

УДК 612.014.46:615.214:547.466

**ХАРАКТЕРИСТИКА ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА
ПРИ ДЕЙСТВИИ N-[N-(1,2:3,4-ДИ-0-ИЗОПРОПИЛИДЕН-А-D-
ГАЛАКТОПИРАНУРОНОИЛ)]-β-АЛАНИНА**

Раваева М.Ю., Коренюк И.И.

В нервной системе моллюсков найдены практически все рецепторы к нейромедиаторам ЦНС позвоночных, таких, как ацетилхолин, серотонин, гамма-аминомасляная кислота [1, 2], глутаминовая кислота [3], глицин [4] и др. [5]. Это позволяет говорить об общности процессов, а значит, и адекватности сравнительных переносов результатов, полученных на нейронах моллюсков и на высших животных. Однако, сведений о наличии рецепторов к аланину на мембране нейронов моллюска в доступной нам литературе не обнаружено, в то время как в ЦНС млекопитающих β-аланин и глицин действуют на одни и те же рецепторы [6]. Высказано предположение, что β-аланин, как и глицин, способны оказывать тормозное действие на нейроны благодаря тому, что у этих аминокислот обнаружен высокий процент совпадений межъядерных расстояний в кристаллической решетке [7]. Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования было выявление наличия нейротропного эффекта, направленности и особенностей характера реакций у идентифицированных и неидентифицированных нервных клеток моллюска *Helix albescens* Rossm. при действии на них одного из производных гликопептидов, радикалом которого является β-аланин. Кроме того, представляло интерес выяснить возможные механизмы нейротропного эффекта и динамику трансмембранных ионных токов во время экспозиции данного соединения. N-[N-(1,2:3,4-ди-0-изопропилиден-α-D-галактопирануроноил)]-β-аланин (далее по тексту «соединение») получен на кафедре органической химии Таврического национального университета [8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты были проведены на 17 нейронах ППа1, 12 – ППа2 и 22 неидентифицированных нейронах висцерального ганглия (ВГ) по общепринятой методике внутриклеточного отведения биопотенциалов [9]. При этом была использована созданная в нашей лаборатории специальная компьютерная программа, позволяющая вести непрерывную запись нейронной активности в течение 10–15 мин, осуществлять автоматический подсчет электрофизиологических параметров отдельных нейронов: уровня мембранного потенциала (МП), частоты генерации импульсов (ЧГИ) и амплитуды усредненных в заданный промежуток времени потенциалов действия (ПД). Данная программа также позволяет получать

первую производную ПД, которая, как известно, характеризует изменения трансмембранных ионных токов в разные фазы ПД. Так, момент, когда мембранный потенциал доходит до нулевого уровня, соответствует максимуму скорости нарастания ПД на первой производной, а когда ПД достигает максимума, первая производная по времени равна нулю и момент начала нисходящей фазы ПД соответствует изменению знака первой производной на противоположный [10].

Эксперименты проводились по схеме: фон – экспозиция соединения в течение 5-10 мин – отмывание 20–40 мин. Диапазон концентраций апплицируемого вещества составлял от 10^{-5} до 10^{-2} М.

Полученные данные обработаны с помощью пакета «Statistica 5.0»

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При введении в омывающий ганглии раствор N-[N-(1,2:3,4-ди-0-изопропилиден- α -D-галактопирануроноил)]- β -аланина (далее «соединение») в концентрации 10^{-5} М у большинства исследованных нейронов был выявлен нейротропный эффект, проявляющийся в незначительных изменениях показателей уровня МП, ЧГИ и амплитуды ПД у всех исследованных нейронов.

У 88 % исследованных нервных клеток при аппликации соединения в концентрациях 10^{-4} – 10^{-2} М наблюдалось дозозависимое (рис. 1 и 4, А) смещение

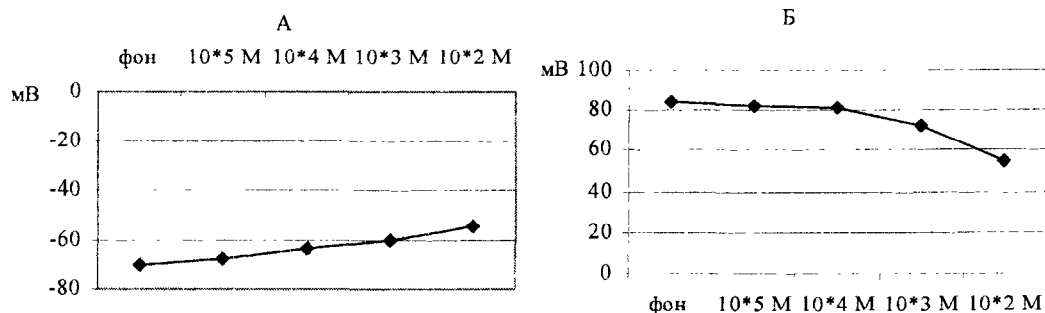


Рис. 1 Изменения уровня мембранного потенциала (А) и амплитуды потенциала действия (Б) на 20 с экспозиции в зависимости от концентрации апплицируемого соединения.

