

ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ И ИОННЫХ ТОКОВ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА ПОД ВЛИЯНИЕМ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА И АЦЕТОНА

УДК 615.216.2:577.3:612.822.3

© А. И. Вислобоков^{1,2}, К. Н. Мельников¹, И. Н. Тюренков³, П. Д. Шабанов²¹ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» МЗ РФ;²ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург;³ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Волгоград

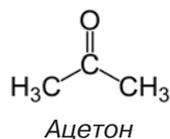
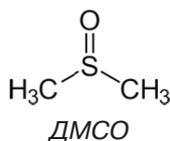
Ключевые слова:

ацетон; диметилсульфоксид; *Planorbarius corneus*; потенциал покоя; потенциал действия; импульсная активность.

Резюме

В микроэлектродных исследованиях и в методике фиксации потенциала показано, что диметилсульфоксид (ДМСО) и диметилкетон (ацетон) в концентрациях до 100 мМ при внеклеточном применении не изменяли электрическую активность идентифицируемых нейронов педальных ганглиев моллюска *Planorbarius corneus*. ДМСО в концентрациях 500 и 1000 мМ (4 и 8 % растворы), а ацетон в меньших концентрациях (от 200 мМ — 1,2 % и выше) деполяризовали нейроны и на этом фоне возрастала частота и длительность потенциалов действия, снижалась их амплитуда и суммарные ионные токи (dV/dt). Изменения были полностью обратимы, при отмывании наблюдалась гиперполяризация клеток, обусловленная, вероятно, активацией электрогенного переноса ионов натрия. Предполагается, что при действии ДМСО и ацетона изменения состояния нейронов вызваны не только изменениями потенциала покоя, но и прямым влиянием на ионные каналы. Под влиянием ацетона снижение амплитуд потенциалов действия нейронов в большей степени происходит вследствие деполяризации и в меньшей — из-за его влияния на ионные каналы. Сделаны выводы об относительной безопасности для биологических объектов ацетона и ДМСО до концентраций 100–200 мМ при их использовании для растворения фармакологических средств.

Диметилсульфоксид (ДМСО) и диметилкетон (ацетон) — биполярные апротонные растворители, имеющие внешнее структурное сходство молекул.



Они имеют широкое применение в быту, различных областях химии, а также в медицине (ДМСО) или растворителей труднорастворимых фармакологических веществ [7, 9, 12, 13]. Но всегда возникает вопрос: а не оказывают ли они неблагоприятного воздействия на биологические объекты, а если оказывают, то в каких концентрациях? В литературе можно встретить сведения о том, что использование ДМСО в растворах безопасно вплоть до 5–10 % по объему (600–1200 мМ), а ацетона — до 0,1–0,25 % (16,7–41,7 мМ). Ацетон является естественным метаболитом организма человека и животных. В нормальных условиях его содержание в сыворотке крови человека не превышает 6 мг/л (0,1 мМ). Токсическая концентрация в крови — 200–300 мг/л (3,3–5,2 мМ), смертельная — 550 мг/л (9,5 мМ) [7].

В связи с тем, что конкретных сведений об изменениях электрофизиологических параметров функционального состояния нейронов под влиянием ДМСО и ацетона в литературе мы не обнаружили, то представляется актуальным изучение влияния ДМСО и ацетона в концентрациях 100–1000 мМ на электрическую активность нейронов, что и явилось целью данного исследования.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроэлектродные исследования выполнены на наиболее крупных идентифицируемых (100–200 мкм) нейронах педальных и висцерально-ганглиев изолированной ЦНС моллюска катушки роговой (*Planorbarius corneus*). Нейроны в ганглиях данного моллюска пигментированы и лучше видны под бинокулярной лупой, чем нейроны прудовика или виноградной улитки. Из тела моллюска вырезали кольцо ганглиев и помещали в камеру объемом около 0,5 см³ с физиологическим раствором (в мМ/л): NaCl — 50; KCl — 2; CaCl₂ — 4; MgCl₂ — 1,5; трис-ОН — 10; pH — 7,5. Для регистрации электрофизиологических характеристик нейронов использовали стеклянные МЭ, заполненные 2,5 М KCl, с сопротивлением 10–20 МОм [1–4]. Измерения ионных токов при фиксации потенциала проведены на изолированных неидентифицированных нейронах с диаметром около 100 мкм.

