

На правах рукописи

Бибинейшвили Елена Зурабовна

**ИЗМЕНЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ЛИПИДОВ МЕМБРАН  
МИЕЛИНОВОГО НЕРВНОГО ВОЛОКНА ПРИ  
ПРОВЕДЕНИИ ВОЗБУЖДЕНИЯ**

Специальность 03.01.02. – “биофизика”

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2015

Работа выполнена на кафедре биофизики Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

**Научный руководитель:**

**Максимов Георгий Владимирович,**

доктор биологических наук,

заведующий лабораторией биофизики клетки в МГУ имени М.В. Ломоносова,

профессор кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

**Официальные оппоненты:**

Сурин Александр Михайлович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, г. Москва.

Шрам Станислав Иванович, кандидат химических наук, старший научный сотрудник федерального государственного бюджетного учреждения «институт молекулярной генетики» Российской академии наук, г. Москва.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт НИИ оптико – физических измерений», г. Москва.

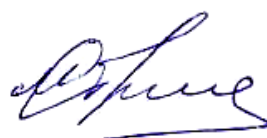
Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 года в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.96 Биологического факультета Московского Государственного университета им. М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12, Биологический факультет МГУ, аудитория \_\_\_.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Московского Государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,

доктор биологических наук



М.Г. Страховская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Исследование молекулярных механизмов генерации и проведения потенциалов действия (ПД) в нервной клетке является актуальной задачей современной биофизики и молекулярной нейрофизиологии. В настоящее время детально исследовано строение миелинового нервного волокна (МНВ), ионные механизмы генерации ПД, однако роль миелина и липидов в данном процессе изучена явно недостаточно. Изменения структуры мембран миелина при проведении серии ПД (СПД) важны не только для поддержания высокого электрического сопротивления миелина, но и регуляции работы ионных каналов, локализованных под миелином [Scherer, Arroyo 2002]. Кроме того, миелин является межклеточным «буфером» для  $K^+$  и  $Ca^{2+}$ , важных клеточных регуляторов и участников проведения СПД.

Известно, что при проведении СПД увеличивается упорядоченность жирнокислотных хвостов липидов мембран (УЖК) [Кольс, Раденович, Максимов 1993], что приводит к изменению функциональной активности мембранных белков (ферментов, рецепторов и переносчиков), селективности и проводимости ионных каналов. Показана взаимосвязь между УЖК, уровнем связанных с мембраной ионов ( $Ca^{2+}$ ), липидным составом мембран и конформационными изменениями мембранных белков [Родионова, 2010]. Показано, что при СПД изменяется уровень мембран-связанного  $Ca^{2+}$ , липидный состав мембран, активность белков-ферментов, вязкость цитоплазмы МНВ [Chen, Nothi, Xu, Huang 2007]. Изменения, возникающие во время проведения СПД, должны иметь характерные различия в зависимости от области МНВ (перехват Ранвье (ПР) и интернодальная область (ИО) (рис. 1)). Однако, до сих пор, эти различия не были выявлены, что можно сделать с помощью современных методов (КР-микроскопии и др).

Известно, что существенную роль в сохранении стабильной структуры миелина играет холестерин, который также формирует рафты в мембранах и участвует в поддержании контактов между мембранными слоями миелина [Steck 1999; Simons 1998; Clementi 2004; Padfield 2007]. Дефицит холестерина может привести к изменению УЖК мембраны, возбудимости и метаболизма нервной клетки. Уровень холестерина в мембране нервного волокна может изменяться благодаря активации ферментов, либо в процессе  $Ca^{2+}$ -зависимого экзоцитоза [Chen, Zhang et al. 2012]. Изменение уровня холестерина в мембранах нервных клеток наблюдается при таких патологиях как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, деменции [Lambert, O'Neill, Padfield 2007, Michikawa 2003, Eckert, Kirsch, Leutz, Wood, Muller 2003].

В данной работе мы исследовали структуру упаковки миелина, изменения морфологии, а также упорядоченность жирных кислот липидов мембран и перераспределение  $Ca^{2+}$  в различных отделах нервного волокна, при проведении возбуждения в норме и при дефиците холестерина.

**Цели и задачи работы.** Цель работы заключалась в исследовании изменений состояния липидов мембран и роли холестерина при проведении возбуждения миелиновым нервным волокном. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать изменения упорядоченности «хвостов» жирных кислот фосфолипидов липидов мембран в перехвате Ранвье и миелине нервного волокна при проведении возбуждения.
2. Исследовать изменения содержания мембран-связанного и свободного внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в перехвате Ранвье и миелине при проведении возбуждения.
3. Исследовать изменение морфологии волокна, упаковки мембранных слоев миелина и структуры цитоплазмы в перехвате Ранвье и миелине при проведении возбуждения.
4. Исследовать изменения упорядоченности «хвостов» жирных кислот липидов мембран в перехвате Ранвье и миелине, при инкубации волокна с холестерин-экстрагирующим агентом метил- $\beta$ -циклодекстрином.
5. Исследовать изменения уровня ионов мембран-связанного и свободного внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в перехвате Ранвье и миелине, при инкубации волокна с метил- $\beta$ -циклодекстрином.
6. Исследовать изменения морфологии, упаковки мембранных слоев миелина и структуры цитоплазмы в перехвате Ранвье и миелине, при инкубации волокна с метил- $\beta$ -циклодекстрином.
7. Исследовать изменения амплитуды ПД, упорядоченности «хвостов» жирных кислот липидов мембран и перераспределения  $Ca^{2+}$  в перехвате Ранвье и миелине, нервных волокон инкубированных с метил- $\beta$ -циклодекстрином, при проведении возбуждения.

**Научная новизна.** Установлено, что при проведении серии ПД в нервном волокне происходит изменение упаковки мембранных слоев миелина и структуры цитоплазмы перехвата Ранвье. Впервые обнаружено, что при возбуждении волокна происходит уменьшение УЖК в перехвате и повышение УЖК мембран миелина, также в перехвате увеличивается содержание внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , а в интернодальной области – снижается содержание мембран-связанного  $Ca^{2+}$ . Впервые установлено, что при инкубации волокна с холестерин-экстрагирующим агентом метил- $\beta$ -циклодекстрином УЖК мембран снижается только в миелине волокна. При экстракции холестерина в перехвате Ранвье и интернодальной области волокна выявлено перераспределение  $Ca^{2+}$ : содержание внутриклеточного  $Ca^{2+}$  кратковременно увеличивается вне зависимости от области волокна, а содержание мембран-связанного  $Ca^{2+}$  снижается в интернодальной области. При дефиците холестерина в перехвате Ранвье и интернодальной области волокна выявлены изменения морфологии, а также упаковки мембранных слоев миелина друг относительно друга. Инкубация волокна с метил- $\beta$ -циклодекстрином нивелирует изменения УЖК в перехвате Ранвье и миелине при проведении серии ПД, и изменяет характер динамики внутриклеточного  $Ca^{2+}$  (происходит накопление иона в цитоплазме интернодальной области).

