

УДК 612.014.46

## АНАЛИЗ АТФ-ЗАВИСИМЫХ И КАЛЬЦИЕВЫХ МЕХАНИЗМОВ В РЕАЛИЗАЦИИ НЕЙРОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ АСПИРИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Черетаев И.В., Кореньюк И.И., Хусаинов Д.Р., Катюшина О.В.,  
Гамма Т.В., Колотилова О.И.

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

Статья посвящена исследованию механизмов нейротропного действия аспирина, ацетилсалицилатов кобальта и цинка. Показано, что наличие аденозинтрифосфата во внеклеточном пространстве существенно модифицирует нейротропные эффекты салицилатов. Сочетанное приложение аденозинтрифосфата с аспирином устраняет угнетение импульсной активности нейронов, вызванное индивидуальным раствором этого препарата, а совместная экспозиция аденозинтрифосфата с ацетилсалицилатами кобальта и цинка, наоборот, усиливает их активирующие эффекты. При блокировании  $\text{CdCl}_2$  и  $\text{BaCl}_2$  поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в нейроплазму из внеклеточной среды и внутриклеточных депо выявлено, что кальциевые механизмы не участвуют в нейротропных эффектах исследуемых салицилатов.

**Ключевые слова:** аспирин, кальций, аденозинтрифосфат, нейротропное действие

## ANALYSIS OF ATP-DEPENDENT AND CALCIUM MECHANISMS IN IMPLEMENTATION NEUROTROPIC ACTION OF ASPIRIN AND ITS DERIVATIVES

Cheretaev I.V., Koreniuk I.I., Khusainov D.R., Gamma T.V.,  
Katiushina O.V., Kolotilova O.I.

*Taurida National University Vernadsky, Simferopol, Crimean Autonomous Republic,  
Simferopol, e-mail: 5612178@ukr.net*

The article is sanctified to research of mechanisms of neurotropic action aspirin, acetylsalicylates of cobalt and zinc. It is showed that the presence of adenosinetriphosphate in an extracellular environment substantially modifies the neurotropic effects of salicylates. Joint application of adenosinetriphosphate with aspirin removes oppressing of impulsive activity of neurons, caused by the action of this drug, and the joint display of adenosinetriphosphate with acetylsalicylates of cobalt and zinc, vice versa, strengthens the activating effects of these salts. At the blockade  $\text{CdCl}_2$  и  $\text{BaCl}_2$  of potential dependent membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -current and their excretions from a intracellular depot showed, that calcium mechanisms did not participate in the neurotropic effects of aspirin and his salts.

**Keywords:** aspirin, calcium, adenosinetriphosphate, neurotropic action

Установлено, что аспирин (Asp) и его комплексные производные – ацетилсалицилаты кобальта (АСК) и цинка (АСЦ) способны изменять электрические потенциалы нейронов ЦНС [1, 2]. Ранее нами было показано [6], что нейротропное действие салицилатов может реализовываться с участием циклических нуклеотидов (цАМФ и цГМФ), а роль других вторичных посредников в его механизме ещё не ясна. Есть лишь сведения о том, что Asp и его производные угнетают синтез аденозинтрифосфата (АТФ) [3], однако это явление не связывают с нейротропными эффектами салицилатов. Известно, что в нейронах АТФ используется для работы ионных насосов и каналов и способен дефосфорилироваться до цАМФ – мессенджера аденилатциклазного каскада передачи сигналов внутрь клетки и агониста P2-рецепторов ионных каналов, а продукт его распада – аденозин – регулирует деятельность P1-рецепторов [4, 12]. Вышеизложенное позволяет предположить, что механизм нейротропного действия Asp и его производ-

ных может в значительной степени определяться изменением вне- и внутриклеточной концентрации АТФ. Обращает внимание и отсутствие в литературе данных о роли  $\text{Ca}^{2+}$  в эффектах салицилатов, хотя известно, что эти ионы могут влиять на возбудимость нейронов и внутриклеточные процессы в них, в том числе и связанные с циклическими нуклеотидами [11].

