

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ПЕРИАКСОНАЛЬНОГО ПРОСТРАНСТВА ПЕРЕХВАТА РАНВЬЕ

© Л.Л.Каталымов

Изучена роль периаксонального пространства в поддержании и восстановлении калиевого гомеостаза миелинизированных нервных волокон.

Известно, что клетки нормально функционируют только в условиях постоянства (гомеостаза) внутренней среды организма (крови, лимфы и непосредственно омывающей их интерстициальной жидкости). Через обеспечение гомеостаза реализуется стратегия выживания организма, и все его системы в большей или меньшей мере служат поддержанию постоянства внутренней среды. На это расходуется основная доля пластических и энергетических ресурсов, поскольку отклонения от нормы любой из многочисленных констант гомеостаза становятся причинами функционально-морфологических нарушений клеток и деятельности всего организма. Нормальное функционирование организма происходит в условиях динамического постоянства внутренней среды, а восстановление нарушенных функций возможно лишь через восстановление измененных параметров гомеостаза. В каждой ткани и в клетке существуют свои особенности и системные механизмы его обеспечения.

Настоящая работа посвящена изучению роли периаксонального пространства перехвата Ранвье, заключенного между возбудимой мембраной нервного волокна и окружающими ее шванновскими клетками, в поддержании и восстановлении калиевого гомеостаза миелинизированных нервных волокон в покое и после их возбуждения. Данная работа является развитием наших предыдущих исследований, посвященных изучению природы следовых потенциалов и связанных с ними следовых изменений возбудимости миелиновых нервных волокон [1, 2, 3] и прижизненной динамики неспецифической реактивной перестройки морфологических структур перехвата Ранвье [4-7].

Опыты проводили на изолированных из седалищного нерва озерной лягушки одиночных нервных волокнах с "открытым" и "закрытым" перехватами Ранвье по модифицированной нами [1, 2, 8] методике И.Тасаки [9].

Выделенное из седалищного нерва миелиновое волокно диаметром 8-12 мкм, длиной 5-6 мм размещали в специальной камере с одним (рис.1, А) или двумя (рис.3, А) воздушными "мостиками-изоляторами". В первом случае волокно вы-

деляли из нерва лишь в интернодальном участке, а исследуемый перехват Ранвье оставляли невыделенным в нервном стволе – "закрытый" перехват. Во втором случае одиночное нервное волокно препарировали так, чтобы ничем не прикрытый исследуемый перехват Ранвье находился в середине изолированного нервного волокна – "открытый" перехват. Участок изолированного нервного волокна с одиночным перехватом Ранвье помещали в среднее отделение экспериментальной камеры, представляющее собой плексигласовый желобок шириной 0,8 мм. Этот желобок заполняли раствором Рингера или растворами исследуемых веществ. Два других перехвата N_1 и N_3 с прилегающими частями нервного ствола располагали в боковых отделениях на отшлифованных и закругленных предметных стеклах. Активность перехватов N_1 и N_3 подавляли 0,2% раствором новокаина, так чтобы функционирующим оставался только один исследуемый перехват N_2 . Раздражение перехвата (N_2), расположенного в среднем отделении, и отведение от него потенциалов действия производили через неполяризующиеся каломельные электроды. Для одновременной поляризации и раздражения перехвата использовали схему Вериги-Ходорова [10].

Морфологические исследования на выделенных живых миелиновых волокнах проведены с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа МБИ-13 (ЛОМО). Перехваты Ранвье, имеющие едва заметную нодальную щель и генерирующие во время возбуждения максимальные ионные токи, были названы "закрытыми", а перехваты, с "исчезающими" (теряющими контрастность) миелиновыми конусами и генерирующими слабые ионные токи – "открытыми" [4]. Материалом для электронной микроскопии служили седалищные нервы лягушки, которые фиксировались и обрабатывались традиционным способом с фиксацией в глутаральдегиде и при контрастировании цитратом свинца и уранилацетатом (подробнее см. [7]).