**Научно-практическая значимость.** Полученные результаты имеют важное научно-практическое значение для понимания роли холестерина в генерации и проведении возбуждения миелиновым нервным волокном. В работе впервые представлены доказательства различных изменений упорядоченности жирно-кислотных хвостов липидов мембран в перехвате Ранвье и области миелина, а также перераспределения  $Ca^{2+}$  при проведении серии ПД и понижении уровня холестерина, что важно для изучения роли аксо-глиальных взаимоотношений при функционировании нервной

системы и разработке фармакологических препаратов для терапии болезни Альцгеймера, Паркинсона и других нейропатий.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на конференции молодых ученых Ломоносов (Москва 2009), 5 международной конференции «прогресс и тенденции бионаноскопии» (Москва 2010), 8-ом Европейском биофизическом конгрессе (Будапешт, Венгрия, 2011), Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино 2013).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, включая 4 статьи в рецензируемых научных журналах.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, четырех глав и заключения. Список цитированной литературы содержит 266 наименований. Работа изложена на 172 страницах и содержит 6 таблиц и 60 рисунков.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**В первой главе** представлен обзор литературы, посвященный трем основным вопросам: 1) особенностям строения и функционирования миелинового нервного волокна; 2) роли организации мембраны (поверхностного заряда, упорядоченности жирнокислотных «хвостов» образующих мембрану липидов, рафтов) в функционировании клеток; 3) роли холестерина и холестерин-экстрагирующего агента метил- $\beta$ -циклодекстрина (МБЦ) в функционировании клеток.

В обзоре литературы приведены данные о том, что проведение серии ПД существенно отличается от проведения одиночного ПД и сопровождается не только изменениями проницаемости ионных каналов, но и структурными перестройками мембраны, изменением ее гидратированности и толщины. Кроме того, при возбуждении наблюдаются увеличение объема периаксонального пространства МНВ (рис. 1), накопление ионов  $K^+$  шванновскими клетками, перемещение микрофиламентов аксоплазмы, связанных с внутренней поверхностью мембраны и другие процессы. Механизм подобных изменений МНВ в настоящее время не изучен и, вероятно, обусловлен изменениями состояния липидов и содержания  $Ca^{2+}$  на поверхности мембран (или в примембранных областях), приводящих к изменению УЖК мембран.

Анализ представленных в данной главе результатов свидетельствует о том, что несмотря на успехи в развитии представлений о роли мембранных белков и липидов в процессе проведения СПД, участие холестерина в комплексе изменений УЖК мембран, структуры и морфологии МНВ и перераспределения  $Ca^{2+}$  практически не изучено. Актуальность исследования обусловлена недостаточным пониманием связи между содержанием холестерина мембраны нервной клетки и патологией нервной системы.

**Во второй главе** сформулированы цели и задачи данной работы.

**В третьей главе** перечислены использованные в работе объекты исследования и реактивы, описаны составы сред инкубации, приведены протоколы приготовления препаратов, суть и основные характеристики использованных в работе методов, а также дано подробное описание проведения экспериментов.

### **Объект исследования**

Объектами исследования служили миелиновые нервные волокна лягушки (*Rana temporaria*) и клеточная культура гиппокампальных нейронов.

### **Методы исследования**

#### **Флуоресцентная микроскопия**

Содержание свободного и мембран-связанного  $\text{Ca}^{2+}$  в МНВ исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Люмам И-3 (ЛОМО) и AxioPlan2 (Zeiss). Флуоресценцию зонда вызывали с помощью галогеновой лампы КГМ 12–100. В работе использовали фотометрическую насадку ФМЭЛ-1А и интерференционные светофильтры (максимумом пропускания 520 нм). Сигнал от ФМЭЛ-1А передавался на вольтметр METEX. Регистрация флуоресценции производилась с частотой 0,2 Гц. Запись результатов на компьютер осуществлялась при помощи программ METEX и dmmg (<http://bitbucket.org/alexeybrazhe/dmmg/>). При работе с микроскопом AxioPlan2 (Zeiss) флуоресценцию зонда вызывали с помощью ртутной лампы OSRAM HBO 50/AC, изображение регистрировали с помощью камеры Axio Cam MRc и сохраняли с помощью программы Axio Vision 3.0. В работе использовали флуоресцентные зонды хлортетрациклин (ХТЦ) ( $10^{-4}\text{M}$ ) и fluo-3AM ( $10^{-6}\text{M}$ ), позволяющие оценить изменения уровней мембран-связанного и свободного внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  соответственно. Результаты экспериментов обрабатывали стандартными статистическими методами.

#### **Лазерная интерференционная микроскопия.**

Для исследования морфологии, а также коэффициента преломления миелина и цитоплазмы нервного волокна использовали лазерный интерференционный микроскоп (ЛИМ). Методика позволяет регистрировать изменения оптической разности хода лучей света (ОРХ), которая пропорциональна разнице коэффициентов преломления объекта и среды, а также геометрическому размеру объекта. Геометрические размеры клетки можно получать с помощью ЛИМ независимо от ОРХ и, сопоставляя изменения ОРХ с изменениями геометрических размеров, делать выводы об изменениях коэффициента преломления исследуемой области клетки. В работе использовали ЛИМ – МИА-Д (ВНИИОФИ). Источником излучения служил полупроводниковый лазер с длиной волны 650 нм и мощностью 5 мВ. В эксперименте использовали объектив 30x, апертура – 0,65, кадры (195x145 мкм) получали при помощи черно-белой 12-битной ПЗС видеокамеры VS-415U (NPK Videoscan, Russia), с матрицей – 6.5x4.83. Регистрацию кадров осуществляли в программе TVMicro-2p. Воспроизведение фазового изображения производилось с использованием метода фазового шага. Интерференционные изображения объекта снимались с течением времени в покое, а также при исследуемых воздействиях. Интерференционные изображения обрабатывались в программах FIJI, SPIP и OriginPro 7.5. Полученные

значения исследуемых параметров обрабатывали стандартными статистическими методами.

