



УДК 577.352.333

Н.Н. ПЕТРАШЕВСКАЯ, В.Б. КАЗАКЕВИЧ

ХАРАКТЕРИСТИКА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН И ПОВЫШЕНИЕ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ АНТИОКСИДАНТОМ ИОНОЛОМ

We have shown that the activation of lipid peroxidation in isolated frog nerves contributes to the alteration of electrophysiological axonal propagation properties. Antioxidant treatment by ionol 10^{-6} g/ml have been demonstrated to preserve the functional stability of nodes of Ranvier, severed from their cell bodies.

В патогенезе дегенерационных изменений нервной ткани, среди факторов, играющих ключевую роль в нарушении функциональной стабильности возбудимой мембраны выделяют свободные радикалы и активируемые ими процессы перекисного окисления липидов. Ключевые функции нейронов – поддержание трансмембранного потенциала, захват и выброс медиатора – чрезвычайно чувствительны к гиперпродукции активных форм кислорода, перекисных радикалов, регистрируемых при развитии окислительного стресса [1,2]. Однако влияние этих процессов на нарушение специализированной аксональной функции проведения нервного импульса остается во многом неясным, что определяется отсутствием адекватных экспериментальных моделей, позволяющих комплексно оценить электрофизиологические и метаболические изменения, развивающиеся при активации дегенерационных процессов в той или иной части нейрона. В данной работе для оценки роли процессов перекисного окисления липидов в нарушении устойчивости аксональной функции проведения нервного импульса предложена модель длящегося переживания изолированных седалищных нервов лягушки. Используя эту экспериментальную модель, мы ставили задачу установить связь между инициированием реакций ПОЛ и электрофизиологическими изменениями активности нервных волокон, а также оценить возможности антиоксидантной защиты функции аксонального проведения потенциала действия.

Материал и методика

В качестве тест-объекта использовались изолированные седалищные нервы лягушки *Rana temporaria*. Изолированные нервы ($n=10$) инкубировались в растворе Рингера для холоднокровных на протяжении 80 ч при температуре $18 \pm 2^\circ\text{C}$. Во второй серии опытов ($n=10$) в среду инкубации нервов вводили антиоксидант ионол (2,6-дитретбутил-4-метилфенол) в концентрации 10^{-6} г/мл, растворенный в этиловом спирте, конечная концентрация которого в среде инкубации составила 1%.

В переживающих нервных волокнах проводили электрофизиологическое тестирование параметров потенциала действия через 5, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ч на фоне продолжающейся экспозиции. Каждый препарат после тестирования в указанном временном интервале переносился в другой бюкс с обновленной средой инкубации. При электрофизиологическом тестировании монофазные потенциалы действия отводили с поверхности нерва точечным хемотродом, заполненным раствором Рингера. Усиление осуществляли усилителем УБП-02 с полосой пропускания 0,1–1000 Гц. Измерение амплитуды и времен-

ных параметров нервного импульса проводили по изображениям на экране осциллографа С1-18 в режиме ждущей развертки. Стимуляцию волокон для получения возбуждения и непрерывного изображения нервного импульса во всех определениях осуществляли на ждущей частоте 30 Гц. Прямоугольные импульсы отрицательной полярности длительностью 0,1 мс подавали на биполярные электроды через равночастотный выход стимулятора ЭСУ-2. Пороговое напряжение в импульсе составляло 6–6,8 В. На осциллограммах определяли амплитуду потенциала действия (ПД, мВ) по калибровочному сигналу усилителя, максимальную скорость мембранной деполяризации ($V_{\max}$, В/с) – по скорости нарастания переднего фронта нервного импульса, скорость проведения импульса (м/с) – по латентности ответа и расстоянию до точки отводящего электрода, абсолютный рефрактерный период (АРП, мс) – по отсутствию ПД на тест-стимул при парной стимуляции, относительный рефрактерный период (ОРП) – по минимальному времени между двумя стимулами, вызывающими равноценные ПД.

