

УДК 612.014.46:615.214:547

## ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГЛИКОПЕПТИДОВ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА *HELIX ALBESCENS* ROSSM

*Раваева М.Ю., Коренюк И.И., Гамма Т.В., Курьянов В.О., Чупахина Т.А*

### **Введение**

В настоящее время синтезируется большое количество веществ, в состав которых входят аминокислоты, обладающие медиаторными свойствами, и естественно, что внимание исследователей направлено на изучение механизмов действия таких соединений на нервную систему [12]. Поскольку на нейронах моллюсков разных видов показано наличие рецепторов глутаминовой кислоты [4], глицина и др. биологически активных веществ [14], то нейроны моллюска являются приемлемой моделью [10] для исследований нейротропного действия соединений, содержащих медиаторные аминокислоты. Целью настоящего исследования было изучение эффектов воздействия на электрическую активность идентифицированных нейронов новых синтезированных соединений класса гликопептидов, в состав которых входят такие аминокислоты как глицин и глутаминовая кислота.

### **Методика**

Эксперименты были проведены по общепринятой методике внутриклеточного отведения биопотенциалов [15] на 35 нейронах ППа1, 47 - ППа2 и 33 - ППа7. Анализу были подвергнуты следующие параметры потенциалов нейронов: уровень мембранного потенциала (МП), критический уровень деполяризации (КУД), частота генерации импульсов (ЧГИ), амплитуда потенциала действия (ПД), длительность его фаз деполяризации и реполяризации, амплитуда и длительность следовой гиперполяризации (СГ). Изучалось действие следующих производных: 1,2:3,4-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопиранозилурановая кислота - 1 (молекулярная масса - 274), N-(1,2:3,4-ди-0-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопиранураноил)-глицил-D,L-глутаминовая кислота - 2 (молекулярная масса - 461), N-[N-(1,2:3,4-ди-0-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопиранураноил)-глицил-глицин - 3 (молекулярная масса 523) [9] на вышеуказанные параметры электрической активности нейронов. Эксперименты проводились по схеме: фон, аппликация и экспозиция соединения во внеклеточной среде в течение 10 мин, отмывание 20 мин. Полученные данные обработаны с помощью пакета "Statistica 5.0" ( $p < 0,05$ ).

### Результаты

*Эффекты воздействия 1,2:3,4-ди-О-изопропилиден- $\alpha$ -D-галактопиранозилуруновой кислоты (1).* В отдельной серии экспериментов мы исследовали влияние этого моносахарида, являющегося химической основой используемых в наших экспериментах гликопептидов. Пороговая концентрация 1 для нейрона ППа2 составляла  $10^{-6}$  М, а для нейронов ППа1 и ППа7 –  $10^{-5}$  М.

В концентрации  $10^{-5}$  М 1 у нейронов ППа2 вызывала незначительное увеличение ЧГИ и их амплитуды (на  $4 \pm 1,3$  мВ), а параметры МП, КУД, длительности ПД и СГ существенно не изменялись. При отмывании у 67 % этих нейронов происходило снижение ЧГИ в 3–4 раза и амплитуды ПД на  $10 \pm 2$  мВ, а в 33 % случаев уже через 1–2 мин наблюдалось полное прекращение импульсации, однако в течение 10–15 мин отмывания у всех нейронов ППа2 исходные параметры ЧГИ и амплитуда ПД восстанавливались. У нейронов ППа1 и ППа7 не наблюдалось существенных изменений исследуемых параметров, т.е. они оказались менее чувствительны к действию 1 в концентрации  $10^{-5}$ .

При увеличении концентрации до  $10^{-4}$  М у всех нейронов наблюдалось волнообразное изменение паттерна ЧГИ с периодическим снижением и повышением импульсации. После аппликации МП в течение 30 с смещался в сторону гиперполяризации на 4–5 мВ, что сопровождалось урежением импульсации в 1,5–2 раза (рис. 1 А). Затем МП возвращался к фоновому уровню, и в 1,5–2 раза увеличивалась ЧГИ. При этом амплитуда ПД существенно не изменялась, а его продолжительность у всех исследованных нейронов увеличивалась незначительно.

