

**ВОЗМОЖНЫЕ АНТИНОЦИЦЕПТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ,  
ЗАПУСКАЕМЫЕ НАНОМОЛЯРНЫМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ УБАИНА  
В ПЕРВИЧНЫХ СЕНСОРНЫХ НЕЙРОНАХ**

© 2020 г. В. А. Пеннийнен<sup>1</sup>, М. М. Халисов<sup>1</sup>, С. А. Подзорова<sup>1</sup>, А. В. Анкудинов<sup>2</sup>,  
В. Б. Плахова<sup>1</sup>, Б. В. Крылов<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: krylov@infran.ru

Поступила в редакцию 29.04.2020 г.

После доработки 24.07.2020 г.

Принята к публикации 18.08.2020 г.

Исследованы ответы первичного сенсорного нейрона на воздействие субнано-молярных и наномолярных концентраций убаина, которые соответствуют его эндогенным концентрациям (ЭУ). Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) обнаружено, что воздействие ЭУ приводило к увеличению жесткости нейрона. Методом локальной фиксации потенциала установлено, что благодаря лиганд-рецепторному связыванию ЭУ с комплексом Na,K-АТФаза/Src происходит снижение величины эффективного заряда активационной воротной системы каналов  $Na_v1.8$ . Установлено также, что ЭУ-активируемый внутриклеточный каскад, в котором комплекс Na,K-АТФаза/Src выполняет функцию трансдуктора сигнала, приводит к снижению интенсивности флуоресценции антител к каналам  $Na_v1.8$ , что было выявлено с помощью метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Полученные результаты позволили высказать предположение о том, что ЭУ, запуская трансдукторную функцию комплекса Na,K-АТФаза/Src и соответствующий внутриклеточный сигнальный каскад, способен модулировать экспрессию гена *SCN10A*, продуцирующего каналы  $Na_v1.8$ , ответственные за кодирование ноцицептивных сигналов.

*Ключевые слова:* сенсорные нейроны, Na,K-АТФаза, убаин, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, атомно-силовая микроскопия, метод локальной фиксации потенциала, каналы  $Na_v1.8$

DOI: 10.31857/S0869813920100088

Трансдукторная функция Na,K-АТФазы, активируемая низкими концентрациями убаина, была впервые обнаружена при исследовании кардиомиоцитов [1, 2]. В мембране первичного сенсорного нейрона нами был обнаружен новый механизм мембранной сигнализации. Важнейшую функцию трансдуктора сигналов, как и в кардиомиоцитах, здесь выполняет Na,K-АТФаза, а эффекторным звеном служат каналы  $Na_v1.8$ , кодирующие ноцицептивную информацию [3–5]. В этом каскадном процессе, направленном тангенциально вдоль мембраны клетки, сигнал, запускаемый ЭУ, приводит к снижению эффективного заряда активационного воротного устройства каналов  $Na_v1.8$ . Важно отметить, что ЭУ присутствует в гипоталамусе в субнано-молярных и наномолярных концентрациях [6]. В настоящей работе исследована возможная физиологическая функция комплекса Na,K-АТФаза/Src, по-

сколькx в соответствии с нашими данными именно этот комплекс должен выполнять функцию трансдуктора сигнала в мембране ноцицептивного нейрона [5, 7].

Мы предполагаем, что указанная функция комплекса Na,K-АТФаза/Src, активируемая ЭУ, приводит к модулированию функциональной активности каналов  $Na_v1.8$  двумя способами. Первый способ, направленный, как было отмечено выше, в тангенциальном направлении, характеризуется быстрой передачей сигнала от комплекса Na,K-АТФаза/Src к каналам  $Na_v1.8$  вдоль мембраны нейрона [8]. Второй механизм проявляется в радиальной передаче сигнала на геном нейрона, при этом активация трансдукторной функции комплекса Na,K-АТФаза/Src должна приводить к запуску внутриклеточного каскада, эффекторным звеном которого может стать ген *SCN10A*, ответственный за продуцирование каналов  $Na_v1.8$  [9]. В том случае, если их плотность в мембране ноцицептивного нейрона уменьшится после воздействия ЭУ, то можно предположить, что указанный агент запускает не только тангенциальный каскад, направленный вдоль мембраны клетки, но и радиальный сигнальный процесс, также ведущий к снижению функциональной активности каналов  $Na_v1.8$ . Настоящая работа посвящена изучению именно этих двух возможных молекулярных механизмов, участвующих в модуляции функциональной активности каналов  $Na_v1.8$ , запускаемых при связывании ЭУ с комплексом Na,K-АТФаза/Src.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были разработаны в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ от 24 ноября 1986 г. (86/609/ЕЭС). Местный комитет по уходу и использованию животных Института физиологии им. Павлова РАН утвердил все экспериментальные методики с животными, разрешение № 12/03 (20.04.2018).

**Метод получения культуры сенсорных нейронов.** Этот метод подробно описан в нашей предыдущей работе [10]. Исследования проведены на нативных сенсорных нейронах спинальных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов, культивируемых в 50-миллиметровых чашках  $\mu$ -Dish (ibidi GmbH, Германия) с тонким дном (170 мкм) или 40-миллиметровых чашках Петри, предварительно покрытых 0.01%-ным раствором поли-L-лизина (Sigma, США), в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Sanyo, Япония) в течение 3-х суток при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Экспериментальные нейроны культивировали в присутствии уабаина (Sigma, США) в концентрации 0.1 нмоль/л в течение трех суток. Клетки исследовали с помощью методов атомно-силовой и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. В последнем случае проводилось иммуноцитохимическое окрашивание нейронов.

**Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ-метод).** Исследование действия ЭУ (0.1 нмоль/л) на механические характеристики изолированных первичных сенсорных нейронов осуществлялось с помощью установки, включающей атомно-силовой микроскоп BioScope Catalyst (Bruker, США) и инвертированный оптический микроскоп Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Регистрация ответов сенсорных нейронов на механическое воздействие осуществлялась в питательной среде при температуре  $\approx 37^\circ\text{C}$ , которая поддерживалась встроенным в атомно-силовой микроскоп нагревательным элементом под управлением температурного контроллера 335-й модели (Lake Shore Cryotronics, США).