ДМСО и ацетон растворяли в физиологическом растворе до концентраций 100, 200, 400, 500, 600, 800 и 1000 мМ. При внеклеточном приложении веществ изучали динамику изменений потенциала покоя (ПП), импульсной активности (ИА), параметров потенциалов действия (ПД) и суммарных ионных токов, оцениваемых по первой производной ПД. Биопотенциалы регистрировали с помощью аналого-цифрового преобразователя фирмы «L-Card» L-791 (Россия).

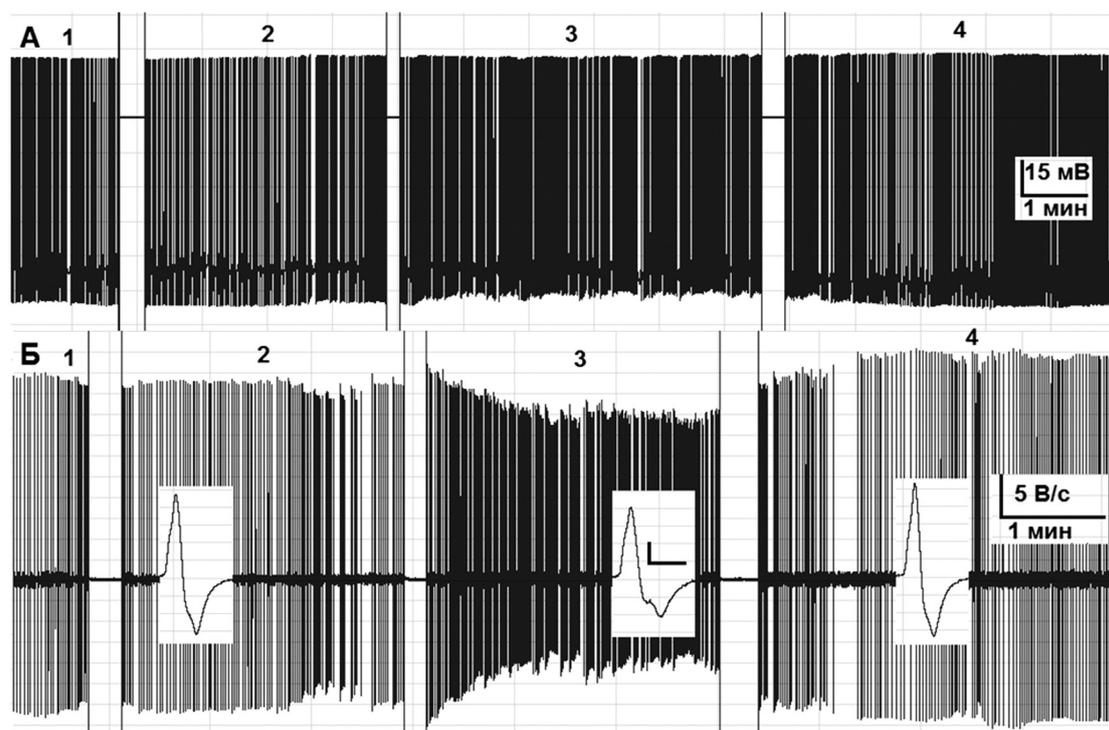
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходные величины ПП для разных нейронов катушки варьировали (среднее значение $55,2 \pm 5,9$ мВ; $n = 15$), они генерировали ПД с «овершутом» амплитудой от 50 до 90 мВ. Некоторые нейроны были молчаливыми, а также с различным характером ИА: регулярной или нерегулярной, одиночной либо пачечной. Большинство результатов получено на импульсноактивных (ИА) нейронах pedalных ганглиев.

