

уменьшается в 2, 25 и 10 раз соответственно с увеличением количества заместителей в молекуле бензида. Изменение константы  $K_4$  носит аналогичный характер в изученных системах (см. табл. 2).

Сравнение  $K_{кат}/K_m$  ( $K_2$ ) для ряда гемопротеидов при окислении бензида показывает, что каталаза практически не окисляет бензидин. Цитохром P-450  $LM_2$  в 35 раз менее эффективен при пероксидазном окислении бензида гемоглобином и в 327 раз — пероксидазы хрена. Введение метильных заместителей в 3 и 5 положения молекулы бензида приводит к значительному уменьшению  $K_{кат}$  ( $K_4$ ) для всех систем, за исключением пероксидазы хрена, у которой наблюдается обратная зависимость. Эффективность пероксидазного окисления производных бензида с введением заместителей уменьшается для всех систем.

Таким образом, при пероксидазном окислении бензида и его производных рядом гемопротеидов и микросомами печени образуются спектрально идентичные продукты реакции. Бензидин эффективно окисляется микросомами печени, цитохромом P-450  $LM_2$  и особенно гемоглобином. Введение метильных и метоксизаместителей в молекулу бензида (ДМБД, ДМОБД, ТМБД) резко снижает эффективность пероксидазного катализа цитохромом P-450  $LM_2$ , мономерами каталазы, гемоглобином и микросомами, но существенно увеличивает для пероксидазы хрена.

### Список литературы

1. Канцерогенные вещества (справочник). М., 1987. С. 332.
2. Саундерс Б. К. Пероксидазы и каталазы // Неорганическая биохимия / Под ред. Г. Эйхгорна. М., 1978. Т. 2. С. 434.
3. Yamazaki I. Peroxidase // Molecular mechanisms of oxygen activation / Edit. O. Nayaichi. New York, 1974. P. 535.
4. Савенкова М. И., Курченко В. П., Метелица Д. И. // Биохимия. 1984. Т. 49. № 7. С. 1147.
5. Еремин А. Н., Усанов С. А., Метелица Д. И. // Биоорганическая химия. 1980. № 6. С. 757.
6. Lowry O. H., Posebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // Journ. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265.
7. Omura T., Sato R. J. // Ibid. 1964. V. 251. P. 3442.
8. Shanon L., Kay M. E., Lew E. J. // Ibid. 1966. V. 341. № 9. P. 2166.
9. Савенкова М. И., Курченко В. П., Метелица Д. И. // Изв. АН БССР. Сер. хим. 1983. № 5. С. 41.
10. Лебедева О. В., Угарова Н. Н., Березин И. В. // Биохимия. 1977. Т. 42. № 8. С. 1372.
11. Ugarova N. N., Lebedeva O. V., Berezin J. V. // Journ. Mol. Catal. 1981. V. 13. P. 215.
12. Yamazaki I., Yokota K. // Mol. Cell. Biochem. 1973. V. 2. № 1. P. 39.

УДК 577.164.32+612.822.56+616.833

В. Т. ШАЛАТОНИН, Н. Н. ПЕТРАШЕВСКАЯ, Т. О. ЧЕРНОВА

### ВЛИЯНИЕ $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛА, РУТИНА И КВЕРЦЕТИНА НА РАЗВИТИЕ РАННЕЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН

Свободные кислородные радикалы вызывают структурно-функциональные повреждения клеток и тканей, нарушая их нормальное функционирование, что определяет развитие многих патологий [1], в том числе и ряда нервно-мышечных [2]. Обнаружение участия свободнорадикального механизма в нейрональной дегенерации [3] открывает возможности для изыскания и применения ингибиторов свободнорадикальных реакций (антиоксидантов) для регуляции дегенерационного процесса в нервно-мышечной системе. В связи с этим необходимы исследования, направленные на выявление потенциальной противодегенерационной активности антиоксидантных веществ. В данной работе изучено влияние на развитие ранней дегенерации двигательных нервных во-

локон распространенных природных антиоксидантов — витамина Е ( $\alpha$ -токоферола), рутина и кверцетина (растительных флавоноидов, относящихся к витаминам группы Р).