### **Спектроскопия комбинационного рассеяния**

Изменения упорядоченности жирнокислотных «хвостов» липидов (УЖК) регистрировали с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), используя специфический сигнал как от жирно-кислотных «хвостов» фосфолипидов, так и от молекул каротиноидов, локализованных в мембранах. Известно, что остатки жирных кислот фосфолипидов имеют характерный спектр КР, с тремя выраженными пиками 2845, 2885 и 2940  $\text{см}^{-1}$ . Полоса 2845  $\text{см}^{-1}$  характеризует несимметричные колебания связи С-Н метиленовых групп жирной кислоты, полоса 2885  $\text{см}^{-1}$  – симметричные колебания этой же связи, а полоса 2940  $\text{см}^{-1}$  – симметричные колебания связи С-Н концевых метильных групп. Величина отношения интенсивностей полос 2940  $\text{см}^{-1}$  и 2885  $\text{см}^{-1}$  обратно пропорциональна УЖК в мембране. Для регистрации спектров КР от нервного волокна использовали спектрометр “NTEGRA” (НТ-МДТ), монохроматическое возбуждение с длиной волны 532 нм, а также волоконно-оптический спектрометр с ПЗС детектором и монохроматическое возбуждение с длиной волны 785 нм, мощность 290 мВт, спектральное разрешение не более 4  $\text{см}^{-1}$ . КР-спектры липидов получали из области ПР и ИО МНВ в покое, а также при исследуемых воздействиях. По данным спектрам определяли характер изменения УЖК. Полученные данные обрабатывались стандартными статистическими методами.

### **Электронный парамагнитный резонанс**

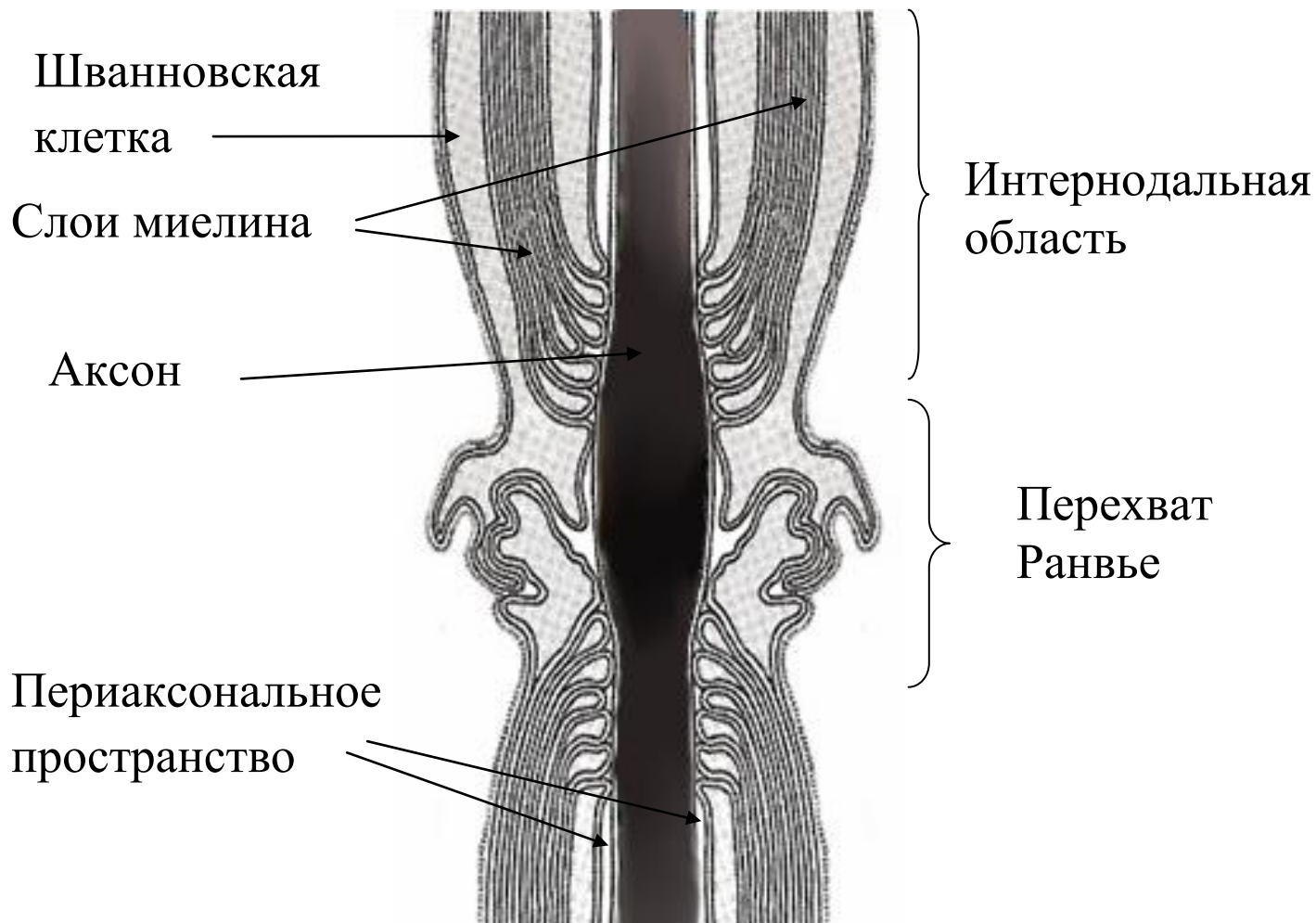
Для определения изменения УЖК мембран миелина использовался метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В работе использовали ЭПР-спектрометр РЭ 1307 (Россия) и зонды: 16-доксилстеарат и 5-доксилстеарат. По формам спектров ЭПР рассчитывали параметры, характеризующие упорядоченность жирнокислотных «хвостов» липидов в мембране. В работе определялись соответствующие значения параметров для МНВ в покое и при исследуемых воздействиях. Полученные значения исследуемых параметров обрабатывали стандартными статистическими методами.

### **Экстраклеточная регистрация ПД.**

Потенциалы действия миелинового нервного волокна регистрировали при помощи биполярного внеклеточного отведения. Стимуляцию волокна осуществляли прямоугольными импульсами переменного электрического тока с помощью электростимулятора ЭСЛ-1 (частота 50 Гц, длительность импульса – 0.3мс, амплитуда 1.0 – 1,2В). Сигнал оцифровывался с частотой 10 кГц при помощи программного обеспечения Lgraph и записывался на жесткий диск компьютера. Определение амплитуды ПД осуществляли для МНВ в норме и при исследуемых воздействиях, получали средние значения относительных изменений и стандартное отклонение этих значений.

**Четвертая глава** содержит результаты и обсуждение исследования.

В ходе проведенного исследования нами были выявлены изменения морфологии нервного волокна, УЖК мембран перехвата Ранвье и миелина (рис 1.), структуры миелина и аксоплазмы, перераспределение  $Ca^{2+}$  при проведении серии ПД, а также при инкубации МНВ с холестерин-экстрагирующим агентом МБЦ. Установлено, что специфические изменения УЖК мембран и перераспределения  $Ca^{2+}$  при проведении серии ПД зависят от отдела МНВ и уровня холестерина в мембранах МНВ.



