

## ВЛИЯНИЕ ЭКДИСТЕРОИДСОДЕРЖАЩЕЙ СУБСТАНЦИИ ИЗ СЕРПУХИ ВЕНЦЕНОСНОЙ *Serratula coronata* L. НА ТРАНСМЕМБРАННЫЕ ИОННЫЕ ТОКИ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА

А. И. Вислобоков<sup>1</sup>, В. В. Володин<sup>2</sup>, Ю. Д. Игнатов<sup>1</sup>, К. Н. Мельников<sup>1</sup>, В. И. Прошева<sup>2</sup>

Изучали изменения трансмембранных калиевых, кальциевых и натриевых ионных токов изолированных нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis* под влиянием экдистероидсодержащей субстанции Серпистен из серпухи венценосной *Serratula coronata* L. в концентрациях 0,01 – 1000 мкг/мл. Использовали метод фиксации мембранного потенциала. Установлено, что Серпистен во всем диапазоне изученных концентраций неизбирательно активирует калиевые и кальциевые токи, увеличивая их амплитуду на 2 – 15 %, а также снижает неспецифические токи утечки мембраны. Натриевые токи при действии Серпистена в низких концентрациях 0,01 – 10 мкг/мл возрастали на 4 – 7 %, а при концентрациях 100 и 1000 мкг/мл — снижались на 5 – 10 %. Эффекты были обратимы. Кинетика развития ионных токов под влиянием Серпистена не изменялась.

**Ключевые слова:** серпуха венценосная *Serratula coronata* L., фитоэкдистероиды, калиевый, натриевый, кальциевый ионный токи, нейроны, *Lymnaea stagnalis*

### ВВЕДЕНИЕ

Фитоэкдистероиды — большая группа (от 150 до 1000) полигидроксилированных стероидов, встречающихся в различных растениях, близких по структуре к гормону метаморфоза (линьки) насекомых экдизону и содержащих в структуре три шестичленных и одно пятичленное кольца с разветвленными цепями радикалов [8, 12]. Эти соединения являются средствами защиты растений от восприимчивых к ним насекомых — фитофагов. Вместе с тем они являются физиологически активными соединениями, оказывающими адаптогенное, нейротропное стимулирующее, а также анаболическое, иммуномодулирующее и противоаритмическое действие [8, 13]. Из надземной части серпухи венценосной (*Serratula coronata* L., Asteraceae) выделена субстанция, содержащая экдистероиды, и названа Серпистеном [4]. В качестве основных компонентов в нее входит 20-гидроксиэкдизон (75 – 81 %) и его структурный изомер 25S инокостерон (9 – 11 %), а также другие соединения, присутствующие в следовых концентрациях: экдизон, макистероны А и С и аюгастерон С [5, 16].

Известно, что потенциал-управляемые ионные каналы и хеморецепторы, встроенные в поверхностные мембраны, обеспечивающие генерацию биоэлектрических импульсов в нервной системе, оказываются мишенью для многих физиологически активных и лекарственных средств [11, 14]. Однако влияние фитоэкдистероидов на ионные каналы нейронов практически не

исследовано. В связи с этим целью данной работы являлось изучение влияния экдистероидсодержащей субстанции Серпистен на ионные каналы мембраны изолированных нервных клеток моллюска *Lymnaea stagnalis*.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

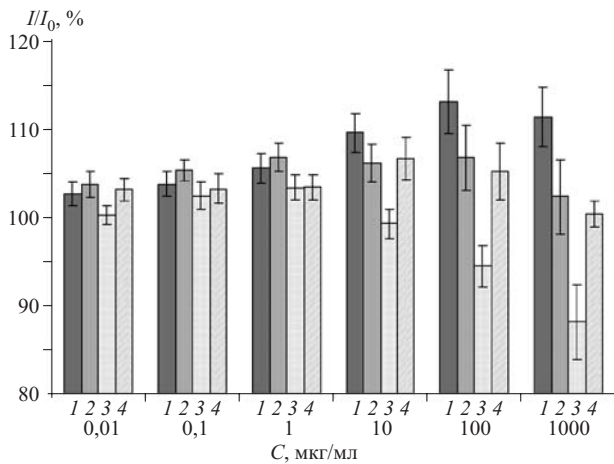
Серпуху венценосную выращивали на производственном участке Института биологии (Республика Коми, район Сыктывкара) и заготавливали в фазу бутонизации. Экдистероидсодержащую субстанцию Серпистен выделяли экстрагированием из листьев растения [4], она содержала смесь экдистероидов: 80 % 20-гидроксиэкдизона и 10 % 25S-инокостерона.