В основе АСМ-измерения механических характеристик клетки лежит техника наноиндентирования – продавливания нейрона зондом с известной силой и отслеживания величины сообщенной изучаемому объекту деформации. Количественное определение механических характеристик производится путем анализа силовых кривых – зависимостей силы взаимодействия от расстояния зонд–нейрон. Более

подробную информацию о принципе АСМ-измерения механических характеристик клеток по силовым кривым можно найти в ряде работ [11, 12].

АСМ-исследование сенсорных нейронов проводили в режиме PeakForce QNM, дающем возможность картировать кажущийся модуль Юнга поверхности клетки за счет автоматического анализа силовых кривых, регистрируемых в каждой точке индентирования. Измерения проводились кантилеверами с низкой жесткостью SNL-D (Bruker, США). Константа жесткости каждого кантилевера определялась по методу тепловых шумов до экспериментов с сенсорными нейронами. Расчет модуля Юнга для сенсорных нейронов производился в соответствии с моделью Снеддона, в которой принимается коническая форма острия зонда [13]. Для обработки АСМ-изображений использовали программы NanoScope Analysis 1.40 (Bruker, США) и Gwyddion 2.55 (свободное ПО) [14]. Сравнение механических характеристик сенсорных нейронов до и после действия ЭУ осуществляли, используя карты модуля Юнга.

**Иммуноцитохимический метод.** Для визуализации нейронов и дальнейшего иммунофлуоресцентного анализа проводили иммуноцитохимическое окрашивание культуры сенсорных нейронов к маркеру каналов  $\text{Na}_v1.8$ . Использовали следующие первичные и вторичные антитела: anti-sodium channel  $\text{Na}_v1.8$  (Sigma, США) и anti-rabbit-FITC (Sigma, США). После удаления культуральной среды нейроны промывали в фосфатно-солевом буфере (PBS; Sigma, США) и фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида (рН 7.4) в PBS в течение 3 мин, затем снова промывали PBS. После промывания PBS нейроны подвергали пермеабиллизации 0.3%-ным Triton X-100 в PBS в течение 15 мин при комнатной температуре, затем клетки инкубировали в 10%-ном растворе фетальной сыворотки коровы в PBS при комнатной температуре в течение 1 ч. Нейроны инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4°C. После этого промывали клетки раствором PBS 3 раза. Инкубировали культуру клеток со вторичными антителами 1 ч в темноте при 37°C. Далее нейроны снова промывали PBS и окрашивали DAPI (Sigma, США) для обнаружения ядер. Препараты хранили при 4°C, затем их использовали для дальнейших исследований.

**Иммунофлуоресцентный анализ.** Для оценки результатов иммуноцитохимического окрашивания, а также для количественного анализа действия ЭУ применяли систему компьютерного анализа микроскопических изображений, состоящую из лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) интегрированного с инвертированным микроскопом Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия), персонального компьютера и программного обеспечения ZEN\_2012 (Carl Zeiss, Германия). Анализировали данные, полученные при 63-кратном увеличении (LD Plan-Neofluar 63x/0.75 Korr., Carl Zeiss, Германия). Интенсивность флуоресценции антител к каналам  $\text{Na}_v1.8$  оценивали с использованием пакета программ ZEN\_2012 (Carl Zeiss, Германия). Интенсивность флуоресценции количественно регистрировали в относительных единицах (о.е.) в выделенной области над ядром нейрона. Распределение интенсивности флуоресценции в пределах выбранной области подчинялось нормальному закону распределения. Площадь исследуемой области как контрольной, так и после воздействия убаина, была одинаковой. Работа выполнена на оборудовании ЦКП Конфокальная микроскопия Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

**Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp method).** Этот метод применялся в конфигурации “регистрация активности целой клетки” (“whole-cell”) [15]. После образования плотного контакта происходил разрыв мембраны нейрона под отверстием микропипетки, что позволяло проводить перфузию клетки, вводя в нее внутриклеточный раствор. Эксперименты проводились на культивируемых изолированных сенсорных нейронах, выделенных из областей L5–S1 ганглиев спинного

мозга новорожденных крысят линии *Wistar*. Культивирование изолированных нейронов в течение двух часов в стандартных питательных средах с использованием  $\text{CO}_2$ -инкубатора позволяло получить интактные клетки. Подробно этот модифицированный метод краткосрочного культивирования диссоциированных сенсорных нейронов описан в нашей предыдущей работе [7].

Для исследования характеристик натриевых каналов в работе использовались следующие стандартные растворы: внеклеточный, содержащий (ммоль/л) 65 NaCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 70 Choline Cl, 10 HEPES Na, 0.0003 тетродотоксина, pH 7.4; внутриклеточный, состоящий из (ммоль/л) 100 CsF, 10 NaCl, 40 CsCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES Na, pH 7.2. Исключение ионов калия из обоих растворов позволило избавиться от всех компонентов калиевого тока, а ионы фтора во внутриклеточном растворе обеспечивали блокирование кальциевых токов [16, 17]. Наличие во внеклеточном растворе тетродотоксина блокировало функционирование быстрых тетродотоксинчувствительных каналов, что делало возможным исследовать ответы только одной популяции каналов, Na<sub>v</sub>1.8.

Для выяснения возможного участия Src-киназы, протеникиназы C и протеинкиназы A во внутриклеточный раствор, заполняющий микропипетку, добавляли соответствующие специфические блокаторы: (мкмоль/л) 10 PP2, 10 тамоксифена или 1 KT5720. Уабаин вводили во внеклеточный раствор, где он постоянно присутствовал в течение всего эксперимента в концентрации 10 нмоль/л. В работе использованы реактивы фирмы Sigma (США).

