

УДК 612.014.46

АДЕНОЗИНТРИФОСФАТ- И КАЛЬЦИЙЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ В НЕЙРОТРОПНЫХ ЭФФЕКТАХ САЛИЦИЛАТОВ

*Чертаев И.В., Кореньюк И.И., Шульгин В.Ф., Хусаинов Д.Р., Катюшина О.В.,
Гамма Т.В., Колотилова О.И.*

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
E-mail: 5612178@ukr.net*

Исследованы аденозинтрифосфат- и кальцийзависимые механизмы регуляции нейронной активности улитки *Helix albescens* Rossm. Показано, что нейротропные эффекты салицилатов зависят от наличия аденозинтрифосфата во внеклеточной среде. При сочетанном применении аденозинтрифосфата с салициловой и ацетилсалициловой кислотами устраняется угнетение электрической активности нейронов улитки, вызванное изолированной экспозицией этих кислот. Добавление во внеклеточную среду аденозинтрифосфата усиливает активирующие нейротропные эффекты солей салициловой и ацетилсалициловой кислот. Блокада трансмембранного тока Ca^{2+} показала, что эти ионы не участвуют в нейротропных эффектах салицилатов, за исключением влияний кальцийзависимого калиевого тока на эффекты салициловой кислоты и салицилата кобальта.

Ключевые слова: аденозинтрифосфат, кальций, нейроны моллюсков, салицилаты.

ВВЕДЕНИЕ

Салициловая (СаК) и ацетилсалициловая (АК) кислоты и их производные – нестероидные противовоспалительные средства, которые легко проникают через гематоэнцефалический барьер и оказывают политропное биологическое действие на различные системы органов человека и животных [1–4], в том числе и нервную [5]. Так, СаК и АК, и их соли с кобальтом и цинком, изменяют функциональное состояние нейронов ЦНС [6, 7] и поведенческую активность животных [8, 9], влияют на межнейронную передачу сигналов через химические синапсы [10, 11]. Кроме того, известно, что соли СаК и АК с кобальтом и цинком, а также некоторые другие биядерные комплексы салицилатов с этими и другими металлами переменной валентности обладают рядом полезных и перспективных преимуществ по сравнению с вышеуказанными кислотами [12–14], в том числе и с точки зрения психофармакологии [8, 9]. Ранее в наших работах [6, 7, 10, 11] было показано, что нейротропные эффекты салицилатов кобальта (СК) и цинка (СЦ), ацетилсалицилатов кобальта (АСК) и цинка (АСЦ) могут быть обусловлены увеличением содержания циклических нуклеотидов (цАМФ, цГМФ). Однако, механизм влияния салицилатов на нервную систему и роль в нём других вторичных посредников ещё во многом не ясны. Есть сведения, что СаК и АК и некоторые их производные угнетают систему энергопродукции клетки, подавляя синтез аденозинтрифосфата (АТФ) [1, 2, 4], но

связь этих событий с нейротропными эффектами салицилатов не выяснена. Известно также, что энергия АТФ используется на активный транспорт ионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} через мембрану и необходима для протекания метаболических процессов в нейронах, работы ионных каналов [15–19]. При этом АТФ способен дефосфорилироваться до цАМФ – мессенджера аденилатцикласного каскада передачи сигналов внутрь клетки и является агонистом P2-рецепторов ионных каналов, а продукт его распада – аденозин – регулирует деятельность P1-рецепторов [15, 16, 18–22]. Кроме того, есть сведения о модулировании АТФ осцилляторных свойств нейронов гиппокампа [23]. Все вышеизложенные сведения относительно АТФ приводят к мысли, что механизм нейротропного действия салицилатов может в значительной степени определяться изменением вне- и внутриклеточной концентрации этого сигнального соединения. Обращает внимание и отсутствие сведений о роли Ca^{2+} как вторичного посредника в эффектах салицилатов, хотя известна их роль в контроле возбудимости нейронов, генерации пейсмекерной активности и запуске многочисленных внутриклеточных процессов, в том числе и опосредуемых циклическими нуклеотидами [16, 24–26].

Целью настоящей работы явилось изучение роли АТФ и ионов кальция в механизмах влияния салицилатов (СаК, АК, СК, СЦ, АСК и АСЦ) на функциональное состояние нейронов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на неидентифицированных нейронах поглочного комплекса ганглиев виноградной улитки *Helix albescens* Rossm. Методика препаровки и подготовки к эксперименту окологлоточного нервного кольца улитки описана ранее [7, 10, 11].

Использованные в нашей работе СаК, хлорид бария, хлорид кадмия (“Merk”, Германия), АТФ (“Здоровье народа”, Украина), АСК, АСЦ, СК и СЦ (синтезированы на кафедре общей химии Таврического национального университета им. В.И. Вернадского) разводили до необходимых концентраций раствором Рингера для холоднокровных. Внутриклеточно отводимую электрическую активность нейронов регистрировали и обрабатывали с применением программы “Action Potential” [6, 7]. Регистрацию и анализ функционального состояния нейронов осуществляли по следующей схеме: фон (1 мин) → контроль – изолированная экспозиция каждого тестируемого вещества (4 мин) → непосредственно эксперимент – экспозиция сочетанного раствора каждого тестируемого вещества с дополнительным компонентом, в зависимости от цели эксперимента это мог быть АТФ, CdCl_2 или BaCl_2 (4 мин) → отмывание – 20 мин. Каждый дополнительный компонент в сочетанном растворе имел такую же концентрацию, как и содержащееся в нём тестируемое вещество. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью критерия Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость нейротропных эффектов салицилатов от увеличения содержания аденозинтрифосфата во внеклеточной среде

В серии экспериментов были исследованы эффекты изолированного и сочетанного с АТФ приложения во внеклеточную среду растворов СаК, АК, СК,

СЦ, АСК, АСЦ. Концентрация каждого вещества в растворе составляла $0,5 \cdot 10^{-3}$ М. Именно в этой концентрации изолированное приложение СаК и АК оказывало выраженное угнетающее, а СК, СЦ, АСК и АСЦ – активирующее действие на электрическую активность нейронов [6, 7].

Следует отметить, что изолированное приложение АТФ в концентрации $0,5 \cdot 10^{-3}$ М не оказывало достоверного влияния на исследуемые параметры электрической активности нейронов ($n = 8$). По-видимому, это связано с тем, что ферменты экто-АТФазы (эктонуклеотидазы) в нормальных условиях разрушают до аденозина дополнительные поступления АТФ, превышающие его физиологическую концентрацию [16].

Экспозиция СаК и АК в концентрации $0,5 \cdot 10^{-3}$ М приводила к угнетению электрической активности нейронов улитки, вызывая снижение ЧГИ и амплитуды ПД, увеличение МП (рис. 1, А-Б, 1 и 2). В ответ на сочетанное приложение СаК ($n = 11$) и АК с АТФ ($n = 11$) ЧГИ достоверно ($p < 0,01$) увеличивалась (рис. 1, А-Б, 1-1') – угнетающие эффекты СаК и АК нивелировались. Кроме того, при совместной экспозиции СаК с АТФ по сравнению с контролем достоверно увеличивалась скорость суммарных входящих ионных токов ($p < 0,01$) и уменьшался МП ($p < 0,05$) (рис. 1, А, 3-3' и 5-5'), а в случае экспозиции АК с АТФ наблюдались изменения этих показателей в том же направлении, но на уровне тенденции.

Поскольку угнетающий нейротропный эффект СаК и АК устранялся АТФ, можно считать, что его механизм обусловлен торможением этими кислотами синтеза АТФ на клеточных мембранах. В отношении же активационного действия АТФ можно было бы думать, что оно обусловлено расходом энергии этого метаболита на удаление Ca^{2+} из нейроплазмы в интерстициальное пространство и депо внутриклеточных органелл с помощью обменивающего механизма $Na^+ - Ca^{2+}$ -помпы и $Ca^{2+} - Mg^{2+}$ -АТФазы мембран соответственно [25, 26]. Однако достоверное возрастание скорости суммарных входящих ионных токов в случае экспозиции раствора СаК+АТФ (рис. 1, А, 3') и на уровне тенденции при аппликации АК+АТФ (рис. 1, Б, 3'), сопровождаются возрастанием ЧГИ (рис. 1, А и Б, 1'). Это свидетельствует в пользу модулирующего действия АТФ на функционирование натриевых и, возможно, кальциевых каналов плазматической мембраны, которые отвечают за развитие ПД. Поскольку кальциевые каналы присутствуют в наружных мембранах не у всех нейронов моллюсков, а СаК и АК воздействовали угнетающе на электрическую активность всех исследованных нейронов, мы считаем, что именно инактивация натриевых каналов вследствие снижения тестируемыми кислотами вне- и внутриклеточной концентрации АТФ вносит существенный вклад в наблюдаемое ингибирование возбудимости нейронов. Также нельзя исключить, что инактивация натриевых каналов частично может быть обусловлена возрастанием роли входящего хлорного и выходящего калиевого токов (в пользу этого свидетельствует тенденция к снижению скорости нарастания суммарных выходящих ионных токов – рис. 1, А-Б, 4 и 4') [6, 7, 11].

Угнетающее действие СаК и АК на электрическую активность нейронов улитки может быть также связано с их ингибирующим влиянием на образование простагландинов в нервной ткани, в частности простагландина E_2 , который

способен усиливать электрическую активность нейронов улитки через цАМФ-опосредуемый сигнальный путь [3, 27].

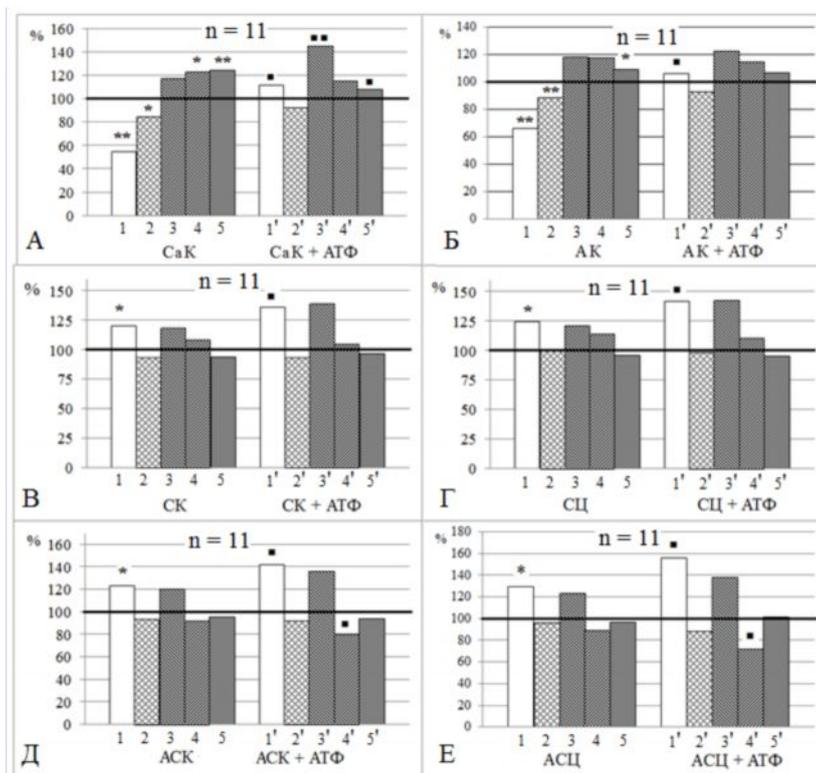


Рис. 1. Статистическая оценка влияния изолированной и сочетанной с аденозинтрифосфатом экспозиции салицилатов в концентрации $0,5 \cdot 10^{-3}$ М на показатели (1-5) электрической активности нейронов улитки.

Примечание: А – салициловая кислота (СаК), Б – ацетилсалициловая кислота (АК), В – салицилат кобальта (СК), Г – салицилат цинка (СЦ), Д – ацетилсалицилат кобальта (АСК), Е – ацетилсалицилат цинка (АСЦ). АТФ – аденозинтрифосфат.