Эксперименты проводили на изолированных нейронах брюхоногого моллюска — прудовика обыкновенного (*Lymnaea stagnalis*) при комнатной температуре (20 – 22 °С). Для получения изолированных нейронов из тела животного вырезали околوجلочное кольцо нервных ганглиев, которое подвергали ферментативной обработке, поместив в 0,25 % раствор трипсина на физиологическом растворе для прудовиков на 40 – 60 мин.

В работе использовали методику внутриклеточного диализа и фиксации мембранного потенциала на целой клетке, помещенной на полиэтиленовую пипетку [6]. Перфузирующий раствор подавали в камеру, где находился нейрон на полиэтиленовой микропипетке, а диализирующий — внутрь этой пипетки. Регистрировали входящие натриевый и кальциевый и выходящие калиевый быстрый и калиевый медленный трансмембранные ионные токи. Неспецифические токи утечки мембраны из регистрируемых ионных токов вычитали автоматически (компенсировали). Разделение ионных токов производили с использованием перфузирующих

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022, ул. Л. Толстого, 6/8.

<sup>2</sup> Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, 167610, ул. Коммунистическая, 28.



**Рис. 1.** Зависимость “концентрация-эффект” при действии эдистероидсодержащей субстанции Серпистен в различных концентрациях на трансмембранные ионные токи нейронов прудовика.

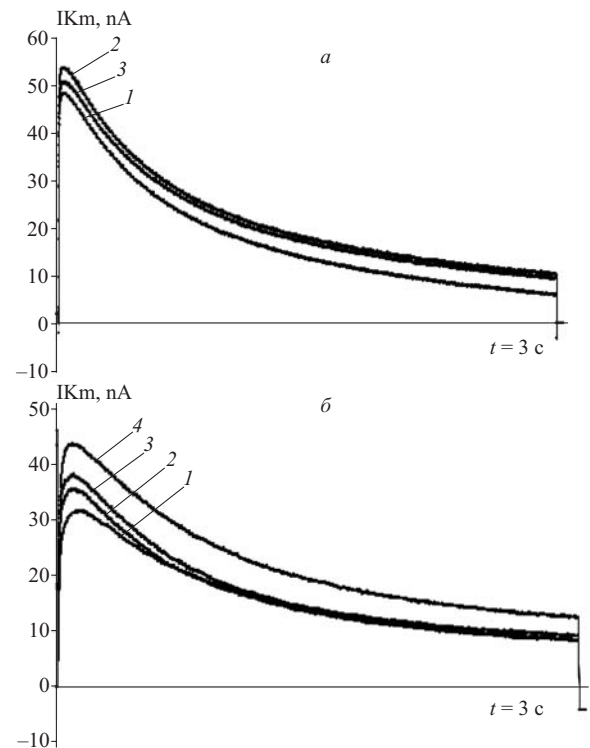
1 — калиевый медленный ток ( $I_{K\text{m}}$ ), 2 — кальциевый ( $I_{Ca}$ ), 3, 4 — натриевые ( $I_{Na1}$  и  $I_{Na2}$ ). По оси ординат — отношение амплитуды калиевого тока при действии субстанции (I) к его исходной величине в контроле ( $I_0$ ), %. Вертикальные линии — доверительные интервалы при  $p = 95\%$ .

(внеклеточных) и диализирующих (внутриклеточных) растворов и путем поддержания соответствующих мембранных потенциалов [3].

Субстанцию предварительно растворяли в соответствующих наружных (перфузирующих) растворах (1 мг в 1 мл), а затем последовательно разбавляли в 10 раз и получали растворы в концентрациях: 100, 10, 1, 0,1, и 0,01 мкг/мл. Эффекты Серпистена развивались быстро и стабилизировались через 2–3 мин, отмывание проводили 5–7 мин. Исходные величины ионных токов принимали за 100 %, а установившиеся их значения при действии Серпистена выражали в % от исходных. Оценку изменений амплитуды и кинетики ионных токов при действии субстанции проводили как визуально с экрана осциллографа и монитора, так и из записей компьютера с помощью специальных программ и графического редактора Excel. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы *Statistica 6.0*. Различия между средними значениями ( $n = 5 - 10$ ) определяли с использованием  $t$ -критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Под влиянием Серпистена в диапазоне концентраций от 0,01 до 1000 мкг/мл наблюдалось увеличение амплитуды калиевых, кальциевых и натриевых ионных токов. Максимальное увеличение амплитуды калиевого медленного тока происходило на 13 % и кальциевого — на 6,7 % при действии Серпистена в концентрации 100 мкг/мл (рис. 1). Влияние Серпистена на натриевые токи во всем диапазоне исследованных концентраций не было столь однозначным, как на калиевые и кальциевые. У некоторых нейронов ( $n = 7$ )

