

- помещениях // Новые методы гигиенического контроля за применением полимерных материалов в народном хозяйстве.— Киев, 1981.— С. 77—79.
9. Boissier J. R., Simon P. L'utilisation d'une reaction, particuliere de la souris (methode de la plaque a trous) pour l'etude des medicaments psychotropes // J. Therapie.— 1964.— 19, N 3.— P. 571.

Всесоюз. ин-т гигиены и токсикологии
пестицидов, полимеров и пласт. масс
М-ва здравоохранения СССР, Киев

Поступила 26.02.85

УДК 612.8.014.423:594.381:612.67

Электрическая активность нейронов прудовиков разного возраста и влияние на нее 2-аминопиридина и тетродотоксина

О. А. Мартыненко

Изменения, происходящие с возрастом в центральных механизмах регуляции, синаптической передаче, обмене медиаторов, аксоплазматическом токе веществ, приводят к нарушению нервной регуляции обмена и функции клеток при старении. Для анализа этих возрастных изменений большое значение могло бы иметь изучение изменения функциональных свойств отдельных нейронов и нарушения связи между электрической активностью и ионными токами.

Для анализа возрастных изменений электрической активности нейронов прудовиков целесообразно было бы провести исследования с применением специфических блокаторов калиевых и натриевых токов, что дало бы возможность иметь представление о состоянии ионных каналов нейронов при старении. Функцию таких блокаторов в наших исследованиях выполняли фармакологические препараты, избирательно подавляющие отдельные компоненты суммарного ионного тока возбудимых мембран. Цель настоящей работы — охарактеризовать электрическую активность нейронов прудовиков разного возраста и установить влияние на нее 2-аминопиридина (блокатора калиевых каналов) и тетродотоксина (блокатора натриевых каналов). Блокирующее влияние 2-аминопиридина (2-АП) на калиевый ток и тетродотоксина (ТТХ) на натриевый ток хорошо известно [3, 12].

Методика

Эксперименты были проведены на взрослых (10—12 мес) и старых (22—24 мес) моллюсках *Lymnaea stagnalis*. Электрическую активность трех нейронов малого парие- тального ганглия регистрировали на двухлучевом осциллографе С1-69 с помощью ФОР'а. Отведение мембранного потенциала покоя и потенциалов действия осуществляли стеклянными микроэлектродами по общепринятой методике [2]. Деполяризующий и гиперполяризующий постоянные токи подавали через отводящий микроэлектрод, включенный в одно из плеч мостовой схемы. В опытах использовали 2-аминопиридин¹ (от $1 \cdot 10^{-4}$ до $6 \cdot 10^{-3}$ моль/л) и тетродотоксин (от 1,5 до 50 мкмоль/л). Препараты вводили в раствор Рингера, омывающий цепочку ганглиев. Действие используемых веществ оценивали по изменению значений мембранного потенциала покоя (МПП), порога прямого раздражения для молчащих нейронов и частоты спонтанной активности для осциллирующих нейронов. Полученные данные обработаны методом прямых разностей [1].

Результаты и их обсуждение

В работе изучали 12 электрофизиологических характеристик мембраны нейронов прудовиков разного возраста. Во время старения происходят разнонаправленные их изменения. Так, на фоне неизменных значений

¹ ICN Pharmaceuticals, Inc., Plainview N. Y.

МПП ($58,8 \text{ мВ} \pm 1,1 \text{ мВ}$ у взрослых и $60,2 \text{ мВ} \pm 1,8 \text{ мВ}$ у старых), входного сопротивления (у старых) нейронов моллюсков у них в 1,5 раза повышаются пороговые значения раздражающего тока (с $0,55 \text{ А} \pm 0,09 \cdot 10^{-9} \text{ А}$ у взрослых до $0,82 \text{ А} \pm 0,01 \cdot 10^{-9} \text{ А}$ у старых). В спонтанно активных нейронах старых прудовиков почти в 2 раза замедляется частота следования потенциалов действия (ПД) — $54,7 \text{ мин}^{-1} \pm 5,9 \text{ мин}^{-1}$ у взрослых и $28,7 \text{ мин}^{-1} \pm 2,6 \text{ мин}^{-1}$ у старых. При старении моллюсков не отмечаются изменения амплитуды ПД