Здесь и далее: горизонтальная жирная линия на каждой диаграмме – значения фоновых показателей, принятые за 100 %. 1 и 1' – частота генерации импульсов, 2 и 2' – амплитуда потенциалов действия, 3 и 3' – скорость суммарных входящих ионных токов, 4 и 4' – скорость суммарных выходящих ионных токов, 5 и 5' – мембранный потенциал; штрихом отмечены показатели электрической активности нейронов после воздействия сочетанного раствора тестируемого вещества с АТФ. n – количество нейронов в эксперименте; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ – достоверные изменения показателей контроля по сравнению с фоном; ■ – $p < 0,05$, ■■ – $p < 0,01$ достоверные изменения показателей эксперимента по сравнению с контролем

Экспозиция СК, СЦ, АСК и АСЦ в концентрации $0,5 \cdot 10^{-3}$ М достоверно ($p < 0,05$) повышала ЧГИ по сравнению с фоном (рис. 1, В-Е, 1). Интересно, что приложение сочетанных с АТФ растворов СК, СЦ, АСК, АСЦ вызывало увеличение ЧГИ (рис. 2 А 1', Б 1', В 1', Г 1') на 15,3, 17,8, 19,2 и 26,8 % ($p < 0,05$) соответственно

по сравнению с контролем, тогда как изолированное воздействие $0,5 \cdot 10^{-3}$ М АТФ не изменяло её показателей. Кроме того, сочетания АТФ с АСК и АСЦ по сравнению с контролем вызвали достоверное уменьшение (рис. 2, Д и Е, 3'-4') скорости нарастания суммарных выходящих токов ($p < 0,01$), что свидетельствует об ингибирующем эффекте АТФ на них. Это может быть связано с инактивацией аденозинтрифосфатом АТФ-зависимых калиевых каналов [15].

Усиление активирующих эффектов СК, СЦ, АСК и АСЦ при совместной их экспозиции с АТФ может быть результатом как суммирования их эффектов, так и непосредственной активацией тестируемыми солями синтеза АТФ на мембранах нейронов. Если под влиянием СК, СЦ, АСК, АСЦ повышается содержание АТФ на мембранах клеток и происходит добавление во внеклеточную среду АТФ при его сочетанной экспозиции с тестируемыми солями, содержание этого метаболита становится выше его физиологической концентрации. Это запускает эктонуклеотидазные реакции распада АТФ, но слишком большое его количество вызывает полное субстратное насыщение активных центров ферментов, принимающих участие в этих событиях. В результате избыток АТФ не успевает быстро разрушаться до аденозина. Естественно, что это приводит к запуску АТФ Р2-рецептор управляемых клеточных процессов [18, 19], изменяющих функциональное состояние нейронов. На основе анализа результатов о скорости нарастания трансмембранных ионных токов в исследованных нейронах (рис. 1, В-Е), а также данных литературы [16, 18–20] относительно влияния АТФ на ионные каналы, мы приходим к выводу, что при сочетанном воздействии АТФ с солями СаК и АК, могут увеличиваться натриевые и, возможно, кальциевые входящие ионные токи, а в случае сочетанной аппликации АТФ с АСК или АСЦ, кроме того могут угнетаться и выходящие калиевые ионные токи. Естественно, что одновременно с этим в нейронах постоянно протекают и обратные, АТФ-зависимые, процессы активного транспорта Na^+ из нейроплазмы в интерстициальное пространство и Ca^{2+} – в клетку и депо в митохондриальных органелл благодаря работе ионных насосов мембран – Na^+ - Ca^{2+} -обменников и Ca^{2+} -АТФаз [25, 26, 28]. Такие события лежат в основе цикличности протекающих на мембране нейронов электрических процессов.

На Рис. 1, В-Е видно, что существуют некоторые отличия в скорости ионных процессов, происходящих при воздействии сочетанного приложения АТФ с СК и СЦ, с одной стороны, и с АСК и АСЦ, с другой. Так, при совместной экспозиции ацетисалицилатов с АТФ снижение скорости выходящих ионных токов по сравнению с эффектами контрольных растворов выше, чем аналогичные эффекты сочетанных с АТФ растворов салицилатов. Мы полагаем, что это можно объяснить отличиями в химическом составе этих комплексных солей, содержащих остатки разных кислот.

Ранее нами было показано [6, 11, 29], что облегчающее и модулирующее влияние СК, СЦ, АСК, АСЦ на нейроны улитки опосредуется цАМФ. Поэтому относительно нейротропных эффектов всех протестированных салицилатов, мы не исключаем, что они могут быть обусловлены АТФ-зависимым изменением концентрации цАМФ в нервных клетках. Так, в отношении СаК и АК известно, что они угнетают синтез АТФ и, естественно, уменьшают уровень цАМФ [1, 3].

Поэтому можно предположить, что активирующие нейротропные эффекты СК, СЦ, АСК и АСЦ обусловлены увеличением синтеза АТФ и его продукта – цАМФ.

Нейротропные эффекты салицилатов при блокаде входящего кальциевого тока хлоридом кадмия

Для выяснения роли трансмембранного входящего кальциевого тока в нейротропных эффектах тестируемых веществ в серии экспериментов мы использовали его блокатор – хлорид кадмия [15, 29, 30].

Из представленных на Рис. 2, А-Г результатов видно, что эффекты изолированного и сочетанного с CdCl_2 применения растворов СаК, АК в концентрациях $0,5 \cdot 10^{-4}$ (рис. 2, А и В) и $0,5 \cdot 10^{-3}$ М (рис. 2, Б и Г) существенно не отличаются друг от друга.

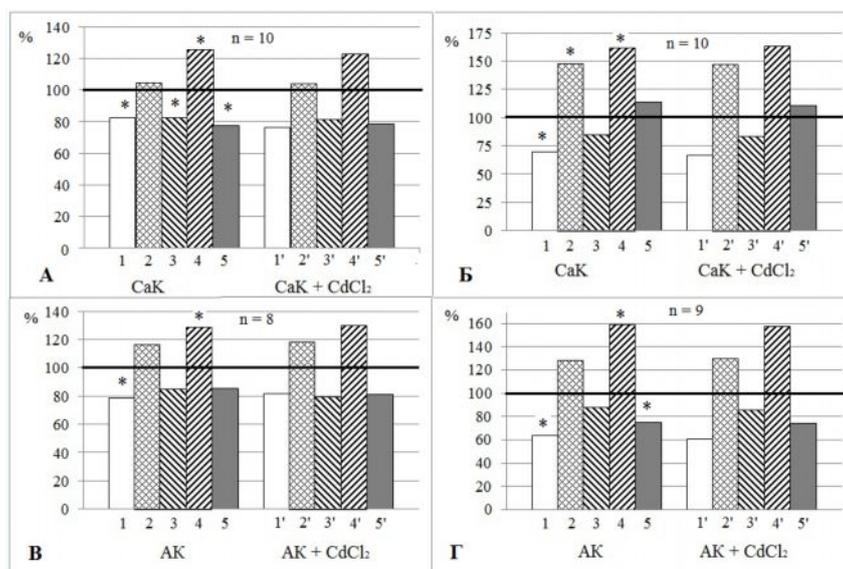


Рис. 2. Статистическая оценка влияния изолированной и сочетанной с CdCl_2 экспозиции салициловой (А, Б) и ацетилсалициловой (В, Г) кислот

Примечание: Концентрации растворов: А, В – $0,5 \cdot 10^{-4}$ М; Б, Г – $0,5 \cdot 10^{-3}$ М. Остальные сокращения и обозначения те же, что и на Рис. 1.