В наших предыдущих работах [3, 4, 7] было уделено особое внимание способу измерения эффективного заряда ( $Z_{eff}$ ) воротного устройства активационной воротной системы каналов Na<sub>v</sub>1.8. Известно, что величина последовательного сопротивления ( $R_s$ ) влияет не только на стационарную ошибку измерения токов, но также резко увеличивает погрешность измерения и кинетических характеристик поведения воротных устройств. Все это сказывается и на погрешности измерений амплитудных значений токов. Эти важнейшие требования к условиям измерения электрических характеристик перфузируемых клеток были разработаны ранее [18]. В соответствии с ними величина  $R_s$  постоянно контролировалась в наших экспериментах. Для того, чтобы она не превышала 3 мОм, размер кончика микропипетки всегда был более 2 мкм. При выполнении этих условий становится возможным применение метода Алмерса [19] для измерения величины  $Z_{eff}$  каналов Na<sub>v</sub>1.8. Подчеркнем, что кинетика инактивации этих медленных натриевых каналов делает их идеальным объектом для измерения эффективного заряда их активационного воротного устройства [3, 4].

**Статистическая обработка** полученных результатов выполнялась в программе STATISTICA 10.0 (StatSoft, США). Этот пакет программ включает в себя условия применения для анализа результатов измерений критерий Колмогорова–Смирнова. Наши данные ему удовлетворяли, что позволило оценить достоверность различий контрольных и экспериментальных данных (интенсивности флуоресценции и величины эффективного заряда) с использованием  $t$ -критерия Стьюдента. Оценка различий между экспериментальной и контрольной группами АСМ-данных проводилась с помощью статистического  $U$ -критерия Манна–Уитни. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Различия принимались статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Результаты АСМ-исследований.** С помощью светового микроскопа выбирали интактные клетки для дальнейшего изучения методом АСМ. АСМ-сканированию

подвергали только надежно иммобилизованные на дне чашки Петри сенсорные нейроны нормальной, присущей клеткам данного типа, веретенообразной формы. Как правило, механическое воздействие зонда атомно-силового микроскопа не причиняло видимого ущерба клеткам. Подчеркнем, что механическая стимуляция заметно не влияла на жесткость поверхности сенсорных нейронов: в течение приблизительно 20 мин сканирования, необходимых для получения полного АСМ-кадра, значимых изменений величины модуля Юнга клеток не наблюдалось. В тех экспериментах, где острие зонда все же повреждало клеточную мембрану, сканирование сразу прекращалось, и этот поврежденный нейрон исключался из дальнейшего анализа.

Отметим, что сенсорные нейроны являются сложным объектом для АСМ-сканирования из-за своей формы, поскольку иммобилизованная на подложке клетка характеризуется резким перепадом своей высоты. В результате, механизм обратной связи не всегда успевает должным образом отследить ее изменения на крутых склонах клетки, что может приводить к ошибочным измерениям. Поэтому при анализе АСМ-изображений сенсорных нейронов избегали края клетки, концентрируясь на центральной части сомы с наиболее пологой поверхностью.

Измерения осуществляли в рамке со стороной 60 мкм, которая была достаточной для помещения в нее исследуемого нейрона. В результате сканирования получали массив тоновых АСМ-изображений. Тон каждой точки таких изображений отражает величину измеряемого параметра: чем светлее тон, тем выше значение параметра. Например, на АСМ-топографии сенсорного нейрона (рис. 1А), отражающей высотное распределение поверхности клетки, темным обозначена гладкая подложка, на которой располагается клетка, а наиболее светлые участки изображения соответствуют соме нейрона.

Для изучения действия ЭУ на механические характеристики сенсорных нейронов анализировались карты модуля Юнга (рис. 1В). Корректность получаемых данных контролировали путем сравнения этих карт. Надежными считались только те данные, которые не отличались при прямом и обратном направлениях АСМ-сканирования. Очевидно, что нервная клетка гетерогенна в отношении своих морфо-функциональных особенностей. Поэтому мы выбирали на соме каждого нейрона небольшую квадратную область со стороной 2 мкм. В результате удалось зарегистрировать такое распределение величин модуля Юнга в этой области, которое было близко к нормальному (рис. 1В, С). Каждая клетка далее характеризовалась средним значением модуля Юнга, полученным при измерениях в указанной области. Затем вычислялось среднее значение данного параметра для двух групп сенсорных нейронов: одна из них была культивирована в среде, содержащей ЭУ (0.1 нмоль/л), а другая была контрольной. Всего было исследовано 8 клеток, культивированных с ЭУ, и 15 контрольных клеток.

Сравнение средних значений модуля Юнга сенсорных нейронов до и после воздействия ЭУ показало, что действие исследуемого агента приводило к существенному увеличению жесткости клеток. Так, сенсорные нейроны, культивируемые в присутствии ЭУ, демонстрировали более чем в 2.8 раза большее среднее значение модуля Юнга по сравнению с контролем.

**Результаты исследований методом лазерной сканирующей микроскопии.** На рис. 2 представлено изменение интенсивности флуоресценции антител к каналам  $\text{Na}_v1.8$  в мембране сенсорного нейрона в контроле и после воздействия ЭУ (0.1 нмоль/л). Распределение значений интенсивности флуоресценции антител к каналам  $\text{Na}_v1.8$  в выбранной области над ядром нейрона в исследованных клетках соответствовало нормальному распределению (тест Колмогорова–Смирнова,  $d = 0.07$ ,  $p > 0.20$ ). Данные иммунофлуоресцентного анализа свидетельствовали о том, что ЭУ-активация трансдукторной функции  $\text{Na}_v1.8$ -АТФазы может запускать внутриклеточный

