



Біоелектрична активність волокон вентрального корінця спинного мозку в умовах експериментальної гіпоандрогенемії

О.Г. РОДИНСЬКИЙ, С.С. ТКАЧЕНКО, І.О. МАРАЖА

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», Дніпро, Україна

E-mail: tkachenkoss@i.ua

Тестостерон має нейропротекторний ефект у нервових волокнах, і дефіцит тестостерону може призводити до різних форм дегенерації нервів, що може, в кінцевому результаті, призводити навіть до морфологічних змін. [1]. Інший розлад, який може бути викликаний порушенням андрогенної чутливості клітин – м'язова атрофія хребта, що характеризується нервово-м'язовими розладами та проксимальною м'язовою слабкістю через дегенерацію мотонейронів. [2]

З дією тестостерону також пов'язане збільшення розміру соматонів, зростання нейритів; андрогени зменшують ступінь пошкодження спинного мозку (СМ) *in vitro* [3].

Праць, що описують вплив гіпоандрогенемії на функціонування нервових волокон небагато, а досліджень, що характеризують зміни біоелектричної активності, особливо у віддалені строки, майже немає. Метою нашого дослідження було проаналізувати функціональний стан провідникової частини еферентної ланки рефлексорної дуги СМ за умов експериментальної гіпоандрогенемії (ЕГ) через 4 місяці від початку її моделювання [4,5].

Матеріали й методи дослідження. Дослідження виконане на щурах-самцях лінії Wistar віком 5–6 міс. та масою тіла 180–260 г, що були поділені на піддослідну ($n=19$) та контрольну ($n=14$) групи. Модель було створено шляхом двобічної орхектомії. Обидві групи тварин утримували у стандартних умовах виварію ($t^{\circ} 22\pm 2^{\circ}\text{C}$, світлий/темний цикл – 12/12 год) на стандартній дієті протягом 120 днів, після чого тварини були задіяні у гострому експерименті. З метою наркотизації вводили інтраперитонеально тіопентал натрію («Sigma», США) в дозі 50 мг/кг маси. Реєстрацію викликаних потенціалів дії (ПД) проводили за допомогою біполярних електродів, накладених на периферичну ділянку сідничного нерву при стимуляції іпсилатерального вентрального корінця (ВК) L_5 імпульсами тривалістю 0,3 мс та силою від 1 до 5 порогів. Аналізували поріг збудження (П), хроніксію, тривалість латентного періоду (ЛП), амплітуду та тривалість ПД. Залучення різнопорогових нервових волокон у процес збудження досліджували шляхом нанесення стимулів від 1,1 П до 2 П. Аналізуючи відповідь нервових волокон на нанесення парних стимулів з інтервалом слідування від 2 до 20 мс, досліджували зміни рефрактерності [4,5]. Статистичну обробку матеріалів дослідження проводили з використанням методів біометричного аналізу, реалізованих у ліцензійних пакетах EXCEL-2003® і STATISTICA 6.1 (StatSoft Inc., Serial No. AGAR909E415822FA). Для обробки

отриманих результатів використовували розрахунок показників наочності у відсотках, середню арифметичну та похибку середньої арифметичної ($M \pm m$). Вірогідність оцінювали за допомогою методів параметричної статистики (критерій t Стьюдента). Зміни показників вважали вірогідними при $p < 0,05$.

Усі експериментальні процедури були виконані відповідно до Європейської директиви Ради співтовариств від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС).

Результати дослідження та їх обговорення. У тварин контрольної групи середнє значення порогу збудження дорівнювало $0,014 \pm 0,0012$ мА ($n=12$), тоді як у тварин з експериментальною гіпоандрогенемією збільшувалося до $0,093 \pm 0,0007$ мА ($n=19$), що становило $664,29 \pm 0,75$ % порівняно з контрольною групою ($p < 0,001$), параметри якої в цьому та подальших досліджах були нами прийняті за 100 %. Хронаксія у контрольних щурів дорівнювала $69,67 \pm 1,37$ мкс ($n=12$). У тварин з гіпоандрогенемією вона зменшувалася до $71,90 \pm 1,94$ % ($p < 0,001$) та дорівнювала $45,42 \pm 0,88$ мкс ($n=19$).

Латентний період виникнення відповіді у кастрованих тварин збільшувався всередньому на $72,73 \pm 2,63$ % ($p < 0,001$). Загальна тривалість викликанної відповіді зростала на $25,53 \pm 1,13$ % ($p < 0,001$). Амплітуда сумарного ПД ВК достовірно зростала на $76,42 \pm 5,88$ % ($p < 0,001$) (див. таблицю).