На представленной осциллограмме (рис.1), амплитуда одиночного потенциала действия (ПД) "закрытого" перехвата Ранвье (рис.1, Б, а)

составила 75 мВ, продолжительность - 1,3 мс, а идущая после ПД следовая деполяризация (СД) имела амплитуду 2,7 мВ, продолжительность около 100 мс. Как оказалось, СД "закрытого" перехвата Ранвье состоит из двух компонентов: короткого (СД₁) с постоянной времени 1,2 мс и продолжительного (СД₂) с постоянной времени 48 мс. В процессе 1-секундной тетанизации (рис.1, В) "закрытого" перехвата Ранвье одиночного нервного волокна СД суммируется – образуется характерное деполяризационное плато в виде некоторого смещения записи выше нулевой линии, особенно заметное при высоких частотах (100, 300 имп./с.) стимуляции. Эти характеристики СД "закрытого" перехвата Ранвье изолированного нервного волокна по своим параметрам совпадают с таковыми СД и связанной с ней экзальтационной фазы, ранее описанные в опытах на целом нерве [1, 11].

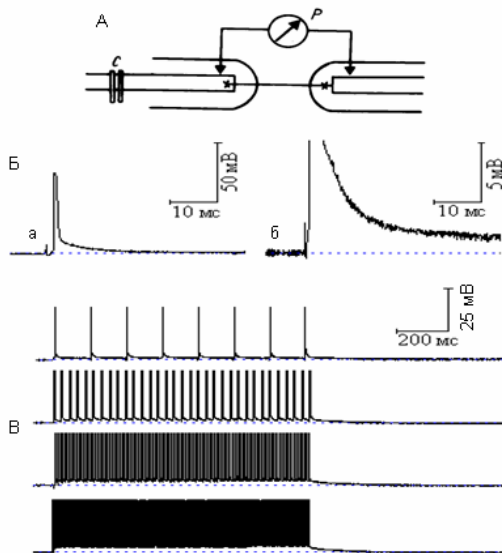


Рис.1. Запись потенциала действия и следовой деполяризации "закрытого перехвата" изолированного нервного волокна озерной лягушки. А – схема расположения волокна с "закрытым" перехватом в экспериментальной камере. С – стимулирующие электроды, Р – регистрирующая цепь. Б - потенциал действия (а) и следовая деполяризация изолированного нервного волокна с "закрытым" перехватом Ранвье после одиночного возбуждения (б) и суммация ее в процессе ритмического раздражения частотой 10, 30, 100, 300 имп./с (В)

У интактных волокон с "закрытым" перехватом Ранвье после продолжительной (несколько секунд) тетанизации развивается еще и длительная посттетаническая гиперполяризация (ПТГ). Как показали наши исследования, у интактных нервных волокон она состоит из трех компонентов: ПТГ₁, ПТГ₂, ПТГ₃ [12]. На рис.2 представлена осциллограмма опыта, в котором после 4-секундной стимуляции одиночного волокна с

"закрытым" перехватом, омываемого раствором Рингера с 1,34 ммоль К⁺ с частотой 150 имп./с, видна кратковременная фаза ПТГ₁ – показана стрелкой. Уменьшение (с 2,5 до 1,34 ммоль) содержания ионов К⁺ в омывающем растворе усиливает выходящий калиевый ток, что способствует выявлению фазы ПТГ₁ [2]. Добавление в омывающий раствор блокатора калиевых каналов мембраны нервного волокна тетраэтиламмония (ТЭА) вызывает полное устранение ПТГ₁, что указывает на связь ее возникновения с повышенной калиевой проницаемостью мембраны в конце ПД [1, 12]. Относительно небольшая продолжительность тетанизации позволила наблюдать достаточно четко две первые фазы ПТГ: ПТГ₁ и ПТГ₂ с постоянными времени 4 и 280 мс соответственно.

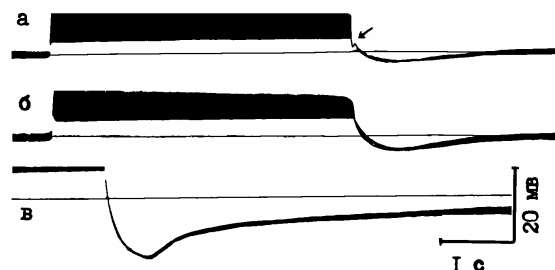


Рис.2. ПТГ одиночного нервного волокна с "закрытым" перехватом в растворе с 1,34 ммоль (а) и 2,5 ммоль (б, в) калия. Частота раздражения на а и б – 150 имп/с, на в – 300 имп/с, продолжительность – 30 с (начало записи не показано)