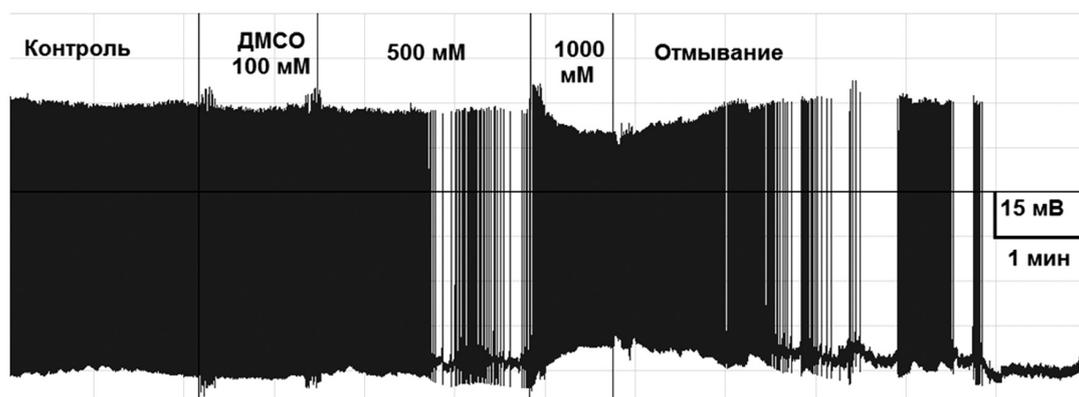
Под влиянием ДМСО и ацетона происходили зависимые от концентрации гипер- и деполяризационные изменения ПП с соответствующими изменениями ИА, параметров ПД и скоростей развития ПД (dV/dt , отражающих суммарные входящие и выходящие ионные токи). Эффекты от обоих веществ стабилизируются через 2–3 мин от начала действия, были обратимы и с гиперполяризующим последей-

ствием в течение 5–15 мин. На фоне незначительных изменений ПП перестройка ИА нейронов была разнообразной, что зависело от их типа, величины ПП (уровня функционального состояния), характера фоновой ИА и концентраций веществ.

На нейроне левого pedalного ганглия (ЛПед1) с пачечной активностью были зарегистрированы реакции на ДМСО в концентрации 500 мМ, амплитуда ПД нейрона не изменялась, но увеличивалась длительность генерации пачек ПД, а в концентрации 1000 мМ нейрон обратимо деполяризовался, перестраивался характер ИА — увеличивалась частота и снижалась амплитуда ПД (рис. 1, А, 3). При отмывании от ДМСО наблюдалась небольшая (до 5–7 мВ) гиперполяризация нейрона (рис. 1, А, 4). Повторное действие ДМСО на этом же нейроне было сходным. Регистрация суммарных ионных токов (dV/dt) показала, что их изменения более выражены (рис. 1, Б), чем изменения амплитуд ПД, и уменьшение амплитуд токов примерно на 10% было уже под влиянием ДМСО в концентрации 500 мМ (рис. 1, Б, 2) и оно усиливалось при действии ДМСО в концентрации 1000 мМ (рис. 2, Б, 3), доходя до 20–25%. На фоне увеличения частоты ИА длительность ПД возрастала (рис. 1, Б, 3 — врезка dV/dt). При отмывании амплитуда и длительность токов восстанавливались, амплитуда ПД превышала контрольные величины (рис. 1, Б, 4), а частота ИА на фоне гиперполяризации, как и в предыдущем эксперименте, снижалась до исходной.



■ Рисунок 1. Изменения электрической активности нейрона катушки левого pedalного ганглия (ЛПед1) под влиянием ДМСО в различных концентрациях. 1 — контроль, 2 — 500 мМ ДМСО, 3 — 1000 мМ, 4 — отмывание; А — изменения ПП, ИА и амплитуды ПД; Б — изменения суммарных ионных токов (dV/dt , вверх — входящие натрий-кальциевые, вниз — выходящие калиевые); перерывы в записях — уровень 0 мВ и начало смены растворов. Калибровка dV/dt на врезках (Б, 2–4): по вертикали — 5 В/с, по горизонтали — 5 мс