*Рис. 1. Схема миелинового нервного волокна.*



## **Исследование состояния липидов мембран при проведении возбуждения миелиновым нервным волокном**

Установлено, что при проведении серии ПД упорядоченность жирнокислотных «хвостов» липидов меняется различно, в зависимости от области МНВ: в области миелина обнаружено увеличение УЖК, а в области перехвата Ранвье – уменьшение УЖК аксолеммы (рис. 2, а, б, кривая 2). Различные изменения УЖК липидов мембраны при возбуждении МНВ могут зависеть как от липидного состава, так и от поверхностного заряда на аксолемме и мембранах миелина (например, от изменения содержания мембран-связанного  $\text{Ca}^{2+}$ ), определяющего характер белок-липидных взаимодействий. В связи с этим, мы исследовали изменения содержания внутриклеточного и мембран-связанного  $\text{Ca}^{2+}$  в различных отделах МНВ при проведении СПД. Установлено, что при возбуждении в перехвате Ранвье наблюдается увеличение концентрации свободного внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , а в миелине наблюдается снижение уровня мембран-связанного  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 3). При возбуждении, блокатор потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов верапамил ( $10^{-4}\text{M}$ ) препятствовал увеличению содержания внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме перехвата Ранвье, что свидетельствует об участии потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов в данном процессе. Установлено, что при возбуждении аксона мембран-связанный  $\text{Ca}^{2+}$  миелина десорбируется наружу шванновской клетки, поскольку в интернодальной области не наблюдается увеличения свободного  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 3). Вероятно, при СПД ион поступает в периаксональное пространство, снижая возбудимость МНВ. Повышение внутриклеточной концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме перехвата может стимулировать деполимеризацию микротрубочек, изменить объем транспортируемых в аксоне веществ, проницаемость щелевых контактов, рН цитоплазмы, работу белков, и, соответственно, ОРХ. В связи с этим, в следующей серии экспериментов с помощью ЛИМ исследовали изменения морфологии и ОРХ в области перехвата Ранвье и интернодальной области волокна при проведении серии ПД. Установлено, что при проведении серии ПД в перехвате Ранвье ОРХ уменьшается (при неизменной длине перехвата Ранвье). В интернодальной области диаметр волокна и аксона под миелином не изменяются, ОРХ миелина снижается (рис. 4). Итак, при проведении серии ПД ОРХ в перехвате и миелине уменьшается, хотя изменений морфологии (длина ПР, диаметр волокна и аксона ИО) мы не обнаружили (рис. 4). Наблюдаемые изменения ОРХ свидетельствуют об уменьшении величины показателя преломления миелина и аксолеммы в перехвате Ранвье, что, свидетельствует об разупорядоченности структуры миелина и цитоскелета аксоплазмы. Известно, что при СПД происходит изменение состояния цитоскелета в области перехвата Ранвье, вызываемое входом  $\text{Ca}^{2+}$ , а снижение ОРХ миелина обусловлено, вероятно, десорбцией мембран-связанного  $\text{Ca}^{2+}$  и расслоением мембран миелина.

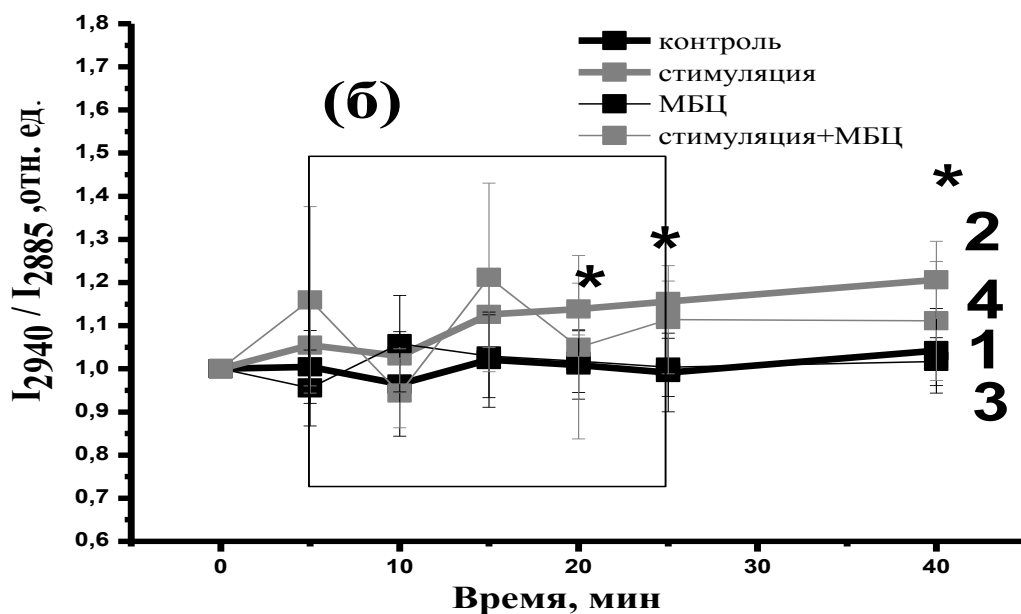
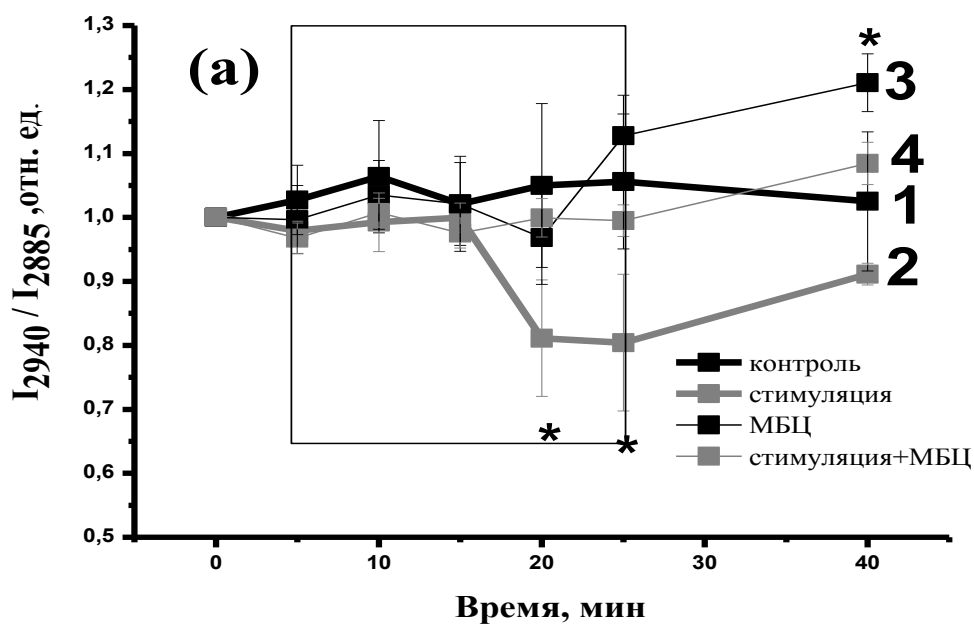