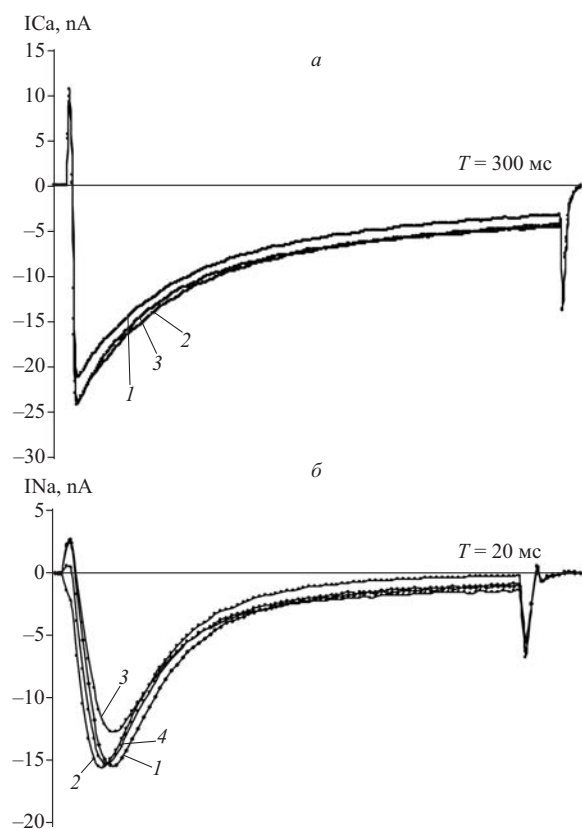


**Рис. 2.** Увеличение амплитуды калиевых ионных токов нейронов под влиянием субстанции Серпистен.

По оси ординат — ионные токи, по оси абсцисс — время. а: 1 — контроль, 2 — Серпистен 10 мкг/мл, 3 — отмывание. б: 1 — контроль, 2 — Серпистен 10 мкг/мл, 3 — 100 мкг/мл, 4 — отмывание.

под влиянием Серпистена в концентрациях 0,01–1 мкг/мл амплитуда натриевых токов возрастала, а при действии в концентрациях 100–1000 мкг/мл — снижалась до 88 % по сравнению с контролем (рис. 1, колонка  $I_{Na1}$ ). У других нейронов ( $n = 6$ ) натриевые токи не снижались, максимальное повышение амплитуды тока на 6,6 % наблюдалось при концентрации Серпистена 10 мкг/мл (рис. 1, колонка  $I_{Na2}$ ). После действия Серпистена в концентрации 1000 мкг/мл эффекты были полностью обратимы уже через 5–7 мин отмывания для калиевых и натриевых токов (но только во второй группе нейронов) и частично — для кальциевых токов и натриевых токов первой группы нейронов.

Незначительное увеличение амплитуды калиевых ионных токов, наблюдавшееся под влиянием Серпистена, происходило без изменений их кинетики (рис. 2). Обнаружено, что активация калиевых медленных токов могла происходить двояким образом: с увеличением их инактивирующейся и неинактивирующейся части (рис. 2, а, кривая 2) или с увеличением только начальной инактивирующейся части (рис. 2, б, кривая 2). После действия Серпистена увеличение амплитуды обеих частей калиевого тока некоторое время сохранялось (рис. 2, б, кривая 4). Активирующее влияние Серпистена на быстрый калиевый ток было сход-



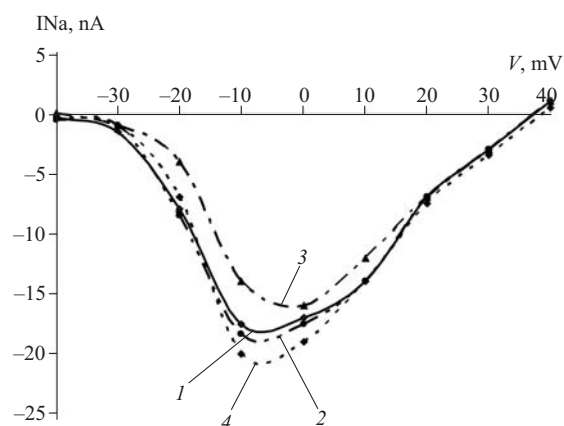
**Рис. 3.** Увеличение амплитуды кальциевых (*a*) и натриевых (*б*) ионных токов нейронов под влиянием субстанции Серпистена.

