

УДК 612.014.46:615.214:547.859:547.918

ТЕСТИРОВАНИЕ НЕЙРОТРОПНЫХ ЭФФЕКТОВ ВИАГРЫ В КОМПЛЕКСЕ С ТРИТЕРПЕНОВЫМИ ГЛИКОЗИДАМИ

Колотилова О.И.

*Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: oyu1978@mail.ru*

Получено два комплекса, один из которых содержит виагру и монодесмозидный, а другой виагру и бисдесмозидный тритерпеновый гликозид. С помощью внутриклеточного отведения электрической активности нейронов определены наличие, направленность, пороговые, оптимальные и токсические концентрации, а также возможные механизмы нейротропного влияния указанных комплексов. Показано, что данные соединения изменяют практически все электрофизиологические показатели, отражающие функциональное состояние нейронов. Так в концентрации 10^{-5} и 10^{-4} М они снижают частоту генерации импульсов, изменяют скорости нарастания входящих и выходящих трансмембранных ионных токов. При аппликации комплексов в концентрации 10^{-3} М, обнаруживалось выраженное увеличение частоты генерации импульсов, снижение амплитуды потенциалов действия, уменьшение скоростей нарастания входящих и выходящих трансмембранных ионных токов. Сделан вывод, что тестируемые вещества в зависимости от концентрации могут как активировать, так и угнетать функциональное состояние нервной системы. Выявленные нами свойства исследуемых соединений указывают на перспективность их дальнейшего исследования.

Ключевые слова: виагра, тритерпеновые гликозиды, нейронная активность, внутриклеточное отведение.

ВВЕДЕНИЕ

Общеизвестно, что виагра (цитрат силденафила) при системном введении оказывает благоприятное действие на эректильную функцию за счет способности селективно ингибировать фосфодиэстеразу 5-го типа [1, 2]. Однако малоизвестно о влиянии этого препарата на нервную систему, как самую чувствительную систему организма. В настоящее время этот препарат интенсивно изучают на предмет наличия у него лечебных эффектов и в других областях клинической медицины [3, 4]. В частности, ранее нами установлено, что раствор индивидуального цитрата силденафила приводит к выраженным нейротропным эффектам [5], а в высоких концентрациях проявляется его нейротоксическое и даже летальное действие. Также, нами выяснено, что целый ряд монодесмозидных тритерпеновых гликозидов (МТТГ) в диапазоне концентраций от 10^{-5} до 10^{-3} М неселективно угнетают электрическую активность нейронов, а в концентрации 10^{-2} М вообще проявляют нейротоксическое действие, бисдесмозидные тритерпеновые гликозиды (БТТГ) в таких же концентрациях не оказывают нейротропных эффектов [5, 6].

Недавно было получено два молекулярных комплекса, один из которых содержит виагру и монодесмозидный (рис. 1 А; **комплекс 1**), а другой – виагру и

бисдесмозидный (рис. 1 Б; **комплекс 2**) тритерпеновые гликозиды [7, 8]. Следует отметить, что гликозиды, входящие в состав указанных выше комплексов, являются действующими веществами противокашлевых препаратов геделикс и проспан [7, 8].

С целью поиска полезных биологических свойств комплексов виагры с МТТГ и БТТГ мы сочли целесообразным определить наличие, направленность, пороговые, оптимальные и токсические их концентрации, а также возможные механизмы нейротропного влияния комплексов при непосредственном приложении их на наружную поверхность мембраны нейронов моллюсков.

