

УДК 612.014.46:615.214:547.918:547.857.4

ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ С КОФЕИНОМ НА ПАРАМЕТРЫ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

Колотилова О.И.¹, Яковишин Л.А.², Коренюк И.И.¹, Гришковец В.И.¹, Катюшина О.В.¹

¹*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина*

²*Севастопольский национальный технический университет, Севастополь, Украина*

E-mail: oхy1978@mail.ru

С помощью внутриклеточного отведения исследовали влияние тритерпеновых гликозидов в комплексе с кофеином, которые вводили во внеклеточную среду, на электрическую активность неидентифицированных нейронов висцерального ганглия виноградной улитки. Продемонстрировано, что аппликация этих соединений непосредственно на клеточную мембрану нейронов приводит к активирующему нейротропному действию, выражающемуся в изменении всех электрофизиологических показателей.

Ключевые слова: моно- и бисдесмозидные тритерпеновые гликозиды, кофеин, молекулярный комплекс, нейроны, нейротропные эффекты

ВВЕДЕНИЕ

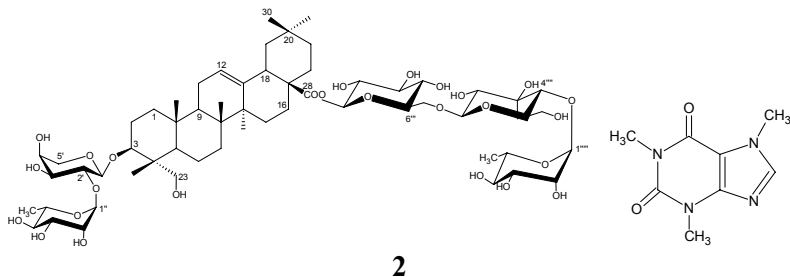
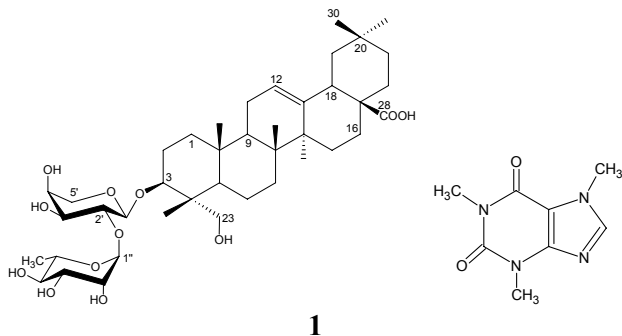
На сегодняшний день постоянно ведется активный поиск и совершенствование нейро- и психотропных препаратов, поэтому существует необходимость изучения характера и «глубины» эффектов воздействия как широко применяемых препаратов, так и новых соединений и их комплексов на состояние структурно-функциональных элементов нервной системы, в частности нейронов. При этом имеется возможность выявить химические вещества с более эффективными и менее токсичными свойствами, что обеспечивает объективную оценку физиологических механизмов, лежащих в основе развивающихся под действием этих препаратов адаптационных перестроек, как в отдельном нейроне, так и в ЦНС в целом.

В предыдущих работах [1, 2] было изучено влияние моно- и бисдесмозидных тритерпеновых гликозидов (ТТГ) на функциональное состояние нейронов виноградной улитки. Следует указать, что в отношении ТТГ выделяют три основных направления их эффектов: цитотоксическое, лечебное и биорегуляторное [3]. Выяснено, что их действие проявляется на нескольких уровнях, изменяя как состояние функции молекулярных механизмов клеток, органов, так и всего организма [4].

Также хорошо известно и то, что в клинической практике давно применяется кофеин, который оказывает возбуждающее влияние на ЦНС, уменьшает чувство утомления, увеличивает психическую активность. Его возбуждающее действие связано со способностью блокировать рецепторы адреналино-тормозного медиатора

ЦНС. Кофеин снижает чувствительность нервных клеток к адреналину и таким образом, опосредованно, оказывает возбуждающее действие [5].

В настоящее время синтезированы два молекулярных комплекса ТТГ с кофеином. Первый (1) представляет собой клатрат 3-O- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-O- α -L-арабинопиранозид хедерагенина с кофеином, а второй (2) – клатрат 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 кофеином:



Необходимо отметить, что гликозиды, входящие в состав комплексов **1** и **2**, являются действующими веществами противокашлевых препаратов «Геделикс» и «Проспан», содержащих экстракт листьев *Hedera helix* [6, 7]. В литературе отсутствуют сведения о их нейротропном влиянии. Логично предположить, что при сочетанном воздействии в определенных концентрациях ТТГ и кофеина удастся выявить положительные или отрицательные нейротропные эффекты при непосредственном приложении их на мембрану нейронов.

