

ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ И ИОННЫХ ТОКОВ НЕЙРОНОВ ПРИ ВНЕ- И ВНУТРИКЛЕТОЧНОМ ДЕЙСТВИИ АЦЕТАТА РТУТИ

ВИСЛОБОКОВ А.И.¹, МАЛОВ А.М.², ОРЛОВ В.И.³

¹ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени
акад. И.П. Павлова Минздрава Российской Федерации; 197022, г. Санкт-Петербург,
ул. Л. Толстого, 6/8. Тел. (812) 338-71-02, e-mail: vislobokov@yandex.ru

²ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»,
192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1
Тел. (812) 365-06-80, e-mail: malexmish@rambler.ru

³Научно-исследовательский институт нейрокибернетики им. А.Б. Когана Академии
биологии и биотехнологии Южного федерального университета; 344090,
Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1, оф. 703. Тел. 8(863) 243-32-67, e-mail: orlov@rostel.ru

Резюме

Проведены исследования изменений внутриклеточных потенциалов идентифицируемых интактных нейронов изолированной ЦНС моллюска катушки роговой (*Planorbarius corneus*) с помощью внутриклеточных микроэлектродов и ионных токов изолированных нейронов катушки и прудовика (*Lymnaea stagnalis*) в условиях фиксации потенциала под влиянием ацетата ртути (АР) в концентрациях 0,1 мкМ, 1,0 мкМ, 10 мкМ, 100 мкМ и 1000 мкМ. Через 3–5 мин после приложения АР в концентрациях от 0,1 мкМ до 10 мкМ в интактных нейронах потенциал покоя (ПП) незначительно (на 1 – 2 мВ) уменьшается, происходит увеличение частоты потенциалов действия (ПД). При концентрациях АР 100 – 1000 мкМ возникает необратимая деполяризация мембраны до -35 – -40 мВ, сопровождающаяся необратимым прекращением генерации ПД.

Изменения ионных токов под влиянием АР оказались более выраженными при меньших концентрациях, чем изменения биопотенциалов. Амплитуда суммарных входящих натрий-кальциевых токов и выходящих калиевых токов неизбирательно и необратимо снижалась под влиянием АР в концентрации от 0,1 мкМ и усиливалась при концентрации 1000 мкМ вплоть до нуля. Изменения наступали быстро, менее чем за 1 мин. Кинетика развития ионных токов не изменялась. Внутриклеточное действие АР в концентрации 100 мкМ не подавляло ионные токи, т.е. было неэффективным.

Ключевые слова: нейроны моллюсков, ацетат ртути, потенциал покоя, потенциал действия, импульсная активность, ионные токи

THE CHANGES OF INTRACELLULAR POTENTIALS AND IONIC CURRENTS IN NEURONS IN THE EXTRA-AND INTRACELLULAR APPLICATION OF MERCURY ACETATE

Vislobokov A.I.¹, Malov A.M.², Orlov V.I.³

Summary

The effect of mercury acetate (MA) in 0.1 μM , 1.0 μM , 10 μM , 100 μM and 1000 μM concentrations on the identified intact and isolated neurons of mollusks *Planorbarius corneus* and *Lymnaea stagnalis* have been studied using a microelectrode technique and the voltage-clamp method. MA at concentrations from 0.1 to 10 μM (after 3 – 5 min of its action beginning) slightly (by 1 – 2 mV) decreased the membrane rest potential in intact neurons. The trend to depolarization and increase of action potential (AP) frequency was observed. But MA at concentrations of 100–1000 μM caused the expressed and irreversible depolarization to the level of -35 – -40 mV that was accompanied with the cessation of AP generation and neuron damage.

The changes of ionic currents under the MA influence were more expressed even at lesser concentrations than the biopotentials changes. Already under the MA effect at concentration of 0.1 μM the amplitude of the total inward sodium-calcium currents and the outward potassium currents was decreased inselectively and irreversibly and the suppression of currents was intensified up to zero at 1000 μM concentration. The changes came rapidly (lesser than during 1 min). The kinetics of ionic currents was not changed. The MA at concentration of 100 μM in the intracellular application on the neurons did not suppress the ionic currents, that is it was uneffective.

Key words: neurons of mollusks, mercury acetate, membrane rest potential, action potential, impulse activity, ionic currents.

Введение

Ртуть и ее соединения относятся к приоритетным неорганическим экотоксикантам. Персистентность ртути, особенно в окружающей среде мегаполисов, высокая токсичность ее и ее соединений стимулируют интерес исследователей и врачей к проблеме ртутных отравлений, в частности к пониманию механизмов действия этого токсиканта и в конечном итоге к поиску возможной терапии.

Известно, что на системном уровне основными точками приложения ртути являются почки, печень и нервная система; научно-практических исследований на эту тему достаточно много. Неврологические нарушения являются одними из первых симптомов токсического действия ртути и чаще других используются при диагностировании соответствующей патологии [1].

Для понимания механизмов действия ртути значительный интерес представляют соответствующие исследования на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях. Экспериментальные данные в этой области были бы полезны как для более полного понимания системного действия ртути на уровне органов и организма в целом, так и для проведения терапевтических мероприятий при отравлении ртутью.

В медицинской практике последних лет случаи воздействия на организм высоких концентраций этого токсиканта и его соединений достаточно редкое явление. В настоящее время на передний план выступают явления меркуриализма и микромеркуриализма [1], как результат длительного воздействия относительно невысоких концентраций ртути и ее соединений на организм. В этих условиях интерес исследователей все больше переключается с изучения системных эффектов отравления ртутью, т.е. на уровне организма в целом, тканей и органов, на клеточный, субклеточный и молекулярный уровень, на котором, собственно, и развивается первичное действие ртути в ее самых низких концентрациях.

Понимание клеточных, субклеточных и молекулярных механизмов действия ртути позволило бы в большей мере переходить от симптоматической терапии ртутного отравления, к патогенетической терапии, направленной на первичные звенья токсического действия ртути.

Изучение действия ртути на ионные токи через нейрональную плазматическую мембрану, на потенциал покоя (ПП) и потенциалы действия (ПД), как молекулярно-клеточные основы патогенеза, представляется достаточно актуальным.