Рис. 2. Изменения упорядоченности жирнокислотных хвостов липидов мембран миелина (а) и перехвата Ранвье (б) 1 – контроль, 2 – возбуждение нервного волокна (частота 50 Гц, длительность импульса – 0.3мс, амплитуда 1 – 1,2В), 3 – экстракция холестерина метил- $\beta$ -циклодекстрином (МБЦ,  $10^{-2}M$ ), 4 – возбуждение волокон инкубированных с МБЦ,  $10^{-2}M$ . По оси ординат отношение пиков 2940 и 2885  $cm^{-1}$  спектра комбинационного рассеяния, отн. ед., по оси абсцисс время, мин. (среднее значение  $\pm$ ошибка среднего). Прямоугольником отмечено время стимуляции. \* – достоверное различие ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, достоверность различий оценивали с помощью  $t$ -критерия.

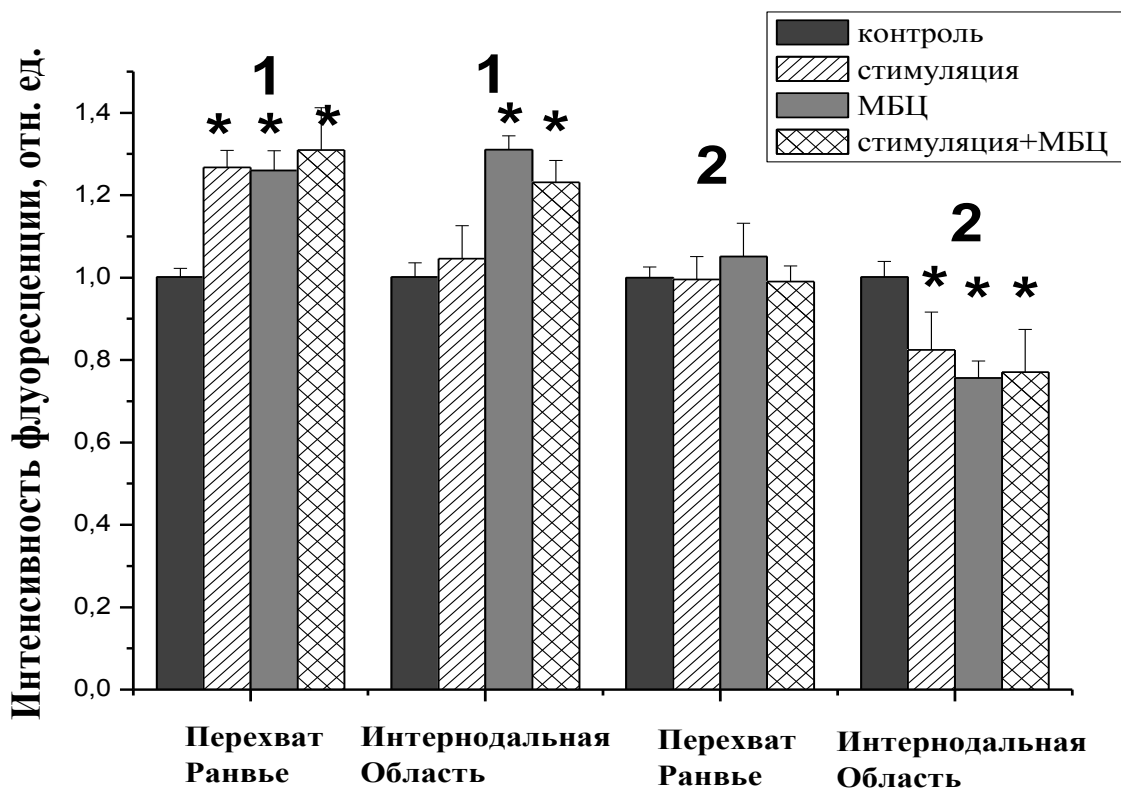


Рис. 3. Перераспределение  $Ca^{2+}$  при 20 мин электрической стимуляции (частота 50 Гц, длительность импульса – 0.3мс, амплитуда 1 – 1,2В) миелинового нервного волокна, обработке метил- $\beta$ -циклодекстрином (МБЦ,  $10^{-2}M$ ) и электрической стимуляции (частота 50 Гц, длительность импульса – 0.3мс, амплитуда 1 – 1,2В) волокон инкубированных с МБЦ. \* – достоверное различие ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, достоверность различий оценивали с помощью  $t$ -критерия. 1 – свободный внутриклеточный  $Ca^{2+}$ , 2 – мембран-связанный  $Ca^{2+}$ .

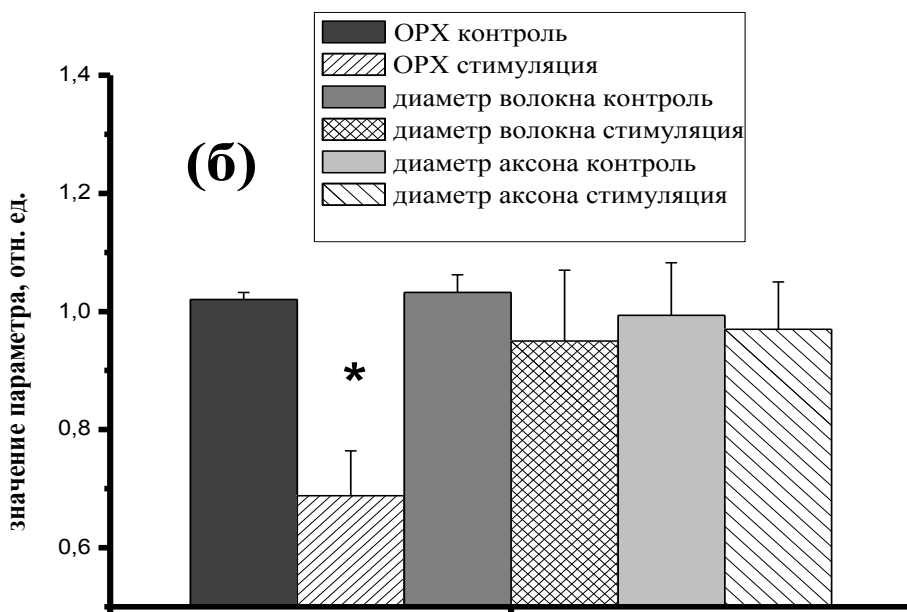
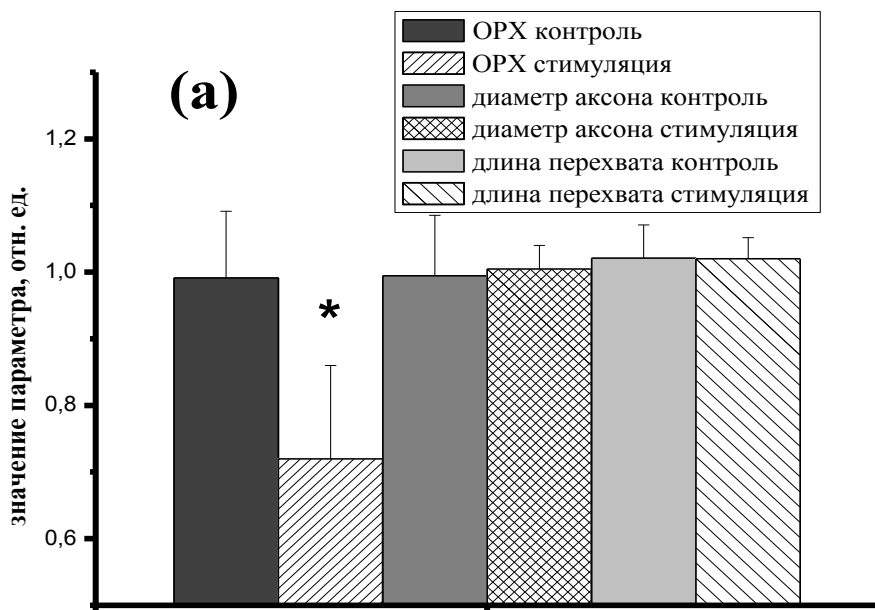


