

С. С. Сергеева, Н. Ю. Васягина, О. С. Сотников, Т. В. Краснова и Е. А. Гендина

СОКРАТИТЕЛЬНАЯ И ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНА ПРИ ДЕЙСТВИИ КОЛХИЦИНА

Лаборатория функциональной морфологии и физиологии нейрона (зав. — проф. О. С. Сотников), Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Целью исследования было изучение сократительной активности травмированных отростков нервных клеток и попытка ингибировать их ретракцию с помощью раствора колхицина. Исследования проводили на живых изолированных нейронах пресноводных моллюсков (*Lymnaea stagnalis* и *Planorbis corneus vulgaris*), которые изучали в фазовом контрасте с помощью цейтраферной компьютерной микровидеоустановки. В контроле в растворе Рингера сократительная активность отростков нервных клеток отмечена в 92% случаев. При действии колхицина отмечалось ингибирование сокращения нервных волокон у 86% нейронов. В опытах по изучению электрической активности нейрона использованы нейроны Ретциуса пиявки. Было выявлено, что инкубация ганглий в растворе колхицина вызывает повышение частоты спонтанной импульсной активности с 0,22 до 0,75 имп./с. Амплитуда спонтанных потенциалов уменьшается с 46,9 до 37 мВ, порог понижается на 18%, длительность спонтанного спайка увеличивается с 4,3 до 7,1 мс, латентный период ответа на раздражающий стимул — с 25,0 до 37,9 мс. При раздражении частотой 7–10 Гц нейрон генерирует более высокую частоту импульсной активности, чем в норме. Таким образом, удалось показать, что колхицин способен ингибировать сократительную активность травмированных отростков нервных клеток, сохраняя в удовлетворительном состоянии электровозбудимую мембрану. Из этого следует, что можно осуществить попытку *in vivo* частично ингибировать сокращение нервных волокон, предотвратив, таким образом, увеличение диастаза нервов, которое не позволяет осуществить их контактное хирургическое сопоставление и способствует развитию массивного рубца на месте перерезки.

Ключевые слова: нейроны, ретракция отростков, микротрубочки, колхицин, электрогенез нейронов

Как известно, сократимость в комплексе с раздражимостью является эволюционно первой реакцией проявления жизни [5]. Взаимосвязь сокращения с биоэлектрической активностью была показана Н. Н. Камия [4] на плазмодии *Physarum*.

Первым ретракцию живого нервного волокна после его химической травмы наблюдал на головастиках лягушки С. С. Speidel [26]. В дальнейшем изучение ретракции травмированных волокон на живых животных, по-видимому, не проводилось. Последнее время двигательная активность различных типов клеток привлекает все большее внимание исследователей [2, 23, 32]. У неизменных нейронов важным видом подвижности является сократительная активность отростков [19, 30]. Двигательные реакции нейронов, как и других типов клеток, связаны с их цитоскелетом. Получены определенные данные об участии микротрубочек в процессе сокращения отростков нервных клеток [16, 28]. Однако механизм их участия остается недостаточно изученным. Так, некоторые авторы считают, что в основе ретракции отростков лежит деполимеризация микро-

трубочек и F-актина [31], тогда как другие [15] — экспериментально доказывают, что при ретракции «оптовая деполимеризация микротрубочек» отсутствует. Получены также данные, которые заставляют сомневаться в том, что микротрубочки играют роль в реакции аксонов на аксотомию [29]. Поэтому мы считали необходимым на нашей модели уточнить с использованием колхицина значение деполимеризации микротрубочек на ретрактивную сократимость поврежденного отростка нейрона.

Колхицин, связываясь с тубулином, препятствует его полимеризации и, таким образом, способствует разборке микротрубочек цитоскелета [1, 10]. При применении колхицина количество микротрубочек уменьшается [9]. В экспериментальных исследованиях колхицин в основном используется для изучения роли микротрубочек в исследованиях механизмов аксонального тока и связанных с ним электрических функций нейронов.