В литературе активно обсуждаются клеточные, субклеточные и молекулярные механизмы действия ртути на нервные клетки – влияние на процессы активного и пассивного трансмембранного переноса ионов, активность ионных каналов [2-7] и ионных насосов [4-6,8] потенциал покоя (ПП) и потенциал действия (ПД), синаптические потенциалы и трансмембранные ионные токи, т.е. на основные электрофизиологические параметры функционального состояния нейронов [2,9-14]. ПП характеризует состояние нейрона и существенно определяет его деятельность: возбудимость, генерацию ПД, межнейронные взаимоотношения. Несмотря на обилие публикаций на эту тему, данных об изменениях параметров электрогенеза и трансмембранного переноса ионов под

влиянием ртути, например, в виде ее ацетата недостаточно. Это соединение является своего рода промежуточным между неорганическими и органическими формами ртути, оно обладает достаточно высокой липофильностью, и относительно низкой константой диссоциации, т.е. может встраиваться в плазматическую мембрану.

Изучение действия ацетата ртути на трансмембранный перенос ионов при внутриклеточном и внеклеточном приложении к нейрону помогло бы открыть неизвестные стороны механизма токсического действия ртути. В данной работе будет обращено внимание на возможные «повреждающие», токсические эффекты ртути на нейроны и их ионные каналы.

Цель

Используя экспериментальную модель нейронов моллюсков и технологию voltage-clamp, получить данные о динамике изменений биопотенциалов и ионных токов при вне- и внутриклеточном действии ацетата ртути в различных концентрациях.

Материалы и методы

Микроэлектродные исследования проведены на идентифицируемых (100–200 мкм) интактных нейронах педальных ганглиев изолированной ЦНС моллюска катушки роговой (*Planorbarius corneus*), обладающих фоновой импульсной активностью (ИА). Исходный внеклеточный физиологический раствор, имел концентрацию ацетата ртути (АР) 1000 мкМ, из которого путем разбавления получали растворы с содержанием АР 100 мкМ, 10 мкМ, 1 мкМ и 0,1 мкМ.

Кольцо ганглиев моллюска помещали в камеру с физиологическим раствором состава (в мМ) – NaCl – 50; KCl – 2; CaCl₂ – 4; MgCl₂ – 1,5; трис-ОН – 10; pH 7,5. Для регистрации электрофизиологических характеристик нейронов использовали стеклянные микроэлектроды (МЭ), заполненные 2,5 М KCl, с сопротивлением 10 – 20 МОм [1, 2].

Эксперименты проведены на 7 экземплярах ЦНС и на 9 нейронах, при этом зарегистрирована электрическая активность и ее изменения при действии ацетата ртути. Оценивали динамику изменений ПП, импульсной активности и параметров ПД.

При изучении влияния ацетата ртути на трансмембранные ионные токи применяли метод внутриклеточного диализа изолированных нейронов и фиксации мембранного потенциала [15, 16].

Другая серия экспериментов выполнена на изолированных нейронах, выделенных из кольца нервных ганглиев. Выделение производили известным методом трипсинизации и механической изоляции нейронов [15, 16]. Для этого кольцо ганглиев помещали на 40 –

45 мин. в 0,25 % раствор трипсина и проназы (1:1) с последующей механической дезагрегацией материала острыми иглами под микроскопом.

Изолированную клетку помещали на полиэтиленовую «пипетку–присоску» [15,16]. Создавая резкие толчки отрицательного гидростатического давления, разрушали мембрана нейрона и формировали пору. При этом образовывался электрический контакт неполяризуемого электрода, соединенного с усилителем фиксации потенциала, с внутриклеточным содержимым. Перфузирующий (наружный) раствор, в который добавляли ацетат ртути, подавался в камеру, где находился нейрон на полиэтиленовой «пипетке-присоске», диализирующий (внутриклеточный), в который также иногда добавляли ацетат ртути, – внутрь этой пипетки.

Биопотенциалы регистрировали с помощью аналого-цифрового преобразователя (АЦП) фирмы «L-Card» L-791 (Россия), ионные токи с помощью АЦП-ЦАП и компьютерной программы «Clamp», разработанной для этой цели.

Статистическую обработку изменений параметров электрической активности нейронов проводили с помощью фрагмента программы Bioactivity Recorder v5.32b [17], встроенной в программу для обслуживания АЦП L-791, а амплитуд ионных токов – с помощью статистической программы R [18]. Использован непараметрический тест Фридмана для связанных выборок. Post-hoc анализ проведен в виде парных сравнений полученных измерений с исходной точкой (нормой) с помощью непараметрического теста Уилкоксона для связанных выборок с поправкой FDR на множественность сравнений.

Результаты и обсуждение

Первая часть настоящей работы была выполнена на нейронах изолированной ЦНС пресноводного моллюска (*Planorbarius corneus*) – катушки. В контроле ПП нейронов составлял $-56,4 \pm 2,9$ мВ ($n = 9$). Нейроны обладали выраженной спонтанной ИА.

При исследовании электрической активности нейронов правого pedalного ганглия (ППед1) ацетат ртути при концентрациях 0,1 мкМ вызывал незначительную деполяризацию, на 1 – 2 мВ, усиливающуюся с возрастанием концентрации АР. При концентрации АР 1000 мкМ наступала необратимая деполяризация до -35 – -40 мВ (Рисунок 1, А). Деполяризация сопровождалась увеличением частоты импульсов, снижением амплитуды ПД, вплоть до прекращения генерации (Рисунок 1, Б). Эти изменения параметров электрической активности нейронов под влиянием ацетата ртути наступали в течение 3 – 5 мин и были трудно обратимы.