Рис. 4. Относительные изменения оптической разности хода лучей (ОРХ), диаметра и длины перехвата Ранвье (а), миелина (б) при 20 мин стимуляции (частота 50 Гц, длительность импульса – 0.3мс, амплитуда 1 – 1,2В), отн. ед. \* – достоверное различие ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, достоверность различий оценивали с помощью  $t$ -критерия.

## **Исследование состояния липидов мембран миелинового нервного волокна при дефиците холестерина**

В следующей серии экспериментов было установлено, что при инкубации нервного волокна с холестерин-экстрагирующим агентом МБЦ происходит уменьшение УЖК мембран миелина, но не перехвата Ранвье (рис. 2, кривая 3). Вероятно, экстракция холестерина осуществляется исключительно в миелине, при этом происходит разрушение рафтов, в которых липиды находятся в более упорядоченном состоянии, чем в окружающей мембране. При инкубации миелинового нервного волокна с МБЦ в перехвате Ранвье и интернодальной области происходят изменения уровней свободного-внутриклеточного и мембран-связанного  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 3). Изменения свободного внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  носят кратковременный характер. Наблюдается продолжительное уменьшение уровня мембран-связанного  $\text{Ca}^{2+}$  в интернодальной области (рис. 3). Возможно часть  $\text{Ca}^{2+}$ , который был связан с миелином, попадает внутрь клетки, с последующим связыванием клеточными  $\text{Ca}^{2+}$ -буферами. Изменение уровня холестерина может нарушать нормальное липидное окружение  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов и таким образом менять их конформацию и проницаемость. С помощью ЛИМ было показано, что после инкубации миелинового нервного волокна с МБЦ наблюдаются изменения морфологии и структуры: в перехвате – увеличивается длина, уменьшается диаметр и ОРХ аксона (рис. 5).

## **Исследование состояния липидов миелинового волокна с пониженным уровнем холестерина при проведении возбуждения**

В следующей серии экспериментов изучали изменения УЖК мембран перехвата Ранвье и миелина волокон, предварительно обработанных МБЦ при проведении серии ПД. Установлено, что возбуждение МНВ при инкубации с МБЦ нивелирует изменения УЖК как в перехвате, так и в миелине (рис 2, кривая 4). Таким образом, проведение серии ПД волокном с пониженным уровнем холестерина в миелине не приводит к изменениям УЖК в миелине и перехвате, наблюдаемым в норме. Уровень холестерина в миелине регулирует УЖК мембран нервного волокна при проведении возбуждения.

Установлено, что при проведении серии ПД нервными волокнами с пониженным уровнем холестерина, в интернодальной области волокна наблюдается длительное повышение содержания свободного внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , которого при действии каждого из факторов по отдельности не происходит. (МБЦ вызывает кратковременное резкое повышение концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в ПР и ИО, а СПД увеличение только в ПР) (рис. 3). Таким образом, при дефиците холестерина

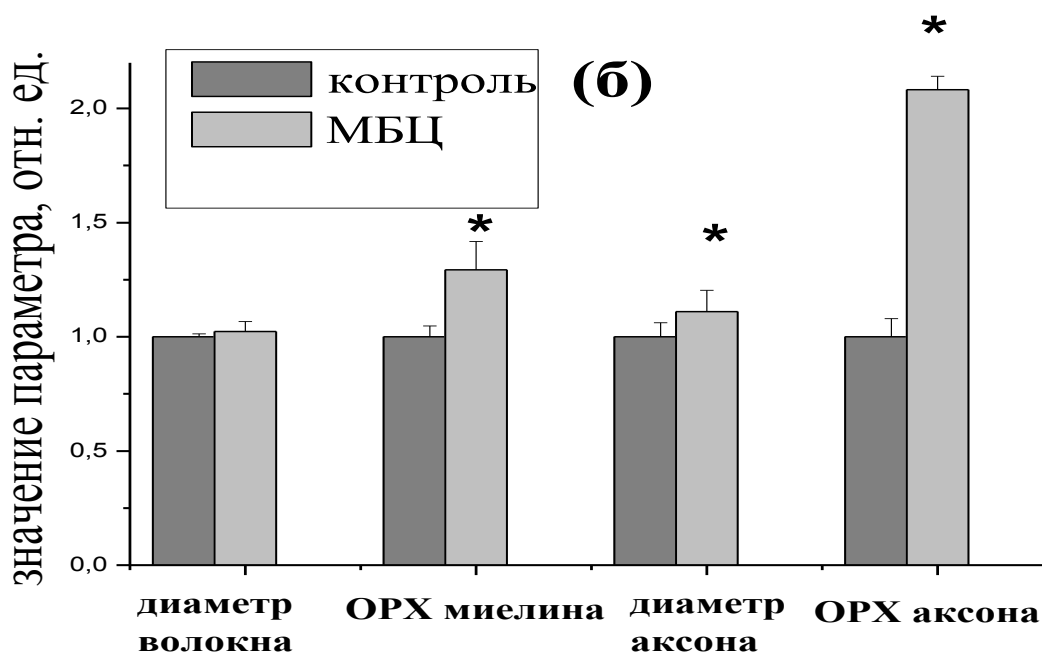
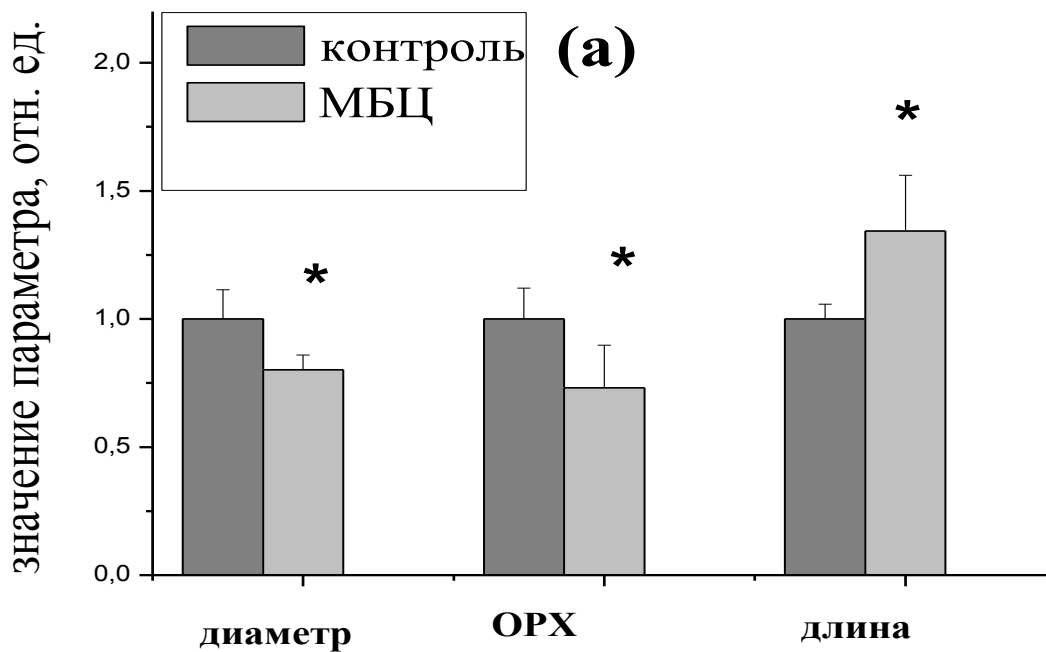