Однако до сих пор остается недостаточно изученным и влияние колхицина на электрогенез

Сведения об авторах:

Сергеева Светлана Сергеевна, Васягина Надежда Юрьевна, Сотников Олег Семенович (e-mail: ossotnikov@mail.ru), Краснова Татьяна Викторовна, Гендина Елена Александровна, лаборатория функциональной морфологии и физиологии нейрона, Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034 Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

нейронов. Не изучены нарушения ретракции и возможности ингибирования сокращения отростков, хотя исследования в данной области могут иметь большое фундаментальное и практическое значение для медицины. Цель настоящей работы — изучение сократительной и электрической активности нейрона под воздействием колхицина.

Материал и методы. Первая серия опытов проведена на живых изолированных из ганглиев нейронах ($n=50$) пресноводных моллюсков (*Lymnaea stagnalis*, $n=26$ и *Planorbis corneus vulgaris*, $n=24$). Одиночные нейроны выделяли из окологлоточного ганглионарного кольца моллюска, которое вначале помещали на 40 мин в 0,4% раствор проназы, приготовленный на растворе Рингера, для удаления соединительнотканых оболочек ганглия и глиальных оболочек нейронов. Затем ганглии ($n=24$) помещали в раствор Рингера или в раствор колхицина с концентрацией 0,2 мг/мл ($n=25$) и проводили пипетирование. Изолированные таким способом нейроны помещали в микрокамеру и исследовали в фазово-контрастном микроскопе с помощью цейтраферной компьютерной микровидеоустановки [7]. Регистрировали клетки с полностью сократившимися, частично сократившимися и несократившимися отростками.

Для изучения влияния колхицина на электрогенез нейрона во второй серии опытов использовали нейроны Ретциуса медицинской пиявки ($n=35$). Для проведения экспериментов часть брюшной нервной цепочки из 5 первых ганглиев извлекали из тела животного. Второй ганглий за оболочку укрепляли иглами на дне экспериментальной камеры и подкрашивали 0,01% раствором нейтрального красного.

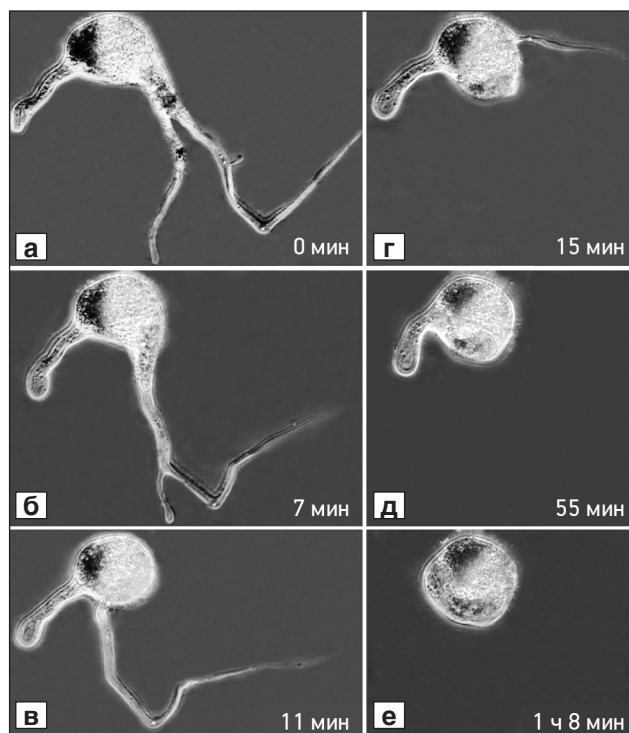


Рис. 1. Линейное сокращение отростков живого изолированного нейрона пресноводного моллюска в растворе Рингера.

а-е — стадии процесса. Время — от начала видеосъемки. Фазовый контраст. Об. 40, ок. 10