Параметри потенціалу дії вентрального корінця спинного мозку в умовах експериментальної гіпоандрогенемії, $M \pm m$

Показник	Контроль	Тварини з ЕГ
Латентний період	$0,44 \pm 0,01$ мс ($n=12$)	$0,76 \pm 0,02$ мс ($n=19$) ***
Амплітуда	$2,12 \pm 0,2$ мВ ($n=12$)	$3,74 \pm 0,22$ мВ ($n=19$) ***
Загальна тривалість	$1,41 \pm 0,03$ мс ($n=12$)	$1,77 \pm 0,02$ мс ($n=19$) ***

Примітка: рівень вірогідності *** – $p < 0,001$

При аналізі динаміки залучення у процес збудження різнопорогових нервових волокон шляхом використання методу нанесення на сідничний нерв поодиноких стимулів зростаючої інтенсивності (від 1,1 до 2 П) крива залежності для тварин з піддослідної групи демонструвала більш швидке зростання амплітуди викликаного сумарного ПД (рис. 1).

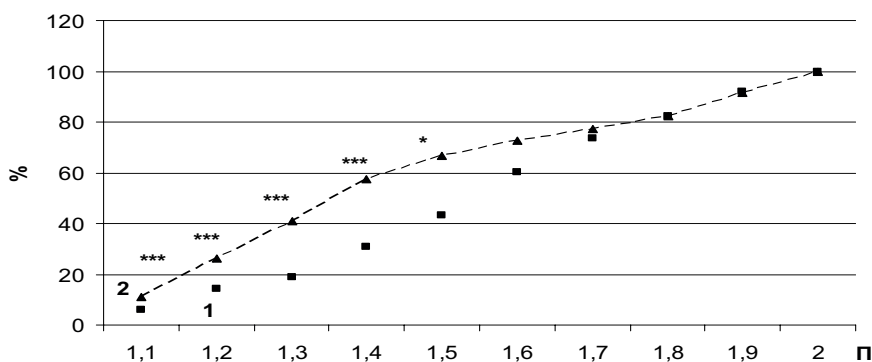


Рис. 1 Зміна амплітуди ПД ВК у відповідь на стимуляцію зростаючої інтенсивності: 1 – контрольні тварини; 2 – тварини з ЕГ; рівень вірогідності * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ порівняно з відповідними значеннями контрольної групи

Помітні та достовірні ($p < 0,001$) зміни спостерігалися при нанесенні стимулів від 1,1 до 1,6 П, що може свідчити про збільшення збудливості низько- та середньопорогових нервових волокон у складі вентрального корінця.

Можливо, ці відхилення були викликані зміною ультраструктури аксонів мотонейронів переднього рогу СМ [6,7], з яких саме і складається вен-

тральний корінець, а також порушенням процесу мієлінізації [7,8] – явищ, характерних для стану тривалої гіпоандрогенемії.

При вивченні лабільності нервових волокон аналіз отриманих даних виявив практично повне відновлення амплітуди викликаної відповіді на тестуючий стимул у тварин з орхектомією на інтервалах від 2 мс до 4 мс, тоді як у тварин контрольної групи спостерігалось виражене пригнічення амплітуди другого ПД ВК. Достовірні відмінності спостерігалися при інтервалах між кондиціонуючим та тестуючим стимулами від 2 мс до 9 мс (рис. 2).

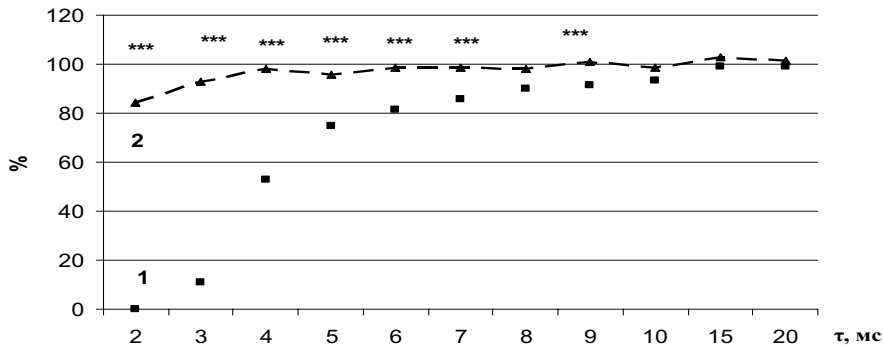


Рис. 2 Зміна амплітуди відповіді волокон ВК на тестуючий стимул: 1 – контрольні тварини; 2 – тварини з ЕГ; рівень вірогідності *** – $p < 0,001$ порівняно з відповідними значеннями контрольної групи