Поэтому в данной работе мы считаем целесообразным выяснить, влияют ли указанные синтезированные комплексы на нейроны, как наиболее чувствительные структурно-функциональные элементы организма. В связи с вышеуказанным, цель данной работы: определить наличие, направленность и механизм воздействия комплексных веществ **1** и **2** на нейроны виноградной улитки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эффекты аппликации комплексного соединения 1 исследованы на 24-х, а соединения 2 – на 21-м неидентифицированных нейронах висцерального ганглия моллюска *Helix albescens* Rossm. Внутриклеточно отводимые биопотенциалы усиливали с помощью универсальной физиологической установки УФУ-БКН (полоса пропускания 0-10 кГц) и через лабораторный интерфейс подавали на компьютер IBM PC. Регистрация параметров биоэлектрической активности нейронов и их обработка обеспечивалась компьютерной программой «Action Potential» [8], позволяющей производить непрерывную запись показателей уровня мембранного потенциала (МП) и потенциалов действия (ПД) в течение заданного времени.

Эксперименты выполнялись по следующей схеме: отводилась фоновая активность, затем раствор Рингера во внеклеточной среде заменяли тестируемым веществом в концентрации 10^{-3} М. Количество однократно выводимого из пипетки раствора вещества составляло 1 мл. Поскольку, объем ванночки, в которой находился препарат составлял 0,5 мл, а проток раствора Рингера при этом перекрывался, то это обеспечивало практически полную замену физиологического раствора на тестируемое вещество. Экспозиция исследуемого соединения продолжалась пять минут, а затем следовало отмывание (20 – 30 мин). Наличие эффектов препарата и их направленность определялось по сопоставлению временных и амплитудных параметров электрических потенциалов в фоне с таковыми, при действии вещества.

Полученные данные обрабатывали с использованием непараметрического критерия Вилкоксона. Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего (%). Значимыми считались показатели при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Эффекты комплекса 3-О- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О- α -L-арабинопиранозид хедерагенина с кофеином

Прямое приложение на мембрану нейронов висцерального ганглия (рис.1.) комплекса 1 приводило к незначительному смещению мембранного потенциала (МП) в сторону деполяризации, сопровождающееся статистически достоверным ($p \leq 0,05$) увеличением ($116,0 \pm 19,7$ %) частоты генерации импульсов (ЧГИ), урежением межимпульсных интервалов ($52,0 \pm 26,0$ %) за счет достаточно значительного ($139,7 \pm 29,8$ %) увеличения кинетики суммарных входящих токов, на фоне небольшого снижения выходящих токов ($85,4 \pm 19,3$ %). Также на 11 % уменьшалась длительность ПД. Такая активность у нейрона сохранялась в течении 5 – 15 минут. Отмывание нейронов практически полностью восстанавливало фоновый уровень МП, ЧГИ.

Эффекты комплекса 3-О- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О- α -L-арабинопиранозил-28-О- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 4)-О- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 6)-О- β -D-глюкопиранозид хедерагенина с кофеином

Типичные эффекты соединения 2 на импульсную активность у разных нейронов висцерального ганглия виноградной улитки были не одинаковыми, хотя