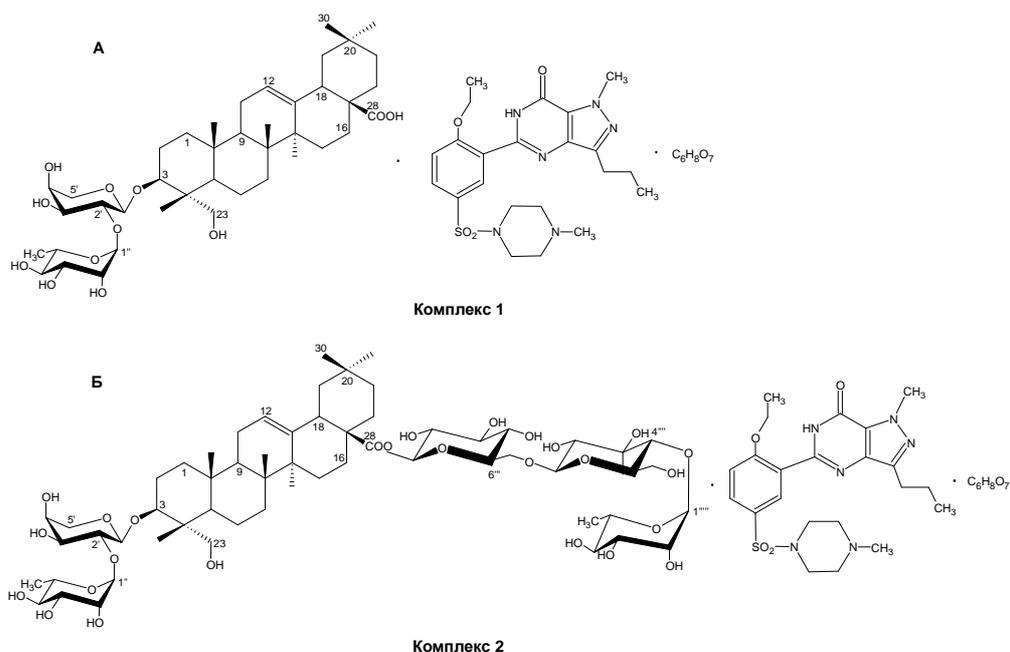


Рис. 1. Структурные формулы: **А** – монодесмозидного тритерпенового гликозида (3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозид хедерагенина с цитратом силденафила (**комплекс 1**)); **Б** – бисдесмозидного тритерпенового гликозида (3-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -*L*-арабинопиранозил-28-*O*- α -*L*-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -*D*-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -*D*-глюкопиранозид хедерагенина с цитратом силденафила (**комплекс 2**)).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эффекты приложения **комплексов 1** и **2** исследованы нами на неидентифицированных нейронах висцерального ганглия моллюска *Helix albescens* Rossm. Применяли стандартную технику внутриклеточного отведения с помощью стеклянных микроэлектродов [9]. Регистрацию и анализ активности нейронов проводили с использованием компьютерной программы [10] по схеме: фон (1-1.5 мин); экспозиция определенной концентрации соединения на поверхностную мембрану нейрона (4-5 мин) и отмывание (20 мин). Параметры отводимых

потенциалов усреднялись в пределах каждого периода записи. Оценивали уровень мембранного потенциала (МП), частоту генерации импульсов (ЧГИ), амплитуду и время развития ПД, максимальные скорости нарастания суммарных входящих и выходящих трансмембранных ионных токов (согласно параметрам первой производной ПД).

Статистическое сравнение параметров электрической активности в фоне и при экспозиции тестируемых комплексов виагры с тритерпеновыми гликозидами производили с помощью непараметрического критерия Вилкоксона. Данные нормировали относительно исходных значений (%); ниже они приведены как средние значения \pm ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нейротропные эффекты комплекса 1. В концентрации 10^{-5} М у всех исследованных нейронов ($n = 22$) эффекты начинали проявляться уже через 5-6 секунд после момента аппликации. Это выражалось в деполяризующем сдвиге МП на 3-8 мВ, на фоне которого урежалась ЧГИ (до $93 \pm 4,2$ %, $p < 0,05$) и увеличивалась амплитуда ПД (до $119 \pm 10,1$ %; рис. 2, А1). Анализ первой производной показал (рис. 2, А, 3), что при этом достоверно увеличивалась скорость нарастания суммарных выходящих ионных токов (до $110 \pm 4,8$ %). Все остальные исследуемые показатели флуктуировали, однако достоверных изменений не претерпевали.

При экспозиции на мембрану нейронов **комплекса 1** в концентрации 10^{-4} М эффект у тестированных нервных клеток ($n = 20$) проявлялся уже через 3-5 секунд. Он заключался в незначительном снижении овершута (на 3-5 мВ) и взаимном прекращении (на 50-70 с) генерации ПД, при неизменном МП. Затем генерация полноценных импульсов восстанавливалась, однако частота их следования была в 1,5–3 раза ниже исходной (рис. 2, Б 1). В общем, у исследованной группы нейронов статистически достоверными оказались следующие изменения их характеристик: ЧГИ снизилась до $73,3 \pm 20,0$ %, а время развития ПД сократилось на 12,4 %.

В концентрации 10^{-3} М у исследованных нейронов ($n = 24$) сначала на фоне сохранения МП происходило угнетение ЧГИ, а затем постепенно снижался овершут и через 20-50 секунд экспозиции развивалась гиперполяризация (в среднем на 10 мВ) мембраны (рис. 2, В,1). МП достигал максимума на 40-50 с экспозиции, после чего начинал медленно восстанавливаться. Несмотря на развитие гиперполяризации, ЧГИ увеличивалась (в среднем до $111,2 \pm 7,2$ %), а амплитуда ПД при этом снижалась (до $84,3 \pm 7,3$ %), составляя у некоторых нейронов около 30% от исходной величины (рис. 2, В 1, 2 и 3). В общем, у разных нейронов динамика модуляции параметров электрической активности была схожей. Анализ усредненных показателей первой производной показал, что **комплекс 1** в концентрации 10^{-3} М, существенно уменьшал суммарные скорости как входящих (до $81,3 \pm 12,4$ %), так и выходящих (до $86,7 \pm 11,9$ %) трансмембранных ионных токов (рис. 2, В, 2 и 3). Из рисунка видно, что суммарные скорости входящих токов существенно снижены, а выходящие токи практически отсутствуют. Это видимо и лежит в основе увеличения времени развития ПД.

Нейротропные эффекты комплекса 2. Приложение комплекса 2 в концентрациях 10^{-5} и 10^{-4} М к наружной поверхности соматической мембраны нейронов (в обоих случаях $n = 20$) на фоне незначительной деполяризации мембраны вызывало снижение ЧГИ (от уровня фона до $90 \pm 6,1$ %; и $78,16 \pm 17,0$ %, соответственно; $p < 0,05$; рис. 3, А и Б), т.е. наблюдалось дозозависимое уменьшение этого показателя.