По оси ординат — ионные токи, по оси абсцисс — время. *a*: 1 — контроль, 2 — Серпистен 10 мкг/мл, 3 — отмывание. *б*: 1 — контроль, 2 — Серпистен 10 мкг/мл, 3 — 1000 мкг/мл, 4 — отмывание.

ным с вышеописанным его влиянием на медленный калиевый.

Увеличение амплитуды натриевых (рис. 3, *a*) и кальциевых (рис. 3, *б*) токов происходило без изменения их кинетики. Вольт-амперные характеристики для натриевых каналов в контроле и при действии Серпистена в концентрации 10 мкг/мл показаны на рис. 4 (кривая 2). При концентрации 1000 мкг/мл максимум снижался (кривая 3) и смещался вправо по оси потенциалов, что указывает на изменения потенциала поверхностного заряда мембраны вблизи натриевых каналов. После отмывания амплитуда натриевого тока оставалась увеличенной (кривая 4) в течение 5–10 мин. Эффекты были обратимы.

Под влиянием Серпистена неспецифические токи утечки мембраны нейронов при регистрации всех ионных токов в большинстве случаев снижались, что указывает на увеличение стабильности мембраны. Однако при действии Серпистена в концентрации 1000 мкг/мл на нейроны первой группы, когда подавлялись натриевые токи, одновременно с этим неспецифические токи утечки мембраны возрастали, т.е. проявлялось дестабилизирующее действие Серпистена.



**Рис. 4.** Изменения вольт-амперных характеристик натриевых каналов под влиянием субстанции Серпистена.

Исходный поддерживаемый потенциал =  $-100$  мВ,  $V$  — тестирующий потенциал. 1 — контроль, 2 — 10 мкг/мл, 3 — 1000 мкг/мл, 4 — отмывание.

Наблюдаемое в наших экспериментах примерно равное увеличение калиевых, кальциевых и натриевых токов при действии Серпистена, указывает на неспецифичность (неизбирательность) его влияния на ионные каналы. Можно предположить, что это связано с каким-то единым мембранным механизмом, возможно, — с активацией процессов фосфорилирования канальных белков [10], регулирующих проницаемость мембран, и единообразным изменением их функционирования.

Нами показано, что кинетика развития ионных токов при действии Серпистена оставалась неизменной, что указывает на отсутствие взаимодействия компонентов препарата с воротными механизмами ионных каналов. Обратимость эффектов свидетельствует о непрочном связывании Серпистена со структурными элементами мембраны.

Неспецифические токи утечки мембраны, отражающие количество ионных пор, через которые происходит свободная диффузия ионов, можно рассматривать в качестве показателя стабильности мембраны. В наших экспериментах под влиянием Серпистена наблюдалось незначительное снижение этих токов, что указывает на мембраностабилизирующее действие Серпистена и свидетельствует об улучшении состояния нервной клетки. При действии же Серпистена в высокой концентрации (1000 мкг/мл) в случае регистрации натриевых токов неспецифические токи утечки возрастали, что свидетельствует о возникновении в этих условиях дополнительных ионпроводящих каналов в мембране и о ее дестабилизации.

Мембранотропные эффекты, показанные в данной работе под влиянием Серпистена, проявлялись при концентрациях, которые были использованы другими авторами, показавшими модуляторное действие фитоэкистероидов на синаптические процессы [13, 15]. В настоящее время принято считать, что для реализации

эффектов стероидов на мембране имеются три возможности: 1) растворение в мембранном бислое и изменение активности некоторых мембранных белков, 2) взаимодействие со специфическим мембранным рецептором, 3) связывание с модуляторным участком рецептора для другой молекулы [9]. Разумеется, эти различные возможности не исключают друг друга. На основании полученных результатов можно предположить, что обнаруженные мембранные эффекты фитоекдистероидов субстанции Серпистен могут лежать в основе модуляции подобными соединениями многих клеточных функций.

Ранее мы показали возможность активации калиевых ионных каналов нейронов моллюсков полисахаридами [3], фармакологическими средствами разных групп — местными анестетиками, психотропными препаратами фенамином, кокаином и другими [1, 2]. Если принять во внимание, что ионные механизмы электрогенеза нейронов моллюсков и млекопитающих принципиально близки [6, 7], то результаты, полученные в данной работе, в определенной степени можно экстраполировать на нейроны теплокровных животных и человека.