Таким образом, целью этой работы явилось изучение роли АТФ-зависимых и кальциевых механизмов в реализации нейротропного действия Asp и его производных – АСК и АСЦ.

### Материалы и методы исследования

Исследования проведены на 159 неидентифицированных нейронах висцерального и правого париетального ганглиев улитки *Helix albescens* Rossm. Для этого окологлоточное нервное кольцо препарировали из тела улитки, фиксировали в экспериментальной камере (объём 0,5 мл) с постоянным протоком раствора Рингера для холоднокровных животных ( $\text{NaCl}$  – 100,  $\text{KCl}$  – 4,  $\text{CaCl}_2$  – 10,  $\text{MgCl}_2$  – 4, трис- $\text{HCl}$  – 10, состав указан в миллимолях на 1 л; температура 18–21°C, pH = 7,5) и удаляли наружные соединительнотканые оболочки [6, 9]. Затем проток раствора Рингера

перекрывали и однократно апплицировали в объёме 1 мл разведённые им до необходимых концентраций вещества. В эксперименте использовали Asp, BaCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub> («Merk», Германия), АТФ («Здоровье народа», Украина), АСК, АСЦ (синтезированы на кафедре общей химии Таврического национального университета им. В.И. Вернадского) с химической чистотой не менее 95%. Электрические потенциалы нейронов регистрировали и записывали методом внутриклеточного отведения с помощью физиологической установки [6] и программы «Action Potential» [10] по схеме: фон (1 мин); экспозиция раствора тестируемого вещества – контроль (4 мин.); экспозиция того же вещества (4 мин) в сочетании с одним из агентов (АТФ, CdCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>); отмывание (20 мин). С помощью указанной программы рассчитывали амплитудно-временные характеристики потенциалов нейронов и оценивали скорость нарастания суммарных трансмембранных ионных токов [6]. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью критерия Вилкоксона.

**Результаты исследования и их обсуждение**

Нейротропные эффекты индивидуальных и сочетанных с аденозинтрифосфатом растворов аспирина, ацетилсалицилатов кобальта и цинка. В данной серии экспериментов были исследованы эффекты индивидуально и сочетанного с АТФ приложения во внеклеточную среду растворов Asp, АСК, АСЦ.

Концентрация каждого вещества в окружающем нейроны растворе составляла 5·10<sup>-4</sup> М. Такая концентрация является физиологической внутри клеток для АТФ [12], и именно в ней Asp, АСК и АСЦ оказывают выраженное нейротропное действие [1, 2].

Приложение к наружной поверхности мембран нейронов (n = 8) индивидуального раствора АТФ в концентрации 5·10<sup>-4</sup> М не оказывало достоверного влияния на исследуемые параметры их электрической активности. В данном случае отсутствие эффектов объясняется тем, что дополнительные поступления АТФ разрушаются ферментами экто-АТФазами до аденозина [12].

Экспозиция индивидуального раствора Asp (n = 11) в концентрации 5·10<sup>-4</sup> М приводила к характерному угнетению электрической активности нейронов: снижала частоту генерации импульсов (ЧГИ), уменьшала амплитуду потенциалов действия (ПД) и увеличивала негативность мембранного потенциала (МП) (рис. 1, а, 1–2). При этом на уровне тенденции снижалась скорость нарастания входящих и увеличивалась (p < 0,05) – скорость нарастания выходящих трансмембранных ионных токов (рис. 1, а, 3–4).