Развитие реакций перекисного окисления липидов в переживающих нервных волокнах оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА), содержание которого определяли через 0, 25, 50 и 80 ч инкубации по реакции с тиобарбитуровой кислотой [3]. В эти же сроки в переживающих нервных волокнах определяли активность фермента антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы СОД КФ 1.15.1.1.17. [4]. Содержание МДА и активность ферментов рассчитывали на 1 мг белка, активность которого определяли по [5].

Статистическая обработка результатов проводилась общепринятыми методами. Достоверность различий между средними величинами оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Характер изменения содержания МДА в изолированных седалищных нервах лягушки при переживании в течение 80 ч при температуре $18 \pm 2^\circ\text{C}$ представлен на рис.1а. Достоверное повышение уровня продуктов ПОЛ наступало к 50 ч после выделения нервов. К этому времени по сравнению с контролем (5 ч после выделения) оно увеличилось на 47 % и составило $1,13 \pm 0,08$ нмоль МДА/мг белка ($p < 0,05$, $n=5$). В дальнейшем содержание МДА прогрессивно нарастало и к 80 ч достигло $1,82 \pm 0,09$ нмоль/мг белка ($p < 0,01$, $n=5$). Антиоксидант ионол, вводимый в среду инкубации изолированных нервов в концентрации 10^{-6} г/мл, уменьшал содержание продукта до $1,10 \pm 0,03$ нмоль МДА/мг белка.

В процессе переживания изолированных нервных волокон в них снижалась супероксиддисмутазная активность (рис.1б). Достоверное изменение активности СОД наблюдалось к 25 ч инкубации и к 80 ч вновь регистрировалось значительное снижение активности этого фермента. Антиоксидант ионол, введенный в среду инкубации, замедлял динамику снижения активности фермента: супероксиддисмутазная активность в нервах, инкубирующихся с ионолом, через 80 ч инкубации была на 26 % выше, чем в нервах, инкубированных в препаратах без антиоксидантной обработки.

Проведенное электрофизиологическое тестирование показало, что при переживании изолированных седалищных нервов лягушки в растворе Рингера амплитуда суммарного потенциала действия волокон группы А практически не изменялась на протяжении 40 ч (рис.2а). Статистически достоверное падение амплитуды ПД регистрировалось через 50 ч, когда она составила $65,0 \pm 6,9$ % от первоначальной величины ($p < 0,01$, $n=10$). В дальнейшем амплитуда ПД прогрессивно снижалась и к 80 ч уменьшилась до 11 ± 2 % от начального значения ($p < 0,001$, $n=10$). Снижение амплитуды монофазного ПД сопровождалось и уменьшением максимальной скорости деполяризации ($V_{\max}$), что свидетельствует о снижении максимальной натриевой проводимости аксонов (рис.2б). Максимальная скорость нарастания переднего фронта ПД волокон группы А изолированных седалищных нервов лягушки за 80 ч переживания уменьшилась на 95,5%. Первоначальное статистически достоверное уменьшение $V_{\max}$ регистрировалось к 40 ч инкубации нервных стволов в физиологическом растворе.