В центре ганглия становились видными две крупные клетки (диаметром около 100 мкм) — нейроны Ретциуса. Остальную часть цепочки приподнимали из 1-й камеры и помещали во 2-ю камеру с вмонтированными биполярными раздражающими электродами. Раствор Рингера в 1-й камере содержал 0,2 мг/мл колхицина. Ганглий экспонировали в растворе Рингера или в растворе колхицина (0,2 мг/мл) по 40 мин. Как было показано ранее, в этих условиях применяемые агенты влияют исключительно на тело и отросток клетки [6]. Электрическую активность нейрона (в контроле — $n=20$, в растворе колхицина — $n=15$) регистрировали экстраклеточно золотым микроэлектродом в стеклянной изоляции. Синаптическую активацию осуществляли, раздражая нервную коннективу между 3-м и 4-м ганглиями толчками электрического тока длительностью 0,3 мс, силой, равной двум порогам, с частотами от 1 до 10 Гц. В контрольных опытах исследовали электрическую активность нейронов в растворе Рингера без колхицина. Все опыты проводили однотипно: сначала регистрировали фоновую импульсную активность нейрона, определяли амплитуду, длительность спайка и порог возбуждения. Затем нейрон раздражали в течение 10 мин с частотой 1–10 Гц.

Результаты исследования. В растворе Рингера после изоляции среди одиночных нейронов выявлялись клетки с поврежденными отростками, которые обнаруживали способность к ретракции и оценивались как жизнеспособные. При этом сократительная активность отростков была отмечена в 92% случаев. В начале обычно происходило постепенное округление концевого отдела отростка, и далее формировалась колба ретракции, которая являлась маркером места сокращения. Скорость сокращения отростков нервных клеток резко колебалась у разных нейронов от 0,3 до 9 мкм/мин. Чаще всего отросток полностью впячивался в тело клетки. Так происходит при обычном линейном сокращении (рис. 1).

Нередко сокращение отростка проявлялось своеобразным способом, когда длина оставалась неизменной, но резко уменьшалась масса его нейроплазмы, которая перемещалась в тело клетки. Отросток истончался, объем его уменьшался, т.е. наблюдалось объемное, изометрическое сокращение. Также можно было выделить смешанный тип сокращения, при котором происходило диффузное перемещение массы нейроплазмы в тело клетки с уменьшением диаметра волокна и некоторым изменением его длины.

При действии колхицина на нейроны отмечалось ингибирование сокращения нервных волокон. В наших опытах блокирование микротрубочек ингибировало движение отростков у 86% нейронов (рис. 2). Из них в 45% случаев наступала полная остановка сокращения, а в 41% — отростки нейронов сокращались, но только частично. Сокращение начиналось после продолжительного латентного периода и не приводило к полному втягиванию отростка в тело клетки. Лишь у 14% ней-

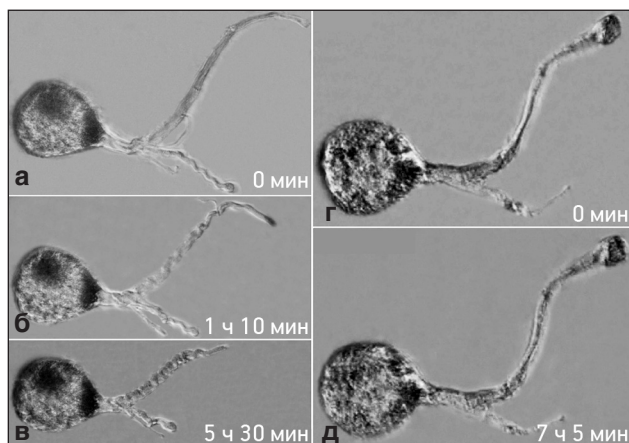


Рис. 2. Ингибирование реакции сокращения отростков нейронов пресноводного моллюска под влиянием раствора колхицина (0,2 мг/мл).

а-в — частичное торможение ретракции; г-д — полный блок сокращения. Время — от начала видеосъемки. Фазовый контраст. Об. 40, ок. 10

ронов отростки полностью сокращались (рис. 3). При полной блокаде ретракции не сокращались даже самые тонкие боковые ответвления инициального отростка. Колба ретракции чаще всего не образовывалась, но даже при ее формировании сокращения отростка могло не произойти.