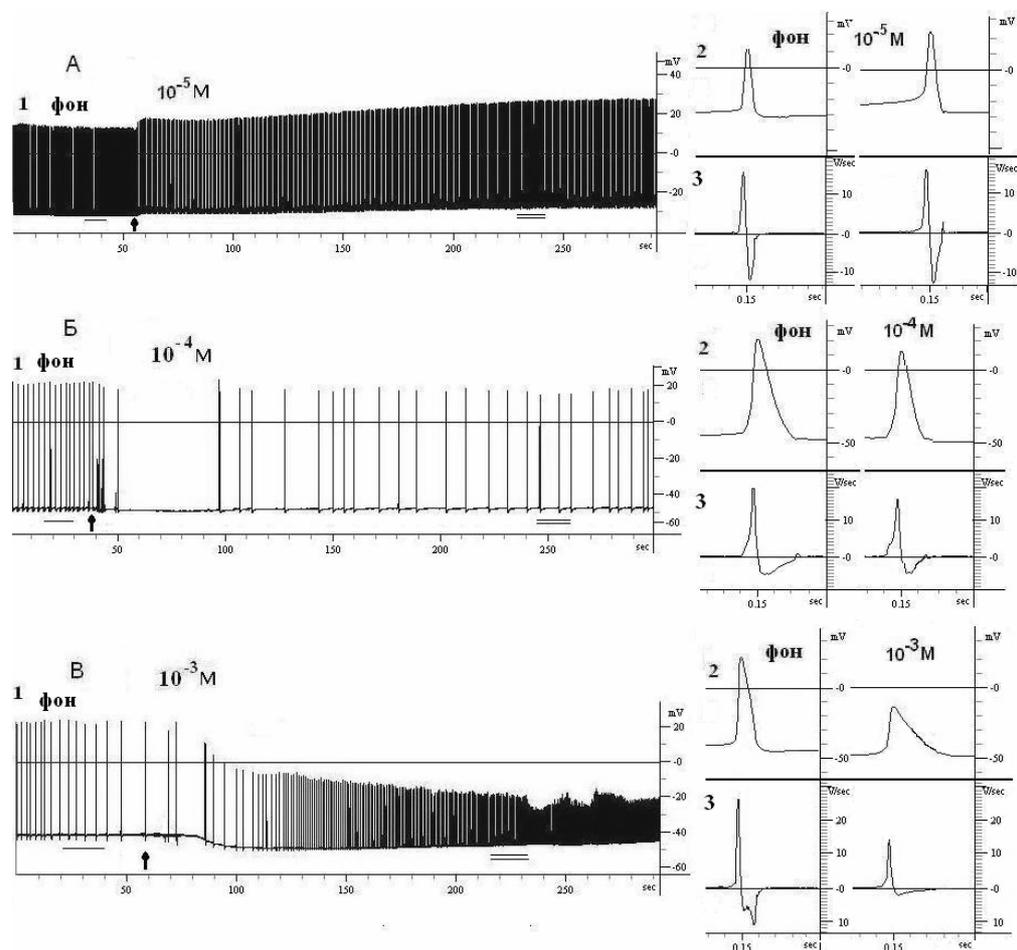


Рис. 2 Эффекты экспозиции разных концентраций комплекса 1 на электрические потенциалы трех неидентифицированных нейронов висцерального ганглия улитки.

Примечание: 1 – примеры нативных нейрограмм; 2 – усредненные потенциалы действия, в фоне и при экспозиции комплекса; 3 – их первые производные. Фрагменты записей, в пределах которых производилось усреднение потенциалов действия, подчеркнуты горизонтальной линией (одной для фона и двойной – для экспозиции). Стрелкой отмечены моменты аппликации.

Таким образом, **комплекс 2** в концентрациях 10^{-5} и 10^{-4} М снижал ЧГИ, незначительно дестабилизировал МП, однако существенно не влиял на амплитуду ПД, а в концентрации 10^{-3} М (рис. 3, В1-3) у всех исследованных нейронов ЧГИ достоверно увеличивалась (до $116,2 \pm 9,12\%$), однако при этом наблюдалась быстрая и полная редукция овершута. Снижение амплитуды ПД в среднем составило $85,1 \pm 8,5 \%$, а суммарные скорости входящих и выходящих трансмембранных ионных токов по отношению к фону снижались практически одинаково (до $86,4 \pm 6,7 \%$ и до $85,8 \pm 7,1 \%$ соответственно).

Следует отметить, что чувствительность у разных нейронов к обоим тестируемым веществам была практически одинаковой и их эффекты сохранялись не менее 5 минут. Эффекты **комплекса 2**, в общем, имели ту же направленность, что и влияние **комплекса 1**, однако были менее выраженными.

