

УДК 612.014.46

ЗАВИСИМОСТЬ ВЛИЯНИЯ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЁ СОЛЕЙ НА НЕЙРОНЫ УЛИТКИ ОТ СОСТОЯНИЯ КАЛЬЦИЕВОЙ СИСТЕМЫ

Чертаев И.В., Хусаинов Д.Р., Коренюк И.И., Гамма Т.В.

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

В статье приведены результаты исследований зависимости нейротропных эффектов салициловой кислоты и салицилатов кобальта и цинка от состояния кальциевой системы нейронов улитки. В первой серии экспериментов для блокады входящего кальциевого тока использовали хлорид кадмия, а во второй с помощью хлорида бария блокировали входящий кальциевый ток и выделение кальция из внутриклеточного депо. Показано, что нейротропные эффекты салициловой кислоты и её солей не зависят от концентрации ионов кальция в цитоплазме нервной клетки.

Ключевые слова: нейроны моллюсков, салициловая кислота, салицилаты, кальций.

ВВЕДЕНИЕ

Выяснение механизмов действия различных фармакологических веществ на нейроны является актуальной задачей современной нейронауки. В проведённых ранее исследованиях показано нейротропное воздействие салициловой кислоты и её солей на нервную систему [1, 2], но механизм этого влияния полностью не был раскрыт. Считается, что значительную роль в регуляции импульсной активности нейронов играют ионы кальция, которые регулируют ионную проницаемость клеточных мембран и обуславливают их возбудимость [3, 4]. Источником кальция в нейронах являются его поступление через каналы плазмалеммы (входящий кальциевый ток) и высвобождение из внутриклеточного депо при входе в клетку натрия, кальция или под действием инозитолтрифосфата [3, 5-8].

Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы явилось изучение зависимости нейротропных эффектов воздействия салициловой кислоты и её солей — салицилата кобальта (СК) и цинка (СЦ) от состояния кальциевой системы нервной клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты были выполнены на 15 идентифицированных и 28 неидентифицированных клетках висцерального (ВГ) и правого париетального ганглиев (ППаГ) улитки *Helix abscence Rossm.* После извлечения окологлоточного нервного кольца из тела улитки, его фиксировали в экспериментальной камере вольфрамовыми иглами. Наружные соединительнотканые оболочки удалялись механическим путём без ферментативной обработки, так как фермент изменяет

активность различных мембранных структур и функциональное состояние клетки. Исследования проводились при температуре 18 – 21⁰С. Комплекс ганглиев моллюска постоянно омывался протоком раствора Рингера для холоднокровных следующего состава (в миллимолях на 1 литр): NaCl – 100, KCl – 4, CaCl₂ – 10, MgCl₂ – 4, трис-HCl – 10 (pH 7,5).

Измерения электрической активности нейронов проводились с помощью стандартного метода внутриклеточного отведения биопотенциалов [8] по программе «фон – аппликация – отмывание». На интактные препараты подглоточного комплекса ганглиев улитки апплицировали путём перфузии как индивидуальные растворы СК, СЦ, салициловой кислоты ($0,5 \cdot 10^{-3}$ М и $0,5 \cdot 10^{-4}$ М), так и комплексные растворы салицилатов и салициловой кислоты с хлоридом кадмия ($0,5 \cdot 10^{-3}$ М и $0,5 \cdot 10^{-4}$ М) или с хлоридом бария ($0,5 \cdot 10^{-3}$ М и $0,5 \cdot 10^{-4}$ М). Исследуемые вещества разводились до нужной концентрации раствором Рингера. Анализу были подвергнуты следующие параметры электрической активности 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).