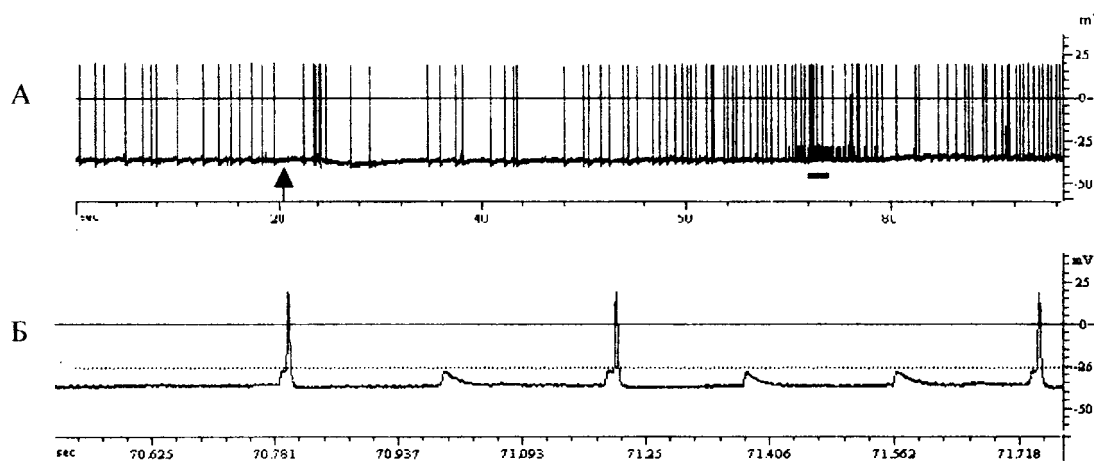


Рис. 1. Влияние соединения 1 в концентрации  $10^{-4}$  на нейрон ППа2.

А – фон и аппликация (стрелкой обозначен момент аппликации), Б – увеличенная во времени часть подчеркнутого фрагмента А, пунктирная линия – уровень амплитуды деполяризационных совигов.

Интересно отметить, что через 40 – 60 с экспозиции вещества у некоторых нейронов ППа2 между ПД появлялись не встречаемые в фоне небольшой амплитуды (7 – 10 мВ) деполяризационные потенциалы (рис. 1 Б). Такие деполяризационные сдвиги с крутым передним фронтом предшествовали полноценным ПД на восходящей части. При этом наблюдались НС-СД (начального сегмента - соматодендритные) углубления, которые могут рассматриваться в качестве критерия его антидромной природы. Деполяризационные пики появлялись, когда ЧГИ достигала определенного максимума, после чего происходило снижение ЧГИ и незначительно деполяризовалась мембрана.

После 20 мин отмывания все вышеперечисленные изменения показателей потенциалов возвращались к фоновому уровню и появления деполяризационных сдвигов МП не наблюдалось.

Реакция всех типов исследованных нейронов на действие данного соединения в концентрации  $10^{-3}$  М выражалась в том, что МП смещался на 2 – 3 мВ в сторону гиперполяризации, однако, как и при действии 1, это сопровождалось увеличением в 1,5-2 раза ЧГИ. Причем у нейронов ППа1, генерирующих в фоне пачечную активность, происходило увеличение числа ПД в пачке без существенного изменения межпачечного интервала (рис. 2 А), а у нейронов с нетипичной пачечной активностью происходило увеличение ЧГИ с тенденцией их группирования в пачки и увеличением в них числа ПД (рис. 2 Б). Кроме того, спайк уширился на 3 – 4 мс за счет увеличения в равной

