются растяжению. Узловые перехваты таких волокон имеют широкую узловую щель, укороченные, неправильной формы миелиновые конусы. Последние могут быть вообще невидимыми. Тогда эллипсовидная форма луковицы узлового перехвата оказывается как бы усечённой на конце, прилегающем к конусу. В этом месте отмечается расслоение компактной миелиновой оболочки на крупные миелиновые слои (рис. 3).

Насечки миелина выглядят набухшими, вдавленными в аксон. В результате последний приобретает четковидную форму. Перикарион шванновской клетки набухает и также вдавливается в осевой цилиндр, деформируя его.

Динамику такого процесса можно наблюдать при действии раствора Рингера со сниженной ионной силой. Прежде всего это сложный процесс, который так же, как и при механической травме, затрагивает все структурные компоненты миелинового волокна. Однако здесь мы рассмотрим только изменения узловых перехватов, которые оказались наиболее чувствительными к исполь-

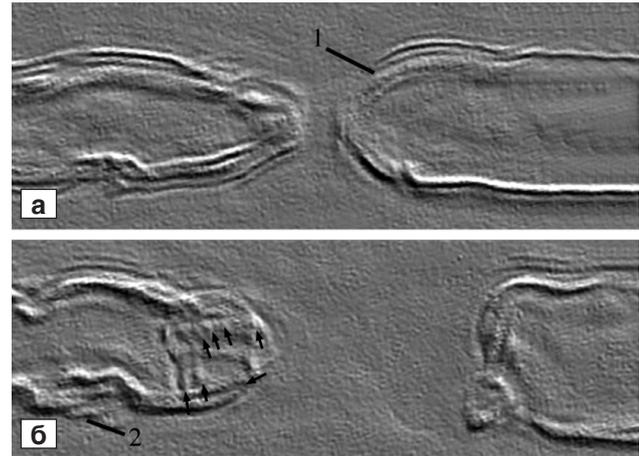


Рис. 1. Кажущееся перемещение миелиновой оболочки по бокам от области узловой щели после механической травмы миелинового волокна при препарировании.

а — слабое механическое воздействие (кажущееся расширение узловой щели); б — значительная механическая травма узлового перехвата (кажущийся сдвиг миелиновой оболочки в стороны от узловой щели). 1 — исчезновение контуров миелиновой оболочки в результате высокодисперсного ее расслоения на оптически невидимые мембранные слои; 2 — набухшая насечка миелина (Шмидта – Лантермана) с расслоением миелиновой оболочки. Стрелки — слои расслоившейся миелиновой оболочки в области луковицы перехвата. Об. 40ФК, ок. 10. Компьютерный эффект Emboss.

зованным неспецифическим агентам и которые приводят к проявлению  $K^+$ -каналов.

Прежде всего нами было обнаружено «смещение» миелиновой оболочки в сторону от узловой щели с её расширением (рис. 4, г). Впечатление такого смещения кажется особенно убедительным при проекции снятых видеофильмов. Однако обращает на себя внимание отсутствие утолщения миелиновой оболочки в той области, куда якобы «смещается» миелин, но он при этом не накапливается, а как бы исчезает.

Это странное явление становится понятным при тщательном рассмотрении деталей процесса. Оказывается, миелиновая оболочка, как пластинчатая структура, при использованном внешнем воздействии, прежде всего, начинает расслаивать-



Рис. 2. Интактное миелиновое нервное волокно.

1 — узловая щель; 2 — конус узлового перехвата; 3 — луковица перехвата; 4 — насечка миелина (Шмидта – Лантермана); 5 — аксон. Об. 25ФК, ок. 10. Компьютерный эффект Emboss.