По оси абсцисс – концентрации.

МП в сторону деполяризации, сопровождающееся увеличением частоты и снижением амплитуды ПД.

Динамика развития реакции нейронов была следующей. В концентрации 10^{-4} М на первых 20-30 с экспозиции соединения МП смещался в сторону деполяризации на $7 \pm 1,6$ мВ, что сопровождалось резким увеличением ЧГИ в 2 – 2,5 раза и снижением амплитуды ПД на $8 \pm 0,9$ мВ. Типичный пример реакции одного из нейронов на аппликацию соединения в концентрации 10^{-4} М представлен на рис. 2. Необходимо отметить, что к 5 мин экспозиции соединения происходило постепенное восстановление исходного уровня МП, ЧГИ и амплитуды ПД.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА ПРИ ДЕЙСТВИИ N-[N-(1,2:3,4-ДИ-О-ИЗОПРОПИЛИДЕН-А-D-ГАЛАКТОПИРАНУРОНОИЛ)]-(-АЛАНИНА

При увеличении концентрации соединения до 10^{-3} М на первых 20 с экспозиции наблюдалось увеличение деполяризации мембраны на $10 \pm 1,3$ мВ (рис. 1, А). Это сопровождалось увеличением ЧГИ в 2,3 – 2,6 раза и снижением амплитуды ПД на

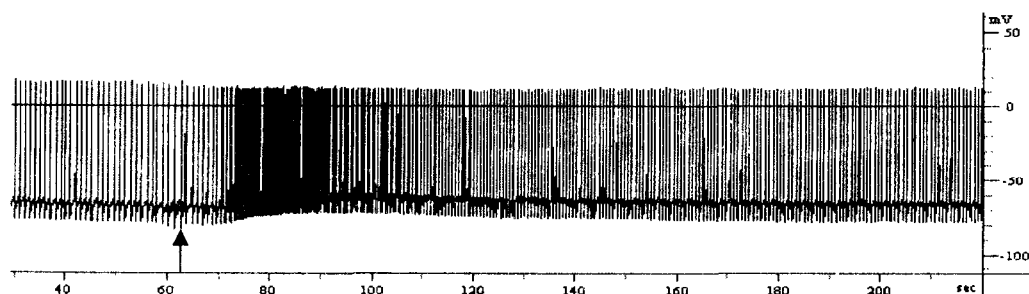


Рис. 2. Влияние соединения в концентрации 10^{-4} М на электрическую активность неидентифицированного нейрона висцерального ганглия.

Стрелкой показан момент аппликации.

$8 \pm 1,6$ мВ (рис. 1, Б). К 5 мин экспозиции наблюдалась только тенденция к восстановлению параметров электрической активности нейронов.

Повышение концентрации соединения до 10^{-2} М уже на первых 10 с экспозиции приводило к деполяризации мембраны на $14 \pm 1,9$ мВ (рис. 1, А), увеличению ЧГИ в 2,5-3 раза и снижению амплитуды ПД на $25 \pm 2,1$ мВ (рис. 1, Б), однако к 5 мин экспозиции, в отличие от действия соединения в меньших концентрациях, не наблюдалось даже тенденции к восстановлению исходных электрических параметров. Так, уровень МП оставался ниже фона на $16 \pm 2,1$ мВ, происходило постепенное снижение ЧГИ в 2-2,5 раза ниже фона и амплитуды ПД на $30 \pm 2,9$ мВ, причем у 65 % из 12 нейронов наблюдалась их полная редукция. Необходимо отметить, что на толчки входящим деполяризующим током эти нейроны не отвечали генерацией ПД. Остальные нейроны не прекращали генерацию ПД.