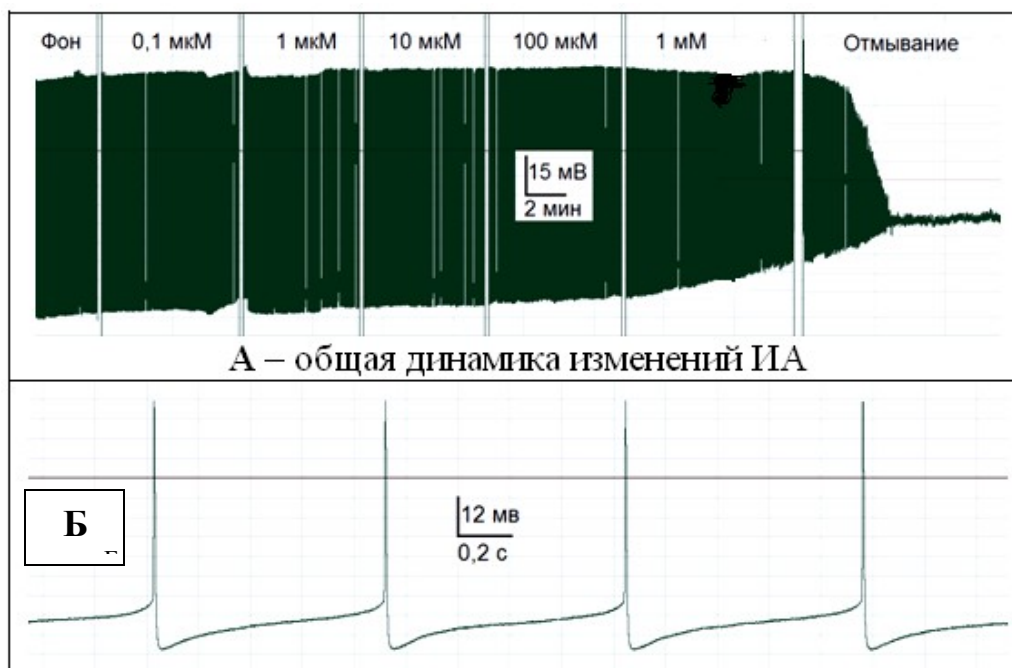


Рисунок 1 – Изменения импульсной активности нейрона ППед 1 под влиянием ацетата ртути в различных концентрациях. А – характер изменений ИА (отмечены моменты смены растворов). Б – ИА и ПД нейрона до действия ацетата ртути.

В таблице 2 представлены результаты статистической обработки межимпульсных интервалов нейрона под влиянием ацетата ртути в различных концентрациях. Снижение частоты ПД при действии ацетата ртути наступает при концентрации АР 1 мкМ и в дальнейшем изменяется мало, несмотря на увеличение концентрации АР, вплоть до финальной концентрации 1000 мкМ, сопровождающейся необратимыми изменениями потенциалов.

Таблица 1 – Изменения параметров ИА нейрона ППед 1, под влиянием АР в различных концентрациях.

Параметры	Норма	Концентрация ацетат ртути (мкМ)				
		0,1	1	10	100	1000
		%				
Средняя частота в % от нормы – 100±47,0 имп/с	100 %	125±32	80,2±48,8	99,6±50,5	167±30,4	189±54,0
Общее число ПД (n)	122	262	169	215	419	457
Примечание – данные соответствуют рисунку 1.						

Характер изменений в распределении межимпульсных интервалов активности нейрона под влиянием ацетата ртути в различных концентрациях, по сравнению с фоном,

представлен на гистограммах (Рисунок 2). При действии ацетата ртути в концентрациях 0,1 мкМ; 100 мкМ и 1000 мкМ наблюдается смещение распределения интервалов ИА влево, в сторону уменьшения их длительности, увеличения частоты.

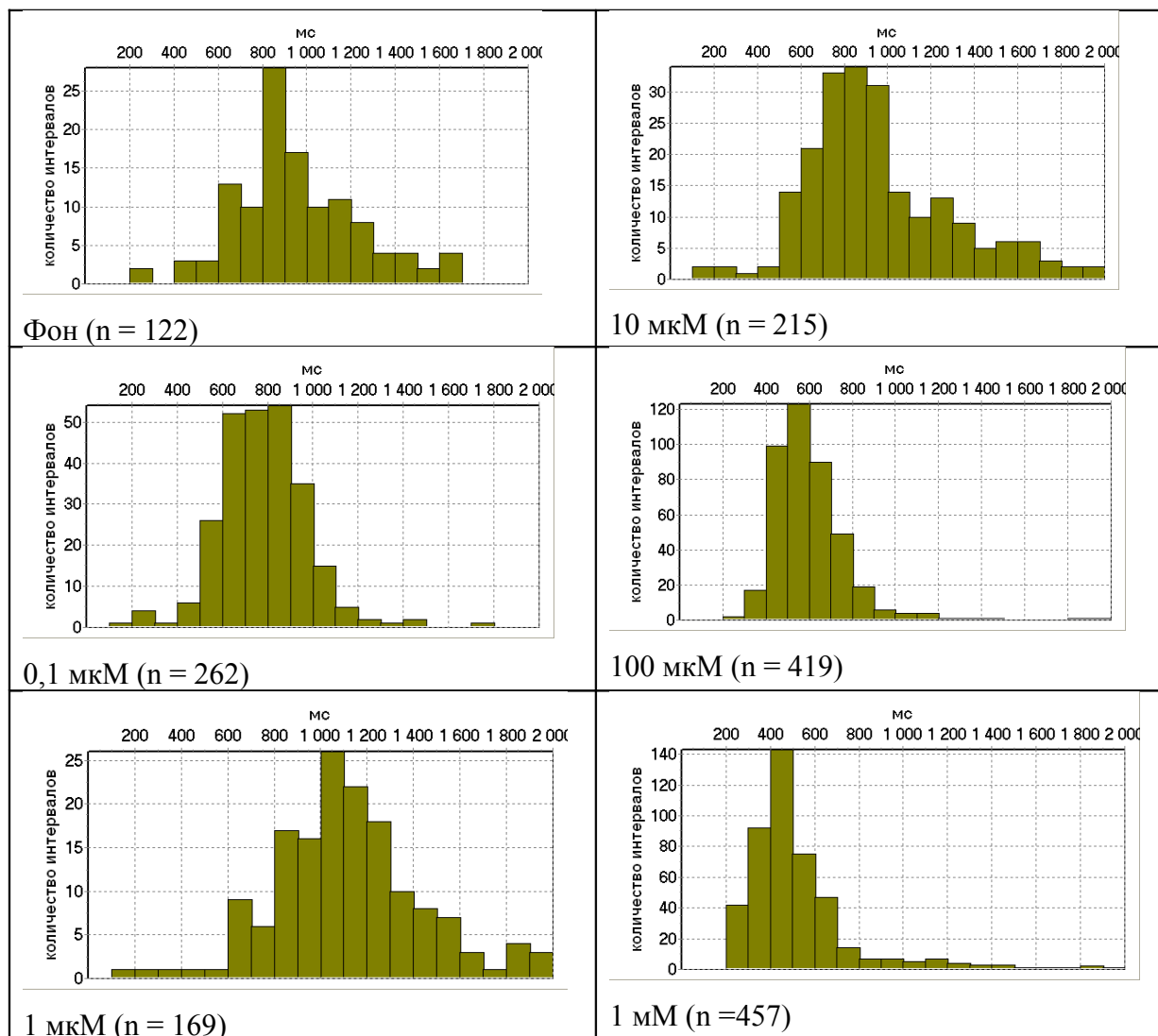


Рисунок 2 – Гистограммы распределения межимпульсных интервалов ИА нейрона

ППед1. Соответствует рисунку 1.