Обработка результатов проводилась с использованием стандартных методов статистики ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффекты салициловой кислоты и салицилатов при блокаде входящего кальциевого тока хлоридом кадмия

В первой серии экспериментов для блокады входящего кальциевого тока использовался блокатор – хлорид кадмия [8, 10, 11]. При воздействии как индивидуального $0,5 \cdot 10^{-3}$ М раствора салициловой кислоты, так и в комплексе с CdCl₂ у фоновоактивных клеток ППаГ (ППа1, ППа7) наблюдалась гиперполяризация мембраны и прекращение генерации потенциалов действия (ПД), мембранный потенциал (МП) увеличивался в среднем до $-85 \pm 2,2$ мВ. Частота генерации импульсов (ЧГИ) под влиянием салициловой кислоты уменьшилась в 2-2,5 раз по сравнению с фоновой, а после аппликации комплексного раствора той же кислоты её значения существенно не изменились. При отмывании у всех нейронов восстанавливались показатели исходного МП, но параметры ПД значительно отличались от фоновых (увеличивалась продолжительность и уменьшалась амплитуда ПД).

Салициловая кислота у неидентифицированных нейронов ВГ вызывала гиперполяризацию их мембраны до -80 ± 4 мВ. В некоторых случаях наблюдалось полное угнетение генерации ПД. После аппликации $0,5 \cdot 10^{-3}$ М раствора салициловой кислоты с хлоридом кадмия существенных изменений параметров МП, КУД, длительности ПД и СГ по сравнению с эффектами салициловой кислоты не происходило. После отмывания восстанавливался фоновый уровень МП

Эффекты индивидуальных и комплексных с CdCl₂ растворов салициловой кислоты в концентрации $0,5 \cdot 10^{-4}$ М существенно не отличались между собой: ЧГИ

0,28 и 0,26 Гц соответственно, амплитуда $46,08 \pm 0,8$ и $45,72 \pm 1,2$ мВ, МП $54,11 \pm 0,6$ и $55,12 \pm 1,5$ мВ. КУД, длительность ПД и СГ также практически не отличались.

Индивидуальные растворы СК и СЦ в концентрации $0,5 \cdot 10^{-3}$ М вызывали существенное увеличение ЧГИ в 1,5-2 раза и увеличение длительности ПД на $2,7 \pm 0,4$ и $2,8 \pm 0,5$ мс соответственно. После замены окружающих ганглий индивидуальных растворов на комплексные существенных изменений электрических параметров не произошло (рис. 1).

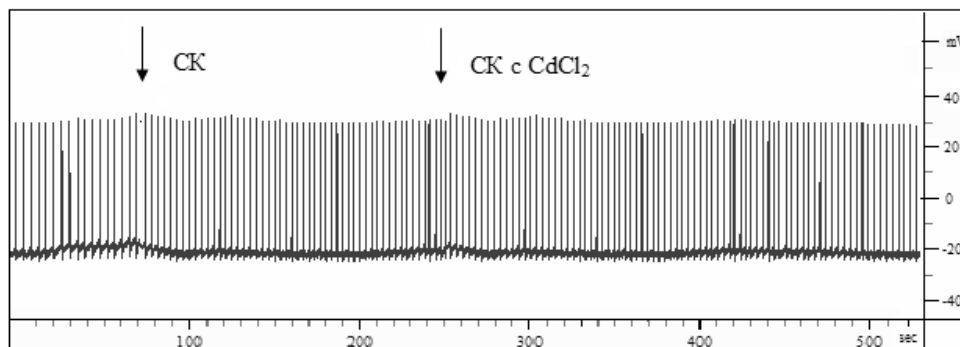


Рис. 1. Эффекты аппликации индивидуального раствора СК и комплексного с хлоридом кадмия ($0,5 \cdot 10^{-3}$ М). Моменты аппликации растворов отмечены стрелками.