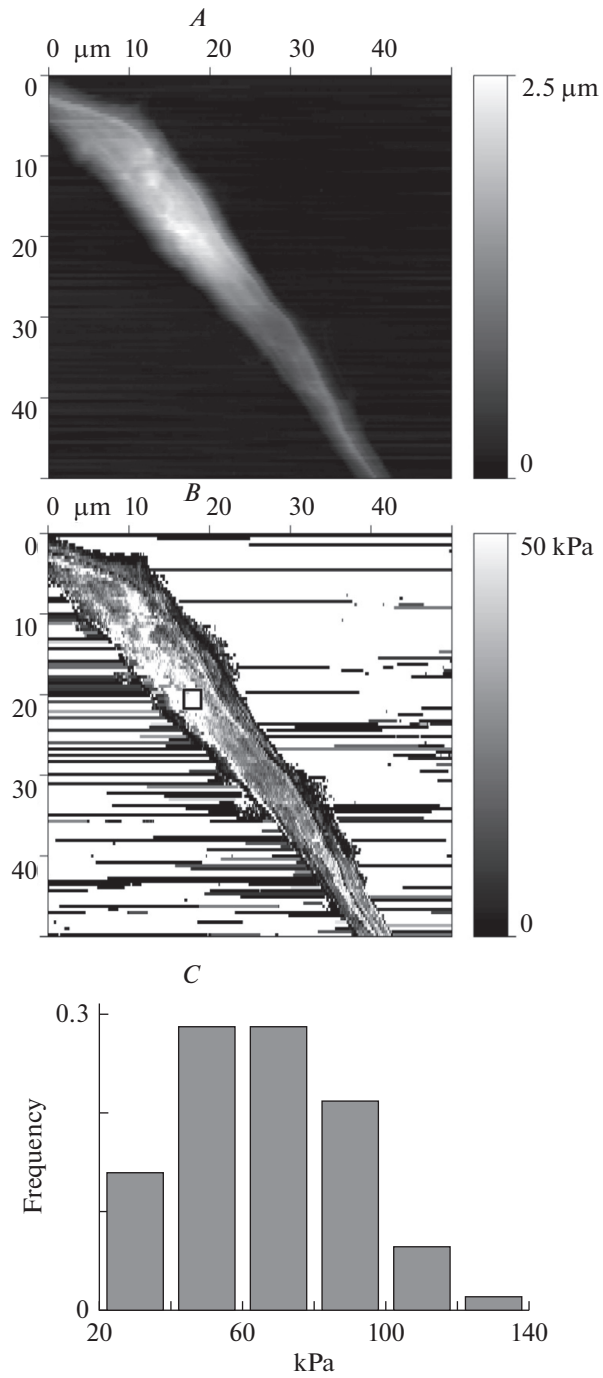
сигнальный каскад, направленный радиально на геном. В наших экспериментах это проявилось в снижении уровня флуоресценции антител к каналам  $\text{Na}_v1.8$ . Данный результат может трактоваться как уменьшение плотности распределения каналов в мембране сенсорного нейрона. Интенсивность флуоресценции антител к  $\text{Na}_v1.8$  каналам, культивированных в присутствии убаина, составила  $3.05 \pm 0.30$  о.е. ( $n = 23$ ), а в контроле  $4.06 \pm 0.50$  о.е. ( $n = 25$ ) (рис. 2С). Можно предположить, что ЭУ запускает внутриклеточный каскад, снижающий эффективность экспрессии генов *SCN10A*, продуцирующих каналы  $\text{Na}_v1.8$ . Этот радиально направленный сигнальный процесс происходит благодаря участию в нем комплекса  $\text{Na}_v\text{K-ATPase/Src}$ , который выполняет здесь свою трансдукторную функцию [5, 7]. Наши предварительные данные указывают на то, что дальнейшая передача сигнала должна здесь происходить благодаря активации р38 MAP-киназного каскада. Дальнейшие исследования позволят проверить это предположение. Другое предположение заключается в том, что ЭУ, активируя трансдукторный комплекс  $\text{Na}_v\text{K-ATPase/Src}$ , запускает еще один каскад, направленный тангенциально, который также модулирует функциональную активность каналов  $\text{Na}_v1.8$ .

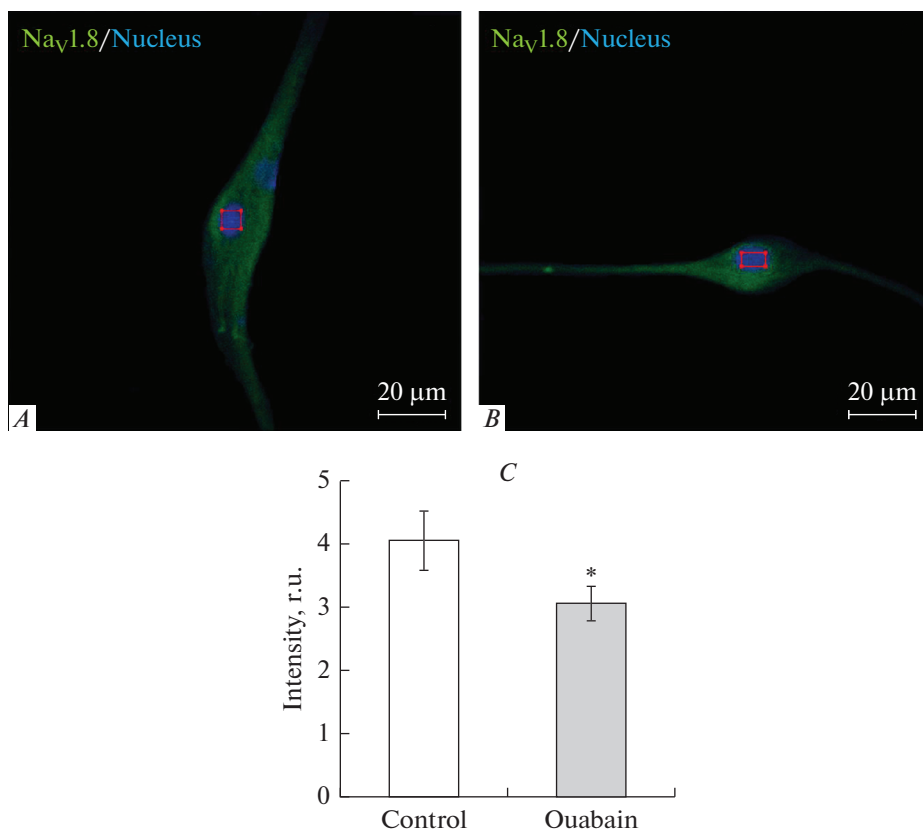
**Результаты исследований методом локальной фиксации потенциала.** На рис. 3 представлены результаты исследования влияния ЭУ на потенциалочувствительность каналов  $\text{Na}_v1.8$ . Было показано, что в отсутствие блокаторов приложение 10 нмоль/л убаина к наружной стороне мембраны приводило к снижению эффективного заряда ( $Z_{\text{eff}}$ ) активационного воротного устройства каналов  $\text{Na}_v1.8$  от контрольного значения  $6.7 \pm 0.4$  ( $n = 15$ ) до  $4.8 \pm 0.3$  ( $n = 10$ ). При предварительном добавлении во внутриклеточный раствор 10 мкмоль/л РР2 приложение ЭУ не приводило к изменению эффективного заряда ( $Z_{\text{eff}} = 6.3 \pm 0.3$  ( $n = 15$ )). Предварительное добавление во внутриклеточный раствор 10 мкмоль/л тамоксифена или 1 мкмоль/л КТ5720 приводило к снижению эффективного заряда соответственно до  $4.7 \pm 0.3$  ( $n = 17$ ) и  $4.6 \pm 0.3$  ( $n = 14$ ). Таким образом, с помощью ингибиторного анализа установлено, что в передаче сигнала вдоль нейрональной мембраны первичного сенсорного нейрона участвует Src-киназа. Ни протеинкиназа А, ни протеинкиназа С не участвуют в этом каскадном процессе, приводящем к модуляции эффективного заряда активационного воротного устройства каналов  $\text{Na}_v1.8$ .