Обращает на себя внимание тот факт, что восстановление исходных параметров при отмывании соединения в различных концентрациях также носило обратный дозозависимый характер. Так, в концентрации 10^{-4} М исходный уровень импульсной активности нейронов восстанавливался, что говорит об обратимом действии данного соединения на нейроны. Практически полное восстановление исходных параметров импульсации после отмывания соединения в концентрации 10^{-3} М происходило у 53 % нейронов, а после экспозиции соединения в концентрации 10^{-2} М – только у 26 % клеток. У остальных нейронов наблюдалось постепенное и необратимое прекращение генерации ПД. Даже после 20 мин отмывания нейроны не воспроизводили импульсы в ответ на одиночную стимуляцию входящим деполяризующим током.

У 12 % из всех исследованных нейронов (в основном клеток ВГ) степень выраженности реакций была значительно ниже, чем у вышеописанных. Это проявлялось в кратковременном (не более 1,5 мин) сдвиге уровня МП в сторону деполяризации на 1-2 мВ, увеличении (в 1,2 – 1,4 раза) ЧГИ и снижении амплитуды ПД на 2-3 мВ.

Таким образом, у исследованных нейронов соединение дозозависимо деполяризовало мембрану, что сопровождалось увеличением ЧГИ и снижением амплитуды ПД. Действие соединения имело обратимый характер при концентрациях 10^{-5} и 10^{-4} М, а при 10^{-3} и 10^{-2} М – частично обратимый или необратимый характер.

Характеристика трансмембранных ионных токов.

Анализируя кривые первой производной ПД нейронов при аппликации данного соединения в диапазоне концентрации 10^{-5} – 10^{-2} М наблюдалось дозозависимое

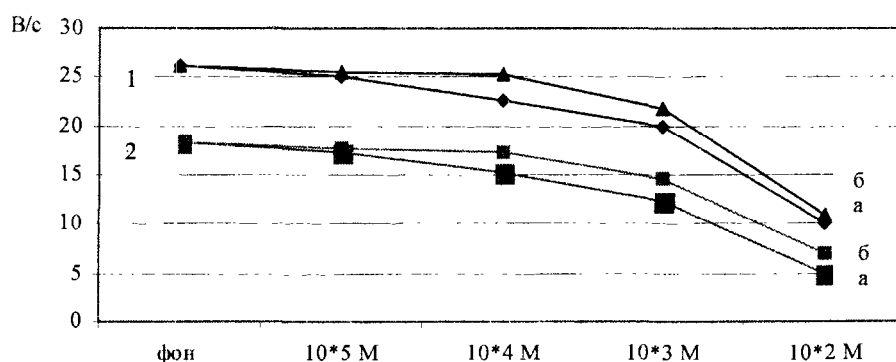


Рис. 3. Зависимость максимумов скорости нарастания (1) и спада (2) на кривой первой производной потенциалов от концентрации соединения (ось абсцисс). а – в течение первых 20 с, б – через 5 мин экспозиции.

уменьшение максимумов как скорости нарастания, так и спада ПД (рис. 3). Причем, в концентрации 10^{-5} М каких-либо значительных изменений максимумов скорости нарастания и спада ПД не обнаружено, а в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-2} М

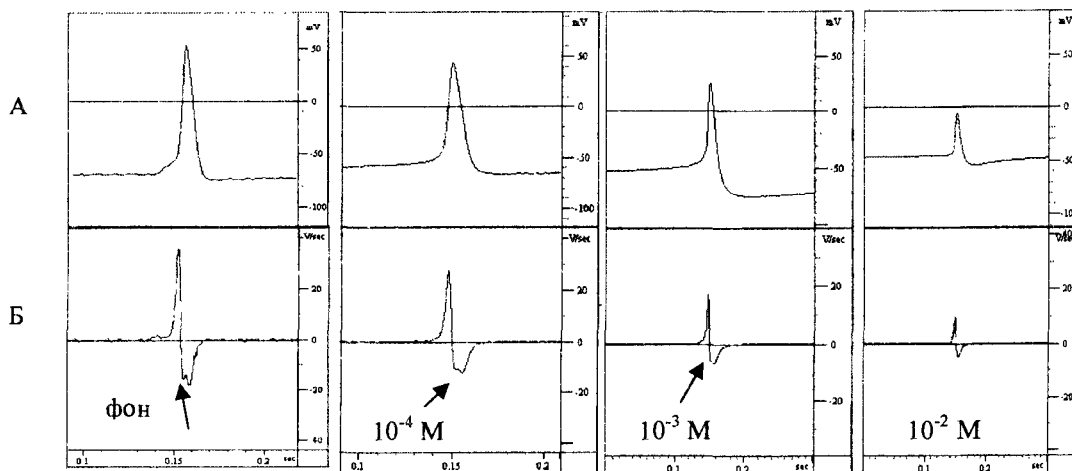


Рис. 4. Усредненный ПД (А) и его первая производная (Б) при действии соединения в различных концентрациях на нейрон ППа1. Стрелкой на Б указана задержка.