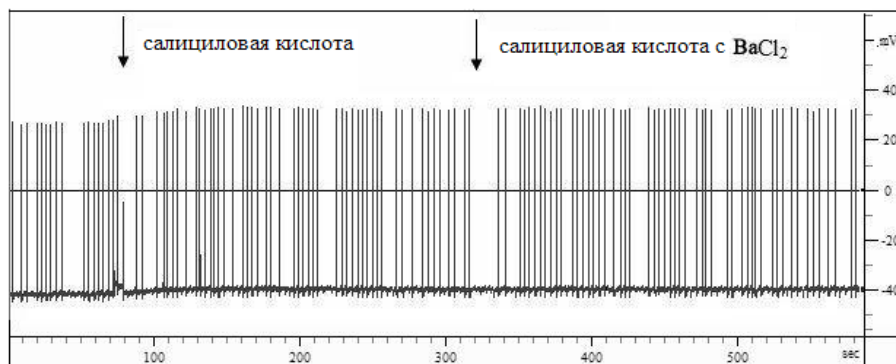
Растворы СК и СЦ в концентрации $0,5 \cdot 10^{-4}$ М не оказывали видимых эффектов на электрическую активность нейронов улитки. После замены окружающих ганглий растворов СК и СЦ на комплексные растворы этих солей с CdCl_2 выраженных эффектов также не наблюдалось ($n=6$ и $n=6$ соответственно для растворов BaCl_2 с СК и СЦ).

В серии экспериментов с CdCl_2 было выяснено, что специфика влияния исследованных салицилатов на электрофизиологическое состояние нейронов практически не изменяется по сравнению с индивидуальными растворами и, следовательно, их нейротропные эффекты слабо связаны с трансмембранным кальциевым током. Но, в данном случае блокада входящего кальциевого тока может компенсироваться за счет выделения кальция из внутриклеточного депо. В связи с этим, во второй серии аналогичных экспериментов мы использовали блокатор входящего кальциевого тока и выделения этого иона из внутриклеточного депо – хлорид бария [12]. Кроме того, BaCl_2 блокирует выходящий кальций-зависимый калиевый ток.

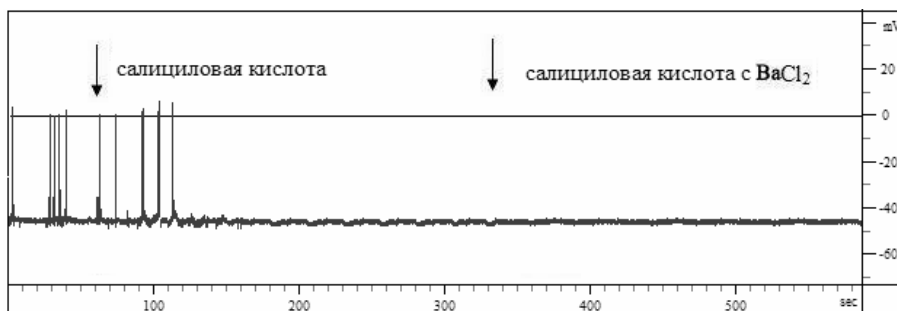
Эффекты салициловой кислоты и салицилатов при блокаде входящего кальциевого тока и выделения кальция из внутриклеточного депо хлоридом бария

В концентрации $0,5 \cdot 10^{-3}$ М салициловая кислота вызывала уменьшение фоновой импульсации в 2-2,8 раз ($n=8$) у неидентифицированных нейронов ВГ (рис. 2, А) либо полное прекращение генерации ПД у идентифицированных

нейронов ППаГ (n=10) (рис. 2, Б). Комплексный раствор $0,5 * 10^{-3}$ М салициловой кислоты и хлорида бария в обоих случаях не оказывал влияния на частоту импульсации и не восстанавливал её до исходного уровня. Салициловая кислота в концентрации $0,5 * 10^{-4}$ М незначительно уменьшала частоту импульсации (в 0,2 раза), при этом наблюдалась тенденция к увеличению времени нарастания ПД (на $0,7 \pm 0,2$ мс). При замене окружающего ганглий раствора на «коктейль» салициловой кислоты с хлоридом бария ($0,5 * 10^{-4}$ М) наблюдалось увеличение частоты ПД в 1,5 раза у нейронов ВГ (n=14), либо тенденция к уменьшению в нейронах ППаГ (n=15).