При сопоставлении эффектов экспозиции двух концентраций ($0,5 \cdot 10^{-4}$ и $0,5 \cdot 10^{-3}$ М) изолированных и сочетанных с CdCl_2 растворов СК, СЦ, АСК, АСЦ достоверных изменений измеряемых показателей потенциалов нейронов улитки не выявлено (рис. 3). Поскольку CdCl_2 не изменяет нейротропные эффекты исследованных салицилатов, можно полагать, что они не связаны с входящим трансмембранным кальциевым током.

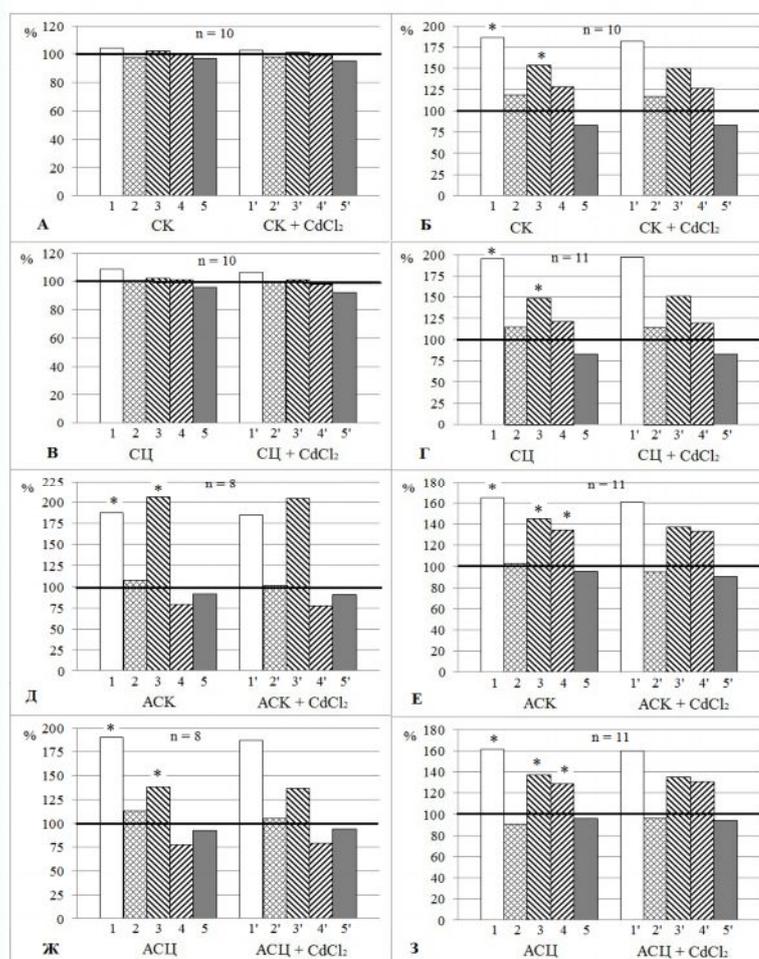


Рис. 3. Статистическая оценка влияния изолированной и сочетанной с CdCl₂ аппликации салицилатов кобальта (А, Б) и цинка (В, Г), ацетилсалицилатов кобальта (Д, Е) и цинка (Ж, З).

Примечание: Концентрации растворов: А, В, Д, Ж – $5 \cdot 10^{-5}$ М; Б, Г, Е, З $5 \cdot 10^{-4}$ М. Остальные сокращения и обозначения те же, что и на рис. 1.

Обсуждая нейротропные эффекты салицилатов и роль Ca²⁺ в их развитии, следует учитывать и особенности количественного соотношения разных типов ионных каналов входящего тока, которое существенно варьирует в плазматической мембране различных нервных клеток. Так, есть сведения [31], что в нервной системе моллюсков 10-15 % нейронов в плазматической мембране содержат только Ca²⁺-каналы входящего тока, другие 10-15 % – только Na⁺, а у остальных 70-80 % присутствуют оба типа каналов. Однако, несмотря на различия в представленности Ca²⁺-каналов в нейронах моллюсков, ранее нами был обнаружен однонаправленный характер воздействия салицилатов как на нейроны, электрическая активность

которых в значительной степени зависит от входящего кальциевого тока (клетки ППа1 и ППа2), так и тех, где такой ток отсутствует (клетка ППа7) [6, 7]. Исходя из всего вышеизложенного, можно считать, что входящий кальциевый ток вряд ли играет существенную роль в нейротропных эффектах салицилатов. Однако, мы не исключаем, что вышеуказанный ток может выступать в качестве дополнительного механизма регуляции салицилатами клеточной возбудимости нейронов, содержащих потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы.

Поскольку блокада хлоридом кадмия входящего кальциевого тока не приводит к ослаблению или исчезновению нейротропных эффектов салицилатов, можно думать, что она компенсируется за счет выделения Ca^{2+} в цитоплазму нейронов из внутриклеточного депо, на что указывают некоторые авторы [25, 32]. В то же время известно [33], что высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных структур повышает возбудимость нейронов, что возможно и при действии СК, СЦ, АСК, АСЦ. Накопление Ca^{2+} в цитоплазме может усиливаться ещё и тем, что ионы Cd^{2+} способны ингибировать Ca^{2+} -АТФ-азу плазматических мембран (PMCA) – ионный насос, способствующий выведению Ca^{2+} из клетки [34].

Чтобы выяснить, участвуют ли ионы Ca^{2+} внутриклеточного депо в механизме нейротропных эффектов салицилатов, в отдельной серии экспериментов мы апплицировали хлорид бария, который блокирует как входящий ток Ca^{2+} , так и выходящий Ca^{2+} -зависимый калиевый ток, а также выделение Ca^{2+} из внутриклеточного депо [15, 35]. Следует напомнить, что ионы Ba^{2+} не влияют на работу PMCA плазматических мембран [34] и это способствует дополнительному уменьшению уровня Ca^{2+} в нейронах при воздействии BaCl_2 .

