

В. А. КАЛИНИН, В. А. ОПРИТОВ, Н. Н. ЕРОФЕЕВ

**СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И АНТИОКИСЛИТЕЛЬНАЯ
АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИПИДОВ КЛЕТОК ЛИСТОВОГО
ЧЕРЕШКА *MIMOSA PUDICA* НА РАЗНЫХ ФАЗАХ
ОДИНОЧНОЙ ВОЛНЫ ВОЗБУЖДЕНИЯ**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 12 I 1972)

Известно, что распространение возбуждения связано не только с электрическими явлениями, но и с комплексом структурно-метаболических изменений в поверхностных мембранах и протоплазме возбудимого субстрата (¹). Среди них наиболее важное значение имеют, по-видимому, сдвиги в системе энергообеспечения данного процесса.

С этой точки зрения существенный интерес представляют результаты, показывающие значительное увеличение содержания свободных радикалов (с.р.) при распространении возбуждения в нервных волокнах и клетках водоросли *Nitella* (^{2, 3}). Было установлено, что интенсивность радикалообразования хорошо коррелирует с физиологической активностью возбудимого объекта (⁴). По мнению авторов, радикальные реакции, протекающие в основном в липидной фракции клеток (⁵), обеспечивают быструю мобилизацию энергетических ресурсов для осуществления полного цикла возбуждения. Измерения антиокислительной активности (ао.а) нерва привели к заключению, что уровень свободнорадикальных реакций при возбуждении регулируется системой природных ингибиторов-антиоксидантов (⁶).

Для понимания роли радикальных реакций в осуществлении распространяющегося возбуждения принципиальное значение имеет изучение содержания с.р. на разных его фазах. Сложность экспериментального решения этой задачи связана с трудностью фиксации объекта на отдельных этапах распространения возбуждения. Весьма перспективным представляется использование для этой цели проводящих пучков высших растений. На данном объекте легко наблюдать одиночную волну возбуждения, характеризующуюся относительно низкой скоростью распространения и довольно растянутыми временными параметрами. При этом важно отметить, что имеющиеся результаты свидетельствуют о значительном сходстве механизмов распространения возбуждения у животных и растений. В частности, недавно показано увеличение содержания с.р. в клетках проводящих тканей растения при возбуждении (⁷), выраженное наиболее резко во фракции структурных липидов (⁸).

В качестве объекта исследований использовали листья стыдливой мимозы (*Mimosa pudica*). Одиночную волну возбуждения в листовом черешке вызывали нанесением капли ледяной воды (1°) в место сочленения подчерешков и определяли путем экстраклеточной регистрации потенциалов действия (п.д). Установка состояла из кисточковых хлорсеребряных электродов с переходными насадками на водопроводной воде, симметричного усилителя биопотенциалов УБП-02 и чернилопишущего регистратора РПЧ-02.

Содержание с.р. определяли методом привитой радикальной сополимеризации с использованием меченого мономера акриламида-С¹⁴ (АА-С¹⁴) (⁹). Введение АА-С¹⁴ в проводящие пучки черешков производили с транс-

пирационным током в течение 18 час. после того, как у листьев полностью пройдет состояние возбуждения, вызванное срезанием (*). Затем к черешку опытного листа подводили электроды и наносили раздражение. На определенной фазе возбуждения ткань черешка быстро фиксировали 96° этанолом. Фиксацию черешка контрольного листа осуществляли аналогичным способом, однако лист перед этим не получал раздражения. Чтобы устранить возможность возбуждения в момент нанесения фиксатора, листья контрольного варианта в специальной камере подвергали действию паров эфира (¹⁰). Такие листья на некоторое время теряли возбудимость.

Таблица 1

Уровень радикалообразования в различных химических фракциях клеток листового черешка *Mimosa pudica* в контроле и при возбуждении (имп/мин 1 мг сухого веса фракции)

Вариант	Протеолипиды	Свободные липиды	Белки
Контроль (без раздражения)	291 ± 16	172 ± 38	17 ± 1
Опыт (раздражение)	394 ± 24 $P > 0,01$	222 ± 14 $P > 0,05$	22 ± 2 $P > 0,05$

Поскольку по имеющимся данным (¹¹) эфирный наркоз может влиять на содержание с.р. в животной ткани, его давали в течение короткого времени (5 мин.).

Для последующего анализа использовали целые черешки, так как выделить из них проводящие пучки у мимозы не представляется возможным. Ввиду весьма значительного объема, занимаемого проводящими пучками в тканях черешка мимозы, такая методика была вполне приемлемой.