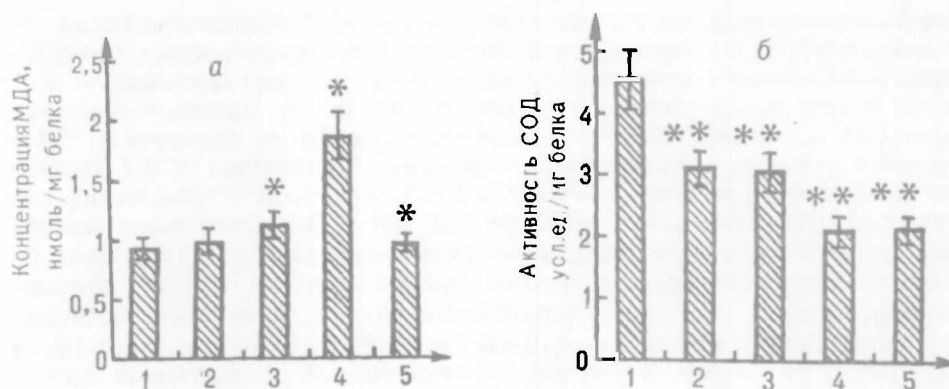


Рис.1. Содержание МДА (а) и активность супероксиддисмутазы (б) в изолированных седалищных нервах лягушки в условиях длительно переживания
1 – контроль (5 ч после выделения), 2 – инкубация 25 ч, 3 – инкубация 50 ч, 4 – инкубация 80 ч, 5 – ионол 10^{-6} г/мл + инкубация 80 ч;
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

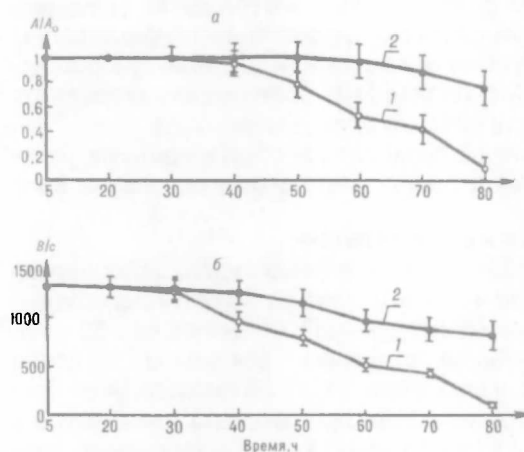


Рис.2. Влияние антиоксиданта ионола на электрофизиологические характеристики переживающих нервных волокон группы А изолированного седалищного нерва лягушки: а – нормированная амплитуда ПД, где А – определяемое, A_0 – контрольное значение, б – максимальная скорость деполяризации ($V_{\max}$); 1 – контроль, 2 – ионол 10^{-6} г/мл

К 50 ч регистрируется также резкое изменение комплекса электрофизиологических показателей, характеризующих специализированную аксональную функцию проведения нервного импульса: длительности абсолютного и относительного рефрактерного периодов, скорости проведения нервного импульса (рис.3 а,б,в). Причем возникновение выраженных функциональных изменений в переживающих нервных волокнах происходило на фоне увеличения содержания МДА и значительного снижения активности СОД.

Антиоксидант ионол (10^{-6} г/мл), добавленный в среду инкубации изолированных нервных волокон, оказывал сильное стабилизирующее

влияние на возбудимую мембрану аксонов. Это выражалось в существенном замедлении скорости потери возбудимости волокнами группы А (см. рис.2а), поскольку ионол увеличивал период наступления достоверного снижения амплитуды суммарного ПД до 60 ч, а к 80 ч после изоляции нерва при его экспозиции в растворе с антиоксидантом ПД уменьшился до $65 \pm 4\%$ от исходного значения, что на 54% меньше, чем в условиях без добавления антиоксидантов. В условиях действия ионола поддержание возбудимости аксонов в ходе их дегенерации было обусловлено частичным сохранением в процессе переживания нормальной скорости деполяризации, которая через 80 ч экспозиции изолированных нервов в растворе с ионолом уменьшилась с 1290 ± 108 В/с до 580 ± 57 В/с, что было на 37% выше величины $V_{\max}$ в нервах, находящихся в растворе без антиоксиданта. Для изолированных нервов при экспозиции в растворе с ионолом характерно более продолжительное сохранение нормальной скорости инактивации системы натриевых каналов и падение калиевой проводимости при реполяризации аксонов. Об этом свидетельствуют меньшие, по сравнению с контролем, сдвиги абсолютного и относительного рефрактерного периодов на фоне действия антиоксиданта (см. рис.3а). Скорость проведения ПД нервными волокнами группы А через 80 ч переживания в среде с ионолом была выше, чем в контрольных опытах, и изменялась всего на 14% от перво-

начальной величины ($p < 0,05$, $n=10$). Обращает на себя внимание тот факт, что на фоне действия антиоксиданта наблюдающиеся изменения амплитуды суммарного монофазного ПД, максимальной скорости развития переднего фронта ПД, скорости проведения нервного импульса имели черты линейного процесса, развивающегося с постоянной скоростью.