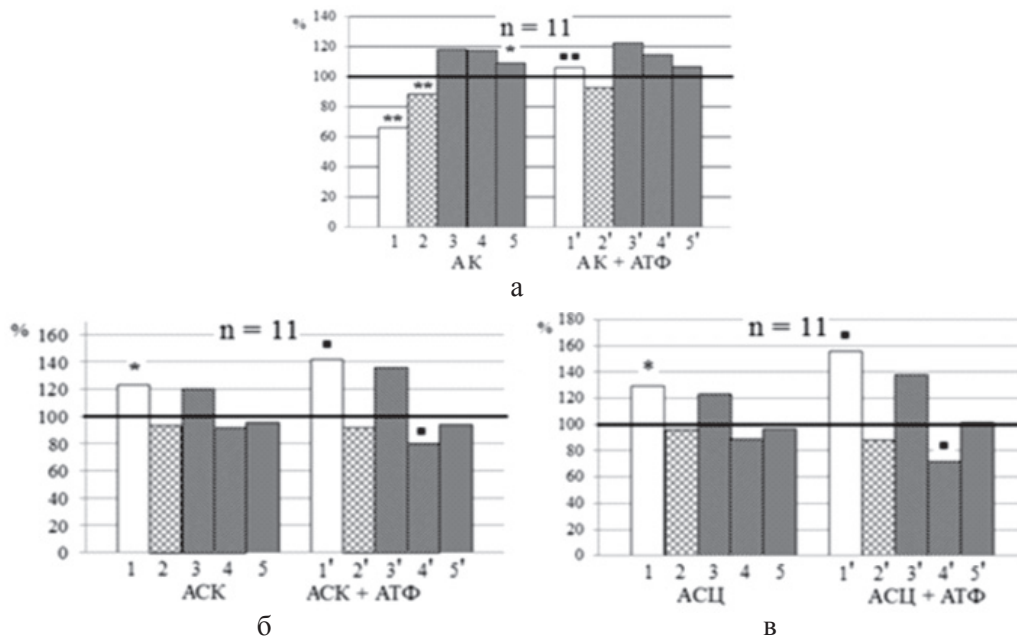


Рис. 1. Нейротропные эффекты индивидуальных и сочетанных с 5·10<sup>-4</sup> М аденозинтрифосфатом (АТФ) растворов аспирина, ацетилсалицилатов кобальта и цинка в концентрации 5·10<sup>-4</sup> М. Примечание: Asp – аспирин, АСК – ацетилсалицилат кобальта, АСЦ – ацетилсалицилат цинка. Тестируемые растворы отмечены на диаграммах. Горизонтальной жирной линией обозначены значения фоновых показателей, принятые за 100%; 1 – частота генерации импульсов, 2 – амплитуда потенциалов действия, 3 – скорость суммарных входящих ионных токов, 4 – скорость суммарных выходящих ионных токов, 5 – мембранный потенциал. 1' – 5' – показатели электрической активности при сочетанной экспозиции салицилатов с АТФ. n – количество исследованных нейронов; \* – 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

По сравнению с эффектами индивидуального раствора Asp воздействие АК + АТФ ( $n = 11$ ) увеличивало ЧГИ ( $p < 0,01$ ) исследованных нейронов на 39,9% (рис. 1, б, 1 и 1'). Таким образом, в присутствии АТФ угнетение ЧГИ, вызванное Asp, нивелировалось. Это сопровождалось увеличением на уровне тенденции скорости нарастания суммарных входящих трансмембранных ионных токов и снижением – выходящих (рис. 1, а, 3–3', 4–4'). Указанные изменения свидетельствуют о возрастании при действии АТФ и (или) продукта его распада – аденозина – проницаемости наружных мембран нейронов для  $\text{Na}^+$  и, возможно,  $\text{Ca}^{2+}$ . Следует напомнить, что в плазматической мембране многих нейронов моллюсков  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы отсутствуют, а добавление АТФ неспецифически нивелировало угнетающие эффекты Asp у всех исследованных нейронов. Поэтому мы считаем, что повышение уровня внеклеточного АТФ приводило главным образом к активации  $\text{Na}^+$ -каналов. Раствор Asp + АТФ на уровне тенденции также снижал и скорость нарастания суммарных выходящих ионных токов, что указывает на некоторое снижение проницаемости мембран для  $\text{K}^+$  (рис. 1, А, 4–4'). Это может быть связано с инактивацией АТФ-зависимого тока  $\text{K}^+$  [4].