Представленные данные об изменениях импульсной активности нейронов являются типичными. Установленные закономерности изменения ПП, ПД и МИ были зарегистрированы и в остальных случаях. Под влиянием АР усиливалась деполяризация нейронов, наступало увеличение частоты межимпульсных интервалов, происходило необратимое прекращение генерации ПД, которая ИА в течение 15 – 20 мин. после удаления АР из омывающего нейрон раствора не восстанавливалась, т.е. действие было практически необратимым.

Более длительное, до 60 мин., приложение АР в тех же концентрациях к нейрону ППед1 в другом эксперименте не обнаружило принципиальных отличий в ИА. На Рисунке 3 показаны результаты одного из таких экспериментов.

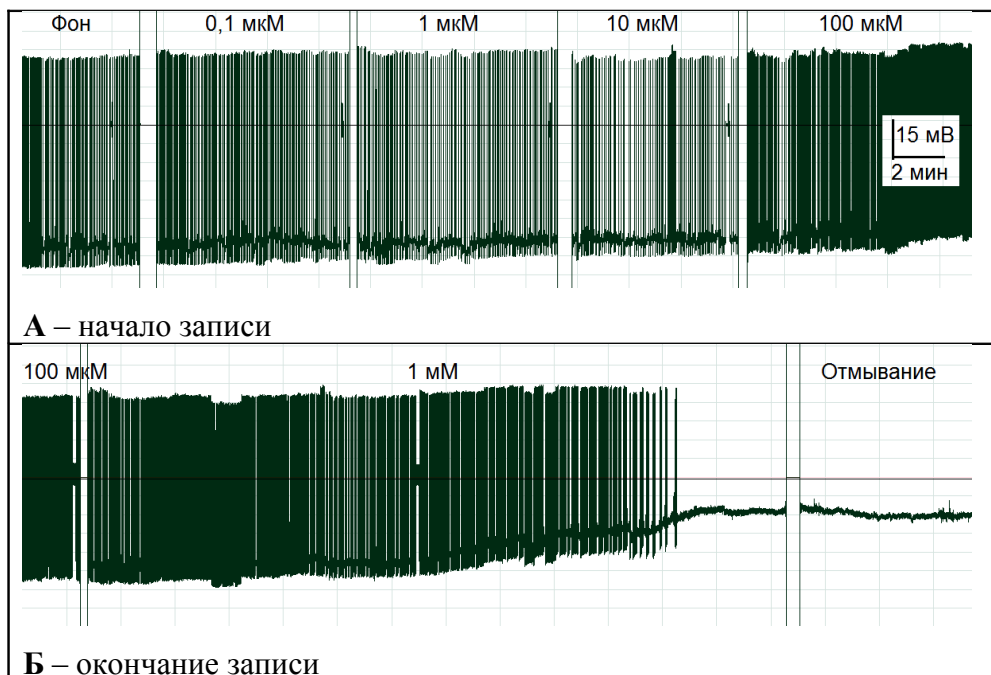


Рисунок 3 – Динамика изменений ИА нейрона ППед1 при продолжительном воздействии АР в различных концентрациях. **А** – общий характер изменений ИА (вертикальные отметка – моменты смены растворов), начало записи. **Б** – окончание записи, прекращение ИА нейрона.

В таблице 2 приведены результаты статистической обработки ИА этого эксперимента.

Таблица 2 – Изменения параметров ИА нейрона ППед1, представленной на рисунке 3 под влиянием длительного приложения АР в различных концентрациях.

Параметры	Норма	Концентрация ацетат ртути (мкМ)			
		0,1	1	10	100
		%			
Средняя частота в % от нормы – $100 \pm 40,2$ имп/с	100 %	$97,6 \pm 38,8$	$71,4 \pm 36,6$	$70,4 \pm 54,6$	$355 \pm 26,4$
Общее число ПД (n)	92	89	64	64	252
Примечание – данные соответствуют рисунку 3.					