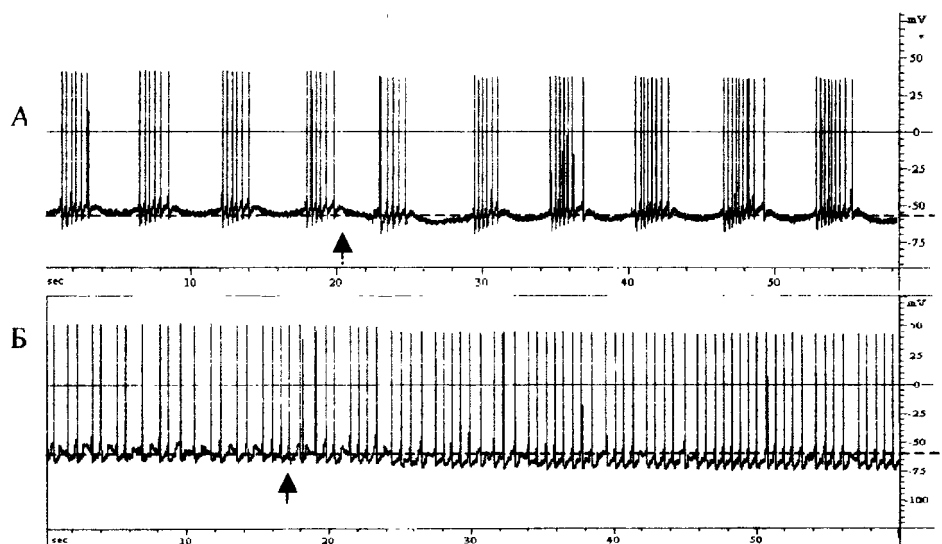


Рис. 2. Влияние соединения 1 в концентрации  $10^{-3}$  на нейрон ППа1.

А – нейрон, генерирующий пачечную активность, Б – мономодально работающий нейрон, пунктирная линия – фоновый уровень мембранного потенциала. Стрелкой показан момент аппликации.

мере продолжительности как фазы деполяризации, так и реполяризации. При отмывании у нейронов ППа1 и ППа7 исходные параметры потенциалов восстанавливались через 5 – 10 мин, а у большинства нейронов ППа2 к 10 мин отмывания наблюдалось полное прекращение ЧГИ, причем искусственная деполяризация мембраны не индуцировала генерацию импульсов.

Таким образом, мы можем констатировать, что для нейронов ППа2 данная доза является токсической и нейроны данной популяции обладают более низкой резистентностью по отношению к соединению 1, чем нейроны ППа1 и ППа7.

Эффекты влияния N-(1,2:3,4-ди-0-изопропилиден-?-D-галактопирануроноил)-глицил-D,L-глутаминовой кислоты (соединение 2). Пороговая концентрация 2 для трех типов исследованных нейронов составила  $10^{-5}$  М, однако, выраженные эффекты наблюдались при концентрации 2  $10^{-4}$  М. При этом, у всех нейронов МП смещался на 2 – 3 мВ в сторону деполяризации, незначительно повышалась ЧГИ, снижались КУД и амплитуда ПД на  $3\pm 1,1$  и  $6\pm 1,9$  мВ соответственно. Длительность фаз деполяризации и реполяризации ПД и амплитуда следовой гиперполяризации увеличивались незначительно. При отмывании по сравнению с фоном амплитуда ПД снижалась на  $10\pm 2$  мВ, а ЧГИ, длительность ПД и амплитуда СГ к 10 мин отмывания приближались к фоновому уровню.

При аппликации 2 в концентрации  $10^{-3}$  М по направленности реакции нейроны были разделены на 2 группы. В первую группу были отнесены 9 % исследованных нейронов, типичный пример развития реакции которых приведен на рис. 3. Как видно из рисунка, на первых 2 с экспозиции происходило резкое смещение МП в сторону деполяризации, сопровождающееся пропорциональным снижением амплитуды ПД и увеличением ЧГИ. При снижении МП на 35 – 45 мВ полностью прекращалась генерация ПД, после чего падение МП до нуля продолжалось 16 – 20 с. После 10-20 мин отмывания исходный уровень МП и активность у этих нейронов восстанавливались.