## ВЫВОДЫ

1. Экдистероидсодержащая субстанция Серпистен в концентрациях от 0,1 до 1000 мкг/мл обладает активирующим мембранотропным действием, проявляющимся в увеличении на 2 – 15 % амплитуд кальциевых, натриевых и калиевых ионных токов мембраны нейронов.

2. В концентрации 1000 мкг/мл Серпистен в 50 % случаев подавляет натриевые токи нейронов на 5 – 10 %.

3. Кинетика развития ионных токов под влиянием Серпистена не изменяется.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта программы Президиума РАН “Фундаментальные науки — медицине Урала” (2004 – 2005 гг.).

Авторы благодарны С. О. Володиной за предоставление препарата Серпистен.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. И. Вислобоков, Ю. Д. Игнатов, *Обзоры по клин. фармакол. и лек. тер.*, **2**(1), 14 – 22 (2003).
2. А. И. Вислобоков, К. Н. Мельников, В. В. Марышева, П. Д. Шабанов, *Психофармакол. и биол. наркол.*, **3**(1–2), 522 – 525 (2003).
3. А. И. Вислобоков, В. И. Прошева, А. Я. Полле, *Бюл. экспер. биол.*, **138**(10), 439 – 441 (2004).
4. В. В. Володин, С. О. Володина, Патент Российской Федерации № 2153346, *Бюл. изобретений*, **21**, 2000.
5. В. В. Володин, В. Г. Лукша, Л. Дайнан и др., *Физиология растений*, **45**(3), 378 – 381 (1998).
6. П. Г. Костюк, О. А. Крышталь, *Механизмы электрической возбудимости нервной клетки*, Наука, Москва (1981).
7. Е. И. Солнцева, Ю. В. Буканова, *Биологические мембраны*, **20**(4), 307 – 313 (2003).
8. *Фитоекдистероиды*, В. В. Володин (ред.), Наука, СПб. (2003).
9. D. W. Brann, L. B. Hendry, and V. B. Mahesh, *J. Steroid. Bioch. Molecular. Biol.*, **52**, 113 – 133 (1995).
10. M. De Waard, H. Y. Liu, D. Walker, et al., *Nature*, **385**, 446 – 450 (1997).
11. B. Hille, *Ion channels of excitable membranes*, Third Edition, University of Washington (2001).
12. J. Koolman, *Zool. Sci.*, **7**, 563 – 580 (1990).
13. R. Lafont and L. Dinan, *Insect Sci.*, **3**(7), 30 (2003).
14. D. E. Pellegrini-Giampietro and F. Moroni, *Voltage-sensitive ion channels: modulation by neurotransmitters and drugs*, Press. Springer Verlag (1988).
15. M. E. Ruffner, S. I. Cromarty, and R. L. Cooper, *J. Neurophysiol.*, **81**, 788 – 794 (1999).
16. V. Volodin, L. Alexeeva, N. Kolegova, et al., *Bioch. Systematics and Ecology*, **6**, 459 – 461 (1998).

Поступила 06.06.06

## THE INFLUENCE OF ECDYSTEROID FRACTION FROM *Serratula coronata* ON TRANSMEMBRANE IONIC CURRENTS OF SNAIL NEURONS

A. I. Vislobokov<sup>1</sup>, V. V. Volodin<sup>2</sup>, Yu. D. Ignatov<sup>1</sup>, K. N. Melnikov<sup>1</sup>, and V. I. Prosheva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> St. Petersburg State Medical University, Lev Tolstoy Street 6/8, St. Petersburg, 197022, Russia

<sup>2</sup> Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Division, Russian Academy of Sciences, Kommunisticheskaya ul. 28, Syktyvkar, 167982 Russia

Changes of the transmembrane potassium, calcium, and sodium ion currents in isolated neurons of *Lymnaea stagnalis* snail under the action of ecdysteroid fraction (serpisten) from *Serratula coronata* L. applied from outside in 0.01 – 1000 µg/ml concentrations have been studied using the voltage-clamp technique. It is established for the first time that serpisten non-selectively activates the potassium and calcium ion currents (the currents amplitude increases by 2 – 15%) and reduces nonspecific membrane leakage currents in the entire range of concentrations. The sodium ion current also increased by 4 – 7% under the action of Serpisten in low concentrations (0.01 – 10 µg/ml) in comparison with control, but this current decreased by 5 – 10% at serpisten concentrations of 100 and 1000 µg/ml. The effects were reversible. The kinetics of currents was not changed under the action of serpisten.