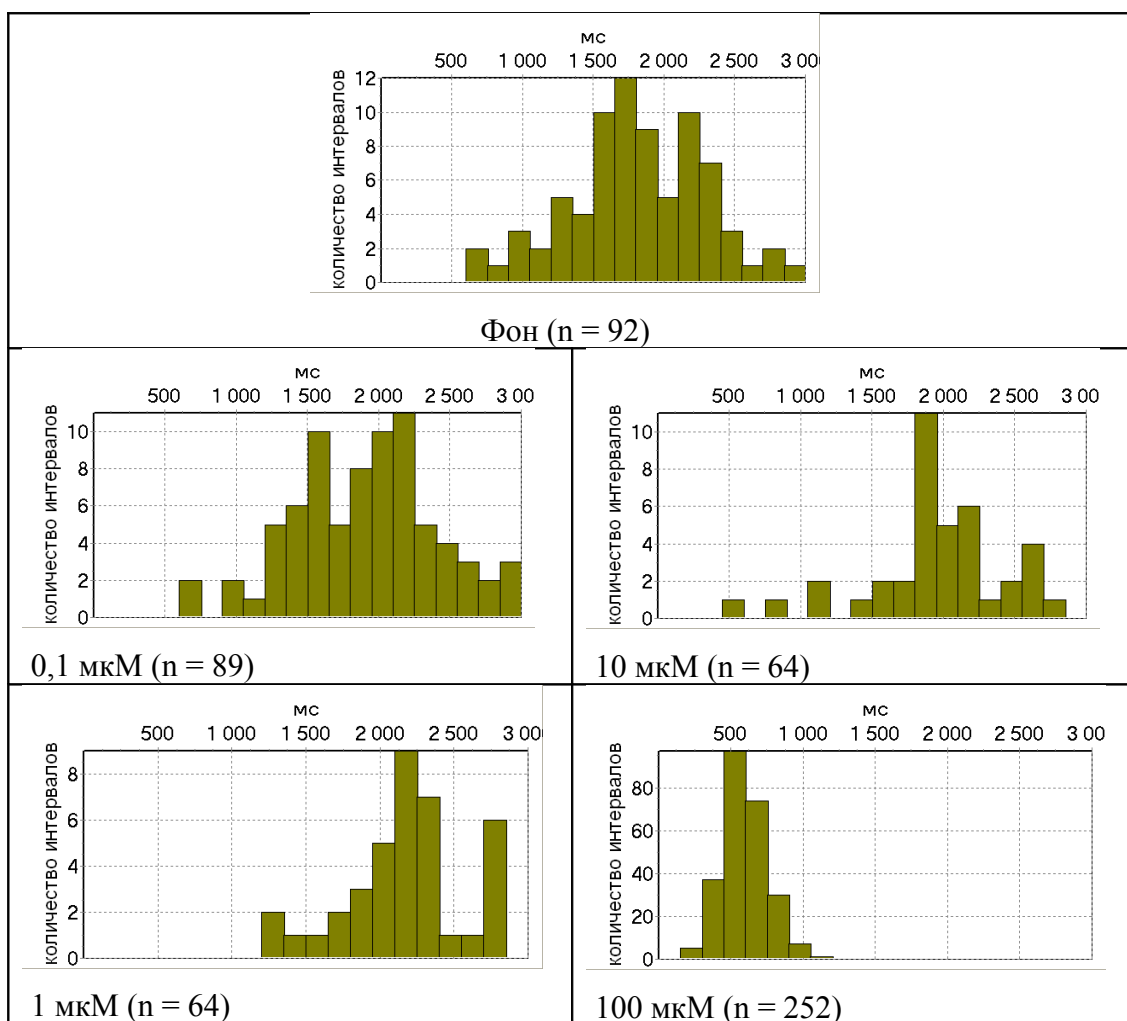


Рисунок 4 – Гистограммы распределения межимпульсных интервалов ИА нейрона ППед1. Соответствует рисунку 3.

Подобный пример реакций еще одного нейрона ППед1 представлен на Рисунке 3, регистрация ИА осуществлялась более 60 мин. При мало изменяющемся уровне ПП в диапазоне концентраций ацетата ртути от 0,1 мкМ до 100 мкМ наблюдалось небольшое снижение частоты ПД и их амплитуды. И только под влиянием ацетата ртути в концентрациях 100 мкМ и 1000 мкМ усиливалась деполяризация нейрона, происходило необратимое прекращение генерации ПД, которое в течение 15 – 20 мин. не восстанавливалось. Следует отметить, что после действия на ЦНС моллюска ацетата ртути в концентрации 1000 мкМ все нейроны оказывались необратимо поврежденными и их ПП составлял всего -35 – -40 мВ. Обработка результатов записи активности этого нейрона показала, что под влиянием ацетата ртути в концентрациях 0,1 – 10 мкМ происходило снижение частоты генерации ПД (Таблица 2). Гистограммы распределения межимпульсных интервалов ИА позволяет утверждать, что увеличение частоты ПД под влиянием АР было начиная с концентрации 100 мкМ (Рисунок 4).

Аналогичные по задаче эксперименты с регистрацией ионных токов технологией voltage-clamp были выполнены на изолированных нейронах другого пресноводного моллюска – прудовика (*Limnaea stagnalis*), при этом реакции интактных и изолированных нейронов на АР были качественно одинаковыми. Под влиянием АР в концентрации 0,1 мкМ начиналось уменьшение амплитуд суммарных входящих натрий-кальциевых и выходящих калиевых токов. С ростом концентрации АР эффекты усиливались. Уменьшение амплитуд токов было необратимым при действии ртути во всех использованных концентрациях. Относительные изменения всех токов были примерно одинаковыми, избирательности действия на те или иные ионные каналы в нейронах не проявлялось. Под влиянием АР в концентрации 1 мМ ионная проводимость мембраны исчезала полностью, т.е. проводимость, как потенциалуправляемых ионных каналов, обеспечивающих генерацию ПД нейронов, так и каналов неспецифической проводимости мембраны, участвующих в поддержании ПП. Изменения ионных токов начинались быстро, уже в первую минуту действия ацетата ртути, т.е. существенно быстрее, чем при действии на интактные нейроны изолированной ЦНС при регистрации биопотенциалов. При этом и эффективные концентрации подавления токов были меньшими, чем подавления потенциалов.

Иллюстрацией ингибирующего действия АР на ионные токи изолированных нейронов может служить данные Рисунков 5 и 6. С увеличением концентраций АР в омывающем нервную клетку растворе входящие и выходящие токи достоверно снижаются.

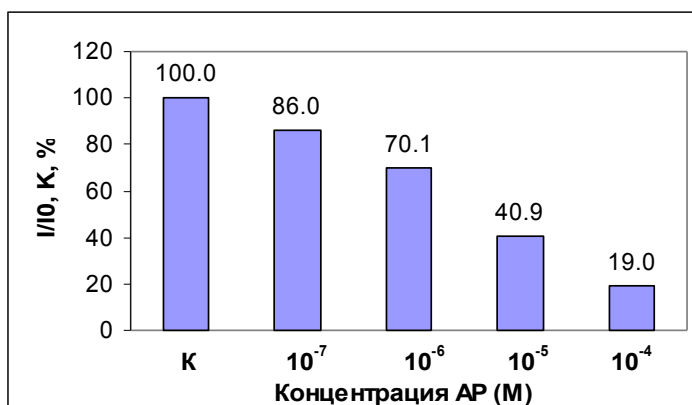


Рисунок 5 – Концентрационная зависимость величины выходящих калиевых медленных ионных токов при действии ацетата ртути. I – токи при действии АР, I₀ – в норме.

Количество измерений, n = 8.