Увеличение содержания калия в наружном растворе с 1,34 ммоль до 2,5 ммоль привело к устранению фазы ПТГ₁ и некоторому увеличению ПТГ₂. При более продолжительной (15 с) и частой (имп./с) амплитуда ПТГ₂ значительно увеличилась и появилась наиболее вариабельная по продолжительности фаза ПТГ₃. Возникновение фаз ПТГ₂ и ПТГ₃ у интактных волокон связано с активацией Na-K насоса мембраны [4], восстанавливающего ионный гомеостаз в цитоплазме нервного волокна и омывающего его интерстициальной (межволоконной) жидкости. Стехиометрия переноса ионов происходит в соотношении 3 Na⁺ : 2 K⁺, поэтому насос является электрогенным: за каждый цикл он вносит в цитоплазму 2 положительных иона и выводит из нее наружу 3 положительных иона. Именно в результате этого на наружной стороне мембраны интактного нервного волокна развивается продолжительная гиперполяризация - ПТГ₂ и ПТГ₃.

Совсем другая картина обнаружилась у изолированных нервных волокон с "открытым" перехватом Ранвье (рис.3), отпрепарированных по классической методике И.Тасаки [8]. Потенциал

действия "открытого" перехвата Ранвье изолированного нервного волокна, омываемого раствором Рингера с нормальным содержанием калия ($2,5 \text{ ммоль}$), сопровождается небольшой по длительности СД (рис.3, Б, а, б). При величине ПД изолированного волокна $75-90 \text{ мВ}$ амплитуда СД, измеренная от максимума до нулевого уровня, в наших опытах колебалась от 1 до 7 мВ ($3,4 \pm 0,28 \text{ мВ}$). Снижение СД происходило экспоненциально в течение $2-2,5 \text{ мс}$ с постоянной времени $1,4 \pm 0,1 \text{ мс}$. СД "открытого" перехвата оказалась однокомпонентной. Из двух компонентов СД интактного ("закрытого") перехвата Ранвье сохранился лишь компонент СД₁, который по своей продолжительности даже короче рефрактерного периода ($5-7 \text{ мс}$), тогда как у интактного перехвата СД, состоящая из двух компонентов (СД₁ и СД₂), на $1-2$ порядка продолжительнее рефрактерного периода. В связи с отсутствием у "открытого" перехвата Ранвье продолжительной СД₂ у него нет и экзальтационной фазы, которая в яркой форме выражена как у "закрытого" перехвата [1], так и у целого нерва [1, 8, 11].

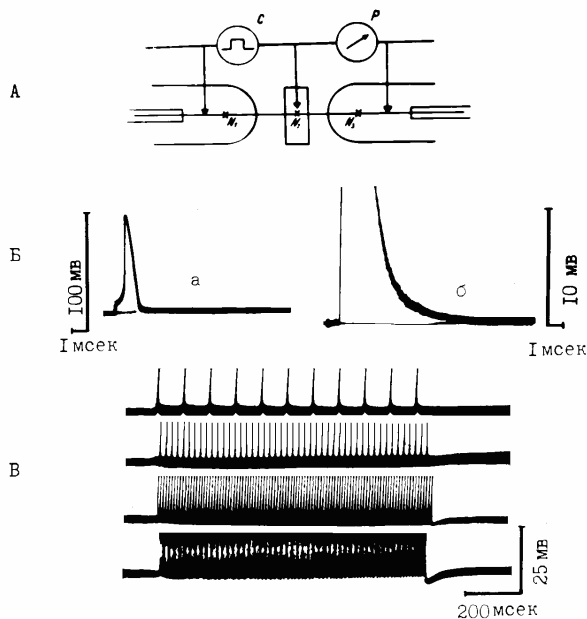


Рис.3. Следовые потенциалы одиночного перехвата Ранвье изолированного нервного волокна. А – схема экспериментальной установки. Б – потенциал действия изолированного нервного волокна при малом – а и при большом – б усилении. В – ответ изолированного нервного волокна на ритмическое раздражение частотой $10, 50, 100, 300 \text{ имп/с}$

Посттетаническая гиперполяризация (ПТГ) у изолированного нервного волокна с "открытым" перехватом Ранвье оказалась тоже на $2-3$ порядка короче, чем у нервного волокна с "закрытым" перехватом. Собственно говоря, у "открытого" перехвата Ранвье выявлялась лишь одна первая

фаза ПТГ₁ (рис.3, В), обуславливаемая повышением калиевой проницаемости мембраны. Ее постоянная времени нарастания составила $4 \pm 0,02 \text{ мс}$, а затухания – $34 \pm 1 \text{ мс}$. Измеряемые же секундами продолжительные фазы ПТГ₂ и ПТГ₃ у "открытого" перехвата Ранвье отсутствуют. Поскольку генерация ПТГ₁ и ПТГ₂ связана с активацией деятельности электрогенного Na-K-насоса мембраны, резонно сделать заключение о том, что у изолированного нервного волокна с "открытым" перехватом Ранвье стимуляция активного транспорта ионов во время и после ритмического возбуждения в силу каких-то причин не происходит.