В опытах по изучению электрической активности нейрона было выявлено, что в контрольных экспериментах клетка генерировала одиночные спонтанные импульсы (рис. 4, а) частотой $0,22 \pm 0,03$ имп./с. Амплитуда спонтанного спайка равнялась $46,9 \pm 0,8$ мВ, длительность была равна $5,9 \pm 0,3$ мс. Латентный период составлял $25,0 \pm 0,7$ мс. При раздражении нейрона с частотой 1–5 Гц он отвечал одним спайком на каждый раздражающий стимул. При раздражении с частотой 7–10 Гц нейрон трансформировал частоту импульсной активности, генерируя потенциал действия не на каждый стимул раздражающего тока (4 и 3 имп./с соответственно) (рис. 5).

40-минутная инкубация ганглия в растворе колхицина вызывает изменение формы спайка (см. рис. 4, б) и повышение частоты спонтанной импульсной активности до $0,75 \pm 0,13$ имп./с. Амплитуда спонтанных потенциалов уменьшается до $37,9 \pm 1,7$ мВ, порог раздражения понижается на 18%, длительность спонтанного спайка увеличивается до $11,7 \pm 0,7$ мс, латентный период возрастает до $37,9 \pm 1,7$ мс. При раздражении нейрона с частотой 1–5 Гц, как и в контроле, нейрон отвечает одним спайком на каждый раздражающий стимул. При раздражении частотой 7 и 10 Гц нейрон отвечает более высокой частотой — 6 и 8 импульсов соответственно (см. рис. 5).

Опыты продемонстрировали, что действие колхицина не вызывает блокады электрической

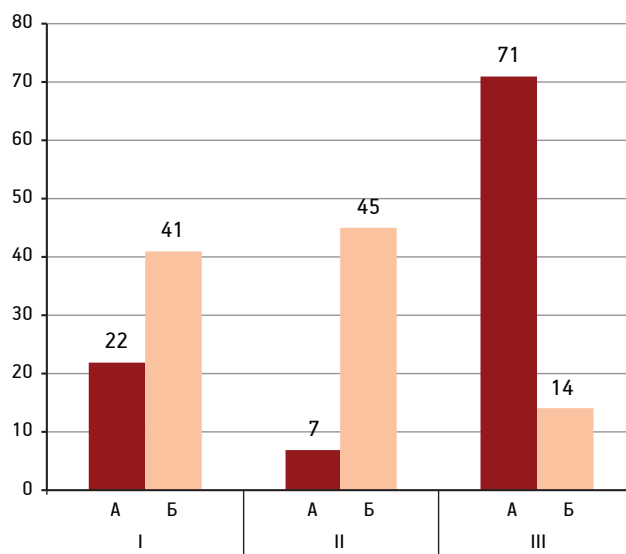


Рис. 3. Относительное содержание нейронов с различным типом двигательной активности отростков у пресноводного моллюска.

По горизонтальной оси: I — нейроны с частично сократившимися отростками; II — с несократившимися отростками; III — с полностью сократившимися отростками; А — в растворе Рингера (контроль); Б — в растворе колхицина; по оси ординат — исследованный параметр (%)

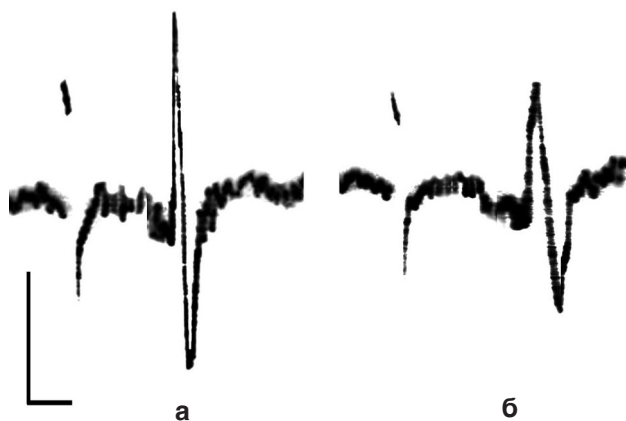


Рис. 4. Форма потенциала действия нейрона Ретциуса пиявки. а — в контроле; б — после действия колхицина

активности нейрона Ретциуса. Увеличение частоты спонтанной импульсной активности, изменение формы спайка, а также порога раздражения нейрона и частоты ответа на высокочастотное синаптическое раздражение (7–10 Гц) свидетельствуют о том, что микротрубочки принимают участие в формировании его электровозбудимости.