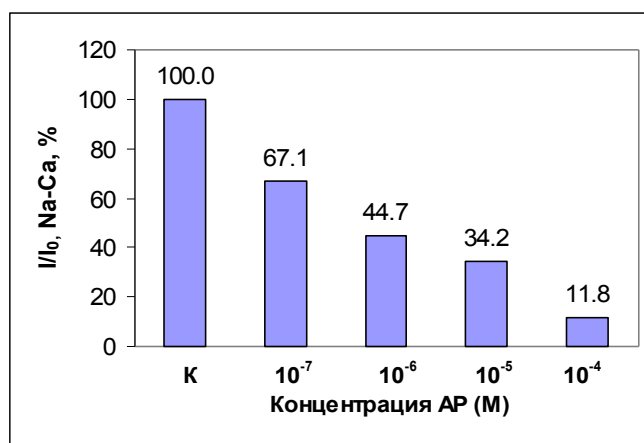


Рисунок 6 – Концентрационная зависимость величины ионных входящих натрий-кальциевых токов при действии ацетата ртути. I – токи при действии AP, I₀ – в норме.

Количество измерений, n = 8.

Сопоставление данных Рисунков 5 и 6 свидетельствует о том, что при всех использованных концентрациях AP входящие токи подавляются в большей мере, чем выходящие. По-видимому, это следствие неспецифического увеличения проводимости нейрональной мембраны при воздействии на нее AP.

Примеры изменений амплитуд и кинетики ионных токов представлены на Рисунке 7 и 8. Отчетливо видна зависимость подавления амплитуд всех токов от используемой концентрации AP. По сравнению с контролем амплитуда входящих натрий-кальциевых токов и выходящих калиевых токов прогрессивно снижалась по мере увеличения используемой концентрации. Необычный пример изменения выходящих калиевых токов под влиянием ацетата ртути показан на Рисунке 8. Под влиянием AP в концентрации 0,1 мкМ и 1 мкМ происходит линейное уменьшение величины тока (кривые 2 и 3 по сравнению с 1 – контролем), но при концентрации AP 100 мкМ наблюдается скачок входящего тока (кривая 5), напоминающий «пробой» мембраны. Это новый, неожиданный факт поведения калиевого тока, требующий своего дальнейшего изучения. При последующем увеличении концентрации AP (1000 мкМ), линейность восстанавливается, ацетат ртути полностью подавляет ионные токи (кривая 6 и кривая 7 – необратимое подавление тока при отмывании).

В заключительной серии экспериментов на изолированных нейронах ацетат ртути в концентрации 100 мкМ, при которой снаружи ионные токи подавлялись почти полностью, AP подавали внутрь нейрона с диализирующим раствором (на внутреннюю сторону мембраны).

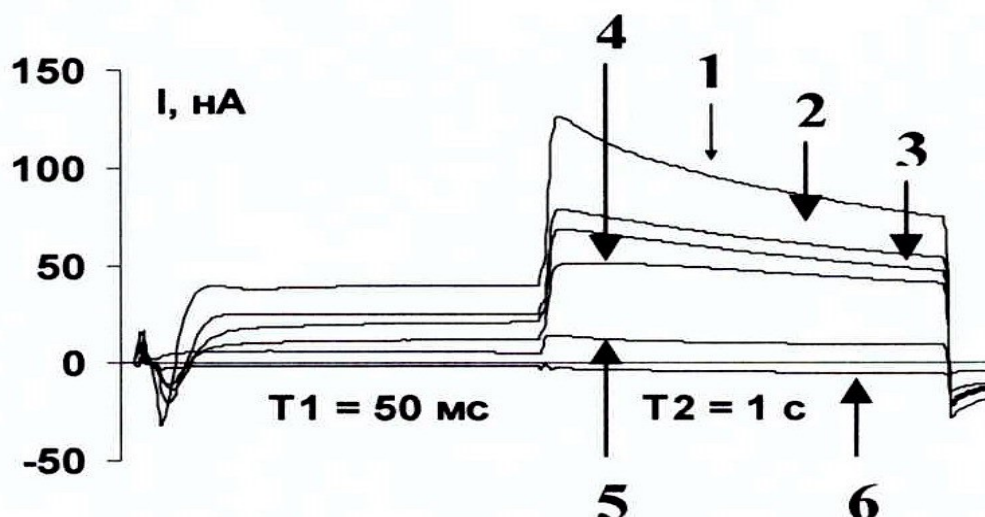


Рисунок 7 – Примеры изменений амплитуд и кинетики развития входящих натрий-кальциевых под влиянием ацетата ртути в различных концентрациях.

1 – контроль, 2 – ацетат ртути 0,1 мкМ, 3 – 1 мкМ, 4 – 10 мкМ, 5 – 100 мкМ, 6 – 1 мМ. По оси абсцисс – время; по оси ординат – ионные токи. Поддерживаемый потенциал – -90 мВ, тестирующие: 1-я ступенька (T1) – 0 мВ, 2-я (T2) – 30 мВ.

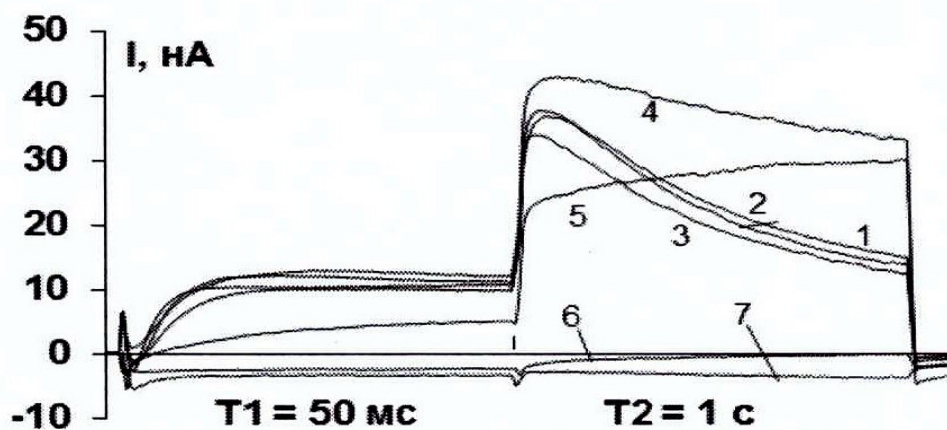


Рисунок 8 – Пример изменения амплитуд и кинетики развития выходящих калиевых ионных токов под влиянием ацетата ртути в различных концентрациях.