Рис. 5. Изменения оптической разности хода лучей (ОРХ), диаметра и длины перехвата Ранвье (а) и интернодальной области (б) при инкубации с холестерол-экстрагирующим агентом метил- $\beta$ -циклодекстрином (МБЦ, 10-2М). \* – достоверное различие ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, достоверность различий оценивали с помощью  $t$ -критерия.

в миелине, при проведении серии ПД,  $\text{Ca}^{2+}$  входит в интернодальную область. Вероятно, при этом в ИО активируется ряд ферментов или происходит изменение состояния цитоскелета, что может приводить к разнообразным физиологическим эффектам, в том числе, отразиться на энергообеспечении процессов проведения возбуждения в ПР и снижении амплитуды ПД.

Возможно, повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в интернодальной области, наблюдаемое при СПД на фоне экстракции холестерина, приводит к нарушению щелевых контактов и разъединению слоев миелина нервного волокна; кроме того возможно увеличение проницаемости мембран (вызываемое небольшим повышением  $\text{Ca}^{2+}$ ). Таким образом еще один возможный механизм влияния уровня холестерина на проведение возбуждения нервных волокон заключается в регуляции холестеринам уровня свободного внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , что при возбуждении волокна важно именно в интернодальной области.

Нарушение структуры волокна (контактов между слоями миелина, их разъединение, сближение слоев), изменение внутренних концентраций ионов, вызываемое уменьшением уровня холестерина, также могут приводить к уменьшению амплитуды ПД при проведении СПД волокном с пониженным содержанием холестерина. Действительно, изменения морфологии волокна и состояния мембран МНВ с дефицитом холестерина проявляется и в снижении эффективности его функционирования: при действии МБЦ амплитуда ПД уменьшается после 40 – 45 мин (рис 6). Возможно, изменения уровня холестерина могут приводить к увеличению порога возбудимости МНВ.

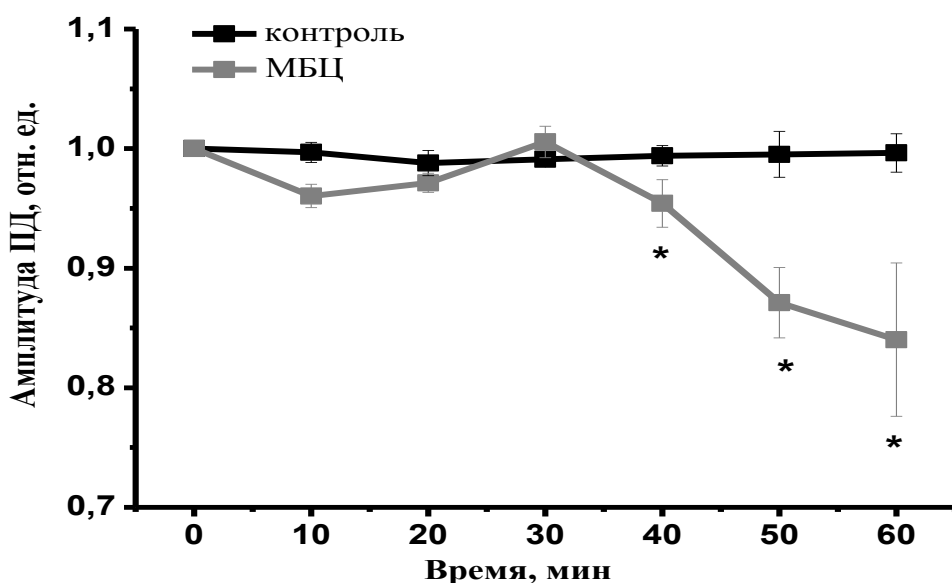


Рис. 6. Изменения амплитуды потенциала действия миелинового нервного волокна в контроле и при инкубации с метил-β-циклодекстрином (МБЦ,  $10^{-2}\text{M}$ ) МБЦ. \* – достоверное различие ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе исследовали состояние упорядоченности жирных кислот липидов мембран перехвата Ранвье и миелина, а также упорядоченность расположения мембранных слоев миелина и перераспределение  $\text{Ca}^{2+}$  в различных областях нервного волокна при проведении возбуждения в норме и при дефиците холестерина. Было показано, что при проведении СПД происходят изменения исследуемых параметров не только в перехвате Ранвье, но и в миелине нервного волокна.