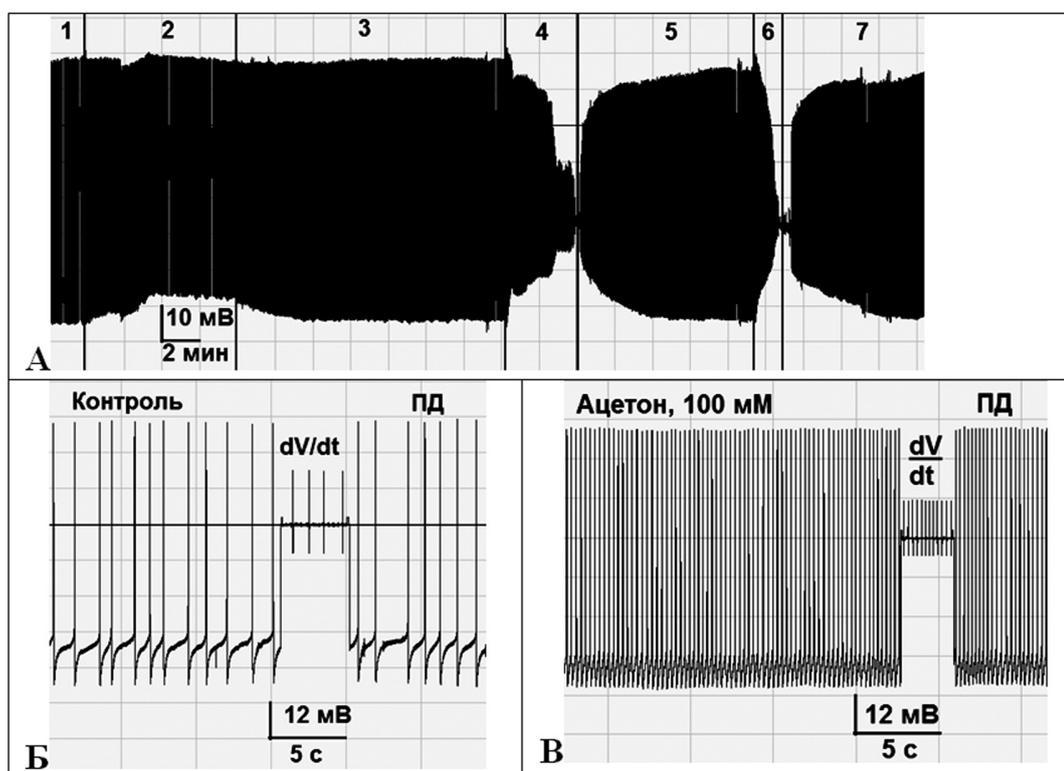


■ Рисунок 2. Изменения электрической активности нейронов катушки правого педаляного ганглия под влиянием ДМСО в различных концентрациях. Изменения ПП, ИА и амплитуды ПД; гиперполяризация нейрона после действия ДМСО в концентрации 1000 мМ; горизонтальная черта — уровень 0 мВ, вертикальные черточки на записях — начало смены растворов

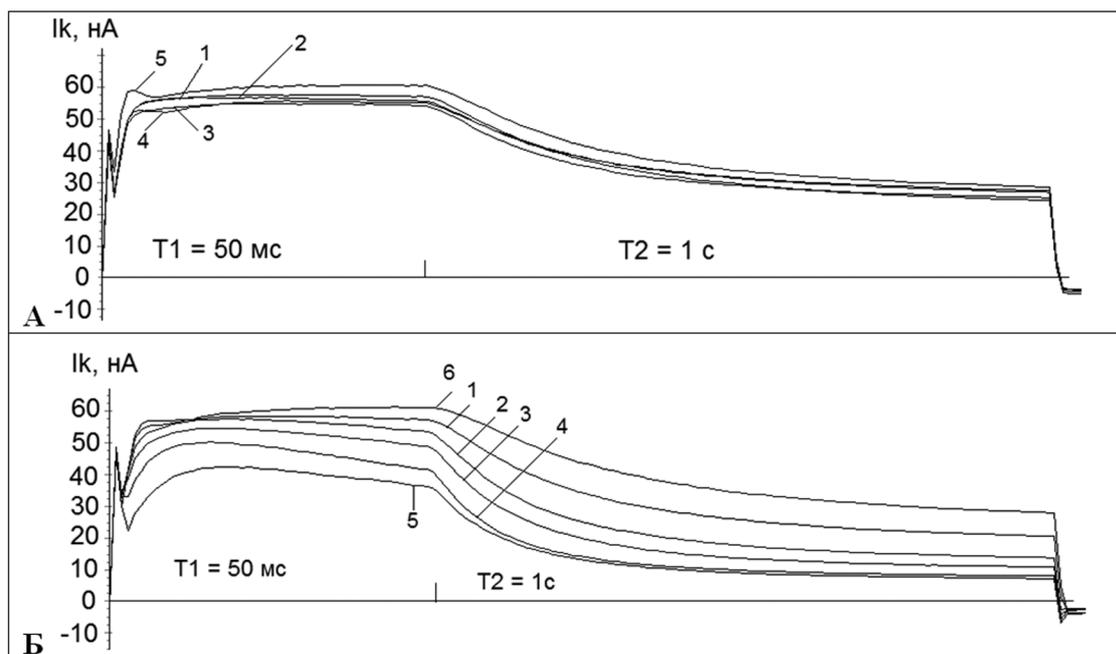
Более выраженные реакции нейрона на приложение ДМСО, представлены на рис. 2: видна слабая реакция при действии концентрации 500 мМ, но более сильное подавление амплитуды ПД при 1000 мМ и гиперполяризация нейрона при значительном урежении ИА в процессе отмывания. Следует еще отметить, что довольно часто на нейронах с низким уровнем ПП влияние ДМСО, как и других фармакологических средств, бывает более сильным. Так на нейронах, исходно имевших низкий уровень ПП (около -45 мВ) под влиянием ДМСО в концентрации