1 – контроль, 2 – ацетат ртути 0,1 мкМ, 3 – 1 мкМ, 4 – 10 мкМ, 5 – 100 мкМ, 6 – 1 мМ, 7 – отмывание. По оси абсцисс – время; по оси ординат – ионные токи. Поддерживаемый потенциал – -90 мВ, тестирующие: 1-я ступенька (T1) – 0 мВ, 2-я (T2) – 30 мВ.

Оказалось, что при этом он не оказывал своего подавляющего действия на ионные токи, что указывает на внеклеточную локализацию мест связывания ртути на нейрональной мембране. Отмывание ацетата ртути с наружной и внутренней сторон мембраны нейронов также не приводило к восстановлению ионных токов.

В целом полученные результаты согласуются с известными из литературы фактами как по эффектам прямого воздействия на нервные клетки, так и по диапазону эффективных концентраций ионов ртути. Однако неэффективность подавления ионных токов ацетатом ртути при внутриклеточном приложении к внутренней стороне мембраны нейронов, по сравнению с его эффективностью при внеклеточном действии, на наш взгляд, является принципиально новым важным фактом. Это означает, что мишеней для ртути на внутренней стороне мембраны нейронов нет или они недоступны. В литературе подобных фактов для ионов ртути мы не обнаружили, так же как нелинейного подавления калиевого тока.

Наряду с этим в литературе немало работ, где было показано подавляющее действие ионов ртути на кальциевые токи нейронов моллюска – $EC_{50} = 5 - 50$ мкМ, а на нейронах крыс – $1 - 2$ мкМ [15]. На клетках почек человека также показано блокирование кальциевых каналов [9,13,14] ионами ртути (EC_{50} около 1 мкМ), но наряду с этим в концентрациях около 10 нМ показано и увеличение токов [13]. Показано блокирование калиевых [10] и натриевых токов [11,19], обсуждается участие субъединиц натриевых каналов в связывании ртути [20]. Имеются предположения о возможных других молекулярных механизмах взаимодействия ионов ртути с SH-группами белков [21], об их прочном связывании и нарушении, вследствие этого, нормальных клеточных функций.

Исследования влияния ртути и ее соединений на организм, в том числе на клеточно-молекулярном уровне, продолжаются, уточняются молекулярные механизмы и места связывания в клетке. Лиганд-зависимые ионные каналы, глициновые рецепторы, нейрональные никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, рецепторы NMDA и глутамата, а также потенциалозависимые ионные каналы (кальциевые, калиевые и натриевые) рассматриваются, как реальные молекулярные мишени [3,5–10,12–14, 20] для различных соединений ртути, подавляющих амплитуды потенциалов и ионные токи. Блокада пресинаптических ПД, связанных с Na^{+} - и Ca^{2+} - каналами, приводит к уменьшению выброса нейромедиаторов и развитию нервных заболеваний [1,3,19].

Деполаризация клеток может объясняться подавлением электрогенной части в работе натрий-калиевого насоса [4,8,22] и изменениями пассивной проницаемости клеточных мембран к ионам натрия и калия, в особенности, в концентрациях более

10 мкМ. Снижение частоты ИА клеток, вероятно, обусловлено снижением их возбудимости вследствие блокирования части каналов входящего тока для ионов натрия и кальция. Увеличение частоты ИА при деполяризации связаны преимущественно с повышением возбудимости нейронов, со снижением критического уровня деполяризации для возникновения ПД.

Подавление амплитуд ионных токов может происходить как из-за непосредственного блокирования ионных каналов для соответствующих ионов (натрия, кальция и калия), так возможной деформации белково-липидной матрицы в результате встраивания в нее АР.

Быстрое наступление эффектов подавления ионных токов изолированных нейронов ацетатом ртути, по сравнению с замедленными реакциями интактных нейронов изолированной ЦНС катушки, можно объяснить большей доступностью молекулярных структур мембраны изолированных нейронов. Интактные нейроны в ЦНС окружены соединительно-тканными оболочками и глиальными клетками, которые, вероятно, частично связывают ионы ртути и служат определенным барьером при их достижении молекулярных структур нейрональной мембраны.

На основании результатов настоящей работы и учитывая данные литературы, можно говорить о множественном электрофизиологическом действии ацетата ртути на нейроны: деполяризация клеток, подавление ионных насосов и токов (блокирование ионных каналов), снижение эффективности синаптических взаимодействий, предельное снижение проводимости. В совокупности эти эффекты способствуют снижению возбудимости нейронов, подавлению активности нейронных сетей, нарушению их деятельности. Вследствие прочного связывания с молекулярными структурами мембран, ртуть оказывает политропное токсическое действие. Наряду с этим отмечено некоторые активирующие эффекты малых (наномолярных) концентраций соединений ртути [11,23], что представляет определенный фармакологический интерес и может быть перспективно для будущих исследований. Представляет определенный интерес поиск паллиативных средств, снижающих токсическое действие солей ртути, например, среди серосодержащих соединений [21, 23].

Спектр эффектов, наблюдаемых при действии ацетата ртути на нейроны, свидетельствует о низкой избирательности механизмов действия этого токсиканта. По-видимому, имеет место полимодальное взаимодействие ртути с лигандами различных функциональных групп, задействованных в активном и пассивном трансмембранном переносе ионов. Концентрационные зависимости наблюдаемых изменений ионных токов и потенциалов свидетельствуют о том, что ртуть с увеличением ее концентрации

взаимодействует с различными функциональными группами. В связи с этим и независимо от открытия новых эффектов воздействия ртути на те, или иные клеточные, субклеточные или молекулярные процессы трудно рассчитывать на избирательную патогенетическую терапию отравлений ртутью.

Выводы

1. Ацетат ртути дозозависимо изменяет электрическую активность нейронов моллюсков. В концентрации 0,1 – 10 мкМ, на фоне незначительной, на 1 – 2% деполяризации нейрональной мембраны возрастает или снижается частота ИА, при этом параметры ПД изменяются незначительно.

2. Ацетат ртути в концентрациях 10 мкМ – 1000 мкМ необратимо деполяризует нейрональную мембрану до -35 – -40 мВ, при этом возрастает частота импульсной активности, снижается амплитуда ПД, возрастает их длительность, вплоть до полного подавления генерации ПД.

3. Ацетат ртути в концентрациях от 0,1 мкМ до 1000 мкМ необратимо подавляет входящие натрий-кальциевые и выходящие калиевые ионные токи.