А



Б

Рис. 2. Эффекты аппликации индивидуального раствора салициловой кислоты и комплексного с хлоридом бария ($0,5 * 10^{-3}$ М). Моменты аппликации растворов отмечены стрелками.

СК и СЦ вызывали увеличение частоты генерации и длительности ПД на $2,9 \pm 0,5$ мс ПД в 1,5-2,5 раза (n=8 и n=7 соответственно для СК и СЦ) в концентрации $0,5 * 10^{-3}$ М. Эффекты индивидуальных и в комплексе с хлоридом бария растворов салициловой кислоты в концентрации $0,5 * 10^{-3}$ М существенно не отличались между собой (n=8 и n=7 соответственно для растворов $BaCl_2$ с СК и СЦ) (рис. 3): ЧГИ 0,27 и 0,25 Гц соответственно, амплитуда $45,48 \pm 0,8$ и $44,02 \pm 0,7$ мВ, МП $52,61 \pm 0,5$ и $52,52 \pm 0,6$ мВ. КУД, длительность ПД и СГ также практически не отличались.

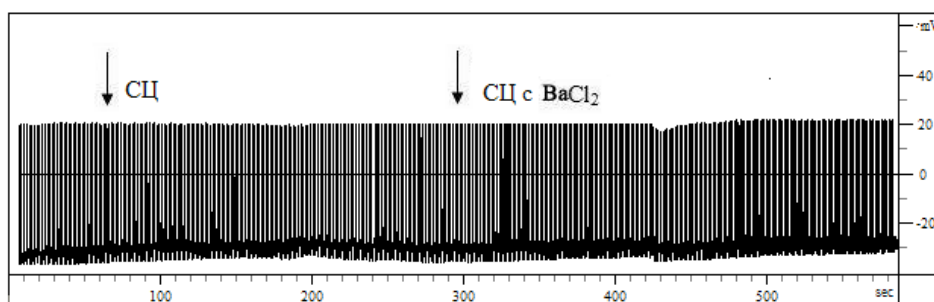


Рис. 3. Эффекты аппликации индивидуального раствора салицилата цинка и в комплексе с хлоридом бария. Моменты аппликации растворов отмечены стрелками.

Растворы СК и СЦ в концентрации $0,5 \cdot 10^{-4}$ М не оказывали эффектов на фоновый уровень электрической активности. После замены окружающего ганглий раствора СК на комплексный раствор $BaCl_2$ с СК наблюдалось увеличение частоты генерации ПД, а раствор СЦ с $BaCl_2$ практически не вызвал изменений ($n=6$ и $n=6$ соответственно для растворов $BaCl_2$ с СК и СЦ).

Выявленные незначительные отличия в эффектах индивидуальных и комплексных растворов салицилатов вероятно обусловлены влиянием хлорида бария, а не салицилатов. В литературе есть данные о снижении хлоридом бария ЧГИ, амплитуды ПД, величины МП [4, 5].

Таким образом, результаты настоящего исследования показали, что нейротропные эффекты салициловой кислоты и её солей — СК и СЦ — не зависят от концентрации ионов кальция в цитоплазме нервной клетки. Однако, возможно, что уменьшение поступления кальция в цитоплазму компенсируется иными механизмами, не связанными с применяемыми блокаторами, например с работой натрий-кальциевых обменников, зависящих от концентрации ионов натрия по обе стороны мембраны [6]. При деполяризации мембраны благодаря поступлению ионов Na^+ внутрь клетки натрий-кальциевые обменники работают в режиме обратного цикла, способствуя выводу ионов натрия и накоплению Ca^{2+} в клетке.

ВЫВОД

Нейротропные эффекты салициловой кислоты и её солей — СК и СЦ — не зависят от концентрации ионов кальция в цитоплазме нейронов улитки. Возможно, что поступление кальция в цитоплазму компенсируется иными механизмами, не связанными с применяемыми блокаторами.