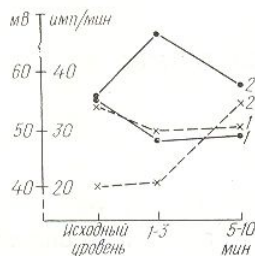
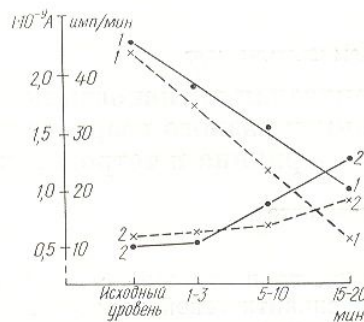


Рис. 1. МПП (1) и спонтанная импульсная активность (2) нейронов взрослых и старых прудовиков через разные промежутки времени после введения 2-аминопиридина. Сплошная линия — взрослые, пунктирная — старые моллюски.

Рис. 2. Частоты следования ПД (1) и пороги прямого раздражения (2) нейронов взрослых и старых прудовиков через разные промежутки времени после введения тетродотоксина.



и его овершута. Не обнаружены различия скорости нарастания переднего фронта ПД у взрослых и старых особей. В то же время у 22—24-месячных прудовиков достоверно снижается скорость спада заднего фронта ПД — до $9,5 \text{ мВ/мс} \pm 0,3 \text{ мВ/мс}$ по сравнению с $12 \text{ мВ/мс} \pm 0,4 \text{ мВ/мс}$ у взрослых ($P < 0,001$). Частота синаптических потенциалов и их длительность у взрослых и старых прудовиков одинакова. Итак, с возрастом достоверно повышается порог прямого раздражения, снижается скорость спада заднего фронта ПД и уменьшается его следовая гиперполяризация. МПП нейронов старых моллюсков при этом не изменяется.

Сразу же после добавления 2-АП в раствор Рингера, в который погружена цепочка окологлоточных ганглиев, происходила выраженная деполяризация нейронов. Деполяризация клеток взрослых и старых прудовиков одинакова по значениям и происходит в одно и то же время (рис. 1). Сдвиг поляризации мембраны нейрона сопровождается изменением частоты следования ПД. Однако временные характеристики изменения спонтанной импульсной активности нейронов взрослых и старых прудовиков разные. Пороговые дозы 2-АП, вызывающие описанные изменения электрических свойств нейрональной мембраны, одинаковы для 12- и 24-месячных прудовиков. Итак, 2-АП одинаковой концентрации вызывает деполяризацию и учащение спонтанной активности нейронов взрослых и старых животных, однако у старых эта реакция отстает во времени.

Добавление ТТХ в раствор Рингера, окружающий препарат цепочки окологлоточных ганглиев прудовика, приводит с первых минут к существенному изменению режима работы спонтанно активного нейрона (рис. 2). Более выраженное замедление генерации ПД нейронов под влиянием ТТХ наблюдается у старых моллюсков и составляет у них 71,9 % по сравнению с 55,3 % у взрослых. Описанные сдвиги наступают у старых животных при использовании концентраций ТТХ в 2 раза меньших ($3,1 \text{ мкмоль/л}$ для старых и $6,2 \text{ мкмоль/л}$ для взрослых). Урежение спонтанной активности, вызванное ТТХ, происходит при неизменной поляризации мембраны и сопровождается сни-

жением прямой возбудимости электровозбудимости в более поздние сроки по мере того, этот сдвиг у старых электрических характеристик ТТХ, являются обратимыми. Наблюдается только урежение частоты следования ее, свидетельствует о снижении активности натриевых каналов под влиянием ТТХ. Такие опыты по изучению влияния ТТХ на возбудимость. Такое сочетание было отмечено многими авторами о влиянии ТТХ на возбудимость моновалентных ионов. В фоне пороговых доз ТТХ, блокирование натриевых каналов приводит к вазопрессии, добавления ТТХ. Полная блокада значительных доз ТТХ приводит к гибели генерации ПД. И так, под влиянием ТТХ замедляется частота следования проведения, снижаются изменения происходят в ТТХ в дозах в 2—2,5 раза.