Поскольку угнетающие нейротропные эффекты Asp устранялись добавлением АТФ в окружающий нейроны раствор в количестве соответствующем его внутриклеточной физиологической концентрации, это даёт основание полагать, что механизм такого эффекта связан с нарушением синтеза АТФ на внутриклеточных мембранах нейронов и сокращением его выброса во внеклеточное пространство. Вызванный Asp недостаток АТФ внутри и вне клеток может быть причиной снижения функциональной активности нейронов за счёт замедления скорости энергетических и опосредованных пуриnergической сигнализацией внутриклеточных процессов. Например, могла нарушаться электрогенная функция  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -насоса, активироваться АТФ-зависимый ток  $\text{K}^+$  [4].

Приложение растворов АСК и АСЦ достоверно повышало ЧГИ по сравнению с фоном, а добавление к этим агентам АТФ ещё больше увеличивало ЧГИ – на 19,2 и 26,8% соответственно ( $p < 0,05$ ; рис. 2, б и в, 1–1'). Растворы АСК + АТФ и АСЦ + АТФ достоверно ( $p < 0,01$ ) уменьшали (рис. 1, б и в, 3'–4') скорость нарастания суммарных выходящих ионных токов.

Данные изменения свидетельствуют об ингибирующем действии АТФ на  $\text{K}^+$ -каналы. Согласно данным [4], это может быть связано с инактивацией АТФ-зависимых  $\text{K}^+$ -каналов, которые были обнаружены и в нейронах брюхоногих моллюсков. Кроме того, все протестированные соли в сочетании с АТФ на уровне тенденции увеличивали скорость нарастания суммарных входящих ионных токов (рис. 1, б-в, 3'), что согласно [6, 12] указывает на увеличение проницаемости натриевых и, возможно, кальциевых ионных каналов.

Не исключено, что усиление активирующих эффектов АСК и АСЦ при добавлении к ним АТФ может быть результатом и непосредственной активации тестируемыми солями синтеза АТФ на мембранах нейронов. В этом случае последовательность событий, происходящих в нейронах при действии растворов АСК + АТФ и АСЦ + АТФ, может быть следующей:

1. Под влиянием АСК, АСЦ происходит увеличение продукции АТФ на внутриклеточных мембранах и его выброса в наружную среду, а добавление АТФ во внеклеточную среду ещё больше увеличивает его содержание здесь.

2. Увеличение уровня АТФ выше физиологических концентраций может запускать последовательные реакции его дефосфорилирования экто-АТФазами и эктонуклеотидазами мембран [11]. Однако слишком большое количество АТФ, по-видимому, вызывает полное субстратное насыщение активных центров этих ферментов, разрушающих АТФ до аденозина.

3. Замедляется распад АТФ, вследствие чего он модулирует функционирование ионных каналов, управляемых  $\text{P}_2$  рецепторами. Аденозин, образовавшийся в результате распада АТФ, может стимулировать процессы, опосредуемые  $\text{P}_1$  рецепторами.

Ранее нами было показано, что облегчающее и модулирующее влияние салицилатов на нейроны улитки опосредуется цАМФ [6], который является активатором/ингибитором различных подтипов  $\text{P}_2$  и  $\text{P}_1$  рецепторов [12]. В присутствии растворов АСК и АСЦ мы тоже наблюдали медленно-волновые колебания МП, которые согласно [6] указывают на изменения концентрации цАМФ и цГМФ. Всё это свидетельствует в пользу предлагаемой нами выше схемы для объяснения эффектов сочетанного воздействия АТФ и солей Asp, поскольку изменение концентрации цАМФ в нейронах может быть вызвано эффектами АТФ и аде-

нозина [12], а в отношении самого Asp известно, что он не только угнетает синтез АТФ, но и уменьшает содержание цАМФ [3]. Мы полагаем, что активирующие нейротропные эффекты АСК и АСЦ, в отличие от угнетающих Asp, обусловлены увеличением синтеза АТФ и, следовательно, цАМФ. Если это так, то можно считать, что в механизме эффектов АСК и АСЦ значительную роль играют внеклеточный уровень АТФ и, по-видимому, его продукта – аденозина.