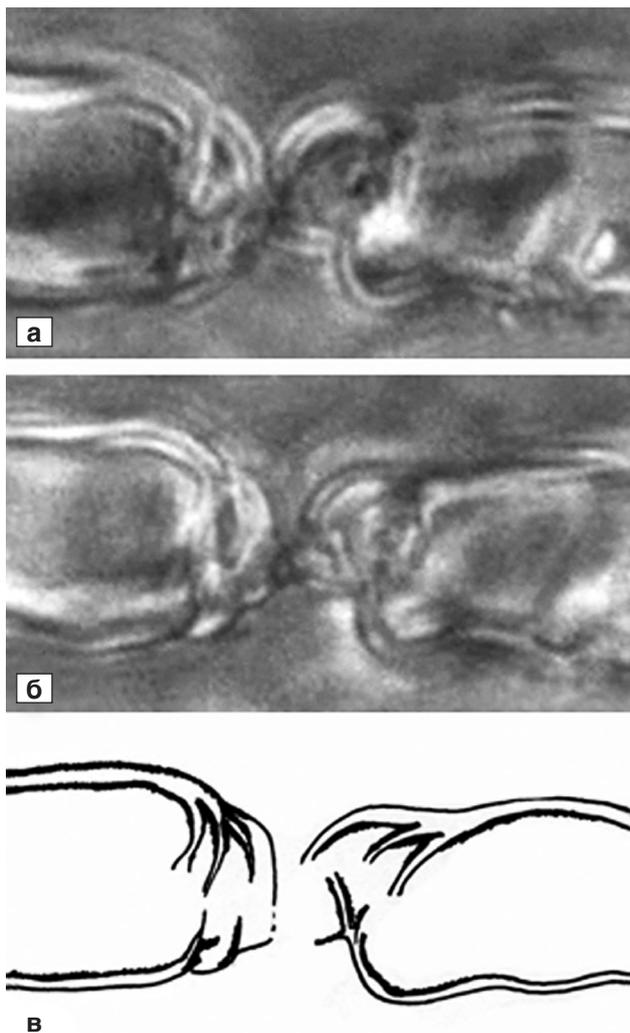


Рис. 3. Узловой перехват после механической травмы миелинового волокна во время препарирования.

а, б — два изображения одного и того же препарата при различной фокусировке; в — суммарная схема расслоения миелиновой оболочки в области конусов и лукович перехвата. Об. 25ФК, ок. 16.

ся у узлового перехвата на крупные, видимые комплексы пластинок (см. рис. 4). Этот процесс начинается с миелинового конуса узлового перехвата. Первые видимые группы пластинок отслаиваются от нижней поверхности миелиновой оболочки и углубляются внутрь аксона и в сторону от узловой щели. Степень расслоения увеличивается и переходит на луковицу перехвата. Видимые пластинчатые комплексы подвижны. Они повторно расслаиваются и соединяются в разных пропорциях, так что часть из них становятся едва заметными, а некоторые, истончаясь, вообще перестают быть видимыми (см. рис. 4, в, г, ж, з).

Видимыми остаются только компактный, нерасслоенный отдел миелиновой оболочки и более-менее крупные комплексы пластинок.

Сильно расслоившиеся отделы становятся невидимыми под световым микроскопом.

В результате наблюдается не движение миелиновой оболочки, а смещение видимой границы между компактным и расслоенным ее отделами, т.е. явление, наступающее в результате продолжающегося и углубляющегося расслоения оболочки. Это и создает иллюзию смещения всей миелиновой оболочки (см. рис. 4, г, з).

Следовательно, сдвига миелиновой оболочки вдоль волокна и освобождения от неё аксона фактически не происходит. Очевидно, отслаивающиеся с внутренней поверхности миелиновой оболочки комплексы пластинок остаются связанными своими концевыми мембранными петлями с аксоном.