Как известно [10], стимуляция при изменении дификация жирокислотной возбудимости мембраны [5] возбудимости во время генерации в результате взаимодействия с мембраной. Молекулярная нервных ганглиев окологлоточных составляет 0,43 [6]. На изменение жидко-кристаллической мембраны увеличивается содержание жирных кислот [8]. Происходят подобные сдвиги в функции натриевых каналов. Изменение чувствительности обусловлено изменением входящих в состав наружной мембраны. ТТХ блокирует один канал блокирующей частично и нейроны старых прудовиков уменьшаются у них численность. Gilly и соавт. [7], выполнили исследование небольшой популяции порогов возбуждения каналов определяют свой возбуждения и играют важную роль в активности. Можно уменьшить число этих каналов, что приводит к уменьшению частоты. Характерные изменения могут повлиять на изменение описанных изменений режима работы 2-АП, определенное значение свойств мембраны, сдвиги

жением прямой возбудимости нейрона (см. рис. 2, кривые 2). Снижение электровозбудимости нейронов у старых прудовиков наблюдается в более поздние сроки по сравнению с наблюдаемой у взрослых. Кроме того, этот сдвиг у старых менее существенный. Описанные изменения электрических характеристик мембраны, вызванные пороговыми дозами ТТХ, являются обратимыми. Тот факт, что под влиянием этих доз наблюдается только урежение спонтанной активности, а не полное прекращение ее, свидетельствует, вероятно, только о частичной блокаде натриевых каналов под влиянием ТТХ. Подтверждением этого явились опыты по изучению влияния на нейрон ТТХ в сочетании с вазопрессинном. Такое сочетание было выбрано в связи с известными данными многих авторов о влиянии вазопрессина на потенциалзависимую проводимость моновалентных ионов, в частности натрия. Оказалось, что на фоне пороговых доз ТТХ, вызывающих, как предполагается, частичное блокирование натриевых каналов, нейрон сохраняет способность реагировать на вазопрессин, и характер ответа клетки такой, как и без добавления ТТХ. Полная блокада натриевых каналов происходит при значительно больших дозах ТТХ. Дозы ТТХ, вызывающие полное ингибирование генерации ПД в нейронах старых моллюсков в 2,5 раза меньше — 18,8 мкмоль/л (по сравнению со взрослыми — 50 мкмоль/л). Итак, под влиянием ТТХ в нейронах взрослых и старых прудовиков замедляется частота следования ПД или наблюдается полное блокирование проведения, снижается прямая возбудимость клетки. Полученные изменения происходят в нейронах старых особей при действии ТТХ в дозах в 2—2,5 раза меньших, чем у взрослых.

Как известно [10], степень открытия этих каналов, может модифицироваться при изменении текучести липидов микроокружения. Модификация жирокислотного состава отражается на транспорте Na через возбудимые мембраны [5]. Подавление увеличения натриевой проводимости во время генерации нервного импульса ТТХ происходит в результате взаимодействия ТТХ с холестерином мембраны, так как холестерин является частью структуры, образующей канал для натрия в мембране. Молекулярное соотношение фосфолипиды/холестерин для нервных ганглиев окологлоточного кольца прудовика обыкновенного составляет 0,43 [6]. На других объектах показано, что при старении изменяется жидко-кристаллическое состояние биологических мембран, увеличивается содержание холестерина и уменьшается — ненасыщенных жирных кислот [8]. Если в мембране моллюсков при старении происходят подобные сдвиги, то они не могут не сказываться на изменении функции натриевых каналов нейронов, связанном с возрастом. Изменение чувствительности нейронов к ТТХ в старости может быть обусловлено изменением доступности тетродотоксиновых рецепторов, входящих в состав наружного устья натриевого канала [9] или их демаскированием [11]. Если принять допущение, что одна молекула ТТХ блокирует один канал [4], факт уменьшения концентрации ТТХ, блокирующей частично или полностью натриевые каналы мембраны нейронов старых прудовиков, может, вероятно, свидетельствовать об уменьшении у них числа натриевых каналов. В последней работе Gilly и соавт. [7], выполненной на аксоне кальмара, обнаружено наличие небольшой популяции натриевых каналов, активируемых в области порога возбуждения. Авторы считают, что пороговые натриевые каналы определяют свойства мембраны аксона в области порога возбуждения и играют важную роль в поддержании ритмической электрической активности. Может быть, полученные нами факты отражают уменьшение числа этих «пороговых» натриевых каналов, что сказывается на уменьшении частоты спонтанной активности нейронов в старости. Характерные изменения биосинтеза белка при старении также могут повлиять на изменение числа ионных каналов. Вероятно, что в описанных изменениях реакций нейронов старых прудовиков, вызванных 2-АП, определенное значение имеют изменения физико-химических свойств мембраны, сдвиги в липидном составе.

Таким образом, полученные нами факты о возрастных особенностях реакции нейронов моллюсков на действие 2-АП и ТТХ могут свидетельствовать об изменении работы калиевых и натриевых каналов, в результате чего изменяются некоторые характеристики нейрона — его возбудимость, спонтанная активность, следовая гиперполяризация ПД.

ELECTRIC NEURONAL ACTIVITY OF DIFFERENT-AGE POND SNAILS AND THE 2-AMINOPYRIDINE AND TETRODOTOXIN EFFECT ON IT

O. A. Martynenko

Experiments on pond snails of different age have shown that during ageing excitability and spontaneous activity of the small parietal ganglion neurons decrease the decay rate of the action potential back front and its trace after hyperpolarization fall down. The value of the membrane resting potential in this case is unchanged. 2-aminopyridine (a blocking agent of potassium channels) in the same concentrations induces depolarization and higher frequency of spontaneous neuronal activity in adult and old pond snails but in the latter this reaction develops slowly. Sodium neuronal channels of old pond snails have much higher sensitivity as compared with neuronal channels of adult individuals. Threshold tetrodotoxin doses evoking partial or complete block of the action potentials generation are 2-2.5 times less for old mollusks than for adult ones.

Institute of Gerontology,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Kiev

1. Конунин В. А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. журн.— 1975.—47, № 6.— С. 776—790.
2. Костюк П. Г. Микроэлектродная техника.— Киев: Наук. думка, 1960.—128 с.
3. Костюк П. Г., Крышталъ О. А. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки.— М.: Наука, 1981.—208 с.
4. Чемерис Н. К. Специфичность действия тетродотоксина на нейроны моллюска // Биофизика.— 1982.—27, № 4.— С. 738—739.
5. Benilken R. M. Lipid function in excitable membranes // Front. Visual Sci. Proc. Univ. Houston College Optom. Dedic. Symp., Houston, Tex, 1977.— New York etc., 1978.— P. 63—69.
6. Bolognani L., Masserini M., Bodini P. A. et al. Lipid composition in ganglia molluscs // J. Neurochem.— 1981.—36, N 3.— P. 821—825.
7. Gilly Wm. F., Armstrong C. M. Threshold channels — a novel type of sodium channel in squid giant axon // Nature.— 1984.—309, N 5957.— P. 448—450.
8. Hegner D. Age-dependence of molecular and functional changes in biological membrane properties // Mech. Ageing and Develop.— 1980.—14, N 1/2.— P. 101—118.
9. Kao C. Y. New perspectives on the tetrodotoxin and saxitoxin receptors // Mol. Basis Drug Action. Proc. Int. Symp., Quaretero, Oct. 13—16, 1960.— New York etc., 1981.— P. 283—297.
10. Romey G., Chicheportiche R., Lazdunski M. Transition temperatures of membrane constituents in the course of erythrocyte ageing // Acta biol. et med. germ.— 1981.—40, N 6.— P. 743—746.
11. Yang J., Johansen J., Kleinheus Anna L. Procaine actions on tetrodotoxin sensitive and insensitive leech neurons // Brain Res.— 1984.—302, N 2.— P. 297—304.
12. Yeh J. L., Oxford G. S., Wu C. H., Narahashi T. Dynamics of aminopyridine block of potassium channels of squid axon membrane // Biophys. J.— 1976.—16, N 2, part 2.— P. 188—201.

Ин-т геронтологии АМН СССР, Киев

Поступила 06.06.85

Состояние калликрина и антипротеиназы при действии слаб

А. В. Кубышкин

Изменения, происходящие в организме под воздействием геомагнитных возмущений, влияющих на состояние системы функций, в частности, на состояние в организме протеолиза с участием ГМП, и поставившие основные ингибиторы.

Методика

Исследование проведено на предварительной адаптации весенний период года в ут. С.р. Бюллетеня планетарных та геофизики, значения ко умеренно возмущенному ГМ

Моделирование низкочастотных возмущений в устройстве, представляющем Гельмгольца. Используемое ма сигнала — синусоида, на та — 0,03 Гц, максимальные ных параметров ГМП обу Рс 2—4 [15] и, кроме того, частот ГМП в диапазоне импульсов [6, 15]. Параметрами измерений.

Воздействие осуществляли после одно-, двух- и исследований две группы конях естественного фона ГМП риаций (с погрешностью не гичном упомянутому выше ностью сохранялся.

Кровь забирали катет после окончания облучения внутрибрюшинно 2,5 %-ной массы животного. В сыворотке активность α_1 -ингибитора пень термо- и кислотостаби ротки связывать трипсин (В плазме крови исследовали

Предварительные результаты по большинству