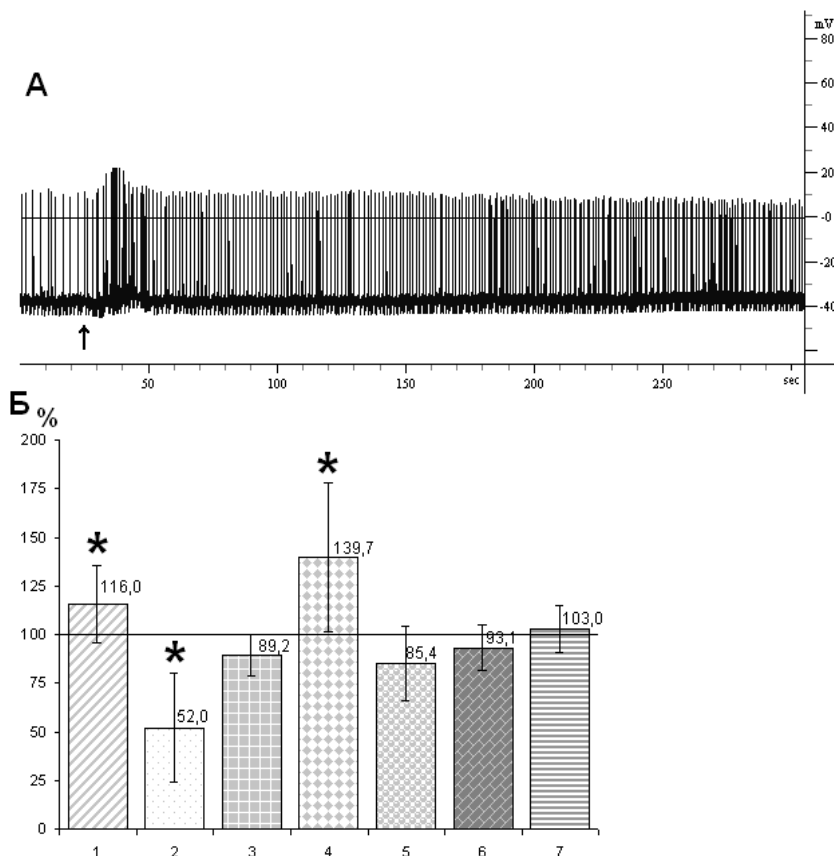


Рис. 1. Эффекты комплекса 1 на функциональное состояние нейронов. На А – стрелкой показан момент аппликации; На Б – эффект усредненных данных (%), $n = 24$; за 100 % принят фоновый уровень соответствующих показателей активности нейронов. Звездочками обозначены случаи достоверных отличий от фоновых показателей. 1 – частота генерации импульсов; 2 – межимпульсные интервалы; 3 – длительность потенциала действия; 4 – суммарные входящие токи; 5 – суммарные выходящие токи; 6 – амплитуда потенциалов действия; 7 – мембранный потенциал.

однонаправлено возбуждающими (рис. 2). У одних нейронов это выражалось в увеличении количества импульсов в пачечной активности нейрона (рис.2, А), у других – молчащих появлялась импульсная активность (рис.2, Б), а у третьих повышалась (рис. 2, В). На Рис. 2, Г видно, что повышение возбудимости нервных клеток, связанное с развитием деполяризации мембраны на 6,7 %, приводит к выраженному ($p < 0,005$) усилению ЧГИ (в среднем до $116,0 \pm 13,7$ %). При этом, естественно уменьшались межимпульсные интервалы (до $88,9 \pm 25,4$ %).