При возбуждении волокна, в перехвате УЖК уменьшается, содержание мембран-связанного  $\text{Ca}^{2+}$  не меняется, но  $\text{Ca}^{2+}$  входит в аксон по потенциал-зависимым каналам. Эти процессы не сопровождаются изменениями морфологии перехвата Ранвье (диаметр и длина ПР), но уменьшается показатель преломления аксоплазмы. При возбуждении в интернодальной области (миелин) УЖК мембран увеличивается, содержание мембран-связанного  $\text{Ca}^{2+}$  снижается, а внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  не меняется. Морфология интернодальной области (диаметр волокна и аксона) не меняется, но показатель преломления миелина уменьшается. Таким образом, при проведении возбуждения аксоном происходят комплексные изменения структуры миелина, при которых упорядоченность липидов мембраны возрастает, а упорядоченность отдельных мембран миелина друг относительно друга (их «упаковка» в миелине) нарушается.

При дефиците холестерина УЖК мембран и содержание мембран-связанного  $\text{Ca}^{2+}$  в перехвате Ранвье не меняются, но выявлен обратимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в аксон и нарушения морфологии перехвата (диаметр и ОРХ уменьшаются, длина ПР растет). Параллельно, в интернодальной области УЖК (в различных областях гидрофобного слоя) и содержание мембран-связанного  $\text{Ca}^{2+}$  миелина снижаются, а также обратимо меняется содержание свободного внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Экстракция холестерина меняет морфологию данной области волокна: диаметр аксона под миелином и коэффициент преломления его цитоплазмы увеличиваются, как и коэффициент преломления миелина.

Выявленные отличия проведения серии ПД нервным волокном в норме и при дефиците холестерина заключаются в нивелировании изменений УЖК мембран перехвата Ранвье и интернодальной области, входе  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму интернодальной области и уменьшении амплитуды ПД. Вероятно, уменьшение уровня холестерина в миелине нервного волокна меняет активность потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, за счет уменьшения упорядоченности липидов мембран, что и приводит к накоплению внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в интернодальной области. Данный механизм может лежать в основе заболеваний, связанных с уменьшением уровня холестерина в мембранах МНВ.



## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при проведении серии потенциалов действия в миелиновом нервном волокне упорядоченность «хвостов» жирных кислот липидного бислоя в перехвате Ранвье снижается, а в миелине – увеличивается;
2. Установлено, что при проведении серии потенциалов действия в миелиновом нервном волокне происходит перераспределение  $\text{Ca}^{2+}$ : в перехвате Ранвье содержание внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  увеличивается, а в миелине содержание мембран-связанного  $\text{Ca}^{2+}$  снижается;
3. Установлено, что при проведении серии потенциалов действия морфология миелинового нервного волокна не меняется, а ОРХ цитоплазмы в перехвате Ранвье и миелине снижается;
4. Установлено, что при экстракции холестерина упорядоченность «хвостов» жирных кислот уменьшается только в липидном бислое миелина, но не в аксолеме перехвата Ранвье;
5. Установлено, что при экстракции холестерина в нервном волокне происходит перераспределение  $\text{Ca}^{2+}$ : в перехвате Ранвье содержание свободного  $\text{Ca}^{2+}$  обратимо увеличивается, а в интернодальной области помимо этого, уменьшается уровень мембран-связанного  $\text{Ca}^{2+}$ ;
6. Установлено, что при экстракции холестерина происходят изменения морфологии (диаметр аксона под миелином увеличивается, а в перехвате – уменьшается; длина перехвата увеличивается) и упаковки липидных слоев миелина (ОРХ миелина увеличивается);
7. Установлено, что после экстракции холестерина изменений в упорядоченности «хвостов» жирных кислот в перехвате Ранвье и миелине в ответ на проведение серии ПД не наблюдается;
8. Установлено, что после экстракции холестерина в ответ на проведение серии ПД увеличивается содержание внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в интернодальной области нервного волокна;
9. Установлено, что при проведении серии потенциалов действия волокон с пониженным уровнем холестерина амплитуда потенциалов действия снижается после 40 мин.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:

1) Е.З. Бибинейшвили, Н.Н. Родионова, А.И. Юсипович, Г.В. Максимов. Изучение миелинового нервного волокна при модификации белок-липидных взаимодействий в миелине// Биологические мембраны, 2013, 30: 142-146.

2) А.Б. Рубин, Н.Н. Родионова, Е.З. Бибинейшвили, А.Р. Браже, Г.В. Максимов. Влияние  $K^+$ -деполяризации и изменения конформации мембранных белков нервного волокна на состояние миелина// Биофизика, 2014, 59: 108-111

3) Е.З. Бибинейшвили, И.Г. Савинкова, А.И. Юсипович, Л.Р. Горбачева, Г.В. Максимов. Изменение морфологии и структуры цитоплазмы нейрона в ответ на действие глутамата и изменение липидного бислоя плазматической мембраны// Биологические мембраны, 2014, 31:83-85

4) Г.В. Максимов, Е.З. Бибинейшвили, А.И. Юсипович, Г.Г. Левин, А.Б. Рубин. Изменения структуры миелина и упорядоченности жирнокислотных «хвостов» миелина при возбуждении нервного волокна// Биофизика, 2014, 59:105 – 107.

### Тезисы конференций:

1) Бибинейшвили Е.З., Браже А.Р. Влияние продолжительного возбуждения и демиелинизации на функционировании миелинового нервного волокна. Международная конференция студентов и молодых ученых «Ломоносов — 2009», 2009, г. Москва, Сборник тезисов Т. 2, С. 8

2) Бибинейшвили Е.З., Браже А.Р., Юсипович А.И., Максимов Г.В. Изменения в миелинизированных аксонах после мембранных модификаций. 8 международный биофизический конгресс, 2011, г. Будапешт, Венгрия, Европейский биофизический журнал с биофизическими письмами, 2011, Т. 40, С. 69-69 DOI

3) Родионова Н.Н., Бибинейшвили Е.З., Юсипович А.И., Максимов Г.В. Наноразмерные изменения оптической разности хода миелинового нерва при модификации его белкового и липидного состава. 5 международная конференция «Современные достижения бионаноскопии», 2011, г. Москва

4) Родионова Н.Н., Бибинейшвили Е.З., Юсипович А.И., Громова Н.В., Максимов Г.В. Изменение оптической разности хода в миелиновом нерве при модификации его белкового и липидного состава. 4 всероссийская научно-практическая конференция, 2011, г. Москва, «Цитометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты», 2011, С. 83-84

5) Бибинейшвили Е.З., Савинкова И.Г., Юсипович А.И., Горбачева Л.Р., Струкова С.М., Максимов Г.В. Изучение морфологии и структуры цитоплазмы нейрона при действии медиаторов или изменении состояния плазматической мембраны. Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», 2013, г. Пущино

6) Юсипович А.И., Родионова Н.Н., Бибинейшвили Е.З., Минаев В.Л., Максимов Г.В. Измерение характеристик нервного волокна при помощи метода лазерной интерференционной микроскопии. 5 международная конференция «Современные достижения бионаноскопии», 2011, г. Москва