4. Ацетат ртути вплоть до концентрации 100 мкМ подавляет ионные токи только при внеклеточном приложении (с наружной стороны мембраны) и неэффективен при внутриклеточном приложении (с внутренней стороны).

Литература

1. Yuan Y. Methylmercury: a potential environmental risk factor contributing to epileptogenesis // *Neurotoxicology*. – 2012. – Vol. 33 (1). – P. 119–126.
2. Atchison W.D. Effects of toxic environmental contaminants on voltagegated calcium channel function: from past to present // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2003. – Vol. 35. – P. 507–532.
3. Castoldi A.F., Coccini T., Ceccatelli S., Manzo L. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury // *Brain Res, Bull.* – 2001. – Vol. 55 (2). – P. 197–203.
4. Huang C.F., Hsu C.J., Liu S.H., Lin-Shiau S.Y. Neurotoxicological mechanism of methylmercury induced by low-dose and long-term exposure in mice: oxidative stress and down-regulated Na⁺/K⁺-ATPase involved // *Toxicol. Lett.* – 2008. – Vol. 176 (3). – P. 188–197.

5. Pekel M., Platt B., Busselberg D. Mercury (Hg^{2+}) decreases voltage-gated calcium channel currents in rat DRG and *Aplysia* neurons // Brain Res. – 1993. – Vol. 632. – P. 121–126.
6. Peng S., Hajela R.K., Atchison W.D. Effects of methylmercury on human neuronal L-type calcium channels transiently expressed in human embryonic kidney cells (HEK-293) // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2002. – Vol. 302. – P. 424–432.
7. Yuan Y., Atchison W.D. Methylmercury induces a spontaneous, transient slow inward chloride current in Purkinje cells of rat cerebellar slices // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2005. – Vol. 313. – P. 751–764.
8. Magour S., Maser H., Greim H. The effect of mercury chloride and methyl mercury on brain microsomal Na-K-ATPase after partial delipidisation with Lubrol // Pharmacol. Toxicol. – 1987. – Vol. 60. – P. 184–186.
9. Huang C.F., Hsu C.J., Liu S.H., Lin-Shiau S.Y. Neurotoxicological mechanism of methylmercury induced by low-dose and long-term exposure in mice: oxidative stress and down-regulated Na^+/K^+ -ATPase involved // Toxicol. Lett. – 2008. – Vol. 176 (3). – P. 188–197.
10. Liang G.H., Jarlebark L., Ulfendahl M., Moore E.J. Mercury (Hg^{2+}) suppression of potassium currents of outer hair cells // Neurotoxicol. Teratol. – 2003. – Vol. 25. – P. 349–359.
11. Shafer T.J., Meacham C.A., Barone S.Jr. Effects of prolonged exposure to nanomolar concentrations of methylmercury on voltage-sensitive sodium and calcium currents in PC12 cells // Brain Res. Dev. Brain Res. – 2002. – Vol. 136. – P. 151–164.
12. Sirois J.E., Atchison W.D. Methylmercury affects multiple subtypes of calcium channels in rat cerebellar granule cells // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2000. – Vol. 167. – P. 1–11.
13. Tarabová B., Kurejová M., Sulová Z. et al. Inorganic mercury and methylmercury inhibit the Cav3.1 channel expressed in human embryonic kidney 293 cells by different mechanisms // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2006. – Vol. 317 (1). – P. 418–427.
14. Yin X., Sun J.Z., Mei Y. et al. Effect of Hg^{2+} on voltage-dependent calcium channels and intracellular free calcium in trigeminal ganglion neurons of rats // Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi. – 2008. – Vol. 26 (9). – P. 542–545.
15. Вислобоков А.И., Игнатов Ю.Д., Галенко-Ярошевский П.А., и др. Мембранотропное действие фармакологических средств. – Санкт-Петербург – Краснодар: Просвещение-Юг. – 2010. – 528 с.

16. Вислобоков А.И., Шабанов П.Д. Клеточные и молекулярные механизмы действия лекарств. – Серия: Цитофармакология. Т. 2. – СПб.: Информ-Навигатор, 2014. – 624 с.
17. Толкунов Ю.А., Сибаров Д.А., Фролов Д.С. Активность первичных афферентных нейронов тонкой кишки при действии гистамина модулируется дефенсином HNP-1 // Сенсорн. сист. – 2009. – Т. 23, №1. – С.79–86.
18. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. – 2014. URL <http://www.R-project.org/>.
19. Shafer T.J. Methylmercury effects on ion channels and electrical activity in neurons: future directions // Cell. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 46 (4). – P. 855–864.
20. Hisatome I., Kurata Y., Sasaki N. et al. Block of sodium channels by divalent mercury: role of specific cysteinyl residues in the P-loop region // Biophys. J. – 2000. – Vol. 79 (3). – P. 1336–1345.
21. Divine K.K., Ayala-Fierro F., Barber D.S., Carter D.E. Glutathione, albumin, cysteine, and cys-gly effects on toxicity and accumulation of mercuric chloride in LLC-PK1 cells // J. Toxicol. Environ. Health A. – 1999. – Vol. 57 (7). – P. 489–505.
22. Скульский И.А., Малов А.М., Глазунов В.В. Обнаружение перехода от электрогенного к электронейтральному режиму в работе Na/K-насоса нейронов моллюска *Planorbarius corneus* при понижении температуры. Доклады АН СССР 1976, 231, № 4 СС. 1014 -1017.
23. Kamath S.U., Pemiah B., Sekar R.K. et al. Mercury-based traditional herbo-metallic preparations: a toxicological perspective // Arch. Toxicol. – 2012. – Vol. 86 (6). – P. 831–838.

Авторы

Вислобоков Анатолий Иванович – зав. отделом нейрофармакологии, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Институт фармакологии им. А.В. Вальдмана ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова Минздрава РФ»; 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8. Тел. (812) 499-71-02, e-mail: vislobokov@yandex.ru

Малов Александр Михайлович – старший научный сотрудник, ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1 Тел. (812) 365-06-80, e-mail: malexmish@rambler.ru

Орлов Валерий Иванович – старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт нейрокибернетики им. А.Б. Когана Академии биологии и биотехнологии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия; 344090, Россия, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/1, НИИ нейрокибернетики ЮФУ. Тел. 8(863) 243-32-67; E-mail: orlov@rostel.ru.