Нейротропные эффекты аспирина и его производных при блокаде входящего кальциевого тока хлоридом кадмия. Для выяснения роли входящего трансмембранного кальциевого тока в нейротропных эффектах Asp, АСК и АСЦ в серии экспериментов мы использовали его блокатор – CdCl<sub>2</sub> [4, 5]. Как видно из рис. 2, эффекты приложения индивидуальных и сочетанных с CdCl<sub>2</sub> растворов указанных веществ в концентрациях 5·10<sup>-5</sup> и 5·10<sup>-4</sup> М существенно не отличались.

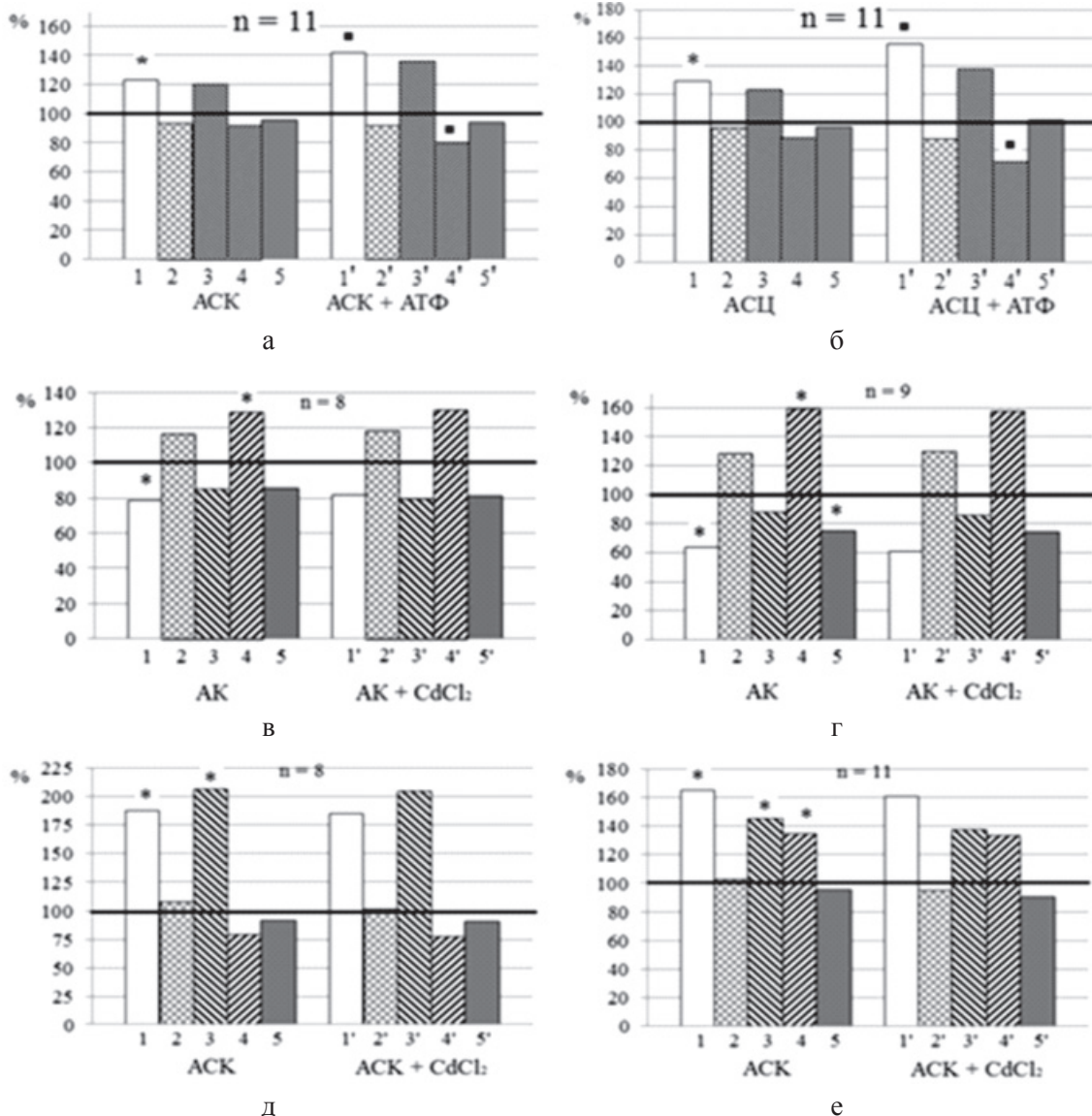


Рис. 2. Нейротропные эффекты приложения индивидуальных и сочетанных с CdCl<sub>2</sub> растворов аспирина, ацетилсалицилатов кобальта и цинка. Примечание: концентрации веществ и CdCl<sub>2</sub> в применяемых растворах 5·10<sup>-5</sup> (А, В, Д) и 5·10<sup>-4</sup> М (Б, Г, Е) Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

Поскольку CdCl<sub>2</sub> не изменял нейротропные эффекты тестируемых веществ, можно полагать, что они практически не связаны с входящим трансмембранным то-

ком Ca<sup>2+</sup>. Иными словами можно считать, что салицилаты не увеличивают проницаемость наружных мембран нейронов для Ca<sup>2+</sup>. Есть даже основания предполагать,

что Asp, АСК и АСЦ сами блокируют этот ионный ток.

Однако отсутствие поступления  $\text{Ca}^{2+}$  из внеклеточной среды в нейроплазму могло компенсироваться за счет выделения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо [11] и благодаря ингибированию  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азы плазматических мембран (PMCA), которая способствует выведению  $\text{Ca}^{2+}$  из клетки против градиента

его концентрации, ионами  $\text{Cd}^{2+}$  [8]. Для того, чтобы выяснить, так ли это, в следующей серии экспериментов вместо хлорида кадмия мы апплицировали на мембраны нейронов хлорид бария – блокатор выделения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, входящего тока  $\text{Ca}^{2+}$  и выходящего  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого калиевого тока [4, 9]. Следует напомнить, что ионы  $\text{Ba}^{2+}$  не влияют на работу PMCA [8].