Экстрагирование липидов из тканей черешков производили по методу Фолча (¹²) с предварительной промывкой гомогената 5% ТХУ. Радиоактивность запolyмеризованного АА-С¹⁴ определяли на установке ПП-8 с торцовым счетчиком Т-25-БФЛ. Предварительные опыты показали, что наибольшее изменение уровня с.р. при возбуждении (табл. 1) наблюдается во фракции протеолипидов (протеолипидная пленка), поэтому в дальнейшей работе исследовали только эту фракцию.

Определение ао.а. протеолипидов производили методом ингибированной электрохемилюминесценции с использованием системы цитрат натрия в метаноле (¹³). Сила тока в ячейке составляла 1 ма. Свечение регистрировали квантометрической установкой с малошумящим ФЭУ-42. Расчет ао.а. производили по формуле: $\text{ао.а.} = (I_0 - I_1) / I_0$, где I_0 — стационарная интенсивность свечения в электрохимической ячейке до введения ингибитора, I_1 — минимальное значение интенсивности свечения ячейки после введения ингибитора.

Все эксперименты были проведены в 8 повторностях. Результаты обрабатывали статистически.

По артефактам на записях п.д. (рис. 1) наглядно видны начальные моменты фиксации тканей черешка мимозы для определения с.р. и ао.а. Первый из них приходится на начало спада п.д. (рис. 1а), второй на 10 мин. после нанесения раздражения (рис. 1б), когда сохраняется длительная послеэпиковая негативация, а листочки еще находятся в сложном состоянии.

Результаты, представленные на рис. 2а, отчетливо показывают, что интенсивность радикалообразования в протеолипидах ткани, зафиксированной сразу после спайки (Δ_1) выше, чем при ее фиксации на 10 мин. после нанесения раздражения (Δ_2).

В соответствии с изменениями интенсивности радикалообразования находятся изменения а.о.а. протеолипидной фракции клеток черешка мимозы (рис. 2б). Более высокой интенсивности радикалообразования на первом сроке фиксации соответствует и более высокая а.о.а. Это является дополнительным подтверждением уже показанного ранее факта, что уровень свободнорадикальных реакций в возбудимом субстрате регулируется системой природных ингибиторов-антиоксидантов (⁶).

Для понимания полученных результатов необходимо знать, каким фазам возбуждения соответствуют установленные изменения уровня

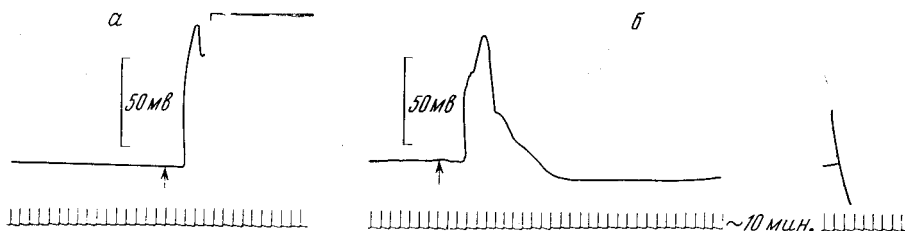


Рис. 1. Потенциалы действия листового черешка мимозы. Стрелкой обозначен момент раздражения. Отметка времени 1 сек.

с.р. и а.о.а. Специальными опытами было показано, что фиксирующее действие 96° этанола достигается на листовом черешке мимозы за 8—12 сек. Это дает основание с большой долей уверенности полагать, что первая фиксация захватывает в наших опытах фазу спада п.д., которая у мимозы составляет 5—10 сек. (¹⁴). Вторая фиксация приходится на период длительной послепиковой отрицательности, которая является отражением продолжающейся рефрактерности у мимозы (¹⁵).