### Материал и методика

Опыты проводили на белых крысах обоего пола с массой тела 150—200 г, у которых для получения модели валлеровской дегенерации под тиопенталовым наркозом (60 мг/кг внутривентрально) хирургически перерезали седалищный нерв. После этого рану зашивали, животных помещали в обычные условия содержания. Через 24 и 48 ч в отдельных группах животных ( $n=10$ ) для электрофизиологического тестирования дегенерации под тем же наркозом обнажали на уровне трети бедра участки обоих седалищных нервов, к ним подводили погружные электроды для электростимуляции. В *m. soleus* вводили биполярные игольчатые электроды для регистрации вызванных суммарных потенциалов действия (М-ответов). М-ответы отображались на экране запоминающего осциллографа С8-13 и фотографировались приставкой фирмы «Medicor». Нервы стимулировали одиночными, парными и ритмическими сериями прямоугольных электрических импульсов (0,2 мс) от стимулятора ЭСУ-2 через радиочастотную приставку. Проводили попарное сравнение амплитуды М-ответов при раздражении дегенерирующего и контрольного нерва-партнера у каждого животного. Для количественной оценки дегенерации получали кривые зависимости амплитуды М-ответов от силы раздражения нерва. Максимумы амплитуды М-ответов характеризовали размер фонда функционирующих двигательных единиц:  $M_k$  — контрольного нерва,  $M_d$  — дегенерирующего нерва. По отношению  $M_d/M_k$  определяли индекс дегенерации (ИД):  $ИД = 1 - M_d/M_k \cdot 100 (\%)$ .

Значение ИД показывает относительное количество выключаемых двигательных единиц в ходе дегенерации. Нарушения нервно-мышечной передачи определяли по изменению времени восстановления синаптической функции после проведения одиночного импульса (Т, мс). За величину Т принимали минимальный интервал между двумя М-ответами, вызываемыми парной супрамаксимальной стимуляцией нерва, при котором амплитуда второго М-ответа была равна амплитуде первого М-ответа, что свидетельствовало о полном восстановлении синаптической передачи. Изменение устойчивости синаптической функции при проведении высокочастотных импульсов выявляли по скорости падения амплитуды М-ответов (V, мВ/с) во времени при супрамаксимальном раздражении нервов с частотой 100 Гц в течение 10 с. Витамин Е ( $\alpha$ -токофериллацетат, Химико-фармацевтическое объединение «Октябрь») опытным группам животных ( $n=20$ ) вводили перорально через зонд в желудок в дозе 500 мг/кг (135 МЕ) на протяжении 5 сут для получения интенсивной терапии высокой дозой антиоксиданта [3].

Рутин (НПО «Витамины») и кверцетин (Sigma, США) вводили внутривентрально в дозах 25 и 125 мг/кг в сутки ( $n=10$ ) в виде 5%-х растворов в диметилсульфоксиде (ДМСО). Контрольная группа животных получала 1 мл растворителя ДМСО ( $n=10$ ). Влияние антиоксидантов на развитие дегенерации оценивали также коэффициентом противодегенерационной защиты, показывающим величину устойчивости аксональных терминалей:  $КПЗ = ИД_k / ИД_a$ , где  $ИД_k$  — индекс дегенерации в контроле,  $ИД_a$  — при применении антиоксидантов. Результаты обработаны статистически и проверены на достоверность по критерию Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Электронейромиографическое тестирование через 24 и 48 ч после перерезки седалищного нерва у крыс показало, что характерным функциональным признаком развития ранней нервно-мышечной дегенерации является нарушение свойств синаптической передачи (табл. 1). Об этом свидетельствуют замедление времени восстановления синапса после проведения одиночного импульса (прогрессирующее удлинение Т) и

Таблица 1

Влияние витамина Е, рутина (Р) и кверцетина (К)  
на развитие нарушений синаптической функции  
при ранней дегенерации (Д) двигательных нервных волокон  
седалищного нерва у крыс ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ )

| Группы и условия опытов | T, мс                | V, мВ/с              |
|-------------------------|----------------------|----------------------|
| 1. Контроль             | $7,8 \pm 0,44$       | $0,20 \pm 0,01$      |
| 2. Д 24 ч               | $9,8 \pm 0,62^{**}$  | $0,43 \pm 0,02^{**}$ |
| 3. Д 48 ч               | $14,3 \pm 0,81^{**}$ | $0,71 \pm 0,08^{**}$ |
| 4. Е+Д 24 ч             | $9,2 \pm 0,80^*$     | $0,26 \pm 0,02^*$    |
| 5. Е+Д 48 ч             | $9,6 \pm 0,80^{**}$  | $0,52 \pm 0,06^*$    |
| 6. ДМСО+Д 24 ч          | $8,9 \pm 0,53$       | $0,39 \pm 0,03$      |
| 7. Р 25 мг/кг+Д 24 ч    | $18,6 \pm 1,50^{**}$ | $0,64 \pm 0,1^{**}$  |
| 8. Р 125 мг/кг+Д 24 ч   | $20,3 \pm 1,24^{**}$ | $0,78 \pm 0,14^{**}$ |
| 9. К 25 мг/кг+Д 24 ч    | $24,8 \pm 2,82^{**}$ | $0,66 \pm 0,12^{**}$ |
| 10. К 125 мг/кг+Д 24 ч  | $30,2 \pm 5,64^{**}$ | $0,80 \pm 0,23^{**}$ |

Примечания: \* —  $P < 0,05$ ; \*\* —  $P < 0,01$  (при сравнении групп 1—2, 2—3, 2—4, 3—5, а также групп 7, 8, 9, 10 с группой 6).

Таблица 2

Влияние витамина Е, рутина (Р) и кверцетина (К)  
на развитие ранней дегенерации (Д)  
двигательных нервных окончаний у крыс ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ )

| Группы и условия опытов | М-ответы мВ    |                  | ИД, %            | КПЗ  |
|-------------------------|----------------|------------------|------------------|------|
|                         | М <sub>К</sub> | М <sub>Д</sub>   |                  |      |
| 1. Д 24 ч               | $14,0 \pm 3,1$ | $8,9 \pm 0,8$    | $36,7 \pm 7,4$   |      |
| 2. Д 48 ч               | $15,1 \pm 2,6$ | $3,4 \pm 0,6$    | $77,5 \pm 8,2$   |      |
| 3. Е+Д 24 ч             | $16,2 \pm 1,8$ | $12,3 \pm 0,8^*$ | $24,1 \pm 5,6^*$ | 1,52 |
| 4. Е+Д 48 ч             | $15,8 \pm 2,3$ | $7,4 \pm 0,5^*$  | $53,2 \pm 7,5^*$ | 1,46 |
| 5. ДМСО+Д 24 ч          | $13,1 \pm 2,6$ | $6,6 \pm 0,3$    | $42,0 \pm 5,3$   |      |
| 6. Р 25 мг/кг+Д 24 ч    | $16,0 \pm 2,1$ | $1,9 \pm 0,12^*$ | $88,9 \pm 6,4^*$ | 0,47 |
| 7. Р 125 мг/кг+Д 24 ч   | $13,8 \pm 3,2$ | $1,1 \pm 0,14^*$ | $92,1 \pm 5,2$   | 0,45 |
| 8. К 25 мг/кг+Д 24 ч    | $10,8 \pm 3,3$ | $0,4 \pm 0,10^*$ | $96,3 \pm 3,2^*$ | 0,44 |
| 9. К 125 мг/кг+Д 24 ч   | $12,6 \pm 2,8$ | $0,1 \pm 0,06^*$ | $99,2 \pm 1,4^*$ | 0,42 |

Примечание: \* —  $P < 0,01$  (при сравнении групп 1—3, 2—4, а также групп 6, 7, 8 и 9 с группой 5).

возрастание скорости декремента амплитуды биоэлектрического ответа на ритмическую стимуляцию нерва ( $V$ ). Наблюдаемые изменения нервно-мышечной передачи следует рассматривать как отражение ранних нарушений структурно-функционального состояния немиелинизированных аксональных терминалей, которые могут служить наиболее чувствительным звеном инициации дегенерационного процесса. На это указывают данные о сохранении нормальной аксональной функции проведения при изменениях синаптической активности терминалей, коррелирующих с их структурной дезорганизацией [4, 5].