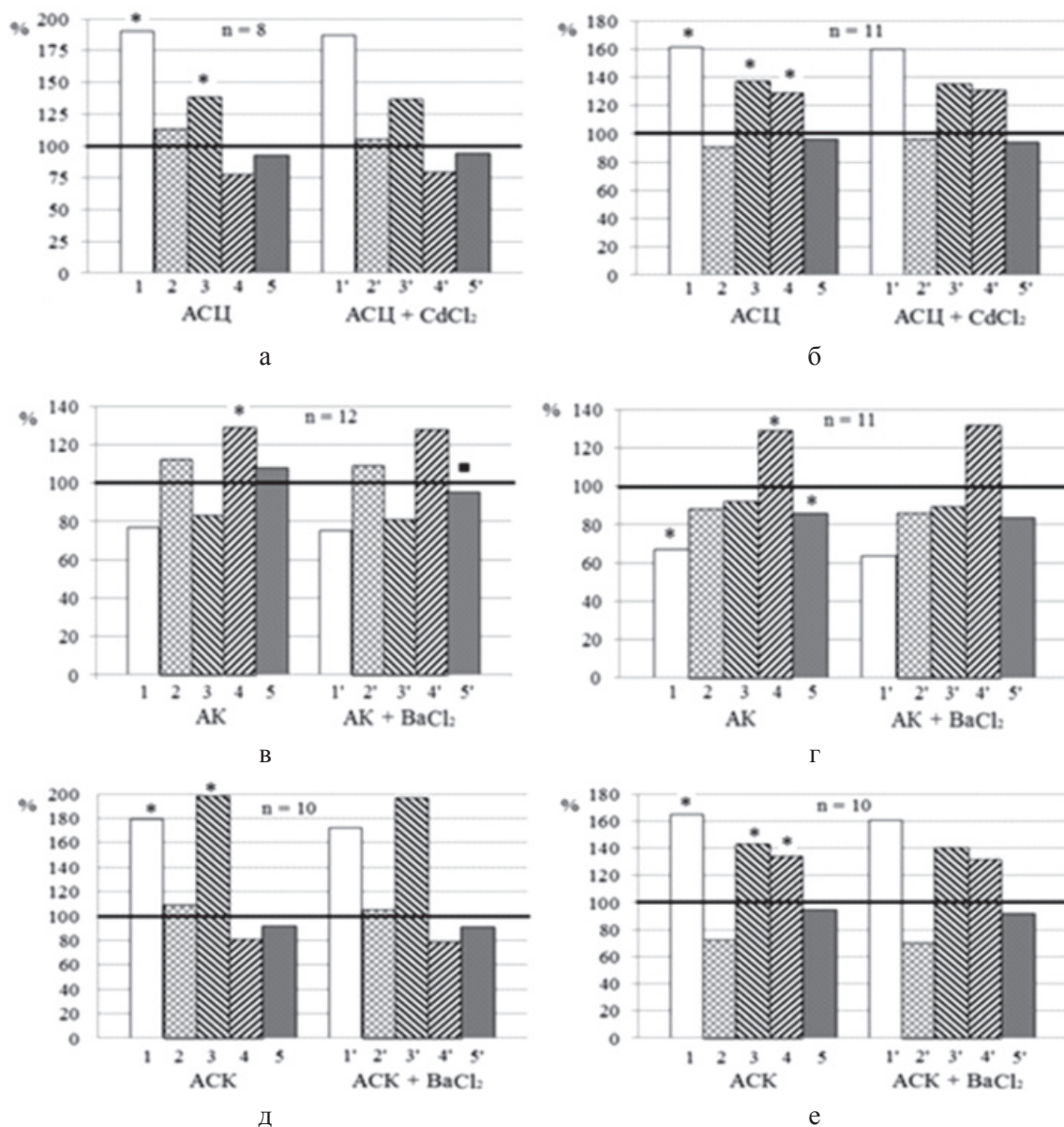


Рис. 3. Нейротропные эффекты приложения индивидуальных и сочетанных с  $\text{BaCl}_2$  растворов аспирина, ацетилсалицилатов кобальта и цинка. Примечание: концентрации тестируемых кислот и  $\text{BaCl}_2$  в используемых растворах  $5 \cdot 10^{-5}$  (А, В, Д) и  $5 \cdot 10^{-4}$  М (Б, Г, Е). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1

Эффекты аспирина и его производных при блокаде хлоридом бария поступления ионов кальция в нейроплазму из наружной среды и внутриклеточных депо. Эффекты

$5 \cdot 10^{-5}$  и  $5 \cdot 10^{-4}$  М индивидуальных Asp, АСК и АСЦ достоверно не отличались от их эффектов в сочетании с  $\text{BaCl}_2$  (рис. 3). Исключением было лишь снижение МП ( $p < 0,05$ )

при действии  $5 \cdot 10^{-5}$  М раствора  $\text{Asp} + \text{BaCl}_2$  (рис. 3, а,  $5-5'$ ). Отмеченные изменения МП согласуются со сведениями литературы [4] о том, что  $\text{BaCl}_2$  может снижать МП. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в механизмах нейротропного действия тестируемых салицилатов ионы  $\text{Ca}^{2+}$  не участвуют.