**ХАРАКТЕРИСТИКА ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА ПРИ
ДЕЙСТВИИ N-[N-(1,2:3,4-ДИ-О-ИЗОПРОПИЛИДЕН-А-D-ГАЛАКТОПИРАНУРОНОИЛ)]-
АЛАНИНА**

выявлено уменьшение максимумов как скорости нарастания на $4,3 \pm 0,9 - 16 \pm 2,3$ В/с, так и спада ПД на $3,1 \pm 0,6 - 13 \pm 1,9$ В/с, соответственно.

Интересным оказалось то, что к 5 мин экспозиции соединения в концентрациях 10^{-5} и 10^{-4} М происходило практически полное восстановление максимума скорости нарастания ПД до исходного уровня, а максимум скорости спада ПД имел тенденцию к восстановлению, однако оставался ниже фона. При более высоких концентрациях наблюдалась только тенденция к восстановлению скорости обоих трансмембранных токов.

Необходимо отметить, что на нисходящей фазе первой производной фоновых ПД нейронов ППа1 и некоторых неидентифицированных клеток ВГ, обнаруживалась характерная задержка (рис. 4). При действии соединения в концентрациях 10^{-4} – 10^{-3} М крутизна нарастания этой задержки заметно сглаживается и уменьшается ее продолжительность, а в концентрации 10^{-2} М – она исчезает. При отмывании соединения в концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} М крутизна и продолжительность задержки практически восстанавливались, а при концентрации 10^{-2} М – не восстанавливались.

Таким образом, анализ кривой первой производной показал, что влияние N-[N-(1,2:3,4-ди-0-изопропилиден- α -D-галактопирануроноил)]- β -аланина в концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} М дозозависимо уменьшал максимумы скорости нарастания и спада ПД, однако уменьшение максимума скорости спада было более выражено. Концентрация 10^{-2} М данного соединения для всех нейронов является токсической.

Результаты электрофизиологических исследований показали, что N-[N-(1,2:3,4-ди-0-изопропилиден- α -D-галактопирануроноил)]- β -аланин вызывал смещение уровня МП в сторону деполяризации, увеличивая ЧГИ и снижая амплитуду ПД. Опираясь на литературные данные [5], нужно отметить, что деполяризацию мембраны могут обеспечить по крайней мере два ионных механизма: увеличение входа ионов натрия в клетку и/или блокирование выхода калиевого тока. На основании анализа динамики трансмембранных ионных токов выявлено дозозависимое уменьшение, как максимума скорости нарастания, так и максимума скорости спада ПД, однако уменьшение максимума скорости спада было значимее. Как известно [10], максимальная скорость нарастания и спада ПД позволяет судить о максимуме входящего и выходящего тока. Исходя из того, что роль переносчиков входящего тока во время восходящей фазы ПД у нейронов улитки выполняют как ионы натрия, так и кальция, выходящего – ионы калия, можно заключить, что данное соединение ингибировало входящий натриевый, кальциевый и выходящий калиевый ионные токи. Однако важной особенностью являлось то, что калиевый ток обнаруживал более высокую чувствительность к действию соединения, чем остальные ионные токи.

Обнаруживаемая у некоторых нейронов задержка на нисходящей фазе первой производной ПД, как известно [11], обусловлена наложением на выходящий калиевый ионный ток противоположного по направлению кальциевого тока. Поскольку при концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} М изменялась крутизна нарастания этой задержки и ее продолжительность, то, очевидно, данное соединение существенно, в

зависимости от концентрации соединения, уменьшает кальциевый ток. При концентрации 10^{-2} М этот ток полностью подавляется, на что указывает исчезновение данной задержки. Действие соединения на входящий кальциевый ионный ток было полностью обратимо в концентрации 10^{-4} М, в 10^{-3} М – частично обратимо и в 10^{-2} М – практически необратимо.

Полное восстановление исходных электрофизиологических показателей к 5 мин экспозиции соединения в концентрациях 10^{-5} – 10^{-4} М, а также тенденция к восстановлению в концентрации 10^{-3} М объясняется развивающимся процессом десенситизации хемочувствительной мембраны к действию тестируемого соединения. Подобные явления наблюдаются при действии различных веществ и на нейроны высших животных [12].