Таким образом, можно полагать, что на фазе спада п.д. в протеолипидах черешка мимозы уровень радикалообразования и а.о.а. значительно выше, чем в период послепиковой негативации. Это различие должно

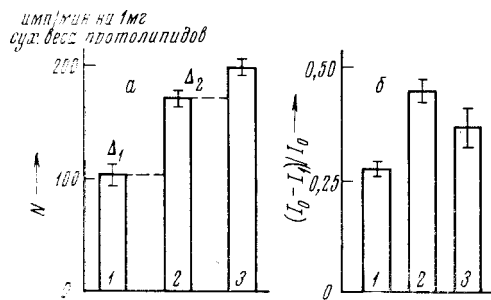


Рис. 2. Интенсивность радикалообразования (а) и антиокислительная активность (б) протеолипидов клеток листового черешка мимозы в контроле (1), на фазе спада п.д. (2) и в период длительной послепиковой негативации (3). Для а: $P < 0,01$ (2), $P < 0,001$ (3); для б: $P < 0,01$ (2), $P < 0,05$ (3). N — интенсивность радикалообразования; $(I_0 - I_1) / I_0$ — антиокислительная активность

быть, по-видимому, еще более резким, если учесть, что метод привитой радикальной сополимеризации дает суммарный результат радикалообразования за данный отрезок времени и что в наших опытах отрезок времени, приходящийся на фазу спада п.д., во много раз меньше периода длительной послепиковой негативации.

Полученные результаты находятся в определенном соответствии с предположениями, высказанными в последнее время в литературе (¹⁶, ¹⁷). По-видимому, в фазу спада п.д. в возбудимом субстрате интенсивно протекают процессы радикального характера, возможно, направленные на быстрое восстановление проводящей способности. Локализация этих процессов в протеолипидной фракции свидетельствует о том, что они тесно связаны с мембранными структурами возбудимых клеток.

Снижение интенсивности радикалообразования в период послепиковой негативации обусловлено по всей вероятности тем, что восстановление

исходного состояния возбудимого субстрата обеспечивается на данном этапе в основном более медленно протекающими энергодающими реакциями.

В заключение необходимо отметить, что при оценке интенсивности радикалообразования на фазе спада п.д. мы исходили из существующего предположения, что процессы радикалообразования на фазе подъема спайка по интенсивности мало отличаются от исходного, контрольного уровня (¹⁶). Однако это предположение требует дополнительного экспериментального подтверждения, что пока связано со значительными трудностями методического порядка.

Полученные в данной работе результаты, как нам представляется, проливают свет на пока еще малоизученный вопрос о динамике энергетических изменений в ходе протекания одиночной волны возбуждения.

В заключение выражаем благодарность О. Р. Кольс, И. М. Лимаренко и Э. И. Выскребенцевой за ценные замечания, высказанные ими при обсуждении данной работы.

Горьковский государственный университет
им. Н. И. Лобачевского

Поступило
12 I 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Руководство по цитологии, 2. Изд. АН СССР, 1966. ² О. Р. Кольс, И. М. Лимаренко, Б. Н. Тарусов, ДАН, 167, № 4, 956 (1966). ³ Б. Н. Тарусов, Ю. П. Козлов и др., Сборн. Свободнорадикальные процессы в биологических системах, М., 1966. ⁴ Ю. П. Козлов, О. Р. Кольс и др., Сборн. Физико-химические основы авторегуляции в клетках, М., 1968. ⁵ И. М. Лимаренко, С. П. Волкова и др., ДАН, 185, № 5, 1164 (1969). ⁶ Г. В. Коссова, О. Р. Кольс и др., Сборн. Физико-химические аспекты возбуждения и проведения, М., 1970. ⁷ В. А. Калинин, В. А. Оприлов, В. А. Худяков, Физиол. раст., 17, в. 2, 309 (1970). ⁸ В. А. Оприлов, В. А. Калинин, Физиол. раст., 17, в. 4, 769 (1970). ⁹ Ю. П. Козлов, Привитая сополимеризация как метод определения свободных радикалов в биологических системах, М., 1970. ¹⁰ Н. Toriguama, Citologia, 27, № 4, 431 (1962). ¹¹ И. М. Лимаренко, Сборн. Физико-химические аспекты возбуждения и проведения, М., 1970. ¹² М. И. Прохоров, З. И. Тупикова, Большой практикум по углеводному и липидному обмену, Л., 1965. ¹³ Ю. М. Петрусевич, Я. С. Славинский, Биофизика, 14, в. 4, 756 (1969). ¹⁴ K. Umrath, Handb. Pflanzenphysiol., 11, Berlin, 1956. ¹⁵ Я. Буреш, М. Петрань, И. Захар, Электрофизиологические методы исследования, М., 1962. ¹⁶ Л. А. Пиружян, В. М. Аристархов, Изв. АН СССР, сер. биол., № 5, 697 (1971). ¹⁷ Г. Е. Федоров, Ю. Е. Вагин и др., Сборн. Физико-химические аспекты возбуждения и проведения, М., 1970.