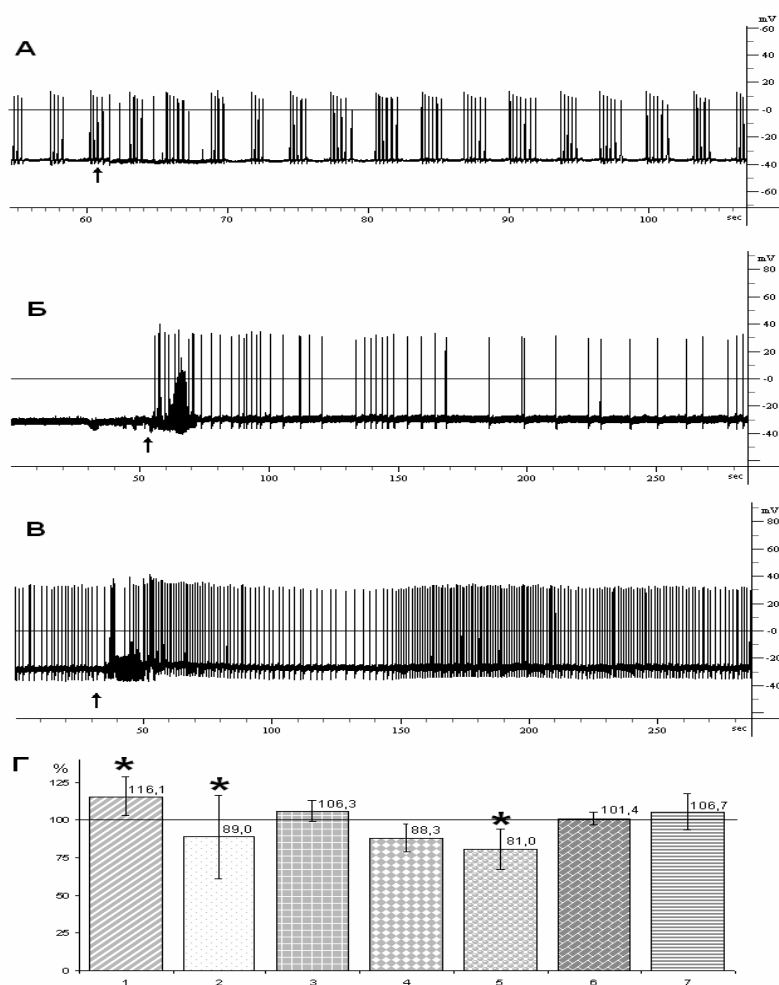


Рис 2. Эффекты комплекса 2 на: А – пачечную активность; Б – молчащий нейрон; В – мономодальную активность; Г - усредненные данные (%), $n = 21$. Остальные обозначения, такие же, как и на Рис. 1.

Анализ суммарных входящих и выходящих токов под воздействием исследуемого вещества показал отрицательную их направленность, с большей выраженностью вторых ($80,9 \pm 13,2$ %). При этом время развития ПД оставалось практически неизменным.

Исследование воздействия комплексов ТТГ с кофеином в концентрации 10-3 М, показало, что как моно- так и бисдесмозидный тритерпеновые гликозиды оказывали активирующее действие на электрофизиологические показатели нейронов. При этом у них была выявлена разнонаправленная кинетика входящих и выходящих токов. Так, при действии комплексного соединения 1 (включает монодесмозидный ТТГ)

увеличивались входящие ($p \leq 0,05$) токи и снижались выходящие. А при действии комплекса 2 (содержит бисдесмозидный ТТГ) снижались как входящие, так и выходящие ($p \leq 0,05$) трансмембранные ионные токи. Из литературных источников известно, что у нейронов моллюска входящий ток обеспечивается ионами натрия и, в заметной степени, кальция, а выходящий – ионами калия [9].

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что нейротропные эффекты тестируемых соединений у большинства исследуемых нейронов при воздействии 1 обусловлены в основном облегчением натриевого ионного тока и ингибированием выходящего калиевого, а при аппликации 2 – ингибированием, как натриевого, так и калиевого ионных токов. Нельзя исключить также возможности того, что исследуемые соединения влияют и на токи ионов хлора [10], которые, как известно, в зависимости от его внутриклеточной концентрации могут вносить определенный вклад в выходящие трансмембранные ионные токи.

Поскольку, одной из мишенью кофеина в основном являются аденозиновые рецепторы плазматической мембраны, кофеин действует как конкурентоспособный антагонист аденозиновых рецепторов, вызывая интенсификацию нейрональной активности [11]. Второй мишенью кофеина являются рианодиновые рецепторы саркоплазматического ретикулума и митохондрий клетки [11, 12]. Взаимодействуя с ними, кофеин способствует выбросу кальция из депо. Этот процесс обуславливает кратковременное, фазическое значительное увеличение ионизированного кальция, за которым следует снижение его концентрации ниже исходного уровня. Такое снижение может быть вызвано усиленной кальций-стимулированной секрецией кальция и перезаполнением кальциевых депо. Эти процессы вероятно и приводят к изменениям функционального состояния нервных клеток. Поэтому при действии комплексного соединения 2 усиление импульсной активности нейронов, возможно в значительной степени связано с блокированием кальцийзависимой калиевой проводимости.

Ранее нами выяснено, что монодесмозидные ТТГ в концентрациях 10^{-3} – 10^{-4} М оказывают гиперполяризующее действие на электрическую активность как идентифицированных, так и неидентифицированных нейронов, а бисдесмозидные ТТГ в концентрации 10^{-3} – 10^{-2} М не влияют на фоновую активность нейронов [1, 2]. Из литературных источников известно, что кофеин оказывает активирующее воздействие на свои мишени и вызывает усиление нейрональной активности. Так аппликация физиологических концентраций кофеина на изолированные нейроны пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* вызывала обратимые де- и гиперполяризационные изменения МП [13]. Данное исследование показывает, что присоединение кофеина к моно- и бисдесмозидным гликозидам приводит к проявлению в большинстве своем деполяризующих эффектов и активирует бисдесмозидные ТТГ. Вероятно, это обусловлено особенностями строения молекулярного комплекса.

ВЫВОД

В основе активирующего нейротропного эффекта тестируемых веществ лежит селективное возбуждение/угнетение трансмембранных ионных токов. Выявление данных свойств у исследуемых комплексов указывает на

перспективность дальнейшего исследования подобных соединений в целях создания новых нейротропных лекарственных средств.