Список литературы

1. Коренюк И.И. Влияние салициловой кислоты и ее 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.
2. Коренюк И.И. Салицилаты кобальта и цинка как функциональные аналоги инициирующего фактора в нервной системе моллюска / И.И. Коренюк, Д.Р. Хусаинов, В.Ф. Шульгин // *Нейрофизиология / Neurophysiology* – 2006. – Т. 38, № 1. – С. 11–18.

3. Berridge M.J. Neuronal calcium signaling / M.J. Berridge // *Neuron*. – 1998. – № 1. – P. 13–18.
4. Костюк П.Г. Кальций и клеточная возбудимость / П.Г. Костюк – М.: Наука, 1986. – 256 с.
5. Механизмы изменения концентрации ионов кальция в цитоплазме нейронов виноградной улитки с участием внутриклеточных кальциевых депо / П.Г. Костюк, А.В. Тепикин, П.В. Белан [и др.] // *Биол. мембраны*. – 1987. – Т. 4, № 9. С. 932–936.
6. От нейрона к мозгу / Д.Г. Николлс, А.Р. Мартин, Б.Д. Валлас, П.А. Фукс – М.: Едиториал УРСС, 2003. – 672 с.
7. Зефиоров А.Л. Ионные каналы нервного окончания / А.Л. Зефиоров, Г.Ф. Ситдикова // *Успехи физиол. наук*. – 2002. – Т. 33, № 4. – С. 3–33.
8. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release / A. Meir, S. Ginsburg, A. Butkevich [et al.] // *Physiol. Rev.* – 1999. – V. 79, № 3. – P. 1019–1088.
9. Kononenko N.I. Modulation of endogenous electrical activity of the bursting neuron in the snail *Helix pomatia* / N.I. Kononenko // *Neurosci.* – 1979. – V. 4, № 12. – P. 307–313.
10. 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.
11. Костюченко О.В. Эндогенная пейсмекерная активность изолированных нейронов моллюска / О.В. Костюченко, И.И. Коренюк // *Учёные записки ТНУ, серия «Биология, химия»*. – 2000. – Т. 2, № 13. – С. 34–41.
12. 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.

Черетаев И.В. Залежність ефектів саліцилової кислоти та її солей на нейрони равлика від стану кальцієвої системи / I.V. Cheretayev, D.R. Husainov, I.I. Korenjuk [et al.] // *Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”*. – 2010. – Т. 23 (62). – № 1. – С. 113–118.

У статті приведені результати досліджень залежності нейротропних ефектів саліцилової кислоти та саліцилатів кобальту й цинку від стану кальцієвої системи нейронів равлика. У першій серії експериментів для блокування вхідного кальцієвого струму використовували хлорид кадмію, а в другій за допомогою хлориду барію блокували вхідний кальцієвий струм і виділення кальцію із внутрішньоклітинного депо. Показано, що нейротропні ефекти саліцилової кислоти та її солей не залежать від концентрації іонів кальцію в цитоплазмі нервової клітини.

Ключові слова: нейрони моллюсків, саліцилова кислота, саліцилати, кальцій.

Cheretayev I.V. Dependence of effects of salicylic acid and its salts on the neurons of snail from the state of calcium system / I.V. Cheretayev, D.R. Husainov, I.I. Korenjuk [et al.] // *Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry*. – 2010. – V.23 (62). – № 1. – P. 113–118.

The article is about of dependence neurotropic effects of salicylic acid and salicylates cobalt and zinc from a state of calcium system snail's neurons In the first series of experiments for blockage of entering calcium current used cadmium chloride, and in the second by means of barium chloride quenched entering calcium current and allocation of calcium from endocellular depot. It is shown, that neurotropic effects of salicylic acid and its salts are not depend from concentration of calcium ions in cytoplasm of the excitatory cage.

Keywords: neurons of mollusc, salicylic acid, salicylates, calcium.

Поступила в редакцію 23.03.2010 г.