Развитие дегенерации преимущественно на уровне аксональных терминалей должно повлечь за собой выключение активности отдельных двигательных единиц и постепенное уменьшение размера их потенциального фонда. Это предположение находит подтверждение в регистрируемом падении максимальной амплитуды вызванных М-ответов (М<sub>д</sub>, табл. 2). Количественно этот процесс охарактеризован индексом деге-

нерации (ИД): через 24 ч после перерезки нерва ИД составлял  $36,7 \pm 7,4 \%$ , через 48 ч ИД увеличивался до  $77,5 \pm 8,2 \%$ . Значения ИД, полученные для различных временных интервалов, показывают, что дегенерационный процесс развивается с небольшим ускорением.

После токоферольного воздействия функциональные признаки ранней дегенерации (замедленное восстановление нервно-мышечного синapses, декрементная реакция на ритмическую стимуляцию, сниженная амплитуда М-ответа) не исчезали, но резко ослабевали (табл. 1, 2), свидетельствуя о задержке развития дегенерационного процесса. При этом значения ИД достоверно уменьшались: для 24 ч дегенерации на 12,5 %, для 48 ч дегенерации на 24,3 % ( $P < 0,01$ ). Возрастала также устойчивость аксональных терминалей, так как величины КПЗ, характеризующие эффективность токоферольной защиты, превышали 1, составляя 1,52 и 1,46 (см. табл. 2).

Наблюдаемый противодегенерационный эффект  $\alpha$ -токоферола, заключающийся в задержке развития ранней дегенерации, по-видимому, основан не только на его антирадикальной активности, но и на мембраностабилизирующем действии, способном предохранять аксональные терминали от фосфолипазного гидролиза, активируемого в двигательных нервных волокнах ионами кальция [6, 7]. Увеличение внутриаксональной концентрации ионов кальция выявляется в ранние сроки после перерезки у крыс седалищного нерва, причем в участках с наиболее выраженной морфологической деструкцией нервного волокна [8]. Поэтому, предотвращая повышение внутриаксональной концентрации кальция хелатирующими агентами, удастся достигнуть замедления дегенерационного процесса [9]. Сочетание антирадикального и стабилизирующего влияний  $\alpha$ -токоферола, возможно, обеспечивает нормализацию порогов кальциевого тока и процессов рециклирования фосфолипидов, нарушающихся при активации перекисного окисления липидов [10, 11], и, следовательно, повышает устойчивость синаптических терминалей, как места инициации ранних функциональных нарушений при дегенерационном процессе.

Предпосылкой для исследования растительных фенолов (рутина и кверцетина) в качестве потенциальных замедлителей нейрональной дегенерации послужили данные об их антиокислительной активности, выявленной в различных биохимических модельных системах перекисного окисления липидов [12, 13]. В частности, показано, что антиоксидантная функция флавоноидов может осуществляться как путем нейтрализации активных форм кислорода, так и в результате хелатирования ионов железа, участвующих в иницировании свободнорадикальных реакций [14].

В опытах с введением животным рутина или кверцетина практически не изменялись нормативные параметры нервно-мышечной функции. Они определялись по тестирующему М-ответу, получаемому при стимуляции интактного нерва ( $M_n$ , табл. 2), что указывало на отсутствие побочного (токсического) влияния исследуемых доз вещества. Однако действие рутина и кверцетина проявлялось у тех же животных на стороне дегенерирующего нерва необычайно сильным падением вызванных М-ответов в *m. soleus*, которое регистрировалось уже через 24 ч после перерезки нерва ( $M_d$ , табл. 2). ИД при этом превышал 80%, составляя в разных группах опытов от 88 до 99%. Через 48 ч после перерезки нерва  $M_d$ -ответы полностью выключались, чего не наблюдалось в контрольных определениях. Кроме того, рутин и кверцетин ускоряли и усиливали дегенерационные изменения функционального состояния синаптической передачи (см. табл. 1). Следовательно, полученные данные позволяют заключить, что рутин и кверцетин, в отличие от  $\alpha$ -токоферола, в условиях ранней нейрональной дегенерации не проявляли своих антиокислительных свойств, которые могли бы лежать в основе защитного противодегенерационного действия в нервно-мышечной системе. Наоборот, в исследованной модели они вместо ожидаемого ингибирования вызвали ускоре-

ние дегенерационного процесса, причем, судя по значениям ИД, более чем в 2 раза.