Эффекты салицилатов при блокаде трансмембранного тока кальция

При сравнении эффектов внеклеточного приложения растворов СаК и СаК+ BaCl_2 ($0,5 \cdot 10^{-4}$ М) мембране различных типов нейронов выявлена определённая селективность в их реагировании. Оказалось, что при воздействии СаК+ BaCl_2 у нейронов ВГ (n=14) произошло увеличение ($p < 0,05$) в 1,5 раза ЧГИ (рис. 4, А, 1 и 1'), а у нейронов ППаГ (n=15) никаких достоверных изменений наблюдаемых показателей вовсе не выявлено (рис. 4, Б). При блокаде BaCl_2 входящего тока Ca^{2+} и его выделения из внутриклеточного депо у всех исследованных нейронов не происходит ни редукции ПД, ни даже достоверного снижения ЧГИ (рис. 4, А-Д, 1 и 1'), а у нейронов ВГ, напротив, этот показатель возрастает (рис. 4, Б, 1 и 1'). Поэтому, мы полагаем, что сами ионы Ca^{2+} не играют существенной роли в нейротропных эффектах тестируемых салицилатов, в том числе и СаК, а повышение ЧГИ в присутствии раствора СаК+ BaCl_2 у нейронов ВГ связаны в основном с блокированием ионами Ba^{2+} Ca^{2+} -зависимого калиевого тока. Подтверждением этому может быть наблюдаемое снижение скорости суммарных выходящих ионных токов ($p < 0,05$) под влиянием комбинации СаК+ BaCl_2 по сравнению с эффектом раствора СаК (рис 4, А, 4 и 4'). Очевидно в нейронах ВГ, функциональное состояние которых зависит от Ca^{2+} -зависимого калиевого тока, регуляция последнего осуществляется небольшим количеством Ca^{2+} -каналов, либо она происходит в основном за счёт выделения Ca^{2+} из внутриклеточного депо. Как следует из Рис. 4, у всех исследованных нейронов достоверных изменений

остальных регистрируемых показателей по сравнению с контролем при воздействии $0,5 \cdot 10^{-4}$ и $0,5 \cdot 10^{-3}$ М сочетанных растворов CaK и АК не было обнаружено, за исключением эффекта снижения ($p < 0,05$) уровня МП (рис 4, Г, 5 и 5') под влиянием $0,5 \cdot 10^{-4}$ М раствора АК+BaCl₂ по сравнению с контролем. Обнаруженные изменения данного показателя согласуются со сведениями литературы [15] о снижении МП BaCl₂. При сопоставлении эффектов внеклеточных $0,5 \cdot 10^{-3}$ М растворов CaK, АК и их сочетаний с BaCl₂ достоверных отличий исследуемых показателей вообще не было обнаружено (рис 4, Г и Д).

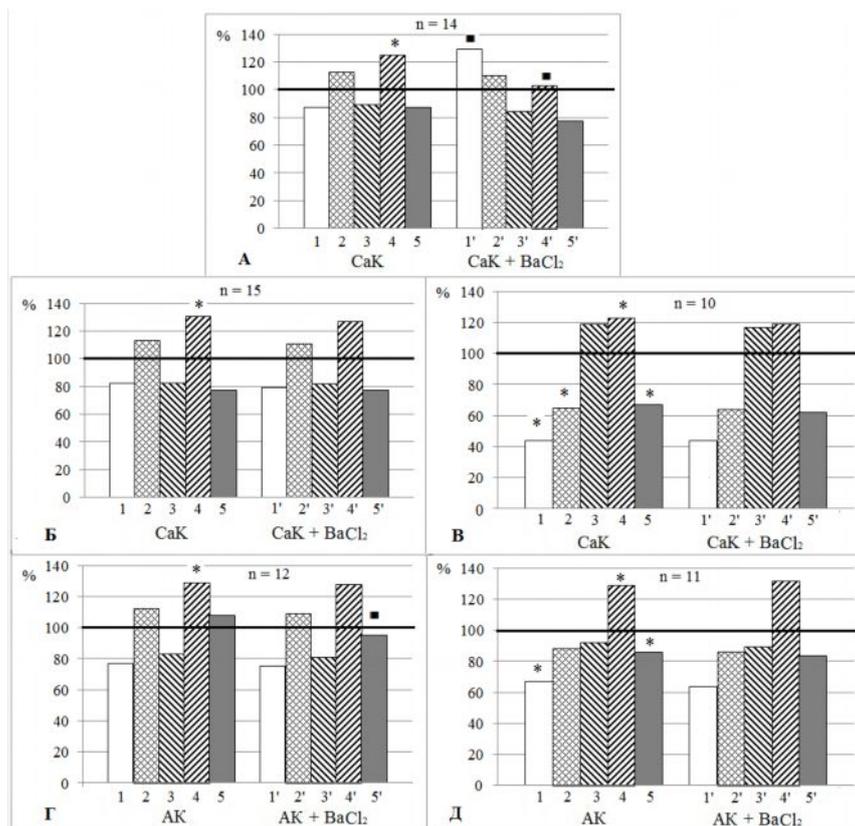


Рис. 4. Статистическая оценка влияния изолированной экспозиции салициловой (А, Б, В) и ацетилсалициловой (Г, Д) кислот и сочетанной с BaCl₂
Примечание: Концентрации растворов: А, Б, Г – $5 \cdot 10^{-5}$ М; В, Д – $5 \cdot 10^{-4}$ М. Остальные сокращения и обозначения те же, что и на рис. 1.

$0,5 \cdot 10^{-4}$ М растворы СК и СЦ (рис. 5, А и В) в отличие от растворов АСК и АСЦ (рис. 5, Д и Ж) достоверно не изменяли исходные показатели электрической активности нейронов. Экспозиция сочетанного раствора СК+BaCl₂ увеличивала по сравнению с контролем ($p < 0,05$) только ЧГИ (рис. 5, А, 1 и 1'). Как и в случае с CaK, изменение данного показателя мы связываем с выключением хлоридом бария

Ca^{2+} -зависимого калиевого тока. На это указывает и выраженная тенденция к снижению (на 11,4 %) по сравнению с контролем скорости суммарных выходящих токов (рис. 5, А, 4 и 4'). Эффекты $0,5 \cdot 10^{-4}$ М СЦ, АСК, АСЦ и их сочетанных растворов с BaCl_2 достоверно не отличались между собой (рис. 5 В, Д, Ж). Такая же картина наблюдалась и при замене $0,5 \cdot 10^{-3}$ М растворов СК, СЦ, АСК и АСЦ на соответствующие сочетанные растворы с BaCl_2 (рис. 5, Б, Г, Е, З).