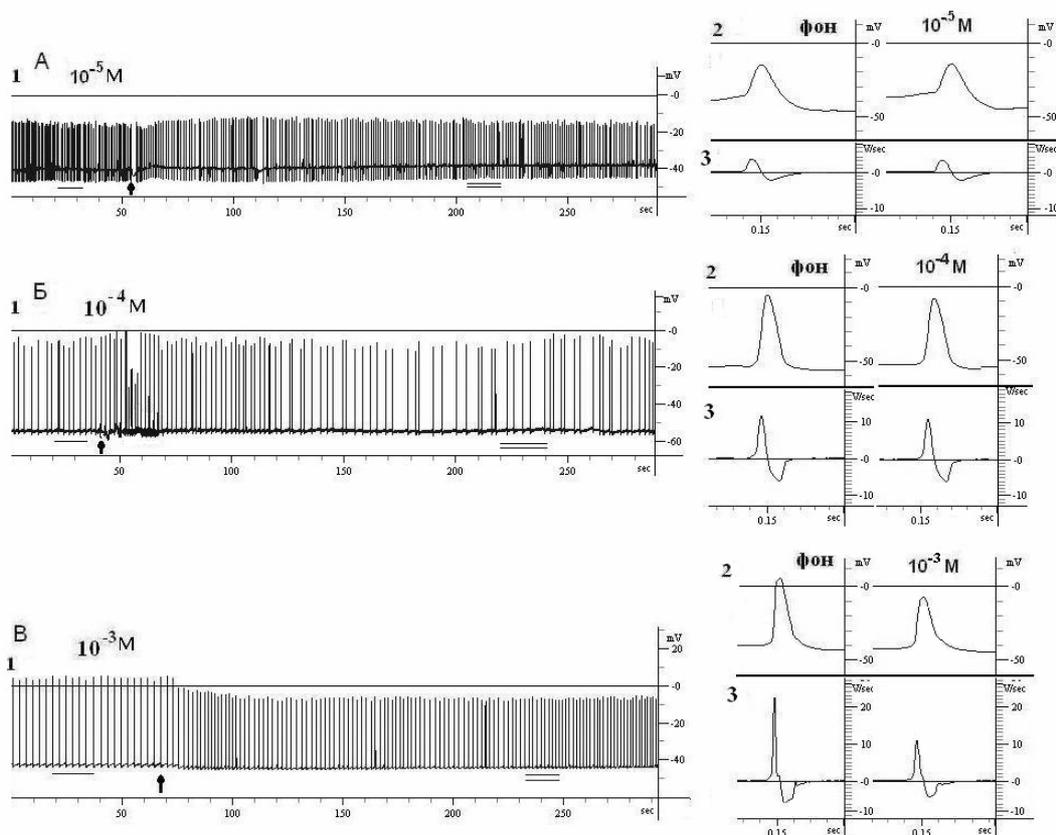


Рис. 3. Эффекты экспозиции разных концентраций **комплекса 2** на электрические потенциалы трех неидентифицированных нейронов висцерального ганглия улитки.

Примечание: обозначения такие же, как и на рис.2.

В течение 20 мин отмывания нейронов, от тестируемых **комплексов** в концентрациях 10^{-5} и 10^{-4} М, происходило восстановление исходных показателей электрической активности, а после приложения концентраций 10^{-3} М эффекты были либо частично обратимыми, либо не обратимыми, что свидетельствует об их токсическом воздействии и на развитие у нейронов состояния парабиоза.

Таким образом, результаты анализа нейротропного действия **комплексов 1 и 2** в разных концентрациях продемонстрировали, что оно весьма значительно. Это проявлялось в изменении практически всех электрофизиологических показателей, отражающих функциональное состояние нейронов (**рис. 4**).

Ранее нами было показано [5], что для эффектов индивидуального раствора виагры характерна выраженная концентрационная зависимость. В диапазоне концентраций 10^{-5} и 10^{-4} М характерны эффекты активации, а в более высоких концентрациях, наоборот проявлялся эффект противоположной направленности. В случае приложения комплексов **1 и 2** в концентрации 10^{-3} М обнаруживалось выраженное снижение амплитуды ПД, уменьшение скоростей нарастания входящих и выходящих трансмембранных ионных токов (**рис. 4**). Анализируя полученные результаты эффектов **комплексов 1 и 2**, выявлено, что у всех нейронов в концентрациях 10^{-5} и 10^{-4} М однонаправлено изменяются электрофизиологические показатели, т.е. развиваются нейротропные эффекты, не характерные для индивидуального применения виагры (наблюдалось - снижение ЧГИ, изменение скорости нарастания входящих и выходящих трансмембранных ионных токов). В случае приложения на мембрану нейрона, исследуемых комплексов в концентрации 10^{-3} М, как и при воздействии индивидуального раствора виагры в аналогичной концентрации, обнаруживалось выраженное снижение амплитуды ПД, увеличение ЧГИ, уменьшение скоростей нарастания входящих и выходящих трансмембранных ионных токов (см. **рис. 4**), что в свою очередь обуславливает эти эффекты.

По данным исследований нашей лаборатории, [6, 11, 12], монодесмозидные гликозиды неселективно угнетают активность нейронов, а бисдесмозидные гликозиды вообще не оказывают влияния на функциональное состояние нейронов. Мы полагаем, что химическая модификация молекулы виагры в виде присоединения к ней ТТГ приводит к образованию неселективных пор в мембране нейронов и утечке K^+ из клетки, что и обуславливает ингибирующий нейротропный эффект и является основным вкладом в угнетении нейротропного действия. Значительное снижение амплитуды ПД является результатом вызванного **комплексами 1 и 2** уменьшения входящего натриевого тока при усилении выходящего калиевого тока. Итак, результаты настоящего исследования дают основание считать, что протестированные нами соединения ускоряют процессы электрогенного транспорта ионов и параллельно активируют/ингибируют суммарные входящие и выходящие ионные токи, участвующие в генерации ПД в зависимости от концентрации тестируемого вещества. Можно также предполагать, что эти вещества способны модулировать возбудимость нейронов не только моллюсков, но и млекопитающих, поэтому для выяснения этого вопроса необходимы такого рода исследования.