1000 мМ на фоне сильной деполяризации ИА прекращалась, но при отмывании она медленно восстанавливалась практически до исходных ее параметров.

В сравнении с ДМСО влияние ацетона на электрическую активность нейронов было заметным уже при концентрации 100 мМ (рис. 3, А, 2), а в концентрациях 600 и 1000 мМ — ИА полностью, но обратно подавлялась (рис. 3, А, 4 и 6). На фоне деполяризации наблюдалось зависимое от концентрации увеличение частоты ПД, снижение их амплитуд и суммарных ионных токов (рис. 3, В).



■ Рисунок 3. Влияние ацетона в различных концентрациях на электрическую активность нейронов катушки роговой. А — динамика изменений ПП, ИА и амплитуд ПД на нейроне левого педаляного ганглия ЛПед1: 1 — контроль, 2 — ацетон 100 мМ, 3 — отмывание, 4 — 600 мМ, 5 — отмывание, 6 — 1000 мМ, 7 — отмывание; Б — развертка во времени фрагмента ИА и ионных токов в контроле (А, 1); В — развертка во времени фрагмента действия ацетона (А, 2), увеличение частоты ПД и снижение токов



■ Рисунок 4. Изменения калиевых ионных токов нейронов катушки под влиянием ДМСО и ацетона. А — ДМСО: 1 — контроль, 2 — 600 мМ, 3 — 800, 4 — 1000, 5 — отмывание; Б — ацетон: 1 — контроль, 2 — 100 мМ, 3 — 200, 4 — 400, 5 — 600, 6 — отмывание

Регистрация ионных токов на изолированных нейронах показала, что их изменения под влиянием ДМСО в концентрациях 600, 800 и 1000 мМ были весьма незначительными, это наблюдалось как для входящих натрий-кальциевых токов, так и для калиевых (рис. 4, А, 2–4). После действия ДМСО амплитуда тока даже незначительно возросла (рис. 4, А, 5). Под влиянием ацетона в концентрациях 100, 200, 400 и 600 мМ уменьшение амплитуд токов были более сильным (рис. 4, Б, 2–5), также обратимым и после его действия несколько увеличенным (рис. 4, Б, 6). Если сравнивать степень снижения амплитуды ПД (рис. 3, А, 4 и 6) и амплитуды ионных токов (рис. 4, Б, 5) под влиянием ацетона в концентрации 600 мМ, то можно видеть, что ионные токи были снижены не полностью (в меньшей степени), а амплитуда ПД была подавлена полностью. Это указывает на то, что под влиянием ацетона уменьшение амплитуды ПД нейронов обусловлено в большей степени их деполяризацией и в меньшей — подавлением ионных токов. Влияние же ДМСО на ПД было обусловлено примерно в равной степени изменениями ПП и модуляцией ионных токов.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные об отсутствии существенно влияния на нейроны моллюска апротонных растворителей ДМСО и ацетона, имеющих структурное сходство молекул, в диапазоне концентраций до 100 мМ и об изменениях ПП при действии или после действия (зависимая от концентрации гипер- и деполяризация) и соответствующих изменениях