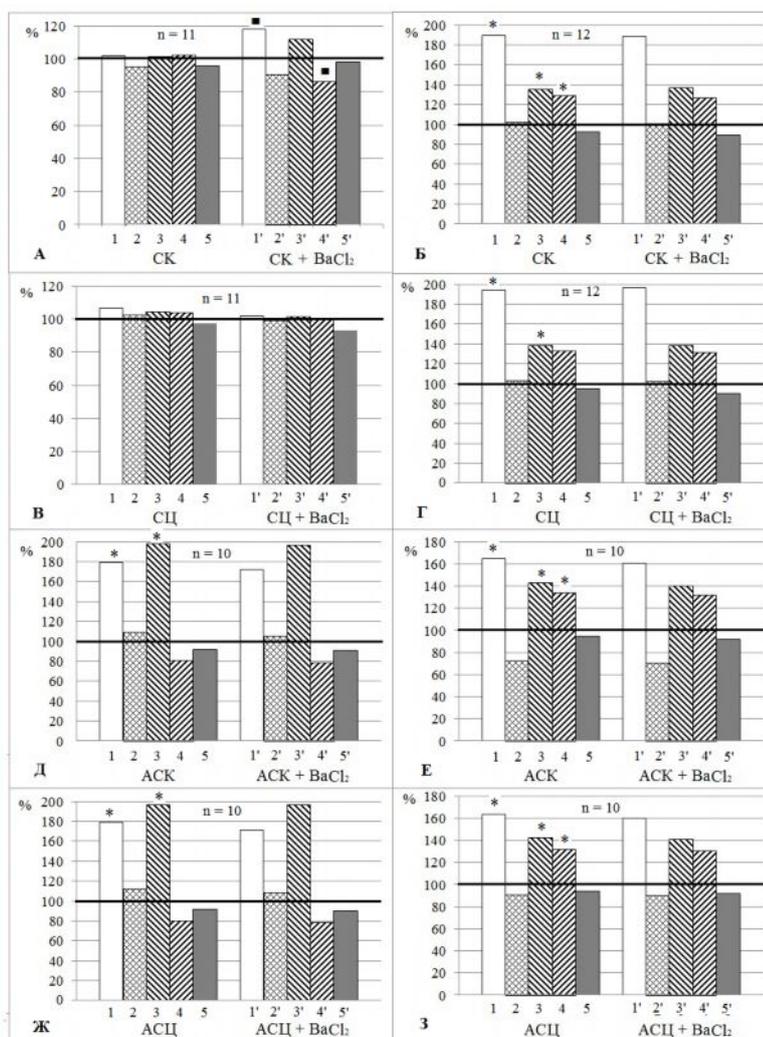


Рис. 5. Статистическая оценка влияния изолированной и сочетанной с BaCl_2 экспозиции салицилатов кобальта (А, Б) и цинка (В, Г), ацетилсалицилатов кобальта (Д, Е) и цинка (Ж, З).

Примечание: концентрации растворов: А, В, Д, Ж – $0,5 \cdot 10^{-4}$ М; Б, Г, Е, З – $0,5 \cdot 10^{-3}$ М. Остальные сокращения и обозначения те же, что и на рис. 1.

В целом из анализа изменений нейротропных эффектов салицилатов хлоридом бария следует, что они напрямую не зависят как от поступающих в нейроплазму ионов Ca^{2+} из внеклеточной среды, так и выделяющихся из внутриклеточного депо. Лишь при воздействии СаК и СК в концентрации $0,5 \cdot 10^{-4}$ М ионы Ca^{2+} могут оказывать влияние на функциональное состояние нейронов улитки, увеличивая Ca^{2+} -зависимый калиевый ток.

Однако, не исключено, что уменьшение поступления ионов Ca^{2+} в цитоплазму могло компенсироваться иными механизмами, на которые использованные нами блокаторы – CdCl_2 и BaCl_2 – не оказывают существенного влияния.

Во-первых, в отношении Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны сомы нейронов моллюсков известно, что среди них преобладают каналы N и L типа, однако встречаются и T каналы [3]. Поскольку Cd^{2+} и Ba^{2+} эффективно блокируют потенциалзависимые L и N каналы входящего кальциевого тока, не оказывая при этом существенного влияния на T каналы [15], не исключено, что недостаток Ca^{2+} после блокады его входящего тока ионами Cd^{2+} и Ba^{2+} частично компенсируется за счёт его поступления через T-каналы [36].

Во-вторых, поступление Ca^{2+} нейроплазму может обеспечиваться благодаря работе Na^+ - Ca^{2+} -обменников, направленность которой зависит от концентрации Na^+ по обе стороны мембраны. Так, в состоянии покоя, когда содержание Na^+ в цитоплазме низкое, Na^+ - Ca^{2+} -обменники выводят Ca^{2+} из нейроплазмы во внешнюю среду [26], а при поступлении ионов Na^+ внутрь клетки, Na^+ - Ca^{2+} -обменники работают в режиме обратного цикла, т.е. способствуют выводу Na^+ и накоплению Ca^{2+} в клетке из внеклеточной среды и внутриклеточного депо [32]. Это может происходить и в присутствии с Ba^{2+} , который, хотя и замещает Ca^{2+} во внеклеточных сайтах Na^+ - Ca^{2+} -обменников, но обладает значительно меньшим сродством к ним, чем Ca^{2+} [28]. Можно предположить, что во время деполяризации мембран нейронов и при ингибировании выделения Ca^{2+} из внутриклеточного депо BaCl_2 , некоторое количество Ca^{2+} всё же поступает внутрь клетки. Наши соображения частично подкрепляются работами [37, 38], в которых показано, что вызванный притоком ионов Na^+ в цитоплазму обратный натрий-кальциевый обмен вызывает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, увеличивая Ca^{2+} -сигнализацию.

В-третьих, возможен механизм компенсации снижения содержания Ca^{2+} в цитоплазме нейронов после воздействия CdCl_2 или BaCl_2 за счёт конкурентного связывания циклических нуклеотидов [20], на синтез которых влияют салицилаты [3, 12], и CdCl_2 или BaCl_2 с рецепторами SMOС Ca^{2+} -каналов.

Не исключено, что рассмотренные нами выше три механизма, не подверженные блокаде ионами Cd^{2+} и Ba^{2+} , могут принимать некоторое участие в нейротропных эффектах салицилатов.