Можно заключить, что запускаемый ЭУ тангенциальный сигнальный каскад, в первую очередь, активирует комплекс  $\text{Na}_v\text{K-ATPase/Src}$ , который, видимо, является важнейшим трансдукторным звеном для тангенциального и радиального распространения сигнала. В обоих случаях происходит снижение функциональной активности каналов  $\text{Na}_v1.8$ . На это указывают наши данные, полученные методами

**Рис. 1.** Пример экспериментальных АСМ-данных сенсорного нейрона. *A* – АСМ-топография сомы контрольного нативного сенсорного нейрона; *B* – АСМ-карта значений модуля Юнга по поверхности сенсорного нейрона (обозначена квадратная область, в рамках которой производился анализ значений параметра для данной клетки); *C* – гистограмма значений модуля Юнга по области анализа, показанной на *B*. АСМ-изображения получены со следующими параметрами сканирования: величина пиковой силы – 1 нН, частота строчной развертки – 0.1 Гц, амплитуда и частота вертикального движения зонда – 1 мкм и 250 Гц соответственно, размер кадра –  $512 \times 128$  точек, направление сканирования – справа налево.

**Fig. 1.** An example of experimental AFM data of a sensory neuron. *A* – AFM topography of the living sensory neuron soma (control data); *B* – AFM map of the Young's modulus values over the surface of the sensory neuron (the square region is indicated within which the parameter values for this cell were analyzed); *C* – histogram of the Young's modulus values over the analysis region shown in *B*. AFM images were obtained with the following imaging parameters: peak force setpoint – 1 nN, scan rate – 0.1 Hz, peak force amplitude and frequency – 1  $\mu\text{m}$ , and 250 Hz, respectively, the frame size –  $512 \times 128$  pixels, the scanning direction – from right to left.



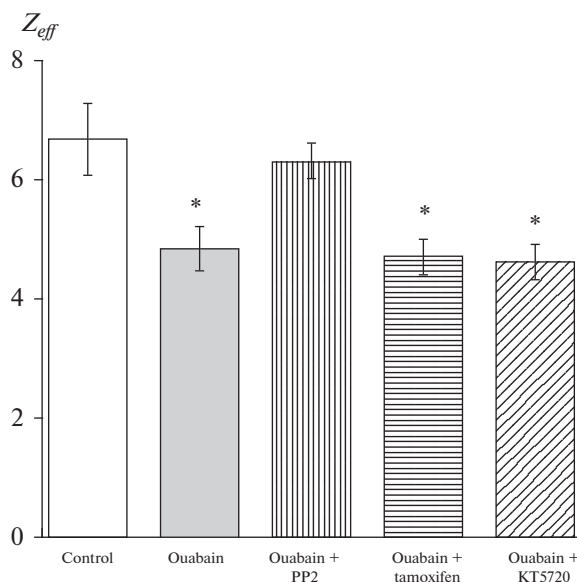


**Рис. 2.** Влияние ЭУ на плотность каналов  $\text{Na}_v1.8$  в первичном сенсорном нейроне. Диссоциированная культура сенсорных нейронов (3-и сутки культивирования) в контроле (A) и после воздействия ЭУ (B). Окраска антителами к каналам  $\text{Na}_v1.8$  (зеленый) и ядра DAPI (синий),  $\times 63$ . Красным прямоугольником отмечена область, в которой была измерена интенсивность флуоресценции каналов  $\text{Na}_v1.8$ . C – уменьшение интенсивности флуоресценции антител к каналам  $\text{Na}_v1.8$  в сенсорных нейронах после воздействия ЭУ. Ось Y – интенсивность флуоресценции в относительных единицах, о.е. ( $n = 23$  контрольные данные и  $n = 25$  после воздействия ЭУ). \* –  $p < 0.05$  ( $t$ -критерий Стьюдента).

**Fig. 2.** The effect of EO on the channel density of  $\text{Na}_v1.8$  in the primary sensory neuron. Dissociated culture of sensory neurons (3 days of cultivation) in control (A) and EO-treated (B). Neurons were immunostained using the antibodies to  $\text{Na}_v1.8$  channels (green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue),  $\times 63$ . Red box marks the area, within which fluorescence intensity of  $\text{Na}_v1.8$  channels was measured. C – A decrease in the fluorescence intensity of antibodies to  $\text{Na}_v1.8$  channels in sensory neurons after exposure to EO. The Y-axis shows the fluorescence intensity in relative units, r.u. ( $n = 23$  for control explants and  $n = 25$  for EO-treated explants). \* –  $p < 0.05$  (Student's  $t$  test).

