

————— ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ —————

ИНГИБИТОР Na^+/K^+ -АТФАЗЫ УАБАИН ПО-РАЗНОМУ ВЛИЯЕТ
НА ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОЗБУЖДАЮЩИХ
И ТОРМОЗНЫХ НЕЙРОНОВ ЭНТОРИНАЛЬНОЙ КОРЫ

© 2023 г. Е. Ю. Прокскурина^{1, 2, *}, Д. С. Синяк², А. В. Зайцев²

¹Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия

²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: elena.yu.proskurina@gmail.com

Поступила в редакцию 19.11.2022 г.

После доработки 02.08.2023 г.

Принята к публикации 08.08.2023 г.

Na^+/K^+ -АТФаза обеспечивает поддержание потенциала покоя в нейроне и трансмембранный градиента катионов K^+ и Na^+ , воздействуя таким образом на ионный транспорт и регулируя клеточный объем. Мутации генов Na^+/K^+ -АТФазы, ослабляющие ее функционирование, если не являются летальными, могут приводить к существенным нарушениям функционирования нервной системы, в том числе к развитию эпилепсии. В разных классах нейронов экспрессируются различные формы Na^+/K^+ -АТФазы, различающиеся по своим характеристикам. Поэтому ослабление функций Na^+/K^+ -АТФазы может по-разному сказываться на функционировании тормозных и возбуждающих нейронов. В данной работе мы исследовали, какие электрофизиологические характеристики пирамидных клеток и быстроразряжающихся интернейронов изменяются под действием антагониста Na^+/K^+ -АТФазы уабаина и как он влияет на синаптическую передачу. Мы выявили, что 5 мКМ уабаина деполяризует мембранный потенциал покоя обоих типов нейронов, уменьшает амплитуду и увеличивает длительность потенциала действия пирамидных нейронов. У быстроразряжающихся интернейронов уабаин уменьшал амплитуду следовой гиперполяризации. У обоих типов нейронов понижался порог генерации потенциала действия и ток, при котором возникает деполяризационный блок. Прочие электрофизиологические характеристики нейронов не менялись при добавлении уабаина. Кроме того, уабаин приводил к быстрому ослаблению ГАМКергической передачи, при этом на возбуждающую синаптическую передачу он не оказывал влияния. Эти новые данные об эффектах действия уабаина на возбуждающие пирамидные нейроны и тормозные интернейроны помогают лучше понять механизм изменения баланса возбуждения и торможения в нервных сетях при ослаблении функций Na^+/K^+ -АТФазы.

Ключевые слова: уабаин, Na^+/K^+ -АТФаза, энторинальная кора, пирамидные клетки, быстроразряжающиеся интернейроны, потенциал действия

DOI: 10.31857/S086981392309008X, **EDN:** OROECO

ВВЕДЕНИЕ

В клетках животных, в том числе нейронах, экспрессируется Na^+/K^+ -АТФаза, обеспечивающая градиент ионов натрия и калия внутри и снаружи клетки. Разница кон-