У 91 % нейронов развитие реакции было иным. При аппликации 2 на фоне деполяризации мембраны на 4 – 6 мВ наблюдалось увеличение ЧГИ в 2 – 3 раза, снижение КУД и амплитуды ПД на  $4\pm 1$  и  $8\pm 2$  мВ соответственно. По мере увеличения

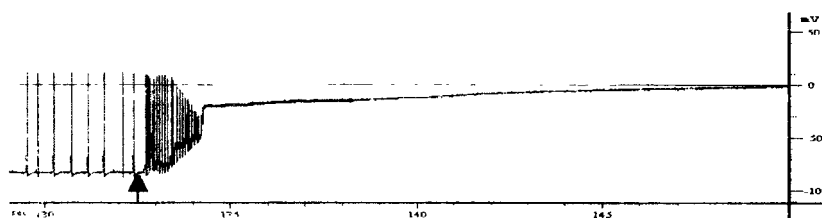


Рис. 3. Эффект воздействия соединения 2 в концентрации  $10^{-3}$  М на электрическую активность нейрона ППа2.

Момент аппликации показан стрелкой

времени экспозиции соединения во внеклеточной среде наблюдалось постепенное уменьшение МП (в целом на 7 – 10 мВ) и амплитуды ПД (в целом на 15 – 40 мВ). Длительность ПД у всех исследованных нейронов увеличивалась на 3-4 мс за счет увеличения в равной мере времени развития фаз как де- так и реполяризации. После отмывания у 27 % нервных клеток разных типов данной выборки происходило снижение частоты и амплитуды ПД, а также регистрировались дендритные ПД. В 64 % препаратов отмечалась гибель нейронов, свидетельством чему служило то, что на толчки входящего тока, подаваемые через 20 мин отмывания, не наблюдалось индуцирования в них генерации ПД.

Эффекты влияния N-[N-(1,2:3,4-ди-0-изопропилиден-?-D-галактопирануроноил)-глицил-глицина (соединение 3). Пороговая концентрация этого вещества для нейронов ППа1 и ППа7 составляла  $10^{-5}$  М, а для нейрона ППа2 –  $10^{-6}$  М.

Соединение 3 в концентрации  $10^{-5}$  у нейронов ППа2 вызывало незначительное снижение ЧГИ к 10 мин экспозиции, а остальные показатели значительно не изменялись. При отмывании в течение 20 мин ЧГИ практически возвращалась к фоновым значениям. У нейронов ППа1 и ППа7 наблюдалась только тенденция к увеличению ЧГИ в первые секунды после аппликации. В концентрации  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$  у всех исследованных нейронов на первых секундах аппликации 3 наблюдался сдвиг МП в сторону гиперполяризации, причем его глубина и продолжительность у разных типов нейронов варьировала. Так, у нейронов ППа2 происходило увеличение МП на  $4 \pm 1$  мВ (рис. 4), которое продолжалось в течение 10 с, затем МП восстанавливался до исходного уровня. У нейронов ППа1 и ППа7 гиперполяризационный сдвиг был немного глубже – на 6 – 8 мВ, однако через 10 с МП начал постепенно восстанавливаться и к 5 мин экспозиции соединения возвратился к фоновому уровню. Вышеперечисленные изменения МП сопровождалась у всех нейронов увеличением ЧГИ в 1,5 – 2,5 раза, а у нейронов ППа1, генерирующих пачечную активность, увеличивалось количество ПД в пачке в 1,5 – 2 раза, а межпачечные интервалы не изменялись. В течение всего времени экспозиции (10 мин) изменения ЧГИ, описанные выше, сохранялись, амплитуда ПД у нейронов ППа1 и ППа7 снижалась на  $6 \pm 2$  мВ, а у нейронов ППа2 – достоверно не изменялась. Длительность фаз де- и реполяризации ПД увеличивалась незначительно (на  $2 \pm 1,2$  мс), а остальные параметры ПД не изменялись.



Рис. 4. Влияние соединения 3 в концентрации  $10^{-3}$  на нейрон ППа2. Стрелкой показан момент аппликации. Калибровка – 50 мВ, 10 с

При включения протока раствора Рингера у 55 % нейронов наблюдалось необратимое прескращение импульсации, у остальных нейронов наблюдалась только тенденция к восстановлению импульсной активности, и так же, как у соединения 2, появлялись аксодендритные ПД.

### Обсуждение

Полученные в ходе экспериментов данные показали, что соединение 1 оказывало на все исследованные нейроны активирующее влияние, выражающееся в увеличении частоты импульсации, без значительного изменения амплитуды ПД. Одним из возможных механизмов данного стимулирующего эффекта может являться активация работы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -насоса. Известно [13], что в нервных клетках брюхоногих моллюсков для энергообеспечения работы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -насоса в первую очередь используется энергия гликолиза, и, поскольку данное соединение является моносахаридом, вероятно, что вышеуказанный эффект является результатом увеличения энергетических обменных процессов в клетке.