Обсуждение полученных данных. В результате проведенного исследования удалось показать, что колхицин способен ингибировать и полностью блокировать сократительную активность травмированных отростков нейронов при сохранении в удовлетворительном состоянии их

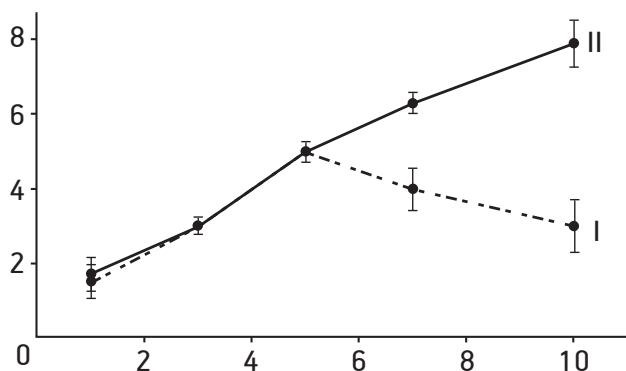


Рис 5. Отношение между частотой раздражения и частотой импульсного ответа нейрона Ретциуса пиявки.

По оси абсцисс — частота раздражения (Гц); по оси ординат — частотный ответ нейрона (имп./с). I — контроль; II — после действия колхицина. Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

электрической функции. Из этого следует, что при перерезке нерва можно было бы осуществить попытку частично ингибировать сокращение прерванных нервных волокон, которое увеличивает диастаз нервов, не позволяет осуществить их контактное хирургическое сопоставление и способствует развитию массивного рубца на месте перерезки. Для этого можно было бы использовать и цитохалазин В, который неплохо блокирует ретракцию [3], но это вещество является высокотоксичным. Колхицин же обладает меньшей токсичностью и давно используется как фармакологическое средство, широко применяется в медицине как противовоспалительное средство для лечения и профилактики ряда заболеваний [18, 25].

По данным литературы известно, что колхицин влияет на электрические характеристики нейрона [14]. При перфузии гигантского аксона кальмара раствором, содержащим колхицин, установлено, что для генерации Na -тока нейролеммы необходимо участие микротрубочек [20]. Разрушение колхицином микротрубочек в колоколообразной сенсилле механорецептора таракана блокирует способность рецептора отвечать на механическое раздражение [22]. Колхицин блокирует электрическую активность дендритов, тела и механорецепторов, не изменяя проводимость аксона [24]. На пресинаптических терминалах верхнего шейного ганглия кошки показано, что колхицин блокирует быстрый аксональный транспорт. Это уменьшает содержание в пресинапсе ацетилхолина, что, в свою очередь, блокирует высокочастотную активацию [27]. Препарат вызывал серьезные морфологические изменения в мотонейронах у кошки, замедляя транспорт белков, но слабо влиял на потенциал покоя и проведение спайков при антидромной стимуляции,

затрагивая в большей степени ортодромное возбуждение. На культуре пирамидных нейронов гиппокампа с помощью методики пэтч-клампа показано, что колхицин влияет на регулируемую протеинкиназой С функциональную пластичность нейронов [11]. Большинство авторов связывают выявленные электрические изменения с нарушениями нейронального транспорта [9, 27].

Наши данные свидетельствуют о связи микротрубочек отростков нейронов с мембранными процессами. Возможно, эта связь осуществляется опосредованно через субкортикальную сеть актиновых филаментов [8]. Имеются указания и на прямое взаимодействие колхицина с ионными каналами [12, 13, 21].