Последний в паранодальной области в результате вдавления отслоившихся пластинок истончается в 3–4 раза, и его диаметр закономерно выравнивается с диаметром отверстия миелинового конуса, т.е. с истончённым в норме диаметром аксона при выходе из миелиновой оболочки (см. рис. 4, г, з). Исходя из ультраструктурной организации паранодальной области, расслоение миелиновых пластинок в этом месте возможно только при набухании цитоплазмы шванновской клетки, которая располагается в концевых мембранных петлях миелиновой оболочки. Так как каждая петля в паранодальной области закреплена на аксоне с помощью мембранных аксоглиальных контактов, она не может перемещаться вдоль аксона. Однако видно, как слои миелиновой оболочки углубляются в осевой цилиндр, пропорционально уменьшая его диаметр. Этот процесс углубления пластинок миелина и сужения аксона имеет предел. Истончение аксона прекращается, когда его диаметр достигает размеров такового при выходе из миелинового конуса в узловую щель. Далее процесс расслоения миелиновой оболочки в паранодальной области, т.е. набухание глиоплазмы мембранных петель, распространяется не внутрь аксона, а в сторону наружных пластинок миелина. Следствием этого является уплотнение глубоких слоев ранее расслоенной миелиновой оболочки. При этом образуется компактная структура, напоминающая прежний миелиновый конус (см. рис. 4, в, г, ж, з).

Однако такой вторичный конус образуется на некотором расстоянии от исходного, причём это расстояние (около 4 мкм) приблизительно равно длине паранодальной области (конус и начало луковицы). Это, по-видимому, связано с тем, что расширенные мембранные петли миелиновой оболочки паранодальной области не могут отделить-

ся от аксона из-за мембранных аксоглиальных контактов.

На фоне продолжающегося расслоения миелиновой оболочки появляются признаки ее разрушения (беспорядочные завихрения, каплевидные структуры).

Обсуждение полученных данных. Таким образом, прижизненные микроскопические исследования структурной кинетики узловых перехватов при воздействии на них факторов, вызывающих появление  $K^+$ -токов в аналогичных условиях физиологических экспериментов, свидетельствуют о высокой подвижности пластинчатого аппарата миелиновой оболочки в паранодальной области. Миелиновая оболочка никуда не удаляется с аксона и не обнажает его. Происходит только её внутренняя перестройка, связанная с набуханием концевых мембранных петель в паранодальной области, расслоением миелиновой оболочки. При этом изменения развиваются в течение 20–45 мин, т.е. в то же время, что и появление  $K^+$ -токов [6, 9] в этой области. Приведенные данные существенно отличаются от представлений других исследователей [5, 7] об удалении миелина из области перехвата. Однако набухание концевых мембранных петель миелиновой оболочки и ее расслоение в паранодальной области должны приводить к значительному снижению электрического сопротивления миелиновой оболочки, что и наблюдается [6], вместе с ухудшением проведения нервных импульсов по волокну [2, 13]. В наших опытах, наряду с расслоением миелиновой оболочки в узловых перехватах, наблюдался сходный процесс расслоения оболочки в насечках миелина при их набухании. Такой процесс в насечках, как показано в опытах ранее [7], также приводит к существенному уменьшению локального сопротивления миелиновой оболочки.

Еще одно примечательное явление, которое удалось выявить в наших опытах, — это стойкое уменьшение диаметра аксона в перинодальной области. Обращают на себя внимание два момента. Во-первых, сужение аксона имеет предел. Его диаметр становится равным таковому аксона при выходе его из миелиновой оболочки в узловую щель. Этот предел аксон не преодолевает. Можно предположить, что это объясняется концентрацией филаментозно-тубулярного цитоскелетного материала в этом месте, подобно тому, что имеет