Относительно влияния соединения 2 можно сказать следующее. Так как данное вещество получено путем введения в структуру диацетонгалактуроновой кислоты 1 дипептидного фрагмента глицил-D,L-глутаминовой кислоты, то можно предположить, что возникающий деполяризационный эффект во многом обусловлен биологической ролью его пептидной части, которая содержит глутаминовую кислоту, относящуюся, как известно [12], к сильным возбуждающим кислотам. Наблюдаемое в ходе экспериментов смещение мембранного потенциала в сторону деполяризации и последующее за этим снижение амплитуды ПД, по-видимому, обусловлено увеличением входа ионов  $\text{Na}^+$ . Подтверждением нашему предположению могут быть исследования [4] деполяризующего действия глутамата на нейроны *Helix*, объясняя его увеличением входящего трансмембранного ионного тока.

Действие соединения 3 на активность нейронов было неоднозначным. Так, гиперполяризация мембраны, сопровождалась увеличением ЧГИ и снижением амплитуды ПД, что, вероятно, обусловлено действием 3 на различные ионные механизмы. Возможно, что данный эффект определен суммарным действием диацетонгалактуроновой кислоты и действием глицил-глицинового фрагмента. Известно [12], что глицин является тормозным нейромедиатором, и полученный эффект обусловлен тем, что активным фактором действия этого соединения является данный дипептидный фрагмент. Так как известно, что нейроны моллюска имеют рецепторы к ГАМК, то возможны, по-крайней мере, два механизма действия глицина: с одной стороны – воздействие на ГАМК-ергические рецепторы, а с другой – усиление ингибиторных процессов в нервной системе за счет снижения обмена - метаболической деградацией ГАМК или усилением ее высвобождения [12].

Несколько пороговые концентрации соединений для нейронов, а также различная реакция нейронов ППа1 и ППа7 по сравнению с нейронами ППа2 на действие

и последствие (отмывание) соединений указывают на индивидуальную хемочувствительность мембран разных типов нейронов. Различия ответных реакций нейронов моллюска на действие соединений, содержащих пептиды, связывают [6] с наличием белого секрета в клетке который характерен для пептидергических клеток. Из используемых нами в экспериментах 3-х типов клеток, нервная клетка ППа2 всегда лишена белого материала, что, вероятно, и обуславливает разнонаправленность ответов нейронов ППа1 и ППа7 от ответов клетки ППа2. Так же, не исключено, что у нейрона ППа2 больше, чем у нейронов ППа1 и ППа7, чувствительных к соединениям 1 и 3 рецепторов на мембране сомы.

Невосстановление фоновых показателей после отмывания соединений в высоких концентрациях и высокий уровень нейрональной летальности указывают на токсическое действие данных соединений. Вероятно, что данные вещества, проникая в мембрану или образуя комплексы с её компонентами, влияют на структуру мембраны, что в свою очередь изменяет её проницаемость. Такое действие характерно практически для всех препаратов в высоких концентрациях, обладающих нейротропными свойствами [11].

Увеличение продолжительности фаз деполяризации и реполяризации ПД у всех типов нейронов под действием 1, 2 и 3 в концентрациях  $10^{-4}$  и  $10^{-3}$ , вероятно, обусловлено активацией входящего кальциевого тока. Входящий кальциевый ток приводит к уширению спайка и к увеличению рефрактерного периода за счет гиперполяризации клетки, вызванной активацией Са-стимулируемой калиевой проводимости вошедшими в клетку ионами кальция [7].

Появление аксодендритных потенциалов у нейронов ППа2 при действии 1 можно объяснить тем, что данное соединение эффективно облегчает антидромное распространение ПД из аксодендритного локуса его генерации на мембрану сомы. Предположение о присутствии локуса пейсмекерной активности в аксодендритном древе высказывалось и ранее [8]. Появление аксодендритных ПД после отмывания 2 и 3 может говорить о том, что мембрана локуса возникновения ПД оказалась менее чувствительной к действию данных гликопептидов, чем мембрана сомы [16]. Кроме того, при изменении возбудимости клетки не каждый импульс НС возбуждает локус генерации, равно как затрудняется проникновение НС-спайка в сому нейрона и запуск СД-генератора [3].