Відомо, що андрогени виступають важливими нейротрофічними факторами розвитку м'язів; втрата нормальної функції андрогенними рецепторами, наприклад виникнення полі-AR, сприяє нейродегенерації [9]. Стероїдні гормони взаємодіють з нейротрофічними факторами у процесах регулювання розростання нейритів та нейропротекції. Так, андрогени взаємодіють з BDNF, регулюючи процеси апоптозу, регулюють експресію BDNF і його рецептора *trkB* в спінальних мотонейронах. [10,11]

Деякі дані свідчать про те, що нейропротекція андрогенів може бути опосередкована послабшенням окисного стресу [12].

Також виявлено зворотню кореляцію між зниженням рівня тестостерону і збільшенням активності ферменту NADPH-діафори, надлишок якого веде до підвищення синтезу супероксид-аніону, стимулюючого окислювальний стрес, що в свою чергу може викликати апоптоз нейронів [13].

Отже, нестача андрогенів, особливо тривало існуюча, може призвести до протилежних наслідків, а саме до нейродегенерації, спричиненої як посиленням впливу вільних радикалів на нервові волокна і зниженням ефективності дії на нейрити нейротрофічних факторів, так і посиленням процесу апоптозу мотонейронів. Вище перелічене може пояснити зниження збудливості нервових волокон сідничного нерва, що ми спостерігали у щурів з гіпоандрогенемією. Оскільки нейродегенерація спричиняє й морфологічні зміни у цитоплазматичній мембрані аксонів, це може бути причиною не лише збільшення порогу збудження сідничного нерву, а й достовірного збільшення тривалості латентного періоду відповіді.

Гіпоандрогенний стан може, навпаки, супроводжуватись зниженням концентрації кальцію в цитоплазмі [14,15], що може призвести до збільшення трансмембранної різниці потенціалу, а отже, й до зниження збудливості нервового волокна.

Андрогени можуть стимулювати розширення, розгалуження аксонів та аксональне радіальне зростання [16]. Є припущення, що тестостерон, індукуючи фосфорилування нейрофіламентів, може також частково відповідати за кількість нейрофіламентів аксонів, що піддаються переносу,

і при цьому – за обіг цитоскелетної матриці, відповідальної за радіальне зростання аксонів [7]. Згідно з існуючими дослідженнями, кастрація призводить до значного збільшення площі поперекового перерізу аксонів порівняно з даними показником у тварин контрольної групи, оброблених тестостероном. Якісно спостерігаються ознаки дегенерації нервів, особливо мієліну, дегенерація оболонки; спостерігалася тенденція зниження щільності розташування волокон у нервах [1].

Відомо про сильний ремієлінізуючий ефект тестостерону. Так, застосування тестостерону з лікувальною метою призводило як до формування нового мієліну, так і до реверсу пошкодження мієлінової оболонки при хронічних демієлінізуючих процесах, викликаних тривалим застосуванням купрizonу – речовини, токсичної для олігодендроцитів. Дана модель стійкої демієлінізації виключає спонтанне відновлення мієліну [8]. Ремієлінізуючий ефект зумовлений взаємодією з рецепторами для андрогенів, оскільки при застосуванні тестостерону у мишей з деактивованими андрогенними рецепторами та купрizonовою моделлю демієлінізації відновлення мієліну не відбувалося [8].

Нестача андрогенів може призводити до порушення нормального відновлення мієлінової оболонки нервових волокон, зокрема аксонів мотонейронів, а при тривало існуючому гострому дефіциті, як то після хірургічної кастрації, може спричинити демієлінізацію нейритів. Пошкодження мієлінової оболонки може призвести до виникнення ефатичного ефекту – поширення збудження на паралельно розташовані нервові волокна (генералізація збудження) та одночасного залучення до збудження більш високопорогових волокон при активації лише низькопорогових [17,18], що спостерігалось нами при подразненні сідничного нерва тварин з гіпоандрогенемією стимулами зростаючої інтенсивності (рис. 1).

Подразнення нерва подвійними імпульсами максимальної інтенсивності виявило суттєве збільшення лабільності у тварин з дефіцитом тестостерону (рис. 2). Можливо, це пов'язане зі зниженням концентрації внутрішньоклітинного кальцію та, як наслідок, зі збільшенням значення вихідного трансмембранного потенціалу спокою. Таким чином, у період відновлення трансмембранного іонного градієнту після генерації потенціалу дії у відповідь на кондиціонуючий стимул, нервові волокна, що знаходились в умовах андрогенемії, досягали стану супрамаксимальної збудливості раніше, ніж волокна тварин контрольної групи.

Крім цього, зниження щільності розташування волокон у нервах кастрованих тварин [1] збільшує об'єм міжклітинної рідини, як ресурс іонів кальцію для відновлення трансмембранного іонного градієнту, що також може вплинути на швидкість відновлення збудливості нервового волокна.

Таким чином, тривало існуюча гіпоандрогенемія призводить до дещо парадоксальних змін у функціонуванні еферентних волокон сідничного нерва, підвищуючи їх біоелектричну активність, насамперед за рахунок високопорогових волокон, на фоні вираженого зниження збудливості та збільшення латентності. Проте, незважаючи на погіршення часових параметрів викликаної відповіді, при дослідженні волокон, позбавлених модулюючого впливу тестостерону, спостерігалось значне збільшення лабільності, що, можливо, пов'язано зі змінами трансмембранного іонного градієнту [14] та морфологічними змінами аксонів мотонейронів [1].

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

ПОСИЛАННЯ

1. *Armagan A, Hatsushi K, Toselli P.* The effects of testosterone deficiency on the structural integrity of the penile dorsal nerve in the rat. *International Journal of Impotence Research.* 2008;20:73–8.
2. *Narayanan R, Mohler ML, Bohl CE.* Selective androgen receptor modulators in pre-clinical and clinical development. *The Open Access Journal of the Nuclear Receptor Signaling Atlas.* 2008;6:1–26.

3. Biatek M, Zaremba P, Borowicz KK. Neuroprotective role of testosterone in the nervous system. *Pol. J. Pharmacol.* 2004;56:509–18.
4. Родинський ОГ, Ткаченко СС, Гузь ЛВ. Викликана біоелектрична активність еферентних волокон сідничного нерва білих щурів за умов експериментальної менопаузи. Медичні перспективи. 2016;106(1):167–71 (*Rodinsky OG, Tkachenko SS, Guz LV The bioelectric activity of efferent fibers of the sciatic nerve of white rats under experimental menopause is induced. Medical perspectives. 2016; 106 (1): 167–71*)
5. Родинський ОГ, Ткаченко СС, Зинів'єва ОГ. Зміна збудливості рухових волокон сідничного нерва білих щурів за умов тривалої гіпоестрогенемії. Український журнал медицини, біології та спорту. 2015;2:169–71 (*Rodinsky OG, Tkachenko SS, Zinovieva OG Changes in the excitability of the motor fibers of the sciatic nerve of white rats under conditions of prolonged hypoestrogenemia. Ukrainian Journal of Medicine, Biology and Sport. 2015;2:169–71*).
6. Fargo KN, Galbiati M, Foecking EM. Androgen regulation of axon growth and neurite extension in motoneurons. *Horm Behav.* 2008 May;53(5):716–28.
7. Pesaresi M, Soon-Shiong R, French L. Axon diameter and axonal transport: In vivo and in vitro effects of androgens. *Neuroimage.* 2015 July 15;115:191–201.
8. Hussain R, Ghomari AM, Bielecki B. The neural androgen receptor: a therapeutic target for myelin repair in chronic demyelination. *Brain a journal of neurology.* 2013;136:132–46.
9. Beitel LK, Alvarado C, Mokhtar S. Mechanisms mediating spinal and bulbar muscular atrophy: investigations into polyglutamine-expanded androgen receptor function and dysfunction. *Frontiers in Neurology.* 2013;53(4):1–16.
10. Verhovshek T, Rudolph LM, Sengelaub DR. BDNF and androgen interactions in spinal neuromuscular systems. *Neuroscience.* 2013 June 3;239:103–14.
11. Hammond J, Le Q, Goodyer C. Testosterone-mediated neuroprotection through the androgen receptor in human primary neurons. *Journal of Neurochemistry.* 2001;77:1319–26
12. Pike CJ, Carroll JC, Rosario ER. Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol.* 2009 July;30(2):239–58.
13. Дмитрієва ОА, Шерстюк БВ. Влияние стресс-индуцированного снижения уровня тестостерона на гистохимические изменения половых органов крыс. *Pacific Medical Journal.* 2007;3:55–7 (*Dmitrieva OA, Sherstyuk BV. The effect of stress-induced decrease in testosterone levels on histochemical changes in rat genital organs. Pacific Medical Journal. 2007;3:55–7*).
14. Foradori CD, Weiser MJ, Handa RJ. Non-genomic Actions of Androgens. *Front Neuroendocrinol.* 2008 May;29(2):169–81.
15. Sarkey S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Classical androgen receptors in non-classical sites in the brain. *Horm Behav.* 2008 May;53(5):753–64.
16. Estrada M, Varshney A, Ehrlich BE. Elevated testosterone induces apoptosis in neuronal cells. *J. Biological chemistry.* 2006;281(35):25492–501.
17. Макий СА, Родинський ОГ, Мозгунов ОВ. Ефаптичне збудження в нервовій системі та умови його виникнення при патологічних станах. Медичні перспективи. 2003;8(1):37–42 (*Makiy EA, Rodinsky OG, Mozgunov OV. Ephaptic excitation in the nervous system and conditions of its occurrence in pathological conditions. Medical perspectives. 2003;8(1):37–42*).
18. Макий Е.А., Неруш П.А., Родинский А.Г., Мякушко В.А. Характеристика вызванных ответов афферентных и эфферентных волокон седалищного нерва у крыс в условиях экспериментального гипертиреоза. *Нейрофизиология.* 2002;34(1):51–9 (*Makiy E.A., Nerush P.A., Rodinsky A.G. Myakushko VA. Characteristic of evoked responses of afferent and efferent sciatic nerve fibers in rats under experimental hyperthyroidism. Neurophysiology. 2002;34(1):51–9*).

Стаття надійшла до редколегії 13.02.2020

RESEARCH ARTICLES

The bioelectric activity of the efferent sciatic nerve fibers in conditions of experimental hypoandrogenemy

O.G. RODINSKY, S.S. TKACHENKO, I.O. MARAZHA

Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine,
Dnipropetrovsk, Ukraine

E-mail: tkachenkoss@i.ua

Testosterone deficiency can lead to various forms of nerve degeneration which can cause even morphological changes. The signs of nerve degeneration are observed, especially myelin, degeneration of the membrane which undoubtedly entails a violation of the conductive function.

The purpose of this study was to investigate changes in the excitability of motor nerve fibers in conditions of prolonged androgen deficiency and the modification of the evoked response parameters. The study was performed on male Wistar rats of 5-6 months old and weighing 180-260 grams, they were divided into experimental (n = 19) and control (n = 14) groups. The

model was created by bilateral orchectomy. Both groups of animals were kept under standard vivarium conditions ($t \text{ } ^\circ 22 \pm 2 \text{ } ^\circ \text{C}$, light / dark cycle – 12/12 h) on a standard diet for 120 days, after which the animals were engaged in an acute experiment. The evoked potentials of action were recorded using bipolar electrodes superimposed on the peripheral section of the sciatic nerve when stimulated with ipsilateral ventral root L5 by pulses of 0.3 ms duration and force from 1 to 5 thresholds. Excitation threshold, chronoxia, latency period, amplitude and response duration were analyzed. The involvement of different threshold nerve fibers in the excitation process was investigated by applying stimuli from 1.1 to 2 thresholds. While analyzing the response of nerve fibers to the application of paired stimuli with an interval of 2 to 20 ms, changes in refractivity were investigated. Statistical processing of the study materials was performed by using biometric analysis methods implemented in EXCEL-2003 and STATISTICA 6.1 (StatSoft Inc., Serial No. AGAR909E415822FA) licensed packages. For calculating the obtained results, the calculation of visibility as a percentage, arithmetic mean and error of the mean ($M \pm m$) was used. Probability was estimated by using parametric statistics methods (Student's t-test). Changes in indicators were considered probable at $p < 0.05$. The threshold of occurrence of the total response of nerve fibers was $664.29 \pm 0.75\%$, chronoxia $71.90 \pm 1.94\%$, latency period $172.73 \pm 2.63\%$, total duration $125.53 \pm 1.13\%$ as compared to the control group. The response amplitude increased by $76.42 \pm 5.88\%$ ($p < 0.001$). When applied to the sciatic nerve of a single stimulus of increased intensity, the dependence curve for animals from the experimental group showed a faster increase in the amplitude of the evoked total action potential. Significant changes ($p < 0.001$) were observed when applying stimuli from 1.1 to 1.6 P, which may indicate an increase in the excitability of low- and mid-threshold nerve fibers within the ventral root. When paired stimuli were used, the response amplitude response to the test stimulus in animals with ovariectomy was observed at intervals of 2 to 4 ms, whereas in the control group it occurred only at an interval of 20 ms, indicating a significant shortening of the refractory neurite period. Thus, the long-existing hypoandrogenemia has a considerable, though paradoxical effect on the functioning of efferent somatic nerve fibers, causing a decrease in their excitability against the background of a significant increase in lability as well as an increase in the amplitude and duration of the evoked response.

Key words: castration, testosterone, nerve, excitability.