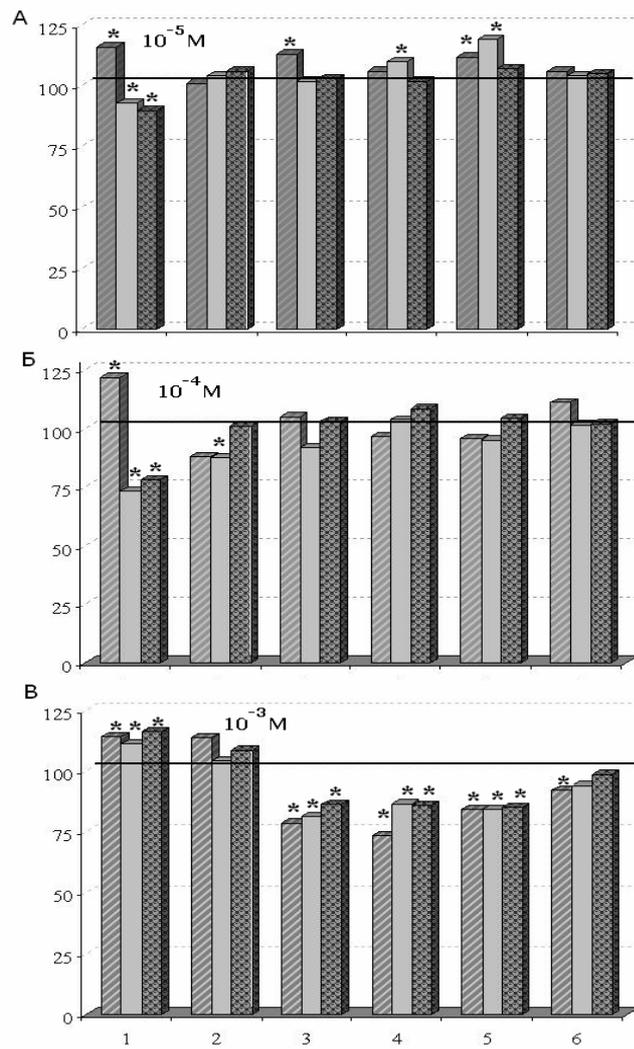


Рис. 4. Диаграммы нормированных усредненных значений (%) показателей функционального состояния нейронов висцерального ганглия улитки при аппликации виагры (столбцы серые в косую полоску), **комплекса 1** (столбцы светло серые) и **комплекса 2** (столбцы темно серые узорчатые) в концентрациях 10^{-5} М – А, 10^{-4} М – Б и 10^{-3} М – В.

Примечание: 1 - частота генерации импульсов; 2 – продолжительность потенциала действия (ПД); 3-4 – скорости нарастания суммарных входящих (3) и выходящих (4) ионных токов; 5 – значения амплитуды ПД; 6 – значения мембранного потенциала. За 100 % приняты значения соответствующих показателей в пределах фона. Звездочками обозначены случаи достоверных отличий от фоновых показателей ($p < 0,05$).

ВЫВОД

Из анализа полученных данных следует, что концентрация 10^{-4} М является оптимальной для функционирования исследованных нейронов, а с увеличением концентрации закономерно увеличивается депрессия функционального состояния нейронов. Обратимость эффектов при отмывании характерна для концентраций 10^{-5} и 10^{-4} М, поэтому они могут считаться безопасными.

Выявление данных свойств у исследуемых соединений указывает на перспективность дальнейшего исследования подобных соединений в целях создания новых нейротропных лекарственных средств.