Список литературы

1. 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.
2. 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.
3. Анисимов М.М. О биологической роли тритерпеновых гликозидов / М.М. Анисимов, В.Я. Чирва // Успехи современной биологии. – 1980. – Т.6, № 3. – С. 351–364.
4. Толкачева Н.В. Тритерпеновые гликозиды листьев плюща крымского *Hedera taurica* Carr. / Толкачева Н.В. – Ин-т физико-химический им. А.В. Богатского АН. Украины, 1992. – 22 с.
5. Kong L.Y. Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide and cytokine production by ultralow concentrations of dynorphins in mixed glia cultures / L.Y. Kong, M.K. McMillian, P.M. Hudson [et al.] // Pharmacol. Exp. Ther. – 1997. – Vol. 280. – P. 61–66.
6. Яковишин Л.А. Комплекс тритерпеновых гликозидов лекарственного препарата Hedelix® / Л.А. Яковишин, В.И. Гришковец // Химия природ. соедин. – 2003. – № 5. – С. 417–418.
7. Исследование тритерпеновых гликозидов лекарственного препарата проспан / Л.А. Яковишин, М.А. Вожжова, А.Л. Кузнецова [и др.] // Журнал орг. и фарм. химии. – 2005. – Т. 3, вып. 1 (9). – С. 57–59.
8. А.с. № 1164229 Україні. Комп'ютерна програма для реєстрації, обробки і автоматизованого аналізу біоелектричних сигналів / А.А. Замотайлов, І.І. Коренюк (Україні). – № 1164229; опубл. 29.11.2004 р
9. Магура И.С. Проблемы электрической возбудимости нейрональной мембраны / Магура И.С. – Киев: Наук. Думка, 1981. – 208 с.
10. Герасимов В.Д. Ионные механизмы деполяризационных ответов, вызываемых аппликацией глутамата, в нервных клетках виноградной улитки / В.Д. Герасимов // Нейрофизиология. – 1982. – Т. 14. – № 6. – С. 572–577.
11. Collins R.O. The effect of calcium pumpinhibitors on the response of intracellular calcium to caffeine in snail neurones / R.O. Collins, R.C. Thomas // Cell Calcium. – 2001. – № 1. – P. 41–48.
12. Orkand R.K. Effect of low doses of caffeine on $[Ca^{2+}]_i$ in voltage-clamped snail *Helix aspersa* neurons / R.K. Orkand, R.C. Thomas // Physiol. – 1995. – Vol. 489. – P. 19–28.
13. Пластичность нейрональных ответов индуцированная низкими концентрациями экзогенных лигандов / О.И. Эпштейн, Т.А. Запара, О.Г. Симонова [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – № 3 (117). – С. 115–120.

Колотілова О.І. Вплив молекулярних комплексів тритерпенових глікозидів з кофеїном на параметри електричної активності нейронів виноградного равлика / О.І. Колотілова, Л.О. Яковишин, І.І. Коренюк [та ін.] // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62). – №1. – С. 32–39.

За допомогою внутрішньоклітинного відведення досліджували вплив тритерпенових глікозидів в комплексі з кофеїном, які вводили в позаклітинне середовище, на електричну активність неідентифікованих нейронів вісцерального ганглія виноградного равлика. Продемонстровано, що аплікація цих сполук безпосередньо на клітинну мембрану нейронів призводить до активуючої нейротропної дії, що виражається в зміні всіх електрофізіологічних показників.

Ключові слова моно- та бісесмосидні тритерпенові глікозиди, кофеїн, молекулярний комплекс, нейрони, нейротропні ефекти.

Kolotilova O.I. Influence of molecular complex triterpene glycosides with caffeine on parameters of the electrical activity of neurons *Helix albescens* / O.I. Kolotilova, L.A. Yakovishin, I.I. Koreniuk [et al.] // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – V.23 (62). – № 1. – P. 32-39.

Using of the intracellular registration investigation of influence triterpene glycosides together with caffeine, which injected in extrocellular medium, on the electrical activity non identification neurons visceral ganglion *Helix albescens*. It was demonstrated that application of compounds directly of membran cells of neuron it leads in marked activity of neurotropic action, it marked in changing all of the eletrofisiological index.

Keywords: mono- and bidesmosidic triterpene glycosides, caffeine, molecular complex, neurons, neurotropic effect.

Поступила в редакцию 15.04.2010 г.