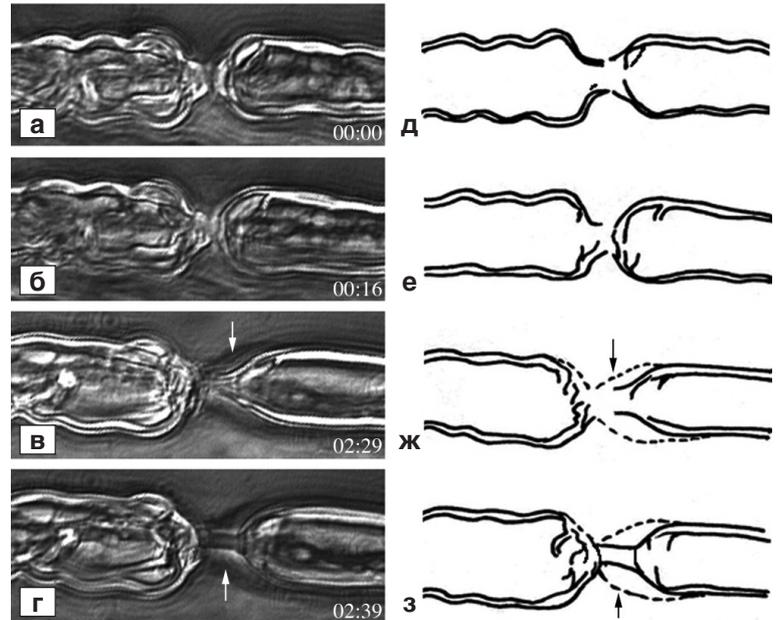


Рис. 4. Изменения узлового перехвата миелинового волокна в гипотоническом растворе Рингера.

а, д — сохранённые конусы перехвата, видна начальная стадия расслоения миелиновой оболочки; б, е — пластинчатое расслоение миелиновой оболочки; в, ж — расслоение миелиновой оболочки в области левой луковицы и формирование вторичного миелинового конуса справа; г, з — расслоение миелиновой оболочки левой луковицы и резкое истончение аксона. Стрелки — следы прежних границ миелиновой оболочки; время — от начала съёмки. а-г — фазовый контраст; д-з — схематическое изображение тех же кадров. Видеомикроскопия. Об. 40ФК, ок. 10.

место в норме в области выхода аксона из миелиновой оболочки в узловую щель.

Во-вторых, наблюдается прямая пропорциональная зависимость локального уменьшения объема, занимаемого аксоном, и увеличение объема, занимаемого расщепленными пластинками миелина (набухшими миелиновыми петлями, содержащими цитоплазму шванновских клеток). Так как наружный диаметр волокна при этом не меняется, создается впечатление, что имеет место пропорциональный массообмен между аксоном и глией. Водная фракция аксоплазмы перемещается в цитоплазму глиоцитов концевых мембранных петель миелиновой оболочки, вызывая их набухание, что приводит к увеличению степени расслоения миелиновой оболочки в перинодальной области. Так как транслокация воды, по-видимому, связана с перемещением ионов, то этот процесс должен оказывать существенное влияние на электрические процессы в узловом перехвате, что было уже показано [2]. Во всяком случае, возможно, речь идет о ранее не известном процессе аксоноглиального взаимодействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ №10-04-90000-Вел\_а и №11-04-0093.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Каталимов Л.Л. и Сотников О.С. Геометрическая роль периаксонального пространства перехвата Ранвье миелинизированных нервных волокон. В кн.: Вестн. Ульяновск. гос. педагог. ун-та им. И.Н. Ульянова. Ульяновск, изд. Федерального агентства по образованию, 2008, вып. 4. с. 116–123.
2. Ревенко С.В., Сотников О.С. и Ходоров Б.И. Сравнительный анализ морфологических и физиологических характеристик перехвата Ранвье. *Нейрофизиология*, 1978, т. 10, № 4, с. 400–406.
3. Сотников О.С. Функциональная морфология живого миелинового нервного волокна. Л., Наука, 1976.
4. Сотников О.С. Статика и структурная кинетика живых асимпатических дендритов. СПб., Наука, 2008.
5. Chiu S.Y. and Ritchie J.M. Potassium channels in nodal and internodal axonal membrane of mammalian myelinated fibres. *Nature*, 1980, v. 284, № 5752, p. 170–171.
6. Chiu S.Y. and Ritchie J.M. Evidence for the presence of potassium channels in the paranodal region of acutely demyelinated mammalian single nerve fibres. *J. Physiol.*, 1981, v. 313, p. 415–437.
7. Chiu S.Y. and Ritchie J.M. Evidence for the presence of potassium channels in the internode of frog myelinated nerve fibres. *J. Physiol.*, 1982, v. 322, p. 485–501.
8. Chiu S.Y., Ritchie J.M. On the physiological role of internodal potassium channels and the security of conduction in myelinated nerve fibres. *Proc. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.*, 1984, v. 220, № 1221, p. 415–422.
9. Chiu S.Y. and Schwarz W. Sodium and potassium currents in acutely demyelinated internodes of rabbit sciatic nerves. *J. Physiol.*, 1987, v. 391, p. 631–649.
10. Horakova M., Nonner W. and Stämpfli R. Action potentials and voltage clamp current of single rat Ranvier nodes. *Proc. 24 th Int. Congr. Physiol. Sci.*, 1968, p. 198.
11. Poliak S., Salomon D., Elhanany H. et al. Juxtaparanodal clustering of shaker-like K<sup>+</sup> channels in myelinated axons depends on Caspr 2 and TAG1. *J. Cell Biol.*, 2003, v. 162, № 6, p. 1149–1160.
12. Sherman D.L., Taif S., Johnson R. et al. Neurofascins are required to establish axonal domains for salutatory conduction. *Neuron*, 2005, v. 48, № 5, p. 737–742.
13. Shrager P., Chiu S. Y., Ritchie J.M. et al. Optical recording of action potential propagation in demyelinated frog nerve. *J. Biophys.*, 1987, v. 51, № 2, p. 351–355.
14. Susuki K., Baba H., Tohyama K. et al. Gangliosides contribute to stability of paranodal junctions and ion channel clusters in myelinated nerve fibers. *Glia*, 2007, v. 55, № 7, p. 746–757.
15. Zhang C.L., Ho P.L., Kintner D.B. et al. Activity-dependent regulation of mitochondrial motility by calcium and Na/K-ATPase at nodes of Ranvier of myelinated nerves. *J. Neurosci.*, 2010, v. 30, № 10, p. 3555–3566.
16. Zhou L., Zhang C.L., Messing A. and Chiu S.Y. Temperature-sensitive neuromuscular transmission in Kv1. 1 null mice: role potassium channels under the myelin sheath in young nerves. *J. Neurosci.*, 1998, v. 18, № 18, p. 7200–7215.