параметров ПД, суммарных ионных токов и ИА под их влиянием только в диапазоне высоких концентраций 200–1000 мМ убедительно свидетельствуют об относительной безопасности использования этих веществ в качестве растворителей фармакологических средств. При этом меньшее повреждающее действие на нейроны оказывает ДМСО. Если сравнивать эффекты ацетона, вызываемые им у человека и на нейронах моллюсков, то можно констатировать меньшую чувствительность (в 5–10 раз) последних к нему. Так ацетон вызывал анестезию головастика ($EC_{50} = 264 \pm 2$ мМ), на нейронах лягушки в концентрации 50 мМ он увеличивал амплитуду ответов рецепторов GABA_A, в концентрации 100 мМ и выше подавлял ионные токи каналов, связанных с рецепторами TRESK, а в концентрации 200 мМ и каналов рецепторов NMDA [13].

На основании полученных данных о том, что после действия растворителей наблюдается и гиперполяризация нейронов, и увеличение амплитуд регистрируемых токов, пока нельзя говорить о каком-либо положительном или стимулирующем их влиянии на нейроны. Концентрации 200–1000 мМ примерно соответствуют 4 и 8 %-м растворам ДМСО, при этом они увеличивают тоничность раствора для моллюсков на 300–700 %. И это свидетельствует о высокой резистентности данных нейронов к изменениям наружных растворов. Таким образом, в экспериментальных исследованиях на биологических объектах вполне оправдано и безопасно использование ДМСО в качестве растворителя фармакологических средств в диапазоне концентраций до 100–500 мМ, и ацетона — до 100 мМ.

Деполаризация клеточных мембран может быть связана с изменениями пассивной проницаемости клеточных мембран к ионам натрия и калия, а гиперполяризация после действия ДМСО — с обезвоживанием нейронов, с увеличением внутриклеточной концентрации ионов натрия и с активацией работы электрогенного натрий-калиевого насоса [9, 12].

Изменения суммарных ионных токов, параметров ПД и ИА нейронов под влиянием ДМСО и ацетона скорее всего обусловлены соответствующими изменениями ПП и в меньшей степени их можно связать с прямым влиянием на потенциалуправляемые ионные каналы или хемоуправляемые каналы синаптических и пейсмекерных структур [2, 5, 6, 8, 10, 11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Вислобов А. И., Игнатов Ю. Д., Галенко-Ярошевский П. А., Шабанов П. Д. Мембранотропное действие фармакологических средств. — СПб.; Краснодар: Просвещение-Юг, 2010. — 528 с.
2. Вислобов А. И., Борисова В. А., Прошева В. И., Шабанов П. Д. Фармакология ионных каналов / Серия: Цитофармакология. Т. 1 — СПб.: Информ-навигатор, 2012. — 528 с.
3. Вислобов А. И., Игнатов Ю. Д., Середенин С. Б. Изменения электрической активности нейронов под влиянием афобазола // Эксперим. и клин. фарм. — 2012. Т. 75, № 6. — С. 3–7.
4. Камкин А. Г., Киселева И. С. Физиология и молекулярная биология мембран клеток: учеб. пособие. М.: ИЦ Академия, 2008. — 592 с.
5. Ashcroft F. M. Ion channels and disease. — Academic Press, San Diego, 2000. — 481 p.
6. Camerino D. C., Tricarico D., Desaphy J. F. Ion channel pharmacology // Neurotherapeutics. — 2007. — Vol. 4, N 2. — P. 184–198.
7. <http://www.himdetrit...emtech/102/103/>
8. Hübner C. A., Jentsch T. J. Ion channel diseases // Hum. Mol. Genet. — 2002. — Vol. 11. — P. 2435–2445.
9. Larsen J., Gasser K., Hahin R. An analysis of dimethylsulfoxide-induced action potential block: a comparative study of DMSO and other aliphatic water soluble solutes // Toxicol. Appl. Pharmacol. — 1996. — Vol. 140, N 2. — P. 296–314.

