

О.В. Костюченко, В.І. Гришковець, І.І. Коренюк

## Особливості дії рослинних глікозидів на нейрони слимака

*Исследовано влияние растительных тритерпеновых гликозидов на нейроны виноградной улитки. Обнаружено, что монодесмозидные гликозиды в концентрации  $2 \cdot 10^{-3} - 10^{-4}$  моль/л, введенные в наружный раствор, вызывают устойчивую гиперполяризацию нейронов. Методом фиксации потенциала установлено, что данные вещества увеличивают амплитуду выходящего калиевого тока. Более низкие концентрации  $10^{-5} - 10^{-7}$  моль/л приводят либо к кратковременному обратимому угнетению импульсной активности, либо не оказывают влияния на фоновую активность нейронов. Действие гликозидов является неспецифическим и развивается в течение 1-2 мин. Высказано предположение, что влияние тритерпеновых гликозидов в высоких концентрациях связано с образованием неселективных пор в мембранах нейронов.*

### ВСТУП

Останнім часом з рослин виділено та синтезовано велику кількість нових хімічних речовин, які рекомендовані для клінічних випробувань. До таких речовин належать і тритерпенові глікозиди (ТТГ). За деякими даними [15] їм властивий широкий спектр біологічної дії – фібринолітичної, кардіотонічної, заспокійливої, протисклеротичної, протизапальної, псевдогормональної тощо. Для глікозидів видів роду *Nedera* нами була показана імунотоксична активність [18]. Проте поряд з лікувальним ефектом, ці речовини мають цитотоксичну дію. Зокрема, ТТГ здатні виявляти гемолітичну [22], антимікробну [23] та протипухлинну дію [20]. Це означає, що при системному введенні вони можуть здійснювати певний вплив на нервову систему, як найбільш реактивну систему організму. Слід відзначити, що дія різноманітних похідних ТТГ на нервові клітини до цього часу не вивчена.

Метою нашої роботи було дослідити дію моно- та бідесмозидних ТТГ на показники електричної активності нейронів виноградно-

го слимака та визначити вплив даних глікозидів на сумарний калієвий струм.

### МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на нейронах центральної нервової системи виноградно-го слимака *Helix pomatia*. Ізольоване навколоткове кільце фіксували за нерви за допомогою вольфрамових голок на дні експериментальної протокової камери (об'єм 0,5 мл). Після механічного видалення зовнішньої оболонки, підглотковий ганглії обробляли ферментом Pronasa E (фірми "Sigma", США) протягом 45 хв і промивали зовнішнім розчином Рінгера, що містив (ммоль/л): NaCl - 100, KCl - 4, CaCl<sub>2</sub> - 10, MgCl<sub>2</sub> - 4, Hepes - NaOH - 10; рН 7,45. Для внутрішньоклітинного відведення біопотенціалів скляні мікроелектроди заповнювали 2,5 моль/л KCl і вони мали опір 10 – 30 МОм. Нейрони ППа1, ППа2, ППа7 і В7 ідентифікували за даними Коваля та Кононенка [17].

Для реєстрації струмів використовували метод фіксації потенціалу в режимі "ціла клітина" [14]. Нейрони були ізольовані за

допомогою багаторазового перепускання правого парієтального та вісцерального ганглія через скляні піпетки (діаметр кінчика 0,5 – 1 мм). Мікроелектроди (опір 2 – 4 МОм) заповнювали розчином такого складу (ммоль/л): KCl - 120, MgCl<sub>2</sub> - 5, Hepes - 10, EGTA - 5; рН 7,4. У деяких експериментах у зовнішній розчин додавали 15 ммоль/л ТЕА-Cl.

Аплікацію хімічних речовин виконували додаванням їх у реєстраційну камеру. Бісдесмозидні ТТГ розчиняли у зовнішньому розчині, а монодесмозидні, нерозчинні у воді сполуки, попередньо перетворювали в натрієву сіль при нагріванні з додаванням Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> та доводили зовнішнім розчином до потрібних концентрацій.

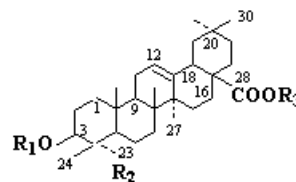
Всі електрофізіологічні експерименти були виконані при кімнатній температурі (19 – 24°C).

Розподіл експериментальних результатів порівнювали з “нормальним” за критерієм Колмогорова - Смірнова (пакет програм Statistica 5,0; рівень значущості P<0,05). Порівняння результатів “до аплікації ТТГ” –

“після аплікації ТТГ” проводили за допомогою U-критерію Манна-Уїтні (достовірність відмінностей середніх значень P≤0,05).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Було зареєстровано активність 27 нейронів ППа1, 21 – ППа2, 34 – ППа7, 14 – В7 та 12 неідентифікованих нейронів у правому парієтальному та вісцеральному гангліях. Використані в роботі ТТГ олеанолової кислоти (R<sub>2</sub>=H) та хедерагенину (R<sub>2</sub>=OH) були виділені з плюща кримського *Hedera taurica* Carr. (**1 – 3, 7 – 11, 15, 16**) [1-5, 9, 10, 12], плюща колхідського *Hedera cochica* C. Koch. (**5, 6, 13, 14**) [6, 11], а також із акантопанакса Зи-больда *Acanthopanax sieboldianus* Makino (**4, 12**) [21], і мали таку хімічну структуру:



|           | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>  | R <sub>3</sub> |
|-----------|----------------|---|----------------|
| <b>1</b>  |                | -O <sub>3</sub> S→ H  |                |
| <b>2</b>  |                | Ara→ OH H   |                |
| <b>3</b>  |                | Rha-(1→2)-Ara→ OH H   |                |
| <b>4</b>  |                | Xyl-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara→ OH H                               |                |
| <b>5</b>  |                | [Rha-(1→2)]-[Glc-(1→4)]-Ara→ H H                            |                |
| <b>6</b>  |                | [Rha-(1→2)]-[Glc-(1→4)]-Ara→ OH H                           |                |
| <b>7</b>  |                | Glc→ OH H   |                |
| <b>8</b>  |                | Glc→Glc→ OH H   |                |
| <b>9</b>  |                | GlcUa→ H H  |                |
| <b>10</b> |                | H <sup>+</sup> O <sub>3</sub> S→ H ←Glc-(6←1)-Glc-(4←1)-Rha |                |
| <b>11</b> |                | Rha-(1→2)-Ara→ OH ←Glc-(6←1)-Glc-(4←1)-Rha                  |                |
| <b>12</b> |                | Xyl-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara→ OH ←Glc-(6←1)-Glc-(4←1)-Rha        |                |
| <b>13</b> |                | [Rha-(1→2)]-[Glc-(1→4)]-Ara→ H ←Glc-(6←1)-Glc-(4←1)-Rha     |                |
| <b>14</b> |                | [Rha-(1→2)]-[Glc-(1→4)]-Ara→ OH ←Glc-(6←1)-Glc-(4←1)-Rha    |                |
| <b>15</b> |                | Glc→ OH ←Glc-(6←1)-Glc                                      |                |
| <b>16</b> |                | Glc→Glc→ OH ←Glc-(6←1)-Glc                                  |                |

Примітка: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> і R<sub>3</sub> – радикали аглікону.

З кожною речовиною (в концентрації від  $10^{-7}$  до  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/л) було проведено понад 15 експериментів на різних нейронах. Інкубація клітин з кожною концентрацією ТТГ проводилася протягом 3 хв. Цього часу було достатньо, щоб виник ефект гіперполяризації, якщо він проявлявся.

*Дія ТТГ на показники електричної активності нейронів.* Перфузія бідесмозидних глікозидів (сполуки **10** – **16**) у концентраціях  $10^{-3}$  –  $10^{-2}$  моль/л, достатніх для отримання ефекту [13], не впливала на електричну активність досліджених нейронів.

Вплив монодесмозидних глікозидів (сполуки **1** – **9**) було вивчено в діапазоні концентрацій  $10^{-7}$  –  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/л. Аплікація даних речовин виявляла виражену дію на фонову активність як ідентифікованих, так і неідентифікованих нейронів. Високі концентрації речовин ( $10^{-3}$  –  $10^{-4}$  моль/л) призводили до стійкої гіперполяризації нейронів, або викликали незворотні зміни в характері імпульсної активності після відмивання. При нижчих концентраціях ( $10^{-5}$  –  $10^{-7}$  моль/л) спостерігалася або короткочасна гіперполяризація з відновленням фонові активності нейронів, або змін у розвитку потенціалу дії (ПД) не відбувалося (рис. 1).

Як видно з рисунка, дія глікозиду **5** на нейрони ППа7 та ППа1 розвивалася протя-

гом 70-80 с після початку перфузії. При відмиванні стандартним розчином Рінгера ефект ТТГ не зникав. На 30-й хвилині від початку відмивання у нейрона ППа7 спостерігалися піки (так звані аксонендритні ПД), які склали за амплітудою  $13,0 \text{ мВ} \pm 1,5 \text{ мВ}$  (рис. 1, 1, б). Виходячи з даних Кононенка [16], що генерація ритмопровідної активності виникає в локусі, віддаленому від соми, тобто в аксонендритному дереві, а потім імпульси електротонічно поширюються до аксонного горбика, де відбувається генерація соматичних ПД, вірогідно, що зона виникнення потенціалів виявляється менш чутливою до впливу ТТГ, ніж сама соматична мембрана. Проте на 40-й хвилині від початку відмивання припинилася генерація і цих низькоамплітудних ПД. Вихідний рівень мембранного потенціалу (МП) нейрона дорівнював  $68,0 \text{ мВ} \pm 1,5 \text{ мВ}$ , а при дії глікозиду протягом усього часу реєстрації змінився на  $5 \text{ мВ} \pm 2 \text{ мВ}$  у бік гіперполяризації і до фонового рівня не відновлювався.

Децю відмінну дію виявив вплив глікозиду **5** на нейрон ППа1. Приблизно через 4,5 хв від початку заміни розчину, що містив ТТГ, на зовнішній розчин, нейрон відновив генерацію ПД, проте їх амплітуда була на  $4,0 \text{ мВ} \pm 1,5 \text{ мВ}$  нижчою за фонову й зменшилась у 1,5–2 рази кількість імпульсів у пачці.

Через 30 хв від початку відмивання спостерігалось суттєве збільшення числа потенціалів у пачці (до  $32 \pm 3$ , фон  $40 \pm \pm 5$ ) та частоти їх проходження в 2-2,5 рази порівняно з фо-

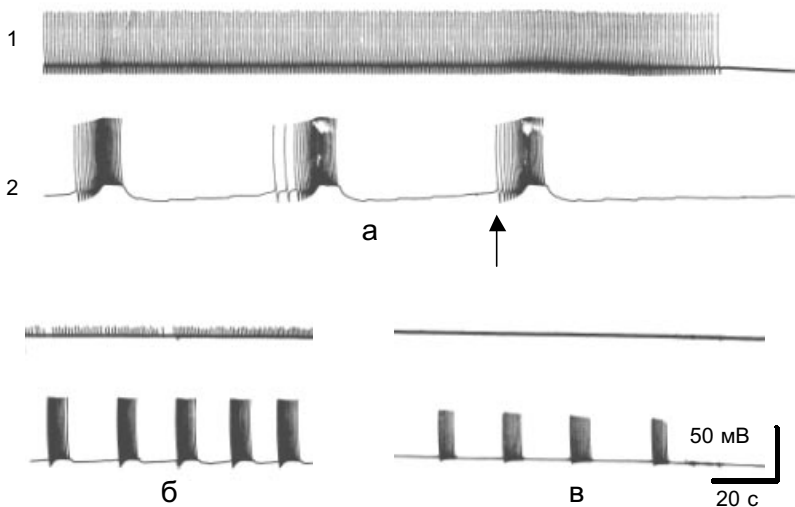


Рис. 1. Вплив глікозиду **5** у концентрації  $10^{-3}$  моль/л на електричну мономодальну активність нейрона ППа7 та пачкову активність нейрона ППа1.

Одночасна реєстрація фонові активності нейронів ППа7 (1) і ППа1 (2); інтервал між записами **а** і **б** – 30 хв, **б** і **в** – 10 хв. Стрілка вказує початок перфузії речовини.

ном (див. рис. 1, 2, б, в). Але незважаючи на всі відновлювальні процеси відбулося повільне згасання ритму і повне його припинення на 40-й хвилині.

Необоротну гіперполяризацию досліджуваних нейронів викликали глікозиди **1**, **2**, **6**, **7**, **9** у концентраціях  $10^{-3}$  та  $10^{-4}$  моль/л. Ефект цих речовин розвивався також протягом 40-60 с. МП змінювався на  $4,0 \text{ мВ} \pm \pm 1,2 \text{ мВ}$  у бік гіперполяризації (рис. 2, 1). Дещо несподіваний результат було отримано при дослідженні впливу глікозидів **3** і **4** на нервові клітини. У даному випадку до розвитку гіперполяризаційного моменту було помітне короточасне збільшення частоти генерації ПД з попереднім деполяризаційним зсувом МП, при цьому амплітуда імпульсів значно знижувалася (див. рис. 2, 2, 3, 4). Відновлення імпульсної активності після відмивання ганглія від хімічного препарату також не відбувалося, як і в вищезазначеному випадку.

Найменший вплив на нервові клітини виявив глікозид **8**. Аплікація цієї речовини в концентрації  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/л викликала стійку гіперполяризацию в нейроні ППа2 і короточасну гіперполяризацию, з відновленням вихідного значення ПД, в нейроні ППа7 (рис. 3, 1, 2). Проте зменшення концентрації вдвічі ( $10^{-3}$  моль/л) не виявляло будь-яких істотних змін у характері імпульсної активності досліджуваних нейронів, зокрема і нейрона ППа2 (див. рис. 3, 3). Більш виражена дія глікозидів у тій чи іншій концентрації, ймовірно, залежить від структури вуглеводних залишків, ніж від аглікону [19].

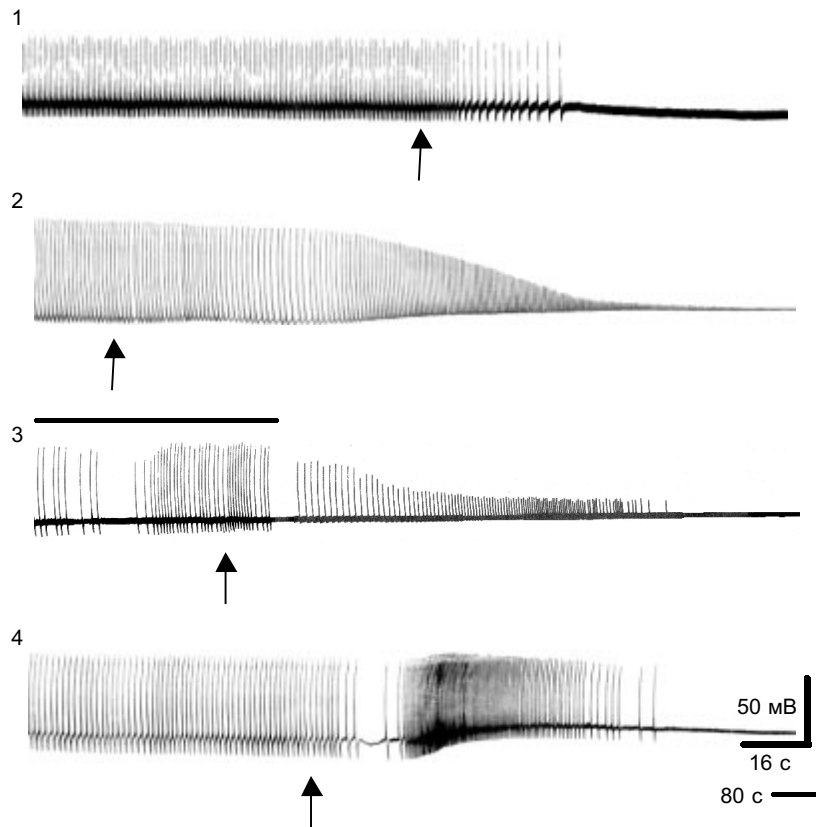


Рис. 2. Вплив глікозидів **1** і **4** на імпульсну активність нейронів: **1** – дія глікозиду **1** в концентрації  $10^{-4}$  моль/л на нейрон ППа7; **2**, **3**, **4** – ефект аплікації глікозиду **4** в концентрації  $10^{-3}$  моль/л на модуляцію ритмічної мономодальної активності нейрона ППа1, ППа2 і неідентифікованого нейрона групи Д у правому парієтальному ганглії відповідно. Стрілками відзначено початок перфузії. Лінія над реєстрацією показує інтервал, коли швидкість запису була зменшена у 5 разів.

Таким чином, отримані нами експериментальні результати дозволяють дійти висновку, що пригнічення розвитку ПД при дії ТТГ зумовлено підвищенням виходом іонів  $\text{K}^+$  із клітини, який призводить до зсуву значення МП у більш негативну ділянку.

*Вплив глікозидів на сумарний калієвий струм.* При додаванні у зовнішній розчин, глікозид **5** збільшував амплітуду сумарного калієвого струму (СКС), викликаючи також зміну його форми (рис. 4, 1). Середнє арифметичне значення амплітуди струму для контролю складало  $1,85 \text{ нА} \pm 0,03 \text{ нА}$ , а для струму, викликаного ТТГ -  $3,38 \text{ нА} \pm 0,18 \text{ нА}$ . Після 5 – 7 хв від початку перфузії кліти-

на припиняла демонструвати вихідний калієвий струм і, можливо, аплікація цієї речовини призвела до загибелі нейронів.

У наступній серії експериментів ми додавали тетраетиламоній (ТЕА) – відомий неселективний блокатор калієвих каналів – у розчин Рінгера, щоб з'ясувати дію ТТГ на кальційзалежний калієвий струм. З рис. 4, 2 видно, що перфузія зовнішнього розчину з ТЕА зменшувала середнє значення амплітуди струму, порівняно з контролем, приблизно на 1,4 нА. Але аплікація глікозиду 5 з ТЕА знімала здатність ТЕА блокувати

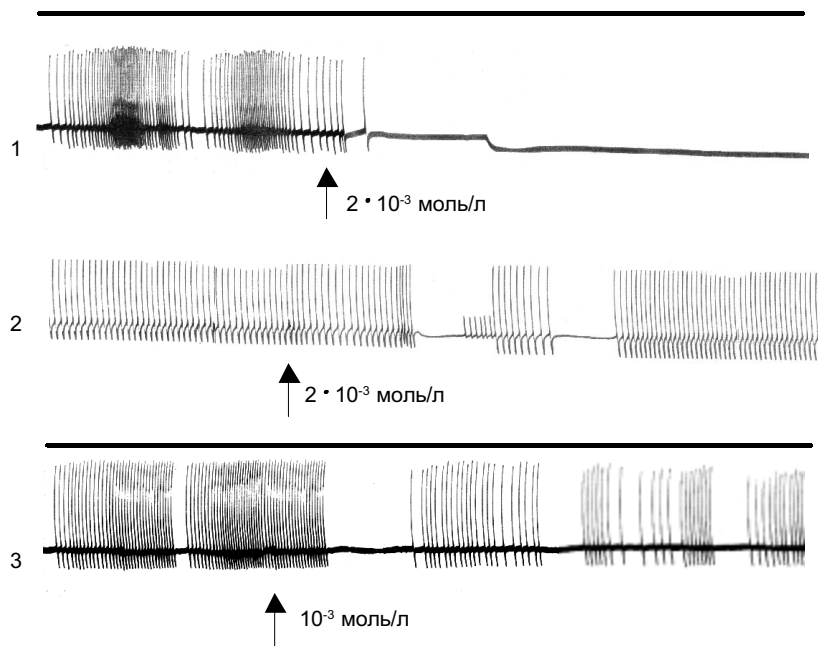
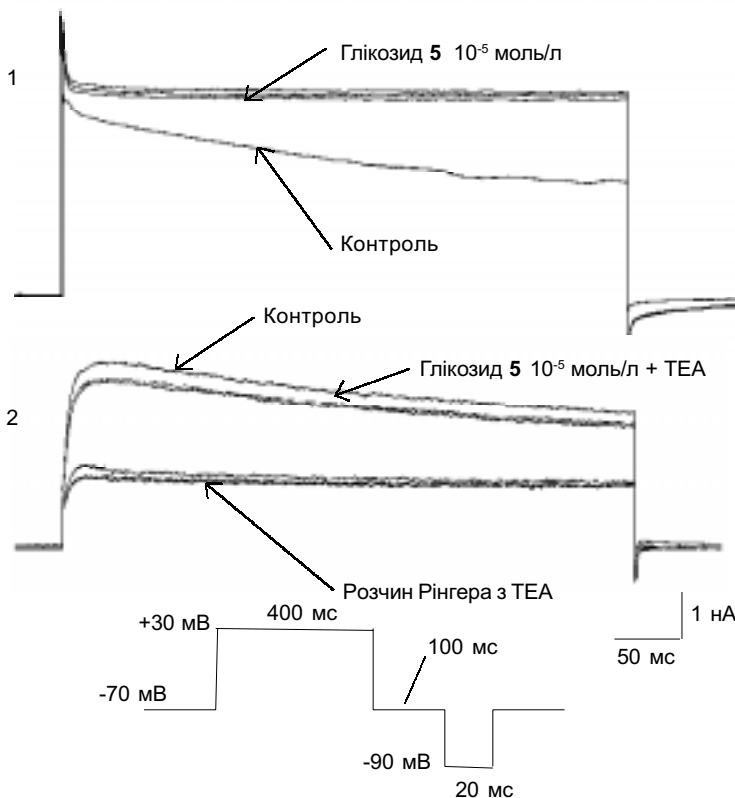


Рис. 3. Реакції нейронів на дію глікозиду 8: 1 і 3 – вплив перфузійного підведення глікозиду на нейрон ППа2, генеруючого повільну пачкову активність; 2 – активність нейрона ППа7 до і після перфузії речовини. Стрілками відзначено початок перфузії. Лінія над реєстрацією показує інтервал, коли швидкість запису була зменшена у 5 разів.



калієвий струм затриманого випрямлення. Амплітуда струму підвищувалася на 1,2 нА. При відмиванні ефект цієї сполуки був необоротним. Нижчі дози глікозиду 5 ( $10^{-7}$  –  $10^{-6}$  моль/л) не впливали на СКС.

Таким чином ТТГ, ймовірно, мають високу спорідненість до зв'язування з ліпідним шаром клітинної мембрани, що зумовлює підвищення іонної провідності в декілька разів і призводить до утворення неселективних пор у мембрані. Це є основним шляхом виходу іонів

Рис. 4. Викликане глікозидом 5 підвищення калієвого струму у неідентифікованих нейронів. Протокол вимірів приведений під записами струмів.

калію з клітини. Втрата внутрішньоклітинного калію сприяє розвитку тривалої гіперполяризації і носить необоротний характер. Ці результати корелюють з даними, одержаними при дослідженні впливу голотурину  $A_2$  на модельні мембрани, що містять стерини [7, 8].

Автори висловлюють щире вдячність М.А. Чванову (Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця) за допомогу в проведенні експериментів з вимірювання калієвих струмів.

**O.V. Kostyuchenko, V.I. Grishkovets,  
I.I. Korenyuk**

### THE EFFECT OF THE PLANT SAPONINS ON THE MOLLUSC NEURONS

The effect of the plant triterpene saponins on *Helix pomatia* neurons is investigated. It was found that monodesmosidic saponins being perfused to the extracellular solution at concentrations  $2 \times 10^{-3} - 10^{-4} M$  induced persistent hyperpolarization of the neurons. By using the patch-clamp technique it was obtained that these substances increased the amplitude of the outward potassium current. At lower concentrations ( $10^{-5} - 10^{-7} M$ ) saponins either led to the transient reversible oppression of the impulse activity, or didn't change the background activity. The influence of saponins is unspecific and develops during 1-2 min. It was supposed that the effect of triterpene saponins at high concentrations was related with the appearance of nonselective holes in neuron membrane.

*Tavrida National V.I. Vernadski University,  
Simferopol*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гришковец В.И., Лолойко А.А., Шашков А.С., Чирва В.Я. Тритерпеновые гликозиды *Hedera taurica* VI. Строение хедерозидов G, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> и I из ягод плюща крымского // *Химия природ. соединений*. – 1990. – №6. – С.779-783.
2. Гришковец В.И., Толкачева Н.В., Шашков А.С., Чирва В.Я. Тритерпеновые гликозиды *Hedera taurica* VIII. Таурозиды F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> и тритерпеноидный сульфат // Там же. – 1991. – № 6. – С.860-861.
3. Гришковец В.И., Толкачева Н.В., Шашков А.С., Чирва В.Я. Тритерпеновые гликозиды *Hedera taurica* IX. Строение таурозидов G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, H<sub>1</sub> и H<sub>2</sub> из листьев плюща крымского // Там же. – 1992. – №5. – С. 522-528.
4. Гришковец В.И., Толкачева Н.В., Шашков А.С., Чирва В.Я. Тритерпеновые гликозиды *Hedera taurica* X. Строение соединений F<sub>4</sub>, I и J из листьев плюща крымского // Там же. – 1992. – №6. – С.683-686.
5. Гришковец В.И., Цветков О.Я., Шашков А.С., Чирва В.Я. Тритерпеновые гликозиды *Hedera taurica* XIV. Строение гликозидов St – G<sub>0-2</sub>, St – J и St – K из стеблей плюща крымского // Там же. – 1997. – №3. – С.397-403.
6. Деканосидзе Г.Е., Джикия О.Д., Вугальтер М.М., Кемертелидзе Э.П. Тритерпеновые гликозиды *Hedera colchica*. Строение хедераколхизидов E и F // Там же. – 1984. – №6. – С. 747-750.
7. Корепанова Е.А., Попов А.М., Анисимов М.М. и др. Действие тритерпеновых гликозидов на ионную проницаемость холестеринсодержащих бислойных мембран // Докл. АН СССР – 1980. – 252, №5. – С.1261-1263.
8. Лихацкая Г.Н., Попов А.М., Аминин Д.Л. и др. Влияние голотуринов и их генинов на пролиферацию клеток и свойства модельных и биологических мембран. – В кн.: Всесоюзное совещание “Биологически активные вещества гидробионтов – новые лекарственные, лечебно-профилактические и технические препараты”: Тез. докл. Владивосток, 1991. – С.98.
9. Лолойко А.А., Гришковец В.И., Шашков А.С., Чирва В.Я. Тритерпеновые гликозиды *Hedera taurica* II. Строение гликозидов B и C из листьев плюща крымского // *Химия природ. соединений*. – 1988. – №3. – С.379-382.
10. Лолойко А.А., Гришковец В.И., Шашков А.С., Чирва В.Я. Тритерпеновые гликозиды *Hedera taurica* III. Строение хедерозидов A<sub>3</sub>, B, E, и F из ягод плюща крымского // Там же. – 1988. – №5. – С.721-726.
11. Мшвилдадзе В.Д., Деканосидзе Г.Е., Шашков А.С., Кемертелидзе Э.П. Минорные гликозиды *Hedera colchica*. Строение хедераколхизидов A<sub>1</sub> и C // *Биоорг. химия*. – 1993. – 19, №10. – С. 1001-1006.
12. Шашков А.С., Гришковец В.И., Лолойко А.А., Чирва В.Я. Тритерпеновые гликозиды *Hedera taurica* I. Строение таурозидов E из листьев *Hedera taurica* // *Химия природ. соединений*. – 1987. – №3. – С. 363-366.
13. Gorshkova I.A., Kalinovski A.I., Piyin S.G. et al. Physicochemical Characteristics of interaction of Toxic Triterpene Glycosides from *Holothurians* with Rat brain Na<sup>+</sup> – K<sup>+</sup> – ATPase // *Toxicol.* – 1989. – 27, №8. – P.937-945.
14. Hamill O.P., Marty A., Neher E. et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches // *Pfluegers Arch.* – 1981. – 391. – P. 85-100.
15. Hostettmann K., Marston A. Saponins. – Cambridge: Cambridge University Press, 1995. – 548 p.
16. Kononenko N.I. 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. – 96, №2. – P. 399-406.
17. Koval L.M., Kononenko N.I.. Newly identified nerve cells of the snail, *Helix pomatia*, associated with the generation of pacemaker activity // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 1994. – 24, №1. – P. 41-46.
18. Krivorutchenko Yu.L., Andronovskaja I.B., Hinkula J. et al. Study of the adjuvant activity of new MDP derivatives and purified saponins and

- their influence on HIV-1 replication in vitro // Vaccine. – 1997. – **15**, №12/13. – P. 1479-1486.
19. Miamoto N., Togawa K., Higuchi R. et al. Constituents of Holothurioidea II. Six Newly identified Biologically Active Triterpenoid Glycoside Sulfates from the sea Cucumber *Cucumaria echinata* // Liebig's Ann. Chem. – 1990. – P.453-460.
20. Okada Y., Shibata S., Ikekawa T. et al. Entada saponin – III, a saponin isolated from the bark of *Entada phaseoloides* // Phytochemistry – 1987. – **26**. – P.2789-2796.
21. Sawada H., Miyakoshi M., Isoda S. et al. Saponins from leaves of *Acanthopanax sieboldianus* // Ibid. – 1993. – **34**, №4. – P. 1117-1121.
22. Takechi M., Tanara Y. Structure-activity relationships of synthetic methyl oleanolate glycosides // Ibid. – 1992. – **31**. – P.3789-3791.
23. Tschesche R. Advances in the chemistry of antibiotic substances from higher plants. In: Pharmacology and Phytochemistry / Ed. H. Wagner, L. Hurhammer. – Berlin: Springer, 1990. – P. 274-289.

*Тавр. ун-т ім. В.І.Вернадського М-ва освіти  
України, Симферополь*

*Матеріал надійшов до  
редакції 10.01.2001*