Список литературы

1. The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia / J.P.Halcox, K.R.Nour, G.Zalos [et al.] // J Am Coll Cardiol – 2002. – № 40. – P. 1232-40.
2. Gore J. Oral sildenafil for treatment of Raynaud phenomenon and digital ulcers secondary to scleroderma (systemic sclerosis) / J. Gore, R. Silver // Arthritis Rheum – 2004. – № 50 (15). – P. 4085.
3. A service of the U.S. National Institutes of Health [http : http://www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)
4. Sildenafil prescribing information. New York, NY: Pfizer, 2004.
5. Тестирование нейротропных эффектов виагры / О.И. Колотилова, И.И. Коренюк, Д.Р. Хусаинов [и др.] // Нейрофизиология/Neurophysiology . – 2011. – Т. 43, №5. – С. 460–465.
6. Нейротропные эффекты химических соединений различных классов и возможные механизмы их действия / [Коренюк И.И., Гамма Т.В., Хусаинов Д.Р. и др.] – Симферополь : ДИАЙПИ, 2012. – 182 с.
7. Яковішин Л.О. Супрамолекулярний комплекс тритерпенового глікозиду хедерасопоніну С і цитрату силденафілу / Л.О. Яковішин, І.Р. Яровий, Д.Ю. Білаш // Ukr. Bioorg. Acta. – 2011. – Т. 9, № 1. – С. 41–45.
8. Yakovishin L.A. Molecular complex of the triterpene glycoside α -hederin and sildenafil citrate (viagra): FT-IR and UV spectroscopy analysis and biological activity / L.A. Yakovishin, Belash D.Yu., Yarovoy I.R. // Ukr. Bioorg. Acta. – 2012. – Vol. 10, No. 1. – P. 38–41.
9. Вплив бензимидазолу та його похідних на електричні показники ідентифікованих нейронів молюска *Helix albescens* / І.І. Коренюк, Т.В. Гамма, М.Ю. Баєвський [та ін.] // Фізіол. журн. – 2002. – Т. 48, № 2. – С. 25.
10. Замотайлов А.А. Комп'ютерна програма для реєстрації, обробки і автоматизованого аналізу біоелектричних сигналів / А.А. Замотайлов, І.І. Коренюк. – Авторське свідоцтво № 11642 від 29.11.2004 р.
11. Влияние тритерпеновых гликозидов на изменение электрической активности идентифицированных нейронов моллюска / О.В. Костюченко, В.И. Гришковец, Е.А. Соболев [и др.] // Химия природ. соедин. – 2001. – № 1. – С. 39-42.
12. Костюченко О.В. Особливості дії рослинних глікозидів на нейрони слимака / О.В. Костюченко, В.І. Гришковець, І.І. Коренюк. // Фізіологічний журнал. – 2001. – Т. 47, №4. – С. 42-48.

Колотілова О.І. Нейротропні ефекти віагри з тритерпеновими глікозидами / О.І. Колотілова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2013. – Т. 26 (65), № 1. – С. 80-88.

Отримано два комплекси, один з яких містить віагру і монодесмозидний, а інший віагру і бідесмозидний тритерпеновий глікозиди. За допомогою внутрішньоклітинного відведення електричної активності нейронів для них визначено наявність, спрямованість, порогові, оптимальні і токсичні концентрації, а також можливі механізми нейротропної впливу зазначених комплексів. Показано, що дані сполуки змінюють практично всі електрофізіологічні показники, які відображають функціональний стан нейронів. Так в концентрації 10^{-5} та 10^{-4} М вони знижують частоту генерації

імпульсів, змінюють швидкості зростання вхідних і вихідних трансмембранних іонних струмів, в концентрації 10^{-3} М, виявлялося виражене збільшення частоти генерації імпульсів, зниження амплітуди потенціалів дії, зменшення швидкостей зростання вхідних і вихідних трансмембранних іонних струмів. Зроблено висновок, що тестовані речовини в залежності від концентрації можуть призвести до пригнічення або активування функціонального стану нервової системи. Виявлені нами властивості досліджуваних сполук вказують на перспективність подальших досліджень.

Ключові слова: тритерпенові глікозиди, віагра, нейрональна активність, внутрішньоклітинне відведення

Kolotilova O.I. Neurotropic effects of viagra with triterpence glycosides / O.I.Kolotilova // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2013. – Vol. 26 (65), No. 1. – P. 80-88.

We had got tow complexes, one of that contains a viagra and монодесмозидный, and other the viagra and бисдесмозидный тритерпеновый glycoside. With intracellular recording of electric activity of neurons presence: orientation, threshold, optimal and toxic concentrations, and also possible mechanisms of neurophilic influence of the indicated complexes. It is shown that these connections change practically all electro-physiological indexes reflecting the functional state of neurons. So in a concentration a 10^{-5} - 10^{-4} М they reduce frequency of generation of impulses, change speeds of growth of incoming and going out transmembrane ionic currents. At the applique of complexes in a concentration a 10^{-3} М, the expressed increase of frequency of generation of impulses, decline of amplitude of potentials of action, reduction of speeds of growth of incoming and going out transmembrane ionic currents, revealed. Drawn conclusion, that testable substances can both activate depending on a concentration and oppress the functional state of the nervous system. Specifies the properties of the investigated connections educed by us on perspective of their further research.

Keywords: viagra, triterpene glycosides, neural activity, intracellular lead

Поступила в редакцію 25.02.2013 г.