◆ Информация об авторах

Вислобов Анатолий Иванович — д. б. н., старший научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова. ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН. 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12. E-mail: vislobokov@yandex.ru.

Мельников Константин Николаевич — к. х. н., асс. кафедры фармакологии. Институт фармакологии им. А. В. Вальдмана ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И. П. Павлова» МЗ РФ. 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 6/8. E-mail: knmelnikov@mail.ru.

Тюренков Иван Николаевич — д. м. н., член-корреспондент РАМН, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей. ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ. 400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1.

Шабанов Петр Дмитриевич — д. м. н., профессор, заведующий отделом нейрофармакологии им. С. В. Аничкова. ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН. 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

10. Narahashi T. Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2000. — Vol. 294, N 1. — P. 1–26.
11. Ragsdale D. S., McPhee J. C., Scheuer T., Catterall W. A. Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. — 1996. — Vol. 93. — P. 9270–9275.
12. Santos N. C., Figueira-Coelho J., Martins-Silva J., Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects // Biochem. Pharmacol. — 2003. — Vol. 65, № 7. — P. 1035–1041.
13. Yang L., Zhao J., Milutinovic P. S., Brosnan R. J., Eger E. I., Sonner J. M. Anesthetic properties of the ketone bodies beta-hydroxybutyric acid and acetone // Anesth. Analg. — 2007. — Vol. 105, N 3. — P. 673–679.

CHANGES OF INTRACELLULAR POTENTIALS AND IONIC CURRENTS OF THE MOLLUSK NEURONS UNDER ACTION OF SOLVENTS DIMETHYLSULFOXIDE AND ACETONE

Vislobokov A. I., Melnikov K. N., Tyurenkov I. N., Shabanov P. D.

◆ **Summary:** Dimethylsulfoxide (DMSO), and dimethyl ketone (acetone) in concentrations up to 100 mM after extracellular application did not change the electrical activity of the identified pedal ganglia neurons of clam *Planorbarius corneus* in microelectrode studies and voltage clamp technique. DMSO in concentrations of 500 and 1000 mM (4 and 8% solution), and acetone in smaller concentrations (from 200 mM–1.2% or higher) was shown to depolarize neurons and to increase the frequency and duration of action potentials, their amplitude and the total ionic currents (dV/dt) being decreased. The changes were fully reversible, hyperpolarization of cells was registered after washing, which was caused probably by activation of electrogenic transport of sodium ions. DMSO and acetone were suggested to change the neuron state not only by changes in resting potential but also by direct effects on ion channels. Acetone reduced amplitude of action potentials in neurons because of depolarization and in less degree because of its effects on ion channels. DMSO and acetone in concentrations of 100–200 mM are concluded to be safe for biological objects when they are used for dissolution of pharmacological agents.

◆ **Key words:** acetone; dimethylsulfoxide; *Planorbarius corneus*; resting potential; action potential; the impulse activity.

Vislobokov Anatoliy Ivanovich — Dr. Med. Sci. (Physiology), Senior Researcher, Anichkov Dept. of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine, NWB RAMS. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12, Russia. E-mail: vislobokov@yandex.ru.

Melnikov Konstantin Nikolayevich — PhD (Pharmacology), Assistant Professor, Dept. of Pharmacology. First St. Petersburg State Medical University. 197022, St. Petersburg, Lev Tolstoy St., 6/8, Russia. E-mail: knmelnikov@mail.ru.

Tyurenkov Ivan Nikolayevich — Corresponding Member of RAMS, Dr. Med. Sci. (Pharmacology), Professor and Head, Dept. of Pharmacology and Biopharmacy. Volgograd State Medical University. 400131, Volgograd, Pavshych Bortsov Squire, 1, Russia.

Shabanov Petr Dmitriyevich — Dr. Med. Sci. (Pharmacology), Professor and Head, Anichkov Dept. of Neuropharmacology. Institute of Experimental Medicine, NWB RAMS. 197376, St. Petersburg, Acad. Pavlov St., 12, Russia. E-mail: pdshabanov@mail.ru.