Поскольку при экспозиции, а также при отмывании соединения в концентрациях 10^{-3} и 10^{-2} М происходило блокирование генерации ПД, однако не вызывало падения МП до нуля, можно предположить, что данное соединение в результате взаимодействия с компонентами мембраны влияет на структуру мембраны, что в свою очередь изменяет её проницаемость. В связи с этим следует отметить, что аналогичный эффект наблюдается при воздействии многих нейротропных веществ в высоких концентрациях [13].

Необходимо отметить, что из всех исследованных в экспериментах нейронов у 12 % клеток ответы носили менее выраженный характер, причем все нейроны находились в ВГ. Вероятно, нейроны, находящиеся в различных ганглиях дифференцированы по функциональному признаку, что выражается в отличиях их хемочувствительности, или они являются более адаптивными [14].

Таким образом, результаты наших исследований указывают на наличие у N-[N-(1,2:3,4-ди-0-изопропилиден- α -D-галактопирануроноил)]- β -аланина нейротропного эффекта, выражающегося в дозозависимом уменьшении МП и амплитуды ПД и увеличении частоты импульсации. Анализ динамики трансмембранных токов показал ингибирование этим соединением всех ионных токов, однако уменьшение токов ионов калия и кальция было более значительным. Действие соединения полностью или частично обратимо в концентрациях 10^{-5} – 10^{-3} М, а в концентрации 10^{-2} М оно является токсическим.

Список литературы

1. Экклс Дж. Физиология синапсов. М.: Мир, 1966. – 395 с.
2. Gerschenfeld H.M. Chemical transmission in invertebrate central nervous system and neuromuscular junctions // *Physiol. Rev.* 1973. – Vol. 53, N 1. – P. 11- 19.
3. Герасимов В.Д. Ионные механизмы деполяризационных ответов, вызываемых аппликацией глутамата, в нервных клетках виноградной улитки // *Нейрофизиология.* - 1982. – Т.14, № 6. – С.572 – 577.
4. Дятлов В.А. Модуляция серотонином глицин-индуцируемых ионных токов в нейронах моллюска // *Нейрофизиология.* – 1989. – Т.21, №3. – С. 413 – 416.
5. Пивоваров, А.С., Саганелидзе Г.Н. Ионные механизмы вызванной ацетилхолином, никотином и мускарином деполяризации нейрона ППа4 виноградной улитки // *Нейрофизиология.* - 1989. - Т 21, №3. – С. 305-314
6. Раевский К.С., Георгиев В.П. Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрохимические аспекты. – М.: Медицина, 1986. – 239 с.

**ХАРАКТЕРИСТИКА ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА ПРИ
ДЕЙСТВИИ N-[N-(1,2:3,4-ДИ-О-ИЗОПРОПИЛИДЕН-А-D-ГАЛАКТОПИРАНУРОНОИЛ)]-(
АЛАНИНА**

7. Керцер С.Л., Баев К.В. Связь между строением кристаллической решетки и биологическим действием некоторых агонистов аминокислотных рецепторов // *Нейрофизиология*. – 1992. – Т. 24, № 1. – С. 44 – 51.
8. Кур'янов В.О., Чупахіна Т.О., Чирва В.Я. Синтез N-уроноіламіноациламідів // 19 Українська конференція з органічної хімії. Львів, 10 – 14 вересня 2001.: 36. Тез.. С. 239.
9. Koponenko N.I. Modulation of endogenous electrical activity of the bursting neuron in the snail *Helix pomatia* // *Neurosci.* - 1979. – Vol.4, №12. – P. 2047-2054.
10. Магура И.С. Проблемы электрической возбудимости нейрональной мембраны. - Киев: «Наукова Думка», 1981. - 208 с.
11. Магура И.С., Вихрева Л.А. Электроуправляемые калиевые каналы соматической мембраны нейронов моллюска // *Нейрофизиология*. - 1984. – Т.16, №3. – С. 296-307.
12. Wong R.K.S., Watkins D.J. Cellular factors influencing GABA response in Hippokampal pyramidal cells // *J. Neurophysiol.* – 1982. – Vol. 48, № 4. – P. 938 – 951.
13. Пирузян Л.А., Ковалев В.И., Лаврецкая Э.Ф., Ландау М.А. и др. Действие физиологически активных соединений на биологические мембраны. М.: «Наука», 1974. – 389 с.
14. Осипов Б.С. Функциональная пластичность нейронов моллюсков.- Ленинград, 1980. – 143 с.

Поступила в редакцию 15.12.2003 г.