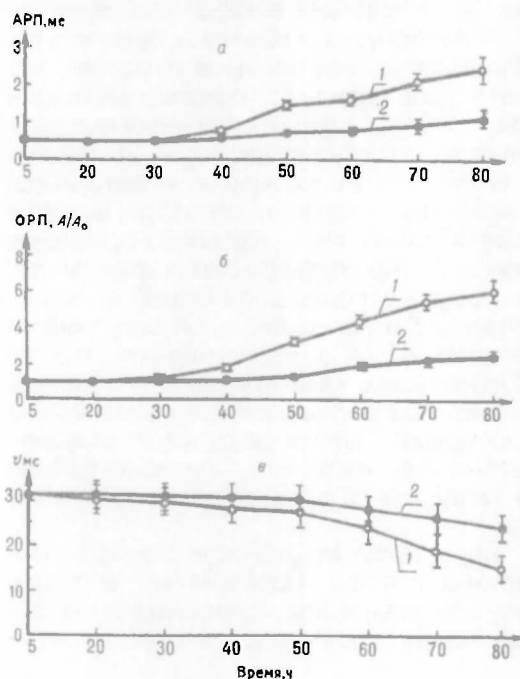


Рис.3. Влияние антиоксиданта ионола на абсолютный и относительный рефрактерный период и скорость проведения потенциала действия волокнами группы А при переживании изолированного седалищного нерва лягушки:

а – длительность абсолютного рефрактерного периода, б – длительность относительного рефрактерного периода, в – скорость проведения (м/с); 1 – контроль, 2 – ионол 10^{-5} г/мл

клетки [6]. Из этого можно заключить, что в нервных волокнах при отсутствии связи с телами нервных клеток в течение определенного времени функционирует достаточное число ионных каналов и насосов, необходимых для поддержания возбудимости. Можно предположить, что интегральные белки каналов, а также метаболически зависимые ионные насосы обладают исключительной стабильностью и обеспечивают функцию волокна вплоть до наступления его дегенерации. Возможно, что данные белковые молекулы могут синтезироваться шванновской клеткой [7]. Тем не менее прекращение аксоплазматического тока, приводящее к так называемому биохимическому угнетению в аксонах, приводит к существенному снижению активности ферментов, в числе которых, согласно результатам наших исследований, и СОД. Это, вероятно, является решающим фактором активации ПОЛ до уровня, превышающего регуляторную значимость этого процесса в проведении ритмического возбуждения по миелинизированным нервным стволам [8]. Наряду с активацией мембрано-деструктивных процессов, активация ПОЛ способна усилить каскад нейротоксических реакций, опосредуя повышение концентрации внутриаксонального кальция. Известно, что повышение содержания свободного кальция в цитоплазме является одним из ключевых факторов нейродегенерации, и повышенная его концентрация отмечена в местах наиболее выраженной морфологической деструкции нервного волокна [9–11]. Результатом этих процессов может явиться структурная дезинтеграция нервного волокна, так называемая валле-

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют заключить, что нарушение устойчивости специализированных функций изолированных нервных стволов после разрыва трофической связи с телом нервной клетки взаимосвязано со свободнорадикальным окислением мембран нервных волокон, а антиоксидантное воздействие оказывает стабилизирующее действие на возбудимую мембрану аксонов при переживании *in vitro*. Известно, что процесс возбудимости нервного волокна обеспечивается функционированием перехватов Ранвье, для которых характерна высокая плотность натриевых и калиевых каналов и ионных насосов. Известный факт длительного сохранения специализированной функции проведения нервного импульса в изолированных нервах холоднокровных животных свидетельствует о значительной функциональной стабильности нервных волокон пойкилотермных животных при разрыве трофической связи с телом нервной

ровская легенерация, приводящая к снижению числа функционирующих нервных волокон, что и отражает снижение амплитуды суммарного ПД.