Влияние колхицина на электрическую активность нейрона свидетельствует о сохранении в удовлетворительном состоянии электровозбудимой мембраны. Эксперименты демонстрируют, что колхицин вызывает повышение возбудимости нейрона, о чем свидетельствуют снижение порога и увеличение частоты импульсной активности. По-видимому, колхицин влияет и на функциональное состояние спайк-генерирующих ионных каналов, что приводит к изменению формы спайка и нарушению адаптации нейрона к высокочастотному синаптическому раздражению. Однако действие колхицина не имеет катастрофических последствий для электрогенеза нейронов, что подтверждает возможность его использования в качестве фармакологического препарата, способного блокировать сократительную активность поврежденных отростков нервных клеток.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-90001-Бел_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Альбертс А., Брей Д., Льюис Р. и др. Молекулярная биология клетки. М., Мир, 1994, т. 3.
2. Васильев Ю. М. Клетка как архитектурное чудо. Соросовский образовательный журн., 1996, № 2, с. 9–11.
3. Васягина Н. Ю., Сергеева С. С., Сотников О. С. и др. Влияние цитохалазина В на сократительную активность поврежденного нерва. Цитология, 2012, т. 54, № 9, с. 671–672.
4. Камия Н. Н. Движение протоплазмы. М., Мир, 1962.
5. Коштыяц Х. С. Основы сравнительной физиологии. Т. II. Сравнительная физиология нервной системы. М., Изд-во АН СССР, 1957.
6. Сергеева С. С. Электрофизиологическое исследование топографии аксодендритных синапсов нейрона Ретциуса пиявки. Физиол. журн. им. И. М. Сеченова, 1995, т. 84, № 10, с. 117–120.
7. Сотников О. С., Васягина Н. Ю., Рыбакова Г. И. и Чепур С. В. Попытка ингибирования сокращения нервных отростков в среде, лишенной ионов кальция. Бюл. экспер. биол., 2010, т. 149, № 2, с. 232–235.

8. Узбекова Т. А., Чернова И. А., Савчук В. И. и др. Метод применения колхицина к блуждающему нерву крысы с целью избирательного действия на аксональный транспорт. Бюл. eksper. биол., 1981, т. 92, № 11, с. 631–634.
9. Aguilar C. E., Bisby M. A., Cooper E. et al. Evidence that transport of trophic factors is involved in the regulation of peripheral nerve fields in salamanders. *J. Physiol.*, 1973, v. 234, № 2, p. 449–464.
10. Bai R., Pei X. F., Boyé O. et al. Identification of cysteine 354 of beta-tubulin as part of the binding site for the A ring of colchicine. *Biol Chem.*, 1996, v. 271, № 21, p. 12639–12645.
11. Bouron A. Colchicine affects protein kinase C-induced modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal pyramidal cells. *FEBS Lett.*, 1997, v. 404, № 2–3, p. 221–226.
12. Bracey K., Ju M., Tian C. et al. Tubulin as a binding partner of the heag2 voltage-gated potassium channel. *J. Membr. Biol.*, 2008, v. 222, № 3, p. 115–125.
13. Coulon P., Wüsten H. J., Hochstrate P. et al. Swelling-activated chloride channels in leech Retzius neurons. *J. Exp. Biol.*, 2008, v. 211, Pt 4, p. 630–41.
14. Gordiner J., Overall R. and Marc J. The microtubule cytoskeleton acts as a key downstream effector of neurotransmitter signaling. *Synapse*. 2011, v. 65, p. 249–256.
15. He Y., Yu W. and Baas P. W. Microtubule reconfiguration during axonal retraction induced by nitric oxide. *J. Neurosci.*, 2002, v. 22, p. 5982–5991.
16. Hou S. T., Jiang S. X. and Smith R. A. Permissive and repulsive cues and signaling pathways of axonal outgrowth and regeneration. *Jnt. Rev. Cell Mol. Biol.*, 2008, v. 267, p. 125–181.
17. Huang S. H., Wang Y. I., Tseng G. F. et al. Active endocytosis and microtubule remodeling restore compressed pyramidal neuron morphology in rat cerebral cortex. *Cell Mol. Neurobiol.*, 2012.
18. Li J. J., Lee S. H., Kim D. K. et al. Colchicine attenuates inflammatory cell infiltration and extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2009, v. 297, № 1, p. 200–209.
19. Luo L. and O'Leary D. D.M. Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2005, v. 28, p. 127–156.
20. Matsumoto G. A proposed membrane model for generation of sodium currents in squid giant axons. *J. Theor. Biol.*, 1984, v. 107, p. 649–666.
21. Mironov S. L. and Richter D. W. Cytoskeleton mediates inhibition of the fast Na⁺ current in respiratory brainstem neurons during hypoxia. *Eur. J. Neurosci.*, 1999, v. 11, № 5, p. 1831–1834.
22. Moran D. T. and Varela F. G. Microtubules and sensory transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971, v. 68, № 4, p. 757–760.
23. Sayas C., Ariaens A., Ponsioen B. et al. GSK-3 is activated by the tyrosine kinase Pyk2 during LPA1-mediated neurite retraction. *Mol. Biol. Cell*, 2006, v. 17, № 4, p. 1834–1844.
24. Schafer R. and Reagan P. D. Colchicine reversibly inhibits electrical activity in arthropod mechanoreceptors. *J. Neurobiol.*, 1981, v. 12, № 2, p. 155–166.
25. Solak Y., Atalay H., Polat I. et al. Colchicine treatment in autosomal dominant polycystic kidney disease: many points in common. *Med. Hypoth.*, 2010, v. 74, № 2, p. 314–317.
26. Speidel C. C. The experimental induction of visible structural changes in single nerve fibres in living frog tadpoles. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1936, v. 4, p. 13–17.
27. Tandon A., Bachoo M., Weldon P. et al. Effect of colchicine application to preganglionic axons on choline acetyltransferase activity and acetylcholine content and release in the superior cervical ganglion. *J. Neurochem.*, 1996, v. 66, № 3, p. 1033–1041.
28. Watts R. I., Hoopfer E. D. and Luo L. Axon pruning during *Drosophila* metamorphosis. Evidence for local degeneration and requirement of the ubiquitin-proteasome system. *Neuron*, 2003, v. 38, p. 871–885.
29. White L. A., Baas P. W. and Heidemann S. R. Microtubule stability in severed axons. *J. Neurocytol.*, 1987, v. 16, p. 775–784.
30. Wong R. and Lichtman J. W. Synapse elimination. In: *Fundamentals of Neuroscience*. San Diego, CA Acad. Press, 2003, p. 533–554.
31. Yamada K. M., Spooner B. S., Wessells H. K. et al. Microfilaments and microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, v. 66, p. 1206–1212.
32. Zhang X-F., Schaefer A. W., Bernette D. T. et al. Rho-dependent contractile responses in the neuronal growth cone are independent of classical peripheral retrograde actin flow. *Neuron*, 2003, v. 40, № 5, p. 931–944.