локальной фиксации потенциала и иммунофлуоресцентного анализа. Несколько более косвенное подтверждение этому получено с помощью АСМ-метода. Очевидно, что снижение плотности встроенных в цитоплазматическую мембрану сенсорного нейрона каналов  $\text{Na}_v1.8$  должно приводить к большей однородности мембраны и, как следствие, к росту величины кажущегося модуля Юнга, т.е. к увеличению жесткости нервной клетки. Подчеркнем, что чувствительность используемых нами методов оказалась достаточной для выявления на молекулярном и клеточном уровнях эффектов наномолярных концентраций уабаина. Именно эти концентрации присутствуют в организме человека [6].





**Рис. 3.** Участие Src-киназы, PKC и PKA в процессах тангенциальной передачи сигнала, запускаемых ЭУ. Воздействие ЭУ приводит к снижению  $Z_{eff}$ . При предварительном добавлении во внутриклеточный раствор блокатора Src-киназы приложение ЭУ с внешней стороны мембраны не приводило к изменению эффективного заряда. Предварительное добавление во внутриклеточный раствор блокатора PKA или блокатора PKC приводило к снижению эффективного заряда. \* –  $p < 0.05$ .

**Fig. 3.** The participation of Src kinase, PKC and PKA in the processes of tangential signal transmission triggered by endogenous concentrations of ouabain.

Exposure to EO reduces  $Z_{eff}$ . When preliminary added to the intracellular solution of the Src-kinase blocker, the application of EO from the outer side of the membrane did not lead to a change in the effective charge value. The preliminary application of the PKA blocker or the PKC blocker to the intracellular solution led to a decrease in the effective charge. \* –  $p < 0.05$ .

В современной литературе широко обсуждается проблема физиологической роли “ненасосной” (non-pumping) функции Na,K-АТФазы, при этом результаты, полученные в различных лабораториях, приводят к противоположным выводам. Эти конфликтные данные подробно обсуждаются в обзоре [20]. На наш взгляд, суть проблемы заключается в том, что физиологическое действие эндогенного уабаина является не только ткане-, но и клеточноспецифическим. В отношении первичного сенсорного нейрона нам удалось за последние десятилетия выстроить непротиворечивую систему взглядов в отношении физиологической роли трансдукторной функции Na,K-АТФазы. При физиологически адекватных условиях молекула уабаина существует в виде кальциевого хелатного комплекса, который благодаря ион-ионному взаимодействию осуществляет лиганд-рецепторное связывание с соответствующим сайтом Na,K-АТФазы [4, 8]. Поскольку в примембранном пространстве свободный кальций существует в очень низких концентрациях, сопоставимых с концентрациями эндогенного уабаина, то, согласно нашему предположению, и “трансдукторный” сайт Na,K-АТФазы должен отличаться от другого сайта связывания “свободного” уабаина, который ингибирует насосную функцию этого белка при его действии в концентрациях на порядки больших. Применение метода локальной фиксации потенциала позволило нам зарегистрировать дозозависимость изменения величины  $Z_{eff}$  от концентрации уабаина. Полученная U-образная

зависимость хорошо аппроксимировалась суперпозицией двух уравнений Хилла, причем величины  $K_d$  составили 7 нмоль/л и 0.1 ммоль/л [4]. Исследование убаин-зависимого тока в нейронах дорзальных ганглиев взрослых крыс также предсказало существование двух сайтов связывания убаина, величины  $K_d$  которых были равны 0.2 и 140 мкмоль/л [21]. Наши эксперименты, проведенные методом органо-типической культуры ткани, подтвердили особую роль хелатного комплекса убаин- $\text{Ca}^{2+}$ : совместное применение убаина и ЭГТА, селективного хелатора ионов кальция, устраняло ингибирующее действие ЭУ на рост нейритов [8]. Мы предполагаем, что ЭУ и “свободный” убаин, выполняют две принципиально различные функции: первый запускает трансдукторную функцию  $\text{Na, K-ATФазы}$ , связываясь со “своим” трансдукторным сайтом, а молекула свободного убаина ингибирует насосную функцию этого белка. Это, в свою очередь, позволяет предположить, что сайты связывания убаина и хелатного комплекса убаин- $\text{Ca}^{2+}$  должны различаться. Связано ли это различие с особенностями лиганд-рецепторного связывания указанных молекул с единственным сайтом  $\text{Na, K-ATФазы}$  или с гетерогенностью ее изоформ, одни из которых служат насосами, а другие только трансдукторами, покажут дальнейшие исследования. Отметим, что в нейронах дорзальных ганглиев обнаружены две изоформы  $\text{Na, K-ATФазы}$ ,  $\alpha 1$  и  $\alpha 3$  [22–26].

Данные современной литературы указывают на то, что ЭУ может считаться гормоном, запускающим внутриклеточные каскадные сигнальные процессы [2, 27, 28]. Наши результаты свидетельствуют о том, что указанный агент является еще и нейрогормоном, активирующим в первичном сенсорном нейроне два каскадных процесса, один из которых направлен в тангенциальном направлении вдоль мембраны клетки к каналам  $\text{Na}_v 1.8$ , а другой - в радиальном направлении на геном [3, 4, 8].

В исследуемом нами первичном сенсорном нейроне выполнение трансдукторной функции  $\text{Na, K-ATФазы}$  не зависит от концентрации внутриклеточных ионов калия: наши эксперименты показали, что, как при нормальных физиологических условиях, так и при отсутствии этих ионов во внутриклеточном растворе,  $\text{Na, K-ATФаза}$  одинаково эффективно выполняла эту функцию, передавая сигналы на активационное воротное устройство каналов  $\text{Na}_v 1.8$  [3]. Конкуренция ионов калия с убаином может, видимо, проявляться только при выполнении насосной функции  $\text{Na, K-ATФазы}$ . Данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют о том, что в молекуле исследуемого белка сайт связывания убаина и сайт связывания двух ионов калия, переносимых внутрь клетки, структурно отличаются друг от друга [29]. Это позволяет заключить, что обнаруженная нами высокая чувствительность каналов  $\text{Na}_v 1.8$  к действию убаина не связана с изменением внутриклеточной концентрации ионов калия.