Следует отметить еще одну важную особенность, проливающую свет на природу отличий "закрытого" от "открытого" перехватов. У "закрытого" и у "открытого" перехватов Ранвье одиночных нервных волокон, омываемых бескальциевым раствором Рингера, в конце потенциала действия возникает хорошо выраженная следовая гиперполяризация (СГ) амплитудой $2,9 \pm 0, \text{ мВ}$. Однако при ритмической стимуляции направление изменения амплитуды СГ было противоположным: у "открытого перехвата", как и в нормальном растворе Рингера, она суммировалась и увеличивалась по амплитуде (рис.3, В), тогда как у "закрытого" перехвата Ранвье, как показано на рис.4, она последовательно снижалась. Подобное явление ранее было описано Франкенхайзером и Ходжкиным [10] на гигантском аксоне кальмара и объяснено снижением калиевого градиента между наружным раствором и цитоплазмой нервного волокна вследствие аккумуляции выходящих во время возбуждения ионов калия в примембранном (периаксональном) пространстве перехвата, отделенном от омывающего раствора каким-то диффузионным барьером.

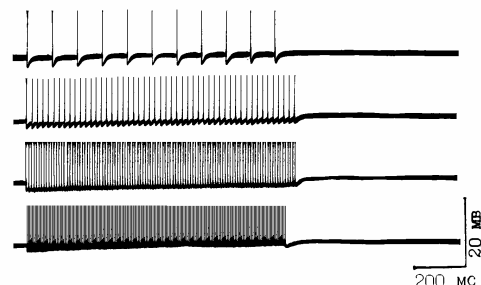


Рис.4. Снижение амплитуды СГ "прикрытого" перехвата в процессе его ритмической стимуляции. Частота ритмической стимуляции последовательно сверху вниз $10, 50, 70, 100 \text{ имп/с}$. Перехват находится в бескальциевом растворе Рингера

Учитывая, что возникновение СГ миелиновых волокон с "закрытым" перехватом Ранвье

связано с повышением калиевой проницаемости мембраны в конце спайка [10, 12, 13, 15], то уменьшение СГ в процессе ритмической стимуляции волокна должно быть следствием снижения калиевого градиента по ту и другую стороны от мембраны, вследствие аккумуляции выходящих во время возбуждения ионов калия с наружной стороны мембраны. Экспериментальные и модельные исследования [6], проведенные на одиночных нервных волокнах лягушки с "закрытым" перехватом, подтвердили существование подобного ионного барьера в области перехвата Ранвье у используемого нами экспериментально животного – озерной лягушки. А противоположная ситуация, наблюдаемая на одиночном волокне с "открытым" перехватом, указывает на отсутствие диффузионного барьера вокруг возбудимой мембраны "открытого" перехвата Ранвье. По всей вероятности, барьер повреждается во время процедуры препаровки нервного волокна и выходящие во время возбуждения ионы калия более не скапливаются в периаксональном пространстве, а свободно диффундируют в омывающий раствор. Имеются данные о том, что во время препарирования нервного волокна возникают и другие изменения перехвата Ранвье. В работе С.В.Ревенко, О.С.Сотникова, Б.И.Ходорова [4] в ходе прижизненного светооптического исследования авторы обнаружили нарушения паранодальной зоны – миелиновых конусов и луковиц перехвата Ранвье. Сопоставление морфологических нарушений нодальной и паранодальной зон с электрофизиологическими характеристиками перехвата выявило определенный параллелизм между степенью морфологических изменений паранодального миелина и падениями значений натриевой и калиевой проводимостей мембраны. При этом, как ни странно, проводимость каналов утечки оставалась на неизменном уровне.

Отсутствие у "открытого" перехвата длительных фаз ПТГ (ПТГ₂ и ПТГ₃), возникновение которых обуславливается усилением деятельности электрогенного Na-K насоса мембраны, подтверждает данные о том, что для активации деятельности насоса необходимо, наряду с увеличением внутриклеточной концентрации ионов натрия, повышение концентрации ионов калия с наружной стороны мембраны.

Становится очевидным, что диффузионный барьер, окружающий аксональную мембрану перехвата, выполняет не только барьерную функцию, обуславливая возникновение СД и экзальтационной фазы, но и гомеостатическую, удерживая вышедшие из волокна во время возбуждения ионы калия в периаксональном простран-

стве. Это создает условия для эффективной [14] реабсорбции Na-K насосом ионов калия в цитоплазму нервного волокна и восстановления исходного натрий-калиевого гомеостаза цитоплазмы и интерстициальной жидкости нерва. Возникающая при этом ПТГ становится дополнительным фактором, обеспечивающим возвращение вышедших во время возбуждения ионов калия в цитоплазму и устранение медленной инактивации натриевых каналов мембраны нервных волокон.

Визуально в процессе препарирования нервного волокна, даже под бинокулярным микроскопом, было видно, что щель перехвата Ранвье все более и более расширяется – иногда в несколько раз. Расширение перехвата выглядело в виде полупрозрачного промежутка между луковицами соседних миелиновых сегментов.

Функциональное состояние приготовленного препарата обратно пропорционально степени "увеличения" нодальной щели перехвата. Если это расширение области перехвата Ранвье было значительным, такой препарат оказывался поврежденным, неспособным генерировать полноценные потенциалы действия.

Визуально казалось, что растяжению подвергалась нодальная часть нервного волокна. Так думают и многие другие исследователи [15, 16, 17]. Однако наблюдение за кинетикой в фазовом контрасте [6, 7] позволило заключить, что на самом деле истинного расширения области щели перехвата Ранвье не происходит. Оказалось, что расширение нодальной части неосторожно отпрепарированного нервного волокна - оптический эффект, возникающий вследствие расслоения миелинового конуса перехвата, когда расслоившиеся комплексы миелиновых ламелл перестают быть видимыми в световой микроскоп [6]. Отступает от нодальной щели не сама миелиновая оболочка, а граница расслоения видимого компактного миелина. На самом деле отчетливо увеличивается в диаметре лишь винтообразный глиальный канал расслаивающий ламеллы паранодиума, что приводит к снижению электрического сопротивления миелина области перехвата Ранвье [7]. Далее выяснилось еще одно важное обстоятельство: денатурация белков возбудимой мембраны нервного волокна мочевиной приводит к подобным же изменениям. На основании этого было сделано заключение о том, что при альтерации нервного волокна первичными **являются**, видимо, изменения возбудимой мембраны нервного волокна и что наступающий протеолиз мембранных белков, возможно, выступает в качестве триггера перестройки глиальных компонентов перехвата Ранвье.

Расслоение миелина в области перехвата Ранвье приводит к увеличению проницаемости миелинового конуса, образующего диффузионный барьер между наружным раствором (интерстициальной жидкостью) и периаксональным (примембранным) пространством волокна. В результате этого калий, выходящий во время потенциала действия, не аккумулируется, как обычно, вблизи возбудимой мембраны, а диффундирует в омывающий раствор. По этой причине у одиночного "открытого" перехвата Ранвье изолированного нервного волокна отсутствуют продолжительная следовая деполяризация [1, 5] и связанная с ней экзальтационная фаза. У данного перехвата отсутствуют и продолжительные компоненты ПТГ (ПТГ₂ и ПТГ₃), возникающие вследствие активации электрогенного Na-K насоса повышенным содержанием калия в наружном растворе и натрия в цитоплазме. Увеличенная концентрация натрия в цитоплазме без повышения концентрации калия в наружном растворе не вызывает активации Na-K насоса, как и не приводит к возникновению продолжительных компонентов ПТГ. Из сказанного становится очевидным, что периаксональное пространство перехвата, заключенное между возбудимой мембраной и окружающими его отростками шванновской клетки, выполняет гомеостатическую роль в отношении нервного волокна, обуславливая стимуляцию деятельности электрогенного Na-K насоса. Диффузия выходящего во время возбуждения калия за пределы периаксонального пространства делает невозможным повышение его концентрации вблизи наружной стороны мембраны до величины, необходимой для активации деятельности Na-K насоса, и, как следствие этого, ведет к нарушению натрий-калиевого гомеостаза нервного волокна – потере цитоплазмой ионов калия и насыщению ее ионами натрия.

1. Каталымов Л.Л. К вопросу о происхождении следовой деполяризации нервных волокон // Физиологический журнал СССР, 1975. 61. 2. С.294-298.
2. Каталымов Л.Л., Глухова Н.В. Некоторые характеристики примембранного пространства миелинизированных нервных волокон // Доклады АН РФ. 2003. 388(3). С.420-422.
3. Valkina O. N, Vergun O. V, Turovetsky V. B, Khodorov B. I. Changes of cytoplasmic pH in frog nerve fibers during K(+)-induced membrane depolarization. 1995. FEBS Lett. Mar 20. 361 (2-3):145-8.
4. Ревенко С.В., Сотников О.С., Ходоров Б.И. Сравнительный анализ морфологических и физиологических характеристик перехвата Ранвье // Нейрофизиология 1978. Т.10. №4. С.400-407.
5. Сотников О.С., Каталымов Л.Л., Лактионова А.А. Механизм структурных изменений перехвата Ранвье под воздействием протеолитических ферментов // Всерос. Конф., посвященная 80-летию академика А.М.Уголева. СПб., 2006. С.89-90.
6. Сотников О.С. Функциональная морфология живого мякотного нервного волокна. 1976.
7. Сотников О.С. Динамика живого нейрона. Л., 1985.
8. Каталымов Л.Л. Возбудимость нервного ствола и одиночного перехвата Ранвье нервных волокон лягушки // Известия АН СССР. Серия Биология. 1978. 2. С.245-258.
9. Тасаки И. Проведение нервного импульса. М., 1957.
10. Ходоров Б.И. Электротон и аккомодация // Успехи соврем. биологии. 1950. 29, 3, 329-359.
11. Lorento de No R. A study of nerve physiology. Studies from the Rockefeller Institute for medical Research, New York. 131-132. 1947.
12. Каталымов Л.Л. Природа ПТГ миелинизированных нервных волокон // Доклады АН СССР. 1978. 241. 5. С.1236-1239.
13. Каталымов Л.Л. Подтверждение гипотезы о существовании диффузионного барьера в области перехвата Ранвье миелинизированных нервных волокон // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1978. 11. С.517-519.
14. **Raimondo D'Ambrosio, David S. Gordon, and H. Richard Winn** Differential Role of KIR Channel and Na⁺/K⁺-Pump in the Regulation of Extracellular K⁺ in Rat Hippocampus J Neurophysiol 87: 87-102, 2002.
15. Chiu S.Y., Ritchie J.M. Potassium channels in nodal and internodal axonal membrane of mammalian myelinated fibres. Nature, 1980. V.284. P.170-171.
16. Chiu S.Y., Ritchie J.M. Evidence for the presence of potassium channels in the internode of frog myelinated nerve fibres. J. Physiol. (Gr. Brit.), 1982, V.322. P.49\85-501.
17. Schwarz J.R., Glassmeier G., Cooper E.C., Kao T.C., Nodera H., Tabuena D., Kaji R. KCNQ channels mediate IKs, a slow K⁺ current regulating excitability in the rat node of Ranvier. J. Physiol. 2006.573.17-3.
18. Frankenhaeuser B., Hodgkin A.L. The after effects of impulses in the giant nerve fibres of Loligo. J. Physiol.(Lond.). 131: 341-376. 1956.
19. Каталымов Л.Л. Ионы натрия не участвуют в генерации следовой деполяризации миелинизированных нервных волокон // Доклады АН, 1995. №6. Т.341. С.839-841.
20. Livinstone R. B., Pfenniger K., Akert K. Specialized paranodal and interparanodal glial-axonal junctions in the peripheral and central nervous system: a freeze-etching study. – Brain Res.. 1973. 58, №1, 1-24.
21. Meves H. Die Nachpotentiale isolierter markhaltiger Nervenfasern des Frosches bei Einzelreizung. Pflug. Arch. ges. Physiol. 272: 336-359. 1960.

**FUNCTIONAL ROLE OF PERIAXONAL SPATIUM
IN NODES OF RANVIER**

L.L.Katalimov

The role of periaxonal spatium in potassium homeostasis recovery and sustenance is studied. Myelinated nerve fibers are examined.