Однако следует учесть, что вызванное блокаторами уменьшение поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в нейроплазму может компенсироваться за счёт других механизмов. Например,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Ba}^{2+}$  эффективно блокируют потенциалзависимые L и N каналы входящего кальциевого тока и не оказывают существенного влияния на T каналы [4], хотя они и встречаются редко в мембранах нейронов моллюсков [7]. Другой путь поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в нейроплазму при действии салицилатов и  $\text{BaCl}_2$  может обеспечиваться благодаря работе  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  -обменников, при этом направление переноса  $\text{Ca}^{2+}$  через наружную мембрану зависит от концентрации  $\text{Na}^+$  по обе её стороны [11]. При поступлении  $\text{Na}^+$  внутрь клетки,  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  -обменники способствуют выводу  $\text{Na}^+$  из клетки и накоплению в нейроплазме  $\text{Ca}^{2+}$  из внеклеточной среды и внутриклеточных депо [11]. Это могло происходить и в присутствии  $\text{Ba}^{2+}$ , обладающих меньшим сродством к внеклеточным сайтам  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  -обменников, чем  $\text{Ca}^{2+}$  [8].

### Выводы

1. Нейротропные эффекты аспирина, ацетилсалицилатов кобальта и цинка существенно зависят от содержания во внеклеточной среде АТФ. Механизм угнетающего нейротропного действия аспирина в значительной степени связан со снижением концентрации АТФ во внеклеточной среде, а активирующие эффекты ацетилсалицилатов кобальта и цинка усиливаются в присутствии АТФ.

2. Блокирование входящего тока и выделения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо с помо-

щью  $\text{CdCl}_2$  и  $\text{BaCl}_2$  показало, что эти ионы не участвуют в реализации нейротропного действия аспирина, ацетилсалицилатов кобальта и цинка. Однако существуют другие механизмы поступления  $\text{Ca}^{2+}$  в нейроплазму, которые не подвержены действию использованных нами блокаторов (функционирование T-каналов входящего кальциевого тока, работа  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обменников). Участие этих механизмов в нейротропном действии салицилатов ещё предстоит выяснить.

### Список литературы

1. Влияние ацетилсалициловой кислоты на электрическую активность нейронов улитки / И.В. Черетаев, Д.Р. Хусаинов, Т.В. Гамма и др. // *Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье*. – 2012. – Т. 15. – С. 310.
2. Влияние ацетилсалицилатов кобальта и цинка на электрическую активность нейронов улитки / И.В. Черетаев, Д.Р. Хусаинов, Т.В. Гамма и др. // *Актуальні питання біології та медицини*. – 2012. – Т. 10. – С. 106–109.
3. Дейл М.М. Руководство по иммунофармакологии / М.М. Дейл, Дж.К. / *Формен*. – М.: Медицина. – 1998. – 332 с.
4. Зефирова А.Л. Ионные каналы нервного окончания / А.Л. Зефирова, Г.Ф. Ситдикова // *Успехи физиол. наук*. – 2002. – Т. 33, № 4. – С. 3–33.
5. Кононенко Н.И. Влияние ионов кадмия на пачечную электрическую активность идентифицированного нейрона виноградной улитки / Н.И. Кононенко, О.Н. Осипенко // *Нейрофизиология*. – 1983. – Т. 15, № 3. – С. 2047–2054.
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*. – 2005. – Т. 37, № 2. – С. 142–150.
7. Мельников К.Н. Разнообразие и свойства кальциевых каналов возбудимых мембран // *Психофармакол. биол. наркол*. – 2006. – Т. 6, № 1–2. – С. 1139–1155.
8. 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.
9. Усачёв Ю.М. Действие ионов стронция и бария на системы связывания и транспорта кальция в нервных клетках / Ю.М. Усачёв, С.Л. Миронов // *Нейрофизиология*. – 1989. – Т. 21, № 6. – С. 820–826.
10. А. с. Украина № 1164229, 29.11.2004 р.
11. Berridge M.G. Neuronal calcium signaling // *Neuron*. – 1998. – Vol. 21, № 1. – P. 13–18.
12. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission / G. Burnstock // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87, № 2. – P. 659–797.