Таким образом, исследованные в нашей работе производные оказывают разнонаправленное действие, которое зависит от типа нейронов, химической структуры соединений и их концентраций.

### **Список литературы**

1. Баев К.В., Русин К.И., Сафронов Б.В. L-глутамат активируемая проводимость мембраны нервных клеток спинного мозга в раннем эмбриогенезе лягушки // *Нейрофизиология*, – 1987. – Т. 19, – №2. – С. 251 – 258.
2. Балабан П.М., Норежля Т.П., Сторожук В.Н. Внутриклеточная регуляция пластических перестроек в нервных клетках при обучении // *Внутриклеточная сигнализация*. – М., 1988. – С. 16–21.

3. Безерия М.Ю., Воронова Н.В., Чумаченко А.А. Значение множественности электровозбудимых локусов мембраны одиночной нервной клетки в обеспечении ее функции // Тезисы докладов XV Съезда всесоюзного физиологического общества им. И.П. Павлова, Кишинев – 1987. – Ленинград: Издательство “Наука”, 1987. – С. 189.
4. Герасимов В.Д. Ионные механизмы деполяризационных ответов, вызываемых аппликацией глутамата, в нервных клетках виноградной улитки // Нейрофизиология, – 1982. – Т.14, – № 6. – С.572–577.
5. Гомазков О.А. Функциональная биохимия регуляторных пептидов. – М: “Наука”, 1992. – 160с.
6. Дятлов В.А. Модуляция серотонином глицин-индуцируемых ионных токов в нейронах моллюска // Нейрофизиология. – 1989. – Т.21. – №3. – С. 413–416.
7. Коваль Л.М., Кононенко Н.И. Новые идентифицируемые клетки виноградной улитки *Helix pomatia*, связанные с генерацией ритмоводящей активности // Журнал высшей нервной деятельности. – 1992. – Т. 42. – Вып. 6. – С. 1124 – 1131.
8. Калинина Н.И., Курчавый Г.Г. Свойства ответов мотонейронов лягушки на аппликацию глутамата // Нейрофизиология. – 1988. – Т. 20. – №6. – С. 776–785.
9. Курьянов В.О., Чупахина Т.О., Чирва В.Я. Синтез N-уроноіламіноациламідів // 36. Тез. 19 Української конференції з органічної хімії. – Львів, 10 – 14 вересня 2001. С. 239.
10. Магура И.С. Проблемы электрической возбудимости нейрональной мембраны. – Киев: “Наукова думка”, – 1981. – 208с.
11. Гирузян Л.А., Ковалев В.И., Лаврецкая О.Ф., Ландау М.А. и др. Действие физиологически активных соединений на биологические мембраны. – М.: Наука, 1974. – 389с.
12. Раевский К.С. Возбуждающие аминокислоты, глутаматные рецепторы и патология ЦНС // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1990. – №1. – С. 3–9.
13. Скульский И.А., Пивоваров Н.Б. Влияние ингибиторов энергетического метаболизма на накопление калия в нейронах моллюска *P. cornuus* // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. – 1988. – Т. 24. – №6. – С.817–821.
14. Boyd P.J., Walker R.J. Action of the molluscan neuropeptide FMRF-amide on neurons in the suboesophageal ganglia of snail *Helix aspersa* // Comp. biochem. and physiol. – 1985. – V.81. – №2. – P. 379-386.
15. Коренько Н.И. Modulation of endogenous electrical activity of the bursting neuron in the snail *Helix pomatia* // Neurosci. – 1979. – V.4. – №12. – P. 2047–2054.
16. Коренько Н.И. Role of the axodendritic tree in the functioning of *Helix* bursting neurons: generation of pacemaker activity and propagation of action potentials along the axon // Neurosci. – 2000. – V.96. – № 2. – P.399–406.

Поступила в редакцию \_\_\_\_\_