Анализ электрофизиологических эффектов, развивающихся в нервных стволах при переживании *in vitro*, свидетельствует об уменьшении скорости нарастания переднего фронта ПД, увеличении времени относительной и абсолютной рефрактерности, о частичной деполяризации сохранивших возбудимость аксонов, а также о поражении части натриевых и калиевых каналов и соответствующем снижении потенциалзависимых ионных проводимостей. Известно, что сильная продолжительная деполяризация, сопровождающаяся глубокой инактивацией каналов входящего тока, ведущая к снижению амплитуды ПД, повышению порогового потенциала, способна существенно уменьшить скорость распространения нервного импульса [12]. Активация несбалансированных реакций ПОЛ может вносить реальный вклад в эти процессы, вызывая значительную деполяризацию возбудимой мембраны и нарушая нормальное функционирование белков каналоформеров. Это подтверждается фактом стабилизации механизма возбудимости нервных волокон, достигаемой антиоксидантным воздействием, что свидетельствует о принципиальной возможности продлевать и нормализовывать функционирование молекулярных структур возбудимой мембраны, образующих натриевые и калиевые каналы и ионные насосы. Можно предположить также, что при антиоксидантном воздействии увеличивается жизнеспособность шванновских клеток, которые в условиях изолированного нерва могут обеспечить синтез некоторого количества белков-каналоформеров, обязательных для поддержания определенного уровня поляризации и сохранения возбудимости.

В заключение можно отметить, что продление сохранности специализированных функций изолированных нервных волокон направленным антиоксидантным воздействием может служить основанием для применения антиоксидантных веществ в целях управления ходом дегенерационного процесса поврежденных нервных стволов.

1. Kagan V.E., Bakalova R.A., Koynova G.M. // *Free radical in the Brain. Aging, Neurological and Mental Disorders*/ Eds. L. Packer, L. Prilipko, Y. Christen. Berlin, 1992. P. 49.
2. Colton C.A., Colton J.S. // *Brain. Res.* 1986. Vol. 364. № 1. P. 151.
3. Ahkava H., Ohishi N., Yagi K. // *Anal. Biochem.* 1979. Vol. 95. № 12. P. 351.
4. Чумаков В.Н., Осинская Л.В. // *Вопр. мед. химии.* 1979. № 3. P. 261.
5. Lowry O.H., Rosenbrough H.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. № 2. P. 265.
6. Wang G.H. // *J. Physiol.* 1985. Vol. 368. № 2. P. 309.
7. Кольс О.Р., Ревин В.В., Свердлов Е.А., Федоров Г.Е. // *Биоантиоксиданты в регуляции метаболизма в норме и патологии.* М. 1982. С. 100.
8. Виноградова И.М. // *Успехи физиол. наук.* 1987. Т. 18. № 4. С. 37.
9. Mata M., Staple J., Fink D. // *J. Neurobiol.* 1986. Vol. 17. P. 449.
10. Badalamente M., Hirst L., Stracher A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1899. Vol. 86. № 15. P. 5983.
11. Medinarella L., Church A.C. // *Exp. Neurol.* 1984. Vol. 84. № 2. P. 396.
12. Davison A., Tibbits G., Shi L. // *J. Mol. and Cell. Biochem.* 1988. Vol. 10. № 2. P. 199.

Поступила в редакцию 22.12.98.

УДК 577.125.33.:616.5.-008.922

Л.Н. БЫШНЕВА., В.В. СЕНЧУК

ВЛИЯНИЕ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ ХРУСТАЛИКА

Was studied the influence of UY-radiation and high concentrations of glucose, galactose and sor-bitol on antioxidant system enzymes of bovine lens – SOD, GPX and GRD. Was found the damage effect so of UY-radiation as high concentrations of monosacharides on lens antioxidant system.

Солнечная радиация является важным экологическим фактором для большинства живых организмов. К важнейшим фотобиологическим процессам относятся процессы фоторегуляции, зрения, деструктивное действие