На наш взгляд, представляется маловероятным, что в ЦНС существует опиоидергический механизм регуляции насосной функцией  $\text{Na, K-ATФазы}$ , хотя такие гипотезы обсуждаются в литературе [30]. Наши данные указывают на то, что опиаты способны модулировать именно трансдукторную функцию указанного белка [3, 4] и влиять на функциональную активность каналов  $\text{Na}_v 1.8$ , что может объяснить сильную анальгетическую активность опиатов. Действительно, в арсенале клинической медицины отсутствуют безопасные и эффективные анальгетики, способные заменить опиаты, необходимость широкого применения которых для купирования хронической боли привела к возникновению опиоидного кризиса, происходящего в США и во многих других странах мира [31]. Настоящая работа показывает возможный альтернативный путь решения этой проблемы, основанный на результатах изучения каскадных процессов, запускаемых очень низкими концентрациями убаина в живых клетках. Этот подход позволил нам ранее разработать неопиоидный анальгетик “Аноцептин®”, который успешно прошел первую фазу клиниче-

ских исследований [32]. Его действующая субстанция, коеновая кислота, так же, как и ЭУ, снижает величину эффективного заряда активационного воротного устройства каналов  $\text{Na}_V1.8$ , причем, функцию трансдуктора сигнала в этом каскаде выполняет комплекс  $\text{Na}_v\text{K-ATPase/Src}$  [4, 5]. Благодаря своей эндогенной природе убаин в наномолярных концентрациях может оказаться не только абсолютно безопасным анальгетиком, но и настолько же эффективным, как и опиаты. Наши дальнейшие исследования позволят проверить это предположение.

### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-015-00079), а также в рамках финансирования Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 гг. (ГП-14, раздел 64).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kometiani P., Li J., Gnudi L., Kahn B.B., Askari A., Xie Z.* Multiple signal transduction pathways link  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 273(24): 15249–15256. 1998.
2. *Xie Z., Askari A.*  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.* 269: 2434–2439. 2002.
3. *Крылов Б.В., Дербенев А.В., Подзорова С.А., Людыно М.И., Кузьмин А.В., Изварина Н.Л.* Морфин уменьшает чувствительность к потенциалу медленных натриевых каналов. *Рос. физиол. журнал. им. И.М. Сеченова.* 85(2): 225–236. 1999. [*Krylov B.V., Derbenev A.V., Podzorova S.A., Lyudyno M., Kuz'min A.V., Izvarina N.L.* Morphine decreases the voltage sensitivity of slow sodium channels. *Ros. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova.* 85(2): 225–236. 1999. (In Russ)].
4. *Krylov B.V., Rogachevskii I.V., Shelykh T.N., Plakhova V.B.* *Frontiers in pain science. V. 1. New nonopioid analgesics: understanding molecular mechanisms on the basis of patch-clamp and quantumchemical studies.* Sharjah, U.A.E. Bentham Science Publishers Ltd. 2017.
5. *Pennyaynen V.A., Plakhova V.B., Rogachevsky I.V., Terekhin S.G., Podzorova S.A., Krylov B.V.* Molecular mechanisms and signaling by comenic acid in nociceptive neurons influence the pathophysiology of neuropathic pain. *Pathophysiology.* 26 (3–4): 245–252. 2019.
6. *Kawamura A., Guo J., Itagaki Y., Bell C., Wang Y., Hauptert G.T. Jr., Magil S., Gallagher R.T., Berova N., Nakanishi K.* On the structure of endogenous ouabain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 6654–6659. 1999.
7. *Plakhova V.B., Pennyaynen V.A., Yachnev I.L., Rogachevskii I.V., Podzorova S.A., Krylov B.V.* Src kinase controls signaling pathways in sensory neuron triggered by low-power infrared radiation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 97(5): 400–406. 2019.
8. *Lopatina E.V., Yachnev I.L., Pennyaynen V.A., Plakhova V.B., Podzorova S.A., Shelykh T.N., Rogachevsky I.V., Butkevich I.P., Mikhailenko V.A., Kipenko A.V., Krylov B.V.* Modulation of signal-transducing function of neuronal membrane  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief. *Med. Chem.* 8(1): 33–39. 2012.
9. *Chambers J.C., Zhao J., Terracciano C.M., Bezzina C.R., Zhang W., Kaba R., Navaratnarajah M., Lotlikar A., Sehmi J.S., Kooner M.K., Deng G., Siedlecka U., Parasramka S., El-Hamamsy I., Wass M.N., Dekker L.R., de Jong J.S., Sternberg M.J., McKenna W., Severs N.J., de Silva, Wilde A.A., Anand P., Yacoub M., Scott J., Elliott P., Wood J.N., Kooner J.S.* Genetic variation in SCN10A influences cardiac conduction. *Nat. Genet.* 42: 149–152. 2010.
10. *Khalisov M.M., Ankudinov A.V., Pennyaynen V.A., Dobrota D., Krylov B.V.* Application of atomic force microscopy for investigation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase signal-transducing function. *Acta Physiol. Hung.* 102 (2): 125–130. 2015.
11. *Kuznetsova T.G., Starodubtseva M.N., Yegorenkov N.I., Chizhik S.A., Zhdanov R.I.* Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron.* 38(8): 824–833. 2007.
12. *Gavara N.* A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics. *Microsc. Res. Tech.* 80(1): 75–84. 2017.
13. *Sneddon I.N.* The relation between load and penetration in axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int. J. Engr. Sci.* 3: 47–57. 1965.
14. *Nečas D., Klapetek P.* Gwyddion. An open-source software for SPM data analysis. *Cent. Eur. J. Phys.* 10(1): 181–188. 2012.
15. *Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.* Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391(1): 85–100. 1981.

16. Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. Effect of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells. *Nature*. 257(5528): 691–693. 1975.
17. Elliott A.A., Elliott J.R. Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J. Physiol. (London)*. 463(4): 39–56. 1993.
18. Osipchuk Y., Timin E. Electrical measurements on perfused cells. In: Kostyuk P.G., Krishtal O.A. Eds. *Intracellular perfusion of excited cells*. New York. Wiley. 1984.
19. Almers W. Gating currents and charge movements in excitable membranes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 82: 97–190. 1978.
20. Askari A. The sodium pump and digitalis drugs: Dogmas and fallacies. *Pharmacol. Res. Perspect.* 7(4): e00505. 2019.
21. Hamada K., Matsuura H., Sanada M., Toyoda F., Omatsu-Kanbe M., Kashiwagi A., Yasuda H. Properties of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump current in small neurons from adult rat dorsal root ganglia. *Br. J. Pharmacol.* 138(8): 1517–1527. 2003.
22. Mata M., Siegel G.J., Hieber V., Beaty M.W., Fink D.J. Differential distribution of Na,K-ATPase isoform mRNAs in the peripheral nervous system. *Brain Res.* 546: 47–54. 1991.
23. Dobretsov M., Hastings S.L., Sims T.J., Stimers J.R., Romanovsky D. Stretch receptor-associated expression of alpha 3 isoform of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in rat peripheral nervous system. *Neuroscience*. 116(4): 1069–1080. 2003.
24. Dobretsov M., Stimers J.R. Neuronal function and  $\alpha 3$  isoform of the Na/K-ATPase. *Front. Biosci.* 10: 2373–2396. 2005.
25. Romanovsky D., Moseley A.E., Mrak R.E., Taylor M.D., Dobretsov M. Phylogenetic preservation of alpha3 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase distribution in vertebrate peripheral nervous systems. *J. Comp. Neurol.* 500(6): 1106–1116. 2007.
26. Paul D., Soignier R.D., Minor L., Tau H., Songu-Mize E., Gould H.J. 3rd. Regulation and pharmacological blockade of sodium-potassium ATPase: a novel pathway to neuropathy. *J. Neurol. Sci.* 340(1–2): 139–143. 2014.
27. Hamlyn J.M., Blaustein M.P., Bova S., DuCharme D.W., Harris D.W., Mandel F., Mathews W.R., Ludens J.H. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(14): 6259–6263. 1991.
28. Hamlyn J.M., Blaustein M.P. Endogenous ouabain: recent advances and controversies hypertension. 68(3): 526–532. 2016.
29. Ogawa H., Cornelius F., Hirata A., Toyoshima C. Sequential substitution of K<sup>+</sup> bound to Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase visualized by X-ray crystallography. *Nat. Commun.* 6: 8004. 2015.
30. Deng H., Yang Z., Li Y., Bao G., Friedrich T., Gu Q., Shen X., Schwarz W. Interactions of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and co-expressed delta-opioid receptor. *Neurosci. Res.* 65(3): 222–227. 2009.
31. Chang A.K., Bijur P.E., Esses D., Barnaby D.P., Baer J. Effect of a single dose of oral opioid and nonopioid analgesics on acute extremity pain in the emergency department. A randomized clinical trial. *JAMA.* 318(17): 1661–1667. 2017.
32. Лопатина Е.В., Поляков Ю.И. Синтетический анагетик аноцептин: результаты доклинических и клинических исследований. *Эфферентная терапия*. 17(3): 79–81. 2011. [Lopatina E.V., Polyakov Yu.I. Synthetic analgesic anocetpin: results of preclinical and clinical studies. *Efferent Therapy*. 17(3): 79–81. 2011. (In Russ)].

### Possible Antinociceptive Mechanisms Triggered by Nanomolar Concentrations of Ouabain in Primary Sensory Neurons

V. A. Penniyaynen<sup>a</sup>, M. M. Khalisov<sup>a</sup>, S. A. Podzorova<sup>a</sup>, A. V. Ankudinov<sup>b</sup>,  
V. B. Plakhova<sup>a</sup>, and B. V. Krylov<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences,  
St. Petersburg, Russia*

<sup>b</sup>*The Ioffe Physical-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences,  
St. Petersburg, Russia*

\*e-mail: krylov@infran.ru

The responses of the primary sensory neuron to the effect of subnanomolar and nanomolar concentrations of ouabain, which correspond to its endogenous concentrations (EO), were investigated. By the method of atomic force microscopy (AFM) it was found that the effect of EO led to an increase in the stiffness of the neuron. It was found using the patch-clamp method that due to the ligand-receptor binding of EO to the Na,K-ATPase/Src complex, the effective charge of the activation gating system of Na<sub>v</sub>1.8 channels decreases. It was also found that EO-activated triggering of the intra-

cellular cascade, in which the Na,K-ATPase/Src complex acts as a signal transducer, leads to a decrease in the fluorescence intensity of antibodies to Na<sub>v</sub>1.8 channels, which was revealed using confocal laser scanning microscopy. The results obtained allowed us to suggest that EO, triggering the transducer function of the Na,K-ATPase/Src complex and the corresponding intracellular signaling cascade, is able to modulate the expression of the *SCN10A* gene, which produces the Na<sub>v</sub>1.8 channels responsible for encoding nociceptive signals.

*Keywords:* sensory neuron, Na,K-ATPase, ouabain, confocal laser scanning microscopy, atomic force microscopy, patch-clamp method, Na<sub>v</sub>1.8 channel

#### ЦИТИРОВАТЬ:

Пеннийянен В.А., Халисов М.М., Подзорова С.А., Анкудинов А.В., Плахова В.Б., Крылов Б.В. Возможные антиноцицептивные механизмы, запускаемые наномолярными концентрациями убаина в первичных сенсорных нейронах. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(10): 1289–1301.

DOI: 10.31857/S0869813920100088

#### TO CITE THIS ARTICLE:

Penniyaynen V.A., Khalisov M.M., Podzorova S.A., Ankudinov A.V., Plakhova V.B., Krylov B.V. Possible Antinociceptive Mechanisms Triggered by Nanomolar Concentrations of Ouabain in Primary Sensory Neurons. Russian Journal of Physiology. 106(10): 1289–1301.

DOI: 10.31857/S0869813920100088