Обнаруженное явление ускорения ранней дегенерации двигательных нервных волокон под влиянием рутина и кверцетина представляет самостоятельный интерес, так как может служить определенным ограничением для применения флавоноидов при нервно-мышечных патологиях свободнорадикального генеза. Имеются основания предполагать, что это явление опосредуется способностью флавоноидов функционировать в качестве прооксидантов — генераторов супероксиданион-радикалов, а также гидроксильных радикалов [15, 16, 17]. Кроме того, известно, что кверцетин вызывает высвобождение ионов кальция из внутриклеточных депо [18], что, как уже отмечалось, также может быть отнесено к факторам, ускоряющим процесс дегенерации.

Таким образом, анализ экспериментальных результатов свидетельствует о существенном различии действия природных соединений с антиоксидантными свойствами на развитие ранней дегенерации двигательных нервных волокон: замедляющем (противодегенерационном)  $\alpha$ -токоферола и ускоряющем рутина и кверцетина.

### Список литературы

1. Del Maestro R. // *Acta Physiol. scand.* 1980. V. 492: Suppl. 1. P. 133.
2. Davison A., Tibbits G., Shi Z., Moon J. // *Journ. Moll. Cell. Biochem.* 1988. V. 84. N 1. P. 199.
3. Hall E. D. // *Brain Res.* 1987. V. 413. N 1. P. 175.
4. Okamoto M., Riker W. F. // *Journ. Gen. Physiol.* 1969. V. 53. N 2. P. 70.
5. Ко С.-Р. // *Journ. Physiol. (Gr. Brit.)*. 1981. V. 32. N 2. P. 627.
6. Давиашвили Е. Г., Ерин А. Н., Прилипко Л. Л. // *Биохимия*. 1986. Т. 51. № 3. С. 472.
7. Спиричев В. Б., Конь И. Я. // *Итоги науки и техники. Сер. Физиология человека и животных*. 1989. Т. 37. С. 160.
8. Mata M., Staple J., Fink D. // *Journ. Neurobiol.* 1986. V. 17. N 9. P. 449.
9. Medinacelli L. D., Church A. C. // *Exp. Neurol.* 1984. V. 84. N 2. P. 396.
10. Pellmar T. C. // *Neuroscience*. 1987. V. 25. N 2. P. 447.
11. Zaleska M., Wilson D. // *Journ. Neurochem.* 1989. V. 52. N 1. P. 255.
12. Cavallini L., Bindoli A., Silipandri N. // *Pharm. Res. Commun.* 1978. V. 10. N 8. P. 133.
13. Костюк В. А., Потапович А. И., Терещенко С. М., Афанасьев И. Б. // *Биохимия*. 1988. Т. 53. № 8. С. 1365.
14. Afanas'ev I. B., Dorozhko A. I., Brodskii A. V. et al. // *Biochem. Pharmacol.* 1989. V. 38. N 11. P. 1763.
15. Hodnick W. F., Kung F. S., Roettger W. J. et al. // *Ibid.* 1986. V. 35. N 6. P. 2345.
16. Loughton M. J., Halliwell B., Evans P. J., Hoult J. R. S. // *Ibid.* 1989. V. 38. N 17. P. 2859.
17. Костюк В. А., Потапович А. И. Кислородные радикалы в химии, биол. и мед. Рига, 1988. С. 45.
18. Bozena A., De Han K., Magotoshi M., Noriaki J. // *Biochem. Biophys. acta: Biomembranes*. 1985. V. 816. N 1. P. 9.

УДК 577.472(28)

Н. М. КРЮЧКОВА

### РОСТ И РАЗВИТИЕ ВЕТВИСТОУСЫХ РАКОВ НА ЕСТЕСТВЕННОМ ПЛАНКТОНЕ ОЗЕР РАЗНОГО ТИПА

До настоящего времени не вполне ясно, в какой степени влияет трофический фактор на продолжительность развития планктонных животных в водоеме.

По данным литературы, прослеживается связь между пищевыми условиями и продолжительностью постэмбрионального развития ( $D_n$ ) ветвистоусых раков в лабораторных условиях. С увеличением концентрации корма (протококковые водоросли) в 13—20 раз  $D_n$  животных фильтратов, по нашим данным, снижалась на 12—50 % [1, 2, 3]. Вместе с тем при одной и той же концентрации водорослей (заведомо в избытке)