центраций этих моновалентных ионов необходима для поддержания мембранныго потенциала покоя и реализации таких функций нейрона, как генерация потенциала действия, поддержание ионного гомеостаза, регуляция метаболизма, осмоса, объема клетки и жизненного цикла [1, 2]. Na^+/K^+ -АТФаза является и энзимом, АТФазой, и ионной помпой. Она состоит из трех субъединиц – α , β и γ [3, 4]. Субъединица α ответственна за ионный транспорт, содержит сайт связывания молекулы АТФ и сайт фосфорилирования. Внеклеточный домен и переходная область содержат сайты связывания специфического антагониста Na^+/K^+ -АТФазы убацина и других кардиогликозидов, которые тормозят работу Na^+/K^+ -АТФазы. Субъединица β усиливает эффективность трансляции и стабильность α -субъединицы, а γ -субъединица влияет на аффинность для ионов Na^+ , K^+ и молекулы АТФ, на кинетику и транспорт, а также стабилизирует Na^+/K^+ -АТФазу [3, 4]. В нейронах млекопитающих экспрессируются $\alpha 1$ -, $\alpha 3$ - и $\beta 2$ -субъединицы, тогда как в глии – $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и $\beta 1$ -субъединицы. Показано, что α -субъединицы различаются по сродству к ионам Na^+ и к убацину. У крыс $\alpha 1$ -изоформа Na^+/K^+ -АТФазы обладает необычно низким сродством к убацину по сравнению с $\alpha 2$ - или $\alpha 3$ -изоформами [5, 6]. Рассчитанные значения IC₅₀ составляет >10 мкМ для $\alpha 1$ - и только 10–500 нМ для $\alpha 2$ - и $\alpha 3$ -изоформ [5]. Повышение внутриклеточной концентрации ионов Na^+ увеличивает активность Na^+/K^+ -АТФазы, однако $\alpha 3$ -изоформа имеет более низкую аффинность к ионам Na^+ – $K_{0.5} = 25–50$ мМ, для других изоформ $K_{0.5} = 10$ мМ [4, 7, 8]. Таким образом, $\alpha 3$ -изоформа будет подключаться при высокой активности нейронов, наблюдаемой, например, при эпилептической активности. Предполагается, что $\alpha 3$ -изоформа может преобладать в нейронах, которые могут поддерживать высокую частоту разрядов [9, 10].

Нарушение функций Na^+/K^+ -АТФазы в результате мутаций может приводить к существенным нарушениям функций нервной системы и в том числе возникновению эпилепсии у человека [11–13]. У мышей линии Myk/+ мутация I810N, которая делает неактивной $\alpha 3$ -АТФазу, наблюдаются сложные парциальные и вторично-генерализованные припадки, значительное снижение порога гиппокампальных судорог *in vitro*, посттетаническая возбудимость гиппокампального пути CA3–CA1 и дегенерация нейронов в гиппокампе [14]. Однако конкретные молекулярные и клеточные механизмы гипервозбудимости нейронных сетей при ослаблении функций Na^+/K^+ -АТФазы требуют дальнейшего изучения.

Один из часто применяемых фармакологических подходов для изучения роли Na^+/K^+ -АТФазы – это использование ингибиторов Na^+/K^+ -АТФазы. В срезах сенсомоторной коры ювенильных крыс было показано, что как пирамидные клетки, так и быстроразряжающиеся интернейроны деполяризуются на 3–10 мВ в ответ на 30-секундную перфузию дигидробаина (100 мкМ), частичного блокатора Na^+/K^+ -АТФазы [15]. Было выявлено, что ингибирование Na^+/K^+ -АТФазы с помощью дигидроубацина не влияет на входное сопротивление нейронов. Основным же открытием было то, что в состоянии покоя плотность тока, характеризующая активность Na^+/K^+ -АТФазы, быстроразряжающихся интернейронов была в 3–7 раз выше, чем пирамидных нейронов. Плотность тока рассчитывалась как отношение деполяризации, вызванной дигидроубаином, к входному сопротивлению и емкости мембранны [15].

На первичной культуре нейронов коры крысы было показано, что Na^+/K^+ -АТФаза в основном колокализована с возбуждающими постсинапсами [16]. Было определено наличие связи между $\alpha 1$ -изоформой Na^+/K^+ -АТФазы и GluA2-субъединицей AMPA-рецептора. Также было показано, что спустя 1 ч после аппликации 50 мкМ

уабаина уменьшается количество GluA1 на 56% и GluA2/3 на 80%. Уабаин приводит также к долговременной депрессии АМРА-синаптической передачи.

Однако в настоящее время эффекты антагониста Na^+/K^+ -АТФазы уабаина на многие электрофизиологические свойства возбуждающих и тормозных нейронов до сих пор не описаны. Поэтому в данной работе мы изучили эффект уабаина на электрофизиологические свойства пирамидных клеток и быстроразряжающихся интернейронов энторинальной коры, а также на синаптическую передачу.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приготовление переживающих срезов энторинальной коры и гиппокампа

В эксперименте использовали взрослых мышей C57BL/6 ($n = 16$), а для оценки коэффициента парных импульсов – 21-дневных крыс Вистар ($n = 6$). Животных содержали в стандартных условиях (соотношение день/ночь составило 12 ч/12 ч, температура $24 \pm 4^\circ\text{C}$) со свободным доступом к корму и воде. Эксперименты выполняли в соответствии с требованиями Комитета по биоэтике ИЭФБ РАН, разработанными на основе международных рекомендаций European Communities Council Directive 1986 (86/609/EEC).

Метод приготовления горизонтальных срезов энторинальной коры и гиппокампа подробно описан ранее [17]. Кратко: после анестезии мышей (крыс) декапитировали, затем быстро извлекали головной мозг и помещали его в охлажденную до 0°C низконатриевую искусственную спинномозговую жидкость (ИСМЖ), аэрируемую газовой смесью 95% O_2 + 5% CO_2 , следующего состава (в мМ): 110 N -метил-D-глюкамин, 2.5 KCl , 1.2 NaH_2PO_4 , 10 MgSO_4 , 0.5 CaCl_2 , 25 NaHCO_3 , 25 D-глюкозы. Срезы мозга толщиной 300 мкм нарезали на вибротоме MicromHM 650V (ThermoFisher Scientific, США) и помещали в аэрируемую ИСМЖ при 35°C . ИСМЖ содержала следующие компоненты (в мМ): 126 NaCl , 2.5 KCl , 1.25 NaH_2PO_4 , 1 MgSO_4 , 2 CaCl_2 , 24 NaHCO_3 , 10 D-глюкозы.

Регистрация ответов нейрона методом патч-кламп “целая клетка”

Изготовленные срезы перемещали в перфузируемую камеру, нейроны глубоких слоев энторинальной коры визуализировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse FN1 (Nikon, Япония), оснащенного водно-иммерсионным объективом (40 \times), оптическим блоком для дифференциального контраста и цифровой камерой Grasshopper3 GS3-U3-23S6M-C (FLIR, США). Электрофизиологическую регистрацию проводили с помощью усилителя HEKA EPC-10 USB (HEKA Electronic, Германия) и программного обеспечения PatchMaster v2x90.4 (HEKA Electronic).

Запись активности нейрона энторинальной коры производили методом патч-кламп “целая клетка” в режиме фиксации тока, постсинаптические токи записывали методом патч-кламп “целая клетка” в режиме фиксации потенциала на -77 или $+3$ мВ. Для записей в режиме фиксации тока использовался внутриклеточный калий-глюконатный раствор следующего состава (в мМ): 135 К-глюконат, 10 NaCl , 5 EGTA, 10 HEPES, 4 ATP-Mg и 0.3 GTP (рН был доведен до 7.25 с помощью KOH). Для записей в режиме фиксации потенциала использовался цезий-метансульфонатный раствор (в мМ): 127 CsMeS, 10 NaCl , 5 EGTA, 10 HEPES, 6 QX314, 4 ATP-Mg и 0.3 GTP (рН был доведен до 7.25 с помощью CsOH).

Критерии поиска пирамидных клеток и быстроразряжающихся интернейронов

Пирамидные клетки в глубоких слоях коры выбирали по следующим критериям: тело нейрона пирамидальной формы, хорошо различим апикальный дендрит

нейрона, а на ступеньку тока нейрон отвечает регулярными пачками потенциалов действия с выраженной частотной адаптацией. Коэффициент адаптации (Cad), рассчитываемый как отношение последнего межспайкового интервала в ответе на ступеньку тока к первому, всех пирамидных нейронов в группе составлял не менее 1.6. Быстроразряжающиеся интернейроны отбирали по следующим критериям: тепло нейрона круглое или в виде вертикального овала, расположено преимущественно в слоях 2–3 коры, дендритное дерево мультиполлярное, а на ступеньку тока нейрон дает высокочастотный спайковый ответ без адаптации. Ширина спайка быстроразряжающегося интернейрона на полувысоте была не более 0.7 мс.

Электрофизиологические характеристики нейрона

Электрофизиологические свойства нейрона изучали с помощью протокола, согласно которому подавали ступеньки гиперполяризующего и деполяризующего тока нарастающей амплитуды и длительностью 1.5–2 с. Мембранный потенциал покоя (RMP) измеряли как средний мембранный потенциал нейрона при нулевой ступеньке тока сразу после прорыва мембранны. Реобаза (Rb) – это минимальная амплитуда тока, при которой генерируется потенциал действия, деполяризационный блок (DB) – это минимальный ток, при котором происходит срыв генерации потенциалов действия. Входное сопротивление (Rin) рассчитывали как коэффициент наклона вольт-амперной характеристики в интервале от –60 до 0 пА. Стационарная частота спайков определялась как число спайков за последнюю секунду ответа на ступеньку тока, FR_{max} – это максимальная стационарная частота для нейрона. Коэффициент адаптации спайков CAd рассчитывался как отношение последнего межспайкового интервала к первому в записи с максимальной частотой спайков. Порог генерации потенциала действия (VT) определялся как точка, где прирост потенциала превышал значение 10 мВ/мс. Амплитуда, ширина и следовая гиперполяризация измерялись для первого спайка при токе реобазы. Амплитуда спайка (APA) определялась как разница между пиком и порогом, ширина спайка (APD) измерялась на полувысоте, следовая гиперполяризация (ANP) рассчитывалась как разница между порогом и минимальным потенциалом после спайка.

Тест парных импульсов

Два электрических импульса с амплитудой тока 50–150 мкА длительностью 100 мкс с интервалом 50 мс подавались посредством внеклеточного биполярного никромового электрода, установленного в глубоких слоях энторинальной коры. В радиусе 100–200 мкм от стимулирующего электрода осуществлялась регистрация постсинаптических токов пирамидного нейрона методом патч-кламп в конфигурации “целая клетка” в режиме фиксации потенциала. Для анализа возбуждающих постсинаптических токов потенциал удерживался на –77 мВ, для анализа тормозных – на +3 мВ. Амплитуда первого ответа измерялась как разница между базовой линией и максимальным значением. Базовая линия определялась как среднее значение за последние 5 мс перед импульсом. В завершении рассчитывался коэффициент парных импульсов (КПИ) как отношение средней амплитуды второго ответа к средней амплитуде первого ответа.

Реактивы

Все реактивы, использованные в работе, были произведены компанией Sigma-Aldrich (США). Для блокады Na^+/K^+ -АТФазы использовался убацин (5 мкМ).

Статистическая обработка данных

Анализ первичных электрофизиологических данных производился с использованием программы Clampfit 10.5.2.6 (MolecularDevices, США). Для статистической обработки данных использовалась среда R-Studio2022.02.2 (R-ToolsTechnology, Канада). Нормальность распределения данных оценивалась по критерию Колмогорова–Смирнова. Эффект действия блокатора оценивался с помощью парного *t*-теста. Все значения приведены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Влияние уабаина на электрофизиологические характеристики пирамидных нейронов и быстроразряжающихся интернейронов энторинальной коры мыши

Для того чтобы определить эффект ингибиции Na^+/K^+ -АТФазы на электрофизиологические свойства нейронов, были записаны ответы нейрона энторинальной коры в срезах мозга взрослой мыши на ступеньки тока разной амплитуды длительностью 2 с методом патч-кламп “целая клетка” в контрольных условиях (раствор Рингера) и после аппликации уабаина (5 мкМ). Мы сравнили действие ингибитора Na^+/K^+ -АТФазы на возбуждающие и тормозные интернейроны. В группу возбуждающих нейронов были включены пирамидные клетки с регулярной спайковой активностью (Руг), а в группу тормозных нейронов – быстроразряжающиеся интернейроны (FS).

1.1. Уабайн деполяризует мембранный потенциал нейронов, но не влияет на входное сопротивление мембраны

Входное сопротивление, определяемое как угол наклона вольт-амперной характеристики (рис. 1), в контрольных условиях составило 175 ± 22 МОм ($n = 8$) для пирамидных клеток и 271 ± 50 МОм ($n = 5$) для быстроразряжающихся интернейронов. Уабайн 5 мкМ не повлиял на входное сопротивление обоих типов клеток (парный *t*-тест, Руг: $p = 0.16$, $n = 8$; FS: $p = 0.6$, $n = 5$). Мембранный потенциал покоя (RMP) пирамидных нейронов повысился на 5 мВ ($p < 0.01$), а FS интернейронов на 3 мВ ($p < 0.05$) под действием уабаина.

1.2. Характеристики паттерна потенциалов действия нейронов

Репрезентативные примеры спайковой активности нейронов в ответ на ступеньку тока приведены на рис. 2а, б. На рис. 2с, д отражены частотно-токовые кривые этих нейронов соответственно. Пирамидные клетки энторинальной коры по своим электрофизиологическим свойствам подразделялись на два класса, как было показано ранее [18]: классические регулярно разряжающиеся нейроны с высоким коэффициентом адаптации и нейроны с длительной задержкой потенциалов действия. В среднем коэффициент адаптации (ISIlast/ISI1) для пирамидных клеток составил 2.1 ± 0.3 ($n = 7$), а максимальная стационарная частота спайков 19 ± 4 Гц ($n = 8$). Быстроразряжающиеся интернейроны обладали высокой частотой спайков 98 ± 15 Гц ($n = 15$) и слабой адаптацией 1.42 ± 0.05 ($n = 7$). Уабайн не изменил коэффициент адаптации нейронов (парный *t*-тест, Руг: $p = 0.2$, $n = 7$; FS: $p = 0.14$, $n = 4$, рис. 2е), а максимальную частоту разрядов уменьшил у пирамидных клеток (Руг: $p < 0.05$; FS: $p = 0.14$, рис. 2f).

Ток, достаточный для генерации потенциала действия (ток реобазы, Rb), в контрольных условиях был 91 ± 11 пА ($n = 8$) для пирамидных клеток и 73 ± 23 пА ($n = 4$) для FS. Уабайн уменьшил ток реобазы быстроразряжающихся интернейронов, но не изменил его для пирамидных клеток (рис. 2g, парный *t*-тест, Руг: $p = 0.2$; FS: $p < 0.05$).

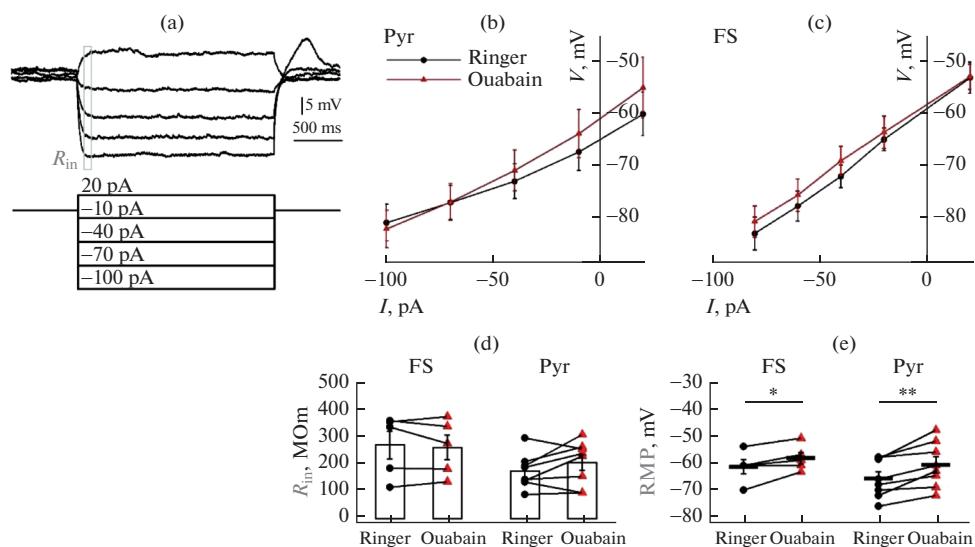


Рис. 1. Влияние уабаина (5 мкМ) на пассивные мембранные свойства пирамидных нейронов (Рур) и быстроразряжающихся интернейронов (FS) энторