

**УДК 612.014.46:612.821:615.214:547.78**

**ВЛИЯНИЕ 1,5-БЕНЗОДИАЗЕПИНОНА-2 И ЕГО ПРОИЗВОДНОГО  
3-ФОРМИЛ-1,5-БЕНЗОДИАЗЕПИНОНА-2 НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ  
АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ МОЛЮСКА *HELIX ALBESCENS ROSSM***

*Епишкин И.В., Коренюк И.И., Гамма Т.В.*

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: epishkn@rambler.ru*

Исследовано влияние 1,5-бензодиазепинона-2 и одного его производного (3-формил-1,5-бензодиазепинона-2) на внутриклеточно отводимые потенциалы нейронов *Helix albescens Rossm.* Установлено, что эти соединения у всех исследованных нейронов однонаправленно и неселективно гиперполяризуют мембрану, снижают частоту генерации импульсов и своеобразно изменяют скорости трансмембранных ионных токов. Выраженность эффектов обоих соединений зависит от их концентрации, и у производного 3-формил-1,5-бензодиазепинона-2 она превосходит таковую 1,5-бензодиазепинона-2. В диапазоне концентраций  $10^{-5}$ - $10^{-3}$  М эффекты данных соединений носят обратимый характер, а в концентрации  $10^{-2}$  М у всех исследованных нейронов необратимо блокируются механизмы генерации потенциалов действия, однако сохраняется способность поддержания мембранного потенциала.

**Ключевые слова:** бензодиазепины, нейрон, электрическая активность.

**ВВЕДЕНИЕ**

Бензодиазепины относятся к так называемым малым транквилизаторам, которые отличаются высокой эффективностью, безопасностью, низкой токсичностью и широким спектром психофармакологического действия: анксиолитическим, противосудорожным, гипнотическим, миорелаксирующим, амнестическим и это соответствует разнообразным областям их клинического применения [1–4]. В настоящее время продолжается синтез новых производных из класса бензодиазепинов. Так синтезирован ряд производных 1,5-бензодиазепина, и среди них выявлены транквилизаторы [5, 6], анальгетики [7], седативные препараты [8], противомикробные [9], противоопухолевые [10], антидиабетические средства [11]. Следует отметить, что на кафедре органической химии ТНУ им. В.И. Вернадского в последнее время также получены несколько новых производных 1,5-бензодиазепинона-2, требующие исследования их биологической активности. В связи с этим, целью данной работы явилось выяснение наличия, направленности и характера нейротропного действия разных концентраций 1,5-бензодиазепинона-2 (1,5-БД) и его производного 3-формил-1,5-бензодиазепинона-2 (3-формил-1,5-БД).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование нейротропной активности 1,5-БД и 3-формил-1,5-БД в концентрациях  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  и  $10^{-2}$  М проведено с помощью методики внутриклеточного отведения биопотенциалов и последующего электрического дифференцирования потенциалов действия (ПД) у идентифицированных и неидентифицированных нейронов правого париетального (ППаГ,  $n = 36$ ) и висцерального ганглиев (ВГ,  $n = 41$ ) *Helix albescens* Rossm. Более подробно методика описана ранее [12]. Нейроны идентифицировали по морфологическим и электрофизиологическим критериям [13, 14]. Регистрацию и обработку потенциалов выполняли с помощью компьютерной программы [15]. Схема эксперимента была следующей: вначале регистрировали (1 мин) фоновую активность нейрона (контроль), затем – в течение 5 мин экспозиции тестируемых веществ и, в случае наличия активности, производили запись (1-2 мин) после 20-30 мин отмывания. Анализ подвергали усредненные значения: мембранного потенциала (МП), амплитуды и времени развития ПД, частоты их генерации (ЧГИ), а также амплитудно-временные показатели гиперполяризации. Полученные данные обработаны статистически с использованием непараметрического критерия Вилкоксона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обнаружено, что оба тестируемых вещества обладают угнетающими нейротропными эффектами, которые начинают проявляться при концентрации  $10^{-5}$  М (порог).

**Эффекты 1,5-БД.** При экспозиции 1,5-БД в концентрации  $10^{-4}$  М у всех исследованных нейронов ППаГ и ВГ, то есть неселективно, наблюдалось увеличение на 3-5 мВ МП и снижение частоты следования ПД и их амплитуды. Типичный пример такой реакции представлен на рис. 1, А. Так, если в фоне амплитуда ПД составляла в среднем  $65,8 \pm 2,0$  мВ, то при экспозиции соединения она снижалась до  $55,5 \pm 0,7$  мВ ( $P = 0,01$ ). При этом снижалось и время развития ПД (см. табл. 1). После отмывания вещества исследуемые показатели электрической активности нейронов возвращались к фоновым. При концентрации 1,5-БД  $10^{-3}$  М на фоне незначительных флуктуаций МП частота следования ПД и их амплитуда достоверно снижались (рис.1, Б; табл. 1). После отмывания вещества МП и импульсная активность нейронов также восстанавливались до уровня фона. Реакция нейронов на приложение 1,5-БД в концентрации  $10^{-2}$  М выражалась в том, что в течение первых 40 с на фоне начальной гиперполяризации ( $4,3 \pm 1,1$  мВ) внезапно увеличивалась возбудимость нейронов, о чем свидетельствует повышение в 2-3 раза ЧГИ (см. рис. 1, В, В'). Затем возник повторный скачок МП в сторону гиперполяризации (на  $11,8 \pm 2,2$  мВ,  $P \leq 0,05$ ) и происходила в начале частичная и далее полная редукция ПД. В последующие 150-250 с экспозиции наблюдалась медленное уменьшение гиперполяризации, однако уровень МП не возвращался к исходному. После отмывания МП постепенно возвращался к исходному уровню ( $-50 \dots -60$  мВ), однако импульсная активность нейронов не возобновлялась.

Анализ скоростей суммарных входящих и выходящих ионных токов показал, что при экспозиции 1,5-БД в концентрациях  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  М происходит, в первую очередь, снижение скорости нарастания выходящих ионных токов, а при концентрации  $10^{-2}$  М в равной степени угнетаются как входящие, так и выходящие ионные токи (табл. 1).

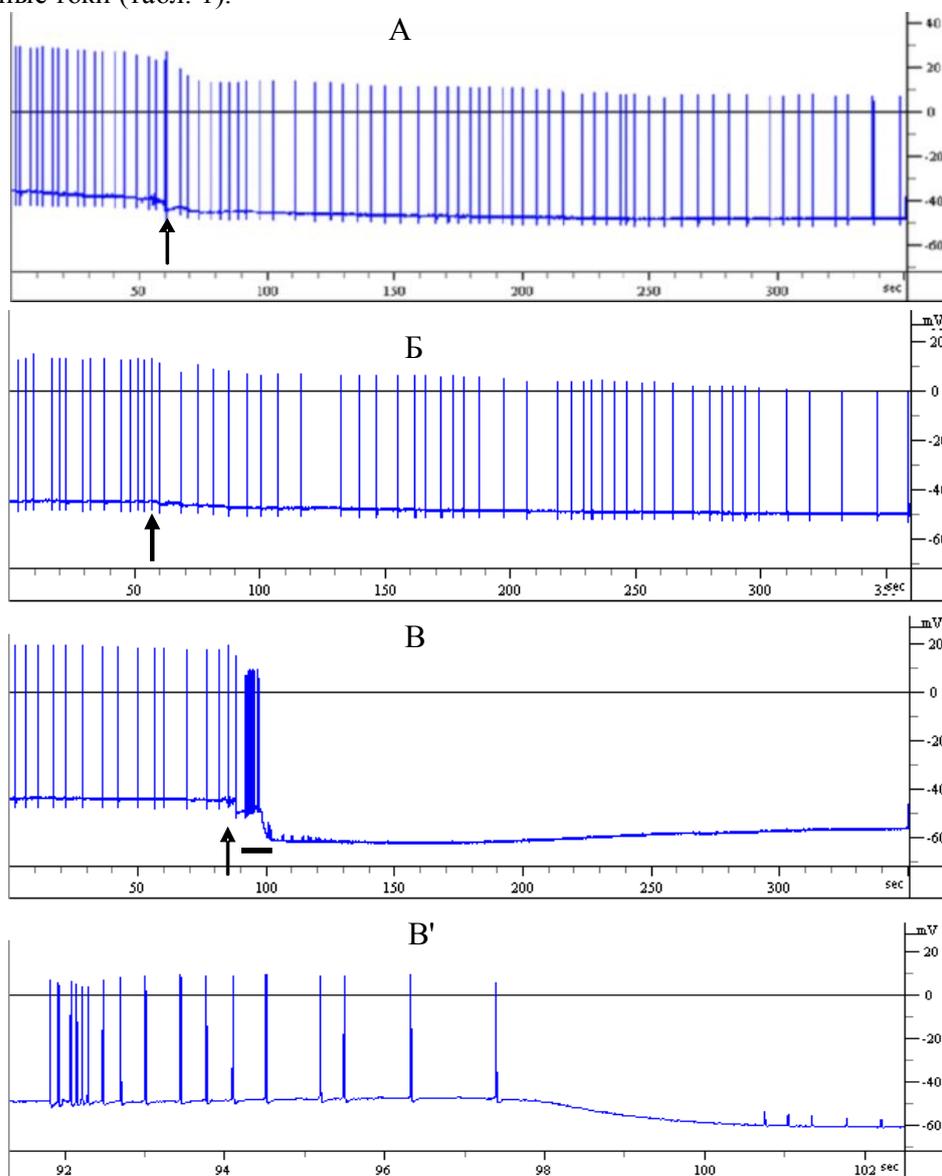


Рис. 1. Влияние 1,5-бензодиазепинона-2 на в концентрациях  $10^{-4}$  (А),  $10^{-3}$  (Б) и  $10^{-2}$  М (В) на электрическую активность нейрона ППа1. На В' – подчеркнутый на В фрагмент. Стрелкой обозначен момент аппликации.

Таким образом, нами установлено, что 1,5-БД обладает нейротропным эффектом, причем его выраженность у каждого нейрона четко зависит от применяемой концентрации. Следует еще раз отметить, что при концентрации  $10^{-2}$  М 1,5-БД наблюдалась глубокая гиперполяризация мембраны и полная редукция ПД (см. рис. 1). Следовательно, 1,5-БД в этой концентрации оказывал токсическое действие на электрогенез нейронов, но не летальное, поскольку при этом сохраняется МП. Мы полагаем, что 1,5-БД при такой концентрации прочно связывается с рецепторами мембраны нейронов и не подвергается метаболическим превращениям.

**Таблица 1.**  
**Влияние 1,5-БД на параметры потенциалов и скорость трансмембранных ионных токов нейронов ППаГ**

Концентрация вещества	Амплитуда ПД, мВ	Время развития ПД, мс	Скорость ионных токов, В/с	
			входящих	выходящих
Фон	65,8 ± 2,0	12,1 ± 1,0	13,4 ± 1,2	13,6 ± 1,2
$10^{-4}$ М	55,5 ± 0,7*	10,3 ± 0,4	14,2 ± 0,4	11,7 ± 0,3
$10^{-3}$ М	43,4 ± 3,6**	8,8 ± 1,0	13,1 ± 0,8	10,6 ± 1,3*
$10^{-2}$ М в течение первых 40 с	2,1 ± 0,6**	15,7 ± 1,8 Б	0,9 ± 0,2**	0,6 ± 0,1**

*Примечание:* \* - достоверность различий фоновых показателей от таковых при аппликации вещества, \* -  $P \leq 0,01$ ; \*\* - при  $P \leq 0,005$ .

**Влияние 3-формил-1,5-БД.** На рис. 2 показан типичный пример влияния 3-формил-1,5-БД в концентрациях  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  и  $10^{-2}$  М на электрическую активность неидентифицированного нейрона ВГ. В общем, характер реакции на приложение разных концентраций этого производного 1,5-БД был аналогичен базовому веществу.

Отличительной особенностью проявления нейротропного эффекта этого производного можно считать некоторую селективность и выраженность его действия на электрическую активность разных нейронов (см. рис. 2). Так у большинства (72 %) исследованных нейронов наблюдалось прекращение генерации ПД продолжительностью 20-25 с, а затем при неизменном уровне МП возобновлялась генерация полноценных ПД (см. рис. 2, А). В концентрации  $10^{-3}$  М эффекты 3-формил-1,5-БД сразу после аппликации выражались в незначительном увеличении уровня МП (на 5-7 мВ) и в 2-3-х кратном увеличении ЧГИ. После кратковременной вспышки импульсов наступала 20-25 секундная пауза с последующим внезапным возобновлением генерации полноценных ПД (см. рис. 2, Б). При экспозиции 3-формил-1,5-БД в концентрации  $10^{-2}$  М время наступления тормозной паузы и ее продолжительность существенно уменьшились; появлялись редуцированные и «полноценные» ПД, которые в последующие 10-15 с экспозиции

полностью исчезали (см. рис. 2, В). После отмывания 1,5-БД в этой концентрации импульсная активность нейронов не восстанавливалась.

У другой части нейронов (28 %) реакция на приложение 3-формил-1,5-БД была схожей с описанной выше, однако у них не наблюдалось четкой тормозной паузы после момента аппликации.

При анализе трансмембранных ионных токов обнаружено, что при концентрации  $10^{-4}$  М наблюдается только достоверное увеличение скорости нарастания входящих ионных токов (см. табл. 2). Не исключено, что именно этим может объясняться увеличение амплитуды ПД, которое обусловлено преимущественно входением  $\text{Na}^+$  и, возможно,  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку.

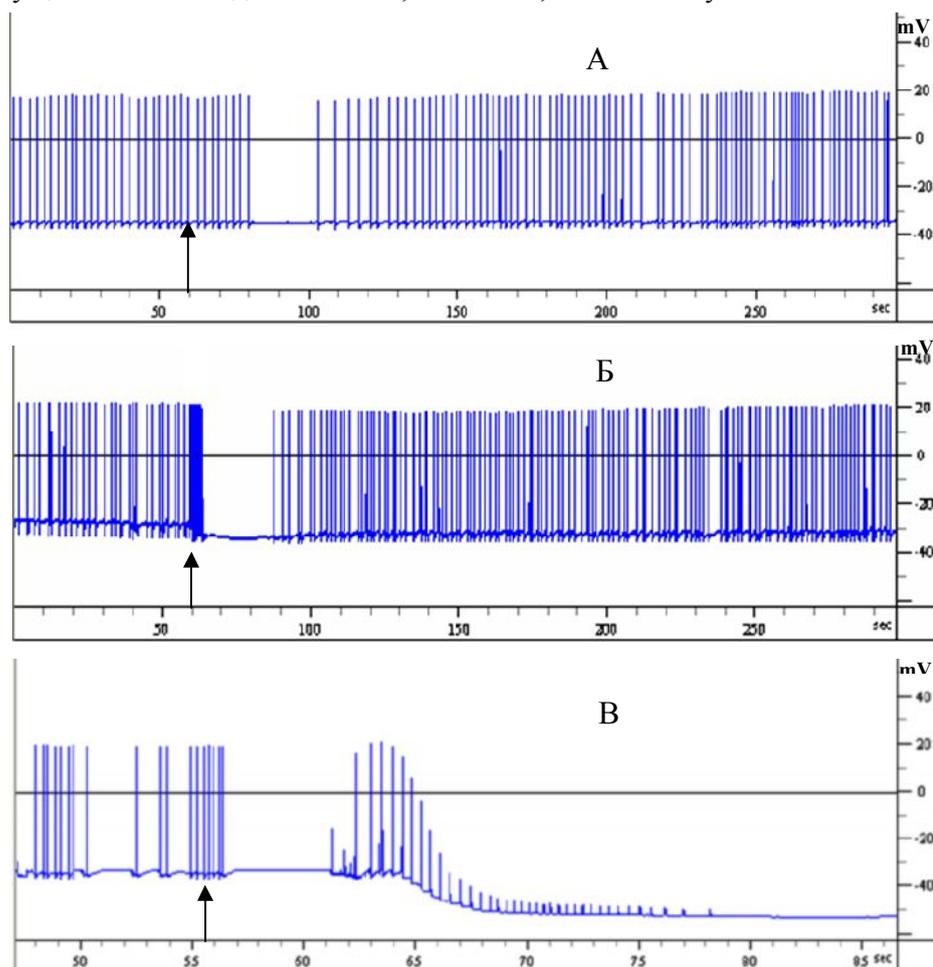


Рис. 2 Эффекты 3-формил-1,5-БД в концентрациях  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  и  $10^{-2}$  М (А-В соответственно) на электрическую активность нейрона висцерального ганглия.

*Стрелкой обозначен момент аппликации. Обращаем внимание, что на В скорость развертки на оригинальной нейрограмме увеличена.*

Интересным феноменом явилось то, что 3-формил-1,5-БД в концентрации  $10^{-3}$  М вызывает только несущественные изменения скорости входящих ионных токов, однако, снижение скорости выходящих ионных токов было довольно существенным (табл. 2). Не исключено, что именно этим можно объяснить снижения амплитуды и длительности ПД.

Количественная характеристика входящих и выходящих ионных токов, после приложением 3-формил-1,5-БД в концентрации  $10^{-2}$  М, также указывает на его токсичность (см. табл. 2). Таким образом, из выше изложенных данных следует, что новое производное 1,5-БД обладает более выраженным угнетающим действием, чем само базовое вещество.

Таблица 2.

**Влияние 3-формил-1,5-БД на параметры электрической активности и скорость трансмембранных ионных токов нейронов висцерального ганглия моллюска**

Концентрация вещества	Амплитуда ПД, мВ	Время развития ПД, мс	Скорость ионных токов, В/с	
			входящих	выходящих
Фон	$46,5 \pm 2,5$	$11,4 \pm 1,1$	$12,3 \pm 1,1$	$7,1 \pm 0,5$
$10^{-4}$ М	$54,1 \pm 1,7^*$	$11,6 \pm 0,7$	$16,1 \pm 0,4^*$	$7,3 \pm 0,5$
$10^{-3}$ М	$45,6 \pm 2,7$	$10,3 \pm 1,0$	$12,6 \pm 1,1$	$5,8 \pm 0,4$
$10^{-2}$ М в течение первых 40 с	$4,2 \pm 0,5^{**}$	$1,1 \pm 0,2^{**}$	$0,46 \pm 0,1^{**}$	$0,2 \pm 0,04^{**}$

Примечание: \* - достоверность различий показателей при аппликации вещества от таковых в фоне  $P \leq 0,05$ ; \*\* – при  $P \leq 0,005$ .

Сравнительный анализ реакций тестируемых нейронов на приложение разных концентраций 1,5-БД и 3-формил-БД показал, что их эффекты имели схожую направленность, однако более выраженное угнетающее действие проявляет 3-формил-1,5-БД. Учитывая угнетающий характер действия этих веществ после приложения их на мембрану нейронов улитки, можно ожидать, что эти соединения при системном их введении смогут проявлять противосудорожные и/или психотропные свойства. В концентрациях  $10^{-4}$  М оба вещества оказывают кратковременное активирующее действие на электрогенез нейронов за счет увеличения проводимости мембраны для ионов натрия. В концентрации  $10^{-2}$  М наблюдается торможение входящих и выходящих ионных токов практически в равной степени. Исходя из этого, можно думать, что выявленное нейротропное действие у 1,5-БД и 3-формил 1,5-БД в концентрации  $10^{-2}$  М при системном введении помимо судорожного может проявляться и как антидепрессантное, что может быть обусловлено взаимодействием этих бензодиазепинов с ГАМК<sub>A</sub>-рецепторным комплексом [16], и следовательно, активацией Cl-каналов, что приводит к гиперполяризации нейронов. Очевидно, что тестируемые вещества тормозят активность ГАМК-ергических нейронов, снижая, таким образом,

выделение в синаптическую щель количество медиатора и уменьшают уровень депрессии у животных [17].

### ВЫВОДЫ

1. Установлено, что 1,5-БД и 3-формил-1,5-БД в диапазоне концентраций  $10^{-5}$ – $10^{-2}$  М обладают однонаправленным, неселективным, тормозным нейротропным эффектом с большей выраженностью у нового производного – 3-формил-1,5-БД.
2. Данные соединения перспективны в дальнейшем изучении наличия, направленности и характерных особенностей психотропных и анальгетических эффектов.

### Список литературы

1. Александровский Ю.А. Клиническая фармакология транквилизаторов / Александровский Ю.А. – МД. – 1973. – 334с.
2. Беляков В.А. Особенности анестезии у больных с сопутствующими нервно-психическими заболеваниями / В.А. Беляков // Анест. и реаниматол. – 1983. – № 3 – С.72–77.
3. Харкевич Д.А. Фармакология. / Харкевич Д.А. – М.: Медицина. – 1993. – 544с.
4. Мосолов С.Н. Основы психофармакотерапии. / Мосолов С.Н. – М., 1996. – 287с.
5. Влияние 3-метил-2,3,4,5-тетрагидро-1Н-1,5-бензодиазепин-2-она на поведенческие реакции крыс / И.И. Коренюк, Т.В. Гамма, Т.М. Ладыгина [и др.] // Ученые записки ТНУ, сер. «биология, химия». – 2006. – Т. 19(58), №4 – С.121–126.
6. Clobazam in refractory childhood epilepsy / Kalra Veena, Seth Rachna, Mishra Devendra [et al.] // Indian Journal of Pediatrics. – 2010. – Vol. 77, № 3. – P. 263–266.
7. 1,5-benzodiazepines. Part XIII. Substituted 4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,5]benzodiazepin-5-amines and 4H-imidazo[1,2-a][1,5]benzodiazepin-5-amines as analgesic, anti-inflammatory and/or antipyretic agents with low acute toxicity / G. Grossi, M. Di Braccio, G. Roma [et al.] // Eur J Med Chem. – 2002. – № 37(12). – P.933–944.
8. Synthesis and pharmacologic study of 1,5-benzodiazepine-2,4-dithiones and their alkyl derivatives / A. Zellou, Y. Cherrah, E.M. Essassi, [et al.] // Ann Pharm Fr. – 1998. – 56(4). – P.175–180.
9. Bhatia M.S. Multiple Linear Regression Study of 2,4-Disubstituted 1,5-Benzodiazepine as Potential Antiinfectives / M.S. Bhatia, P.B. Choudhari, K.B. Ingale // Iranian J. of Pharmaceutical Sciences. – 2010. – 6(3). – P.199–208.
10. Yoshinaga K, Kawasaki D, Emori Y ANTITUMOR AGENT US Patent Application 20100086553, Appl. №:12/632182, Pub. Date: 04/08/2010, Fil. Date: 12/07/2009.
11. Yasuhiro Ohtake 2,3,4,5-tetrahydro-1H-1,5-benzodiazepine derivative and medicinal composition US Patent Appl. 20080076760, Appl. №: 11/718982, Pub. Date: 03/27/2008.
12. Эффекты воздействия бензимидазола и некоторых его производных на параметры электрических потенциалов нейронов моллюска Гамма Т.В., Коренюк И.И. Баевский М.Ю. [и др.] // Ученые записки ТНУ, серия «Биология, химия». – 2003. – Т. 16,(55) – С. 20–27.
13. Сахаров Д.А. Генеалогия нейронов. / Сахаров Д.А. – М.: Наука, 1974. – 184с.
14. Коренюк И.И. Нейротропные эффекты химических соединений различных классов и возможные механизмы их действия / Коренюк И.И. – Симферополь: ДИАЙПИ, 2012 – 182 с.
15. А.с. № 11642 Украины, «Компьютерная программа для регистрации, обработки и автоматизированного анализа биоэлектрических сигналов “ActionPotential”» // А.А. Замогайлов, И.И. Коренюк. – 2004.
16. Nutt D.J. GABAA-receptors. Receptor Data for Biological Experiments: a Guide to Drugs Selectivity / D.J. Nutt // Ellis Horwood, London. – 1991. – P.225–229.
17. The GABAergic hypothesis of depression / Lloyd K.G., Zivkovic B., Scatton B. [et al.] // Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. – 1989. – Vol. 13.3.4. – P. 341–351.

Єпішкін І.В. Вплив 2,3,4,5-тетрагідро-1Н-1,5-бензодіазепінону-2 та 3-форміл-2,3,4,5-тетрагідро-1Н-1,5-бензодіазепінону-2 на електричну активність нейронів молюску *Helix albescens rossm* / І.В. Єпішкін, І.І. Коренюк, Т.В. Гамма // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 1. – С. 67-74.

Досліджено вплив 1,5-бензодіазепінона-2 та одного його похідного (3-форміл-1,5-бензодіазепінона-2) на потенціали нейронів *Helix albescens Rossm.*, які відводили внутрішньоклітинно. Встановлено, що ці речовини однонаправлено і неселективно гіперполяризують мембрану, зменшують частоту генерації імпульсів і змінюють швидкість трансмембранних іонних струмів. Виразність ефектів обох сполук залежить від їх концентрації і у похідного 3-форміл-1,5-бензодіазепінону-2 вона перевершує таку 1,5-бензодіазепінону-2. В діапазоні концентрацій  $10^{-5}$ - $10^{-3}$  М ефекти цих сполук мають зворотній характер, а в концентрації  $10^{-2}$  М у всіх досліджених нейронів незворотно блокуються механізми генерації потенціалів дії, однак зберігається здібність підтримки мембранного потенціалу.

**Ключові слова:** бензодіазепін, нейрон, електрична активність.

Epishkin I.V. Effect of 1,5-benzodiazepinon-2 and 3-formyl-1,5-benzodiazepinon-2 on electrical activity of neurons in mollusks *Helix albescens rossm* / I.V. Epishkin, I.I. Korenyuk, T.V. Gamma // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 1. – P. 67-74.

It is investigated an intracellular effect of 1,5-benzodiazepinone-2 and 3-formyl-1,5-benzodiazepinone-2 on the electric activity *Helix albescens Rossm.* neurons. It is established that the action these substances depend on their concentration and appears in hyperpolarization of the membrane, reducing a pulse frequency generation and ion currents changes. At a concentration of effects of these compounds are reversible, and the concentration of- irreversible. In the concentration range  $10^{-5}$ - $10^{-3}$  M effects of these compounds are reversible, and concentration of  $10^{-2}$  M in all investigated neurons irreversibly blocked the mechanisms generating action potentials, but retained ability to support membrane potential.

**Keywords:** benzodiazepinone, neuron, electrical activity.

Поступила в редакцію 13.02.2012 г.