Поступила в редакцию 11.11.2010

### EARLY REACTIVE CHANGES OF MYELIN SHEATH IN THE AREA OF MYELIN SHEATH GAPS (NODES OF RANVIER) IN NERVE FIBERS (A SUPRAVITAL STUDY)

*O.S. Sotnikov, T.N. Kokurina, I.A. Solovyiova and S.S. Sergeeva*

Using the inverted phase contrast microscope, the supravital study of structural dynamics of single myelin sheath gaps (nodes of Ranvier) of isolated frog myelin nerve fibers was performed after mechanical injury and in the medium with the decreased ion force under the conditions which induce, in electrophysiological experiments, the expression of the axolemmal K<sup>+</sup>-channels in the paranodal area. Videorecording has shown that within this area the myelin sheath stratification appeared that was associated with the swelling of Schwann cell cytoplasm enclosed in the terminal membranous loops of myelin. An increase of the degree of stratification of the lamellar myelin complexes make them invisible in the light microscope; therefore, it is not the translocation of the myelin sheath from the node cleft that is recorded, as many authors believed, but a shift of only the visible border of the compact, yet unstratified myelin sheath. Hence, the removal of myelin (demyelination) was absent, and the electrophysiological effect can be accounted for by a significant fall of electrical resistance in paranodal area as a result of swelling of terminal loops and stratification of the myelin sheath. Preparations examination also revealed a decrease of the axonal diameter in, which is proportional to swelling of the myelin sheath terminal parts. Since the outer fiber diameter did not change, it can be concluded that the process observed is the result of swelling of the Schwann cell cytoplasm due to the axoplasm water fraction which may be a peculiar process of axo-glial interactions.

**Key words:** *myelinated nerve fiber, myelin sheath gaps (nodes of Ranvier), demyelination, K<sup>+</sup>-channels of nodes*

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