Поступила в редакцию 23.02.2012
Получена после доработки 20.08.2012

NEURON CONTRACTILE AND ELECTRICAL ACTIVITIES AS AFFECTED BY COLCHICINE

S. S. Sergeyeva, N. Yu. Vasyagina, O. S. Sotnikov,
T. V. Krasnova and Ye. A. Gendina

The purpose of this investigation was to analyze the contractile activity of traumatized nerve cell processes and to try to inhibit their retraction by colchicine solution. Isolated living neurons of mollusks (*Lymnaea stagnalis* and *Planorbis cornu vulgaris*) were studied using phase contrast and time-lapse microvideorecording. In the control group, contractile activity of nerve cell processes in Ringers solution was detected in 92% of cases. Application of colchicine resulted in the inhibition of retraction of nerve fibers in 86% of neurons. In the experiments designed to study neuron electrical activity, leech Retzius neurons were used. It was found that ganglion incubation in colchicine solution of increased the frequency of spontaneous pulse activity from 0.22 to 0.75 imp/s. The amplitude of spontaneous potentials decreased from 46.9 to 37 mV, the threshold was reduced by 18%, spontaneous spike duration increased from 4.3 ms to 7.1 ms, while the latent period of the response to irritating stimulus increased from 25.0 to 37.9 ms. During the irritation with a frequency of 7–10 Hz, neuron generated higher frequency of pulse activity, than in norm. Thus, it was possible to show, that colchicine can inhibit the contractile activity of the traumatized nerve cell processes, preserving an electroexcitable membrane in a satisfactory state. These results suggest that it is possible to partially inhibit the nerve fiber retraction in vivo, thus preventing the diastasis increase in the nerves that impedes their contact surgical *approximation* and promotes the development of a massive scar in severed area.

Key words: neuronal microtubules, neuronal process retraction, colchicine, neuronal electrogenesis

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