ВЫВОДЫ

1. Нейротропные эффекты салициловой и ацетилсалициловой кислот, салицилатов и ацетилсалицилатов кобальта и цинка существенно зависят от наличия во внеклеточной среде АТФ. Механизм угнетающего нейротропного действия салициловой и ацетилсалициловой кислот в значительной степени связан со

- снижением концентрации АТФ в околоклеточном пространстве, а активирующего салицилатов и ацетилсалицилатов кобальта и цинка – с увеличением продукции АТФ на клеточных мембранах и последующей активации им P2 пуринергических рецепторов.
2. Входящий ток Ca^{2+} через каналы типа L и N и выделение этого иона из внутриклеточного депо напрямую не оказывают существенного влияния на нейротропные эффекты салицилатов. Однако, эффекты салициловой кислоты и салицилата кобальта ($0,5 \cdot 10^{-3}$ М) испытывают опосредованное влияние поступающих в нейроплазму ионов Ca^{2+} , поскольку зависят от Ca^{2+} -зависимого калиевого тока.
 3. Поступление Ca^{2+} в цитоплазму нейронов и участие в изменении их функционального состояния под влиянием салицилатов может обеспечиваться и другими механизмами, например, работой Na^+ - Ca^{2+} -обменников в режиме обратного цикла и Ca^{2+} -каналов входящего тока Т типа.

Список литературы

1. Дейл М.М. Руководство по иммунофармакологии / М.М. Дейл, Дж.К. Формен / М.: Медицина, 1998. – 332 с.
2. Коваленко В.Н. Компендиум – 2005 – лекарственные препараты / В.Н. Коваленко, А.П. Викторов. – К.: МОРИОН, 2005. – 1920 с.
3. Машковский М.Д. Ацетилсалициловая кислота в ряду современных лекарственных средств / М.Д. Машковский // Хим.-фарм. журн. – 1994. – Т. 28, № 2. – С. 4–8.
4. Лекарственная терапия воспалительного процесса: экспериментальная и клиническая фармакология противовоспалительных препаратов / [Сигидин Я.А., Шварц Г.Я., Арзамасцев А.П., Либерман С.С.] – М.: Медицина, 1988. – 240 с.
5. Hardman J.G. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics / Hardman J.G., Limbird L.E., Gilman A.G. – New York: McGraw-Hill, 2001. – 2148 pp.
6. Коренюк И.И. Влияние салициловой кислоты и её солей на электрическую активность нейронов виноградной улитки / И.И. Коренюк, Д.Р. Хусаинов, В.Ф. Шульгин // Нейрофизиология / Neurophysiology. – 2005. – Т. 37, № 2. – С. 142–150.
7. Коренюк И.И. Салицилаты кобальта и цинка как функциональные аналоги иницирующего фактора в нервной системе моллюска / И.И. Коренюк, Д.Р. Хусаинов, В.Ф. Шульгин // Нейрофизиология / Neurophysiology. – 2006. – Т. 38, № 1. – С. 11–18.
8. Влияние ацетилсалициловой кислоты, ацетилсалицилатов кобальта и цинка на поведенческие реакции крыс / Т.В. Яковчук, О.В. Катюшина, Д.Р. Хусаинов [и др.] // Учёные записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского, серия «Биология, химия». – 2010. – Т. 23, № 2. – С. 193–199.
9. Психотропная активность солей салициловой кислоты в условиях поведенческих тестов у крыс / Т.В. Яковчук, О.В. Катюшина, К.Р. Хусаинова [и др.] // Учёные записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского, серия «Биология, химия». – 2009. – Т. 22, № 1. – С. 25–31.
10. Влияние салициловой кислоты и её солей на время синаптической передачи / Д.Р. Хусаинов, О.В. Катюшина, И.В. Черетаев [и др.] // X Міжнародні Новорічні біологічні читання: міжнар. конф. 10-11 гр. 2010 р.: тези доп. – Миколаїв, 2010. – С. 325–329.
11. Влияние ацетилсалициловой кислоты, ацетилсалицилатов кобальта и цинка на время синаптической задержки / Черетаев И.В., Хусаинов Д.Р., Катюшина О.В [и др.] // Актуальные вопросы биологической физики и химии: матер. VI междунар. науч.-техн. конф. – Вып. 7. – Севастополь, 2011. – С. 55–57.

12. Григорьева А.С. Оптимизация фармакотерапевтической активности биометаллов при комплексообразовании с НПВП / А.С. Григорьева. – Микроэлементы в медицине. – 2000. – Т. 2, № 1 – С. 17–22.
13. Противовоспалительная активность солей ацетилсалициловой кислоты / О.В. Катюшина, Д.Р. Хусаинов, И.И. Коренюк [и др.] // X Міжнародні Новорічні біологічні читання: міжнар. конф. 10-11 гр. 2010 р.: тези доп. – Миколаїв, 2010. – С. 186–189.
14. Modulation of the biological properties of aspirin by formation of a bioorganometallic derivative / I. Ott, V. Kircher, C. Bagowski [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2009. – Vol. 48, No 6. – P. 1160–1163.
15. Зефилов А.Л. Ионные каналы нервного окончания / А.Л. Зефилов, Г.Ф. Ситдикова // *Успехи физиол. наук.* – 2002. – Т. 33, № 4 – С. 3–33.
16. Зиганшин А.У. Роль рецепторов АТФ (P2-рецепторов) в нервной системе / А.У. Зиганшин // *Неврол. вест.* – 2005. – Т. 37, № 1-2. – С. 45–53.
17. Костюк П.Г. Исследование метаболической зависимости функции ионных каналов в мембране нервной клетки / П.Г. Костюк // *Нейрофизиология.* – 1984. – Т. 16, №3. – С. 286–296.
18. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission / G. Burnstock // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87, No 2. – P. 659–797.
19. Burnstock G. Purinergic receptors in the nervous system / G. Burnstock // *Curr. Top. Membr.* – 2003. – Vol. 54, № 1. – P. 307–368.
20. Зинченко В.П. Внутриклеточная сигнализация / В.П. Зинченко, Л.П. Долгачёва – Пуццино: Аналитическая микроскопия, 2003. – 84 с.
21. Burnstock G. ATP and its metabolites as potent extracellular agents / G. Burnstock // *Curr. Top. Membr.* – 2003. – Vol. 54, No 1. – P. 1–27.
22. Latini S. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations / S. Latini, F. Pedata // *J. Neurochem.* – 2001. – V. 79, № 3. – P. 463–484.
23. Модулирующее влияние аденозинтрифосфата на осцилляторные свойства гиппокампальных нейронов в раннем онтогенезе / В.Ф. Сафиулина, А.М. Касьянов, Е.М. Соколова [и др.] // *Журн. высш. нервн. деят.* – 2003. – Т. 53, № 4. – С. 446–450.
24. Мельников К.Н. Разнообразие и свойства кальциевых каналов возбудимых мембран / К.Н. Мельников // *Психофармакол. биол. наркол.* – 2006. – Т. 6, № 1-2. – С. 1139–1155.
25. Berridge M.G. Neuronal calcium signaling / M.G. Berridge // *Neuron.* – 1998. – Vol. 21, № 1. – P. 13–18.
26. Brini M. Calcium pumps in health and disease / M. Brini, E. Carafoli // *Physiol. Rev.* – 2009. – Vol. 89, № 4. – P. 1341–1378.
27. Никитин В.П. Простагландины и функциональная специфичность нейронов виноградной улитки / В.П. Никитин, В.В. Шерстнёв // *Нейрофизиология / Neurophysiology.* – 1981. – Т. 13, № 6. – С. 580–588.
28. Dipolo R. Sodium-calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions / R. Dipolo, L. Beauge // *Physiol. Rev.* – 2006. – Vol. 86, No 1. – P. 155–203.
29. Кононенко Н.И. Механизмы генерации ритмоводящей активности в идентифицированных нейронах виноградной улитки / Н.И. Кононенко, О.В. Костюченко // *Нейрофизиология / Neurophysiology* – 2001. – Т. 33, № 1. – С. 46–54.
30. Кононенко Н.И. Влияние ионов кадмия на пачечную электрическую активность идентифицированного нейрона виноградной улитки / Н.И. Кононенко, О.Н. Осипенко // *Нейрофизиология / Neurophysiology* – 1983. – Т. 15, № 3. – С. 2047–2054.
31. Вислобоков А.И. Фармакологическая модуляция ионных каналов мембраны нейронов / Вислобоков А.И., Игнатов Ю.Д., Мельников К.Н. – СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2006. – 288 с.
32. Parekh A.B. Store-operated calcium channels / A.B. Parekh, J.W. Putney // *Physiol. Rev.* – 2005. – Vol. 85, No 2. – P. 757–810.
33. Влияние увеличения и снижения содержания внутриклеточного кальция на электрические характеристики командных нейронов у обученных улиток / Т.Х. Гайнутдинова, Д.И. Силантьева, В.В. Андрианов [и др.] // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2010. – Т. 152, № 2. – С. 29–40.
34. Пестов Н.Б. Регуляция Са-АТФ-азы плазматических мембран / Н.Б. Пестов, Р.И. Дмитриев, М.И. Шахпоронов // *Усп. биол. химии.* – 2003. – Т. 43, № 1. – С. 99–138.

35. Усачёв Ю.М. Действие ионов стронция и бария на системы связывания и транспорта кальция в нервных клетках / Ю.М. Усачёв, С.Л. Миронов // *Нейрофизиология / Neurophysiology* – 1989. – Т. 21, № 6. – С. 820–826.
36. Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels / E. Perez-Reyes // *Physiol. Rev.* – 2003. – Vol. 83, No 1. – P. 117–161.
37. Reverse Na^+ - Ca^{2+} exchange contributes to glutamate-induced intracellular Ca^{2+} concentration increases in cultured rat forebrain neurons / K.R. Hoyte, S.R. Arden, E. Aizenman [et al.] // *Mol. Pharm.* – 1998. – Vol. 53, No 4. – P. 742–749.
38. Reverse mode Na^+ - Ca^{2+} exchangers trigger the release of Ca^{2+} from intracellular Ca^{2+} stores in cultured rat embryonic cortical neurons / M.-P. Wu, L.-S. Kao, H.-T. Liao [et al.] // *Brain Res.* – 2008. – Vol. 128, No 1. – P. 41–51.

Черетасв І.В. Аденозинтрифосфат- та кальційзалежні механізми у нейротропних ефектах саліцилатів / І.В. Черетасв, І.І. Коренюк, В.Ф. Шульгін, Д.Р. Хусайнов, О.В. Катюшина, Т.В. Гамма, О.І. Колотилова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2012. – Т. 25 (64), № 1. – С. 230-243.

Досліджені аденозинтрифосфат- і кальційзалежні механізми регуляції нейронної активності равлика *Helix albensis* Rossm. Показано, що нейротропні ефекти саліцилатів залежать від наявності аденозинтрифосфату в позаклітинному середовищі. При поєднаному застосуванні аденозинтрифосфату з саліциловою і ацетилсаліциловою кислотами усувається пригноблення електричної активності нейронів равлика, викликане ізольованою експозицією цих кислот. Додавання в позаклітинне середовище аденозинтрифосфату посилює активуючі нейротропні ефекти солей саліциловою і ацетилсаліциловою кислот. Блокада трансмембранного струму Ca^{2+} показала, що ці іони не беруть участі в нейротропних ефектах саліцилатів, за винятком впливів кальційзалежного калієвого струму на ефекти саліцилової кислоти і саліцилату кобальту.

Ключові слова: аденозинтрифосфат, кальцій, нейрони моллюсків, саліцилати.

Cheretayev I.V. Adenosinetriphosphate- and calciumdependence mechanisms of salicylate neurotropic effects / I.V. Cheretayev, I.I. Korenyuk, V.F. Shulgin, D.R. Husainov, O.V. Katyushina, O.I. Kolotilova // Scientific Notes OF Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No 1. – P. 230-243.

The adenosinetriphosphate- and calciumdependence mechanisms of adjusting of snail's neuron activity of *Helix albensis* Rossm are researched. It was shown that the neurotropic effects of salicylates depends on the presence of adenosinetriphosphate in a extracellular environment. At joint application of adenosinetriphosphate with salicylic and acetylsalicylic acids the oppressing effect of these acids on electric activity of snail's neurons is removed. Adding to the extracellular environment of adenosinetriphosphate strengthens the activating neurotropic effects of salts salicylic and acetylsalicylic acids. The blockade of transmembrane current of Ca^{2+} showed, that these ions did not participate in the neurotropic effects of salicylates, except for influences of calcium-dependent potassium current on the effects of salicylic acid and cobalt salicylate.

Keywords: adenosinetriphosphate, calcium, neurons of mollusk, salicylates.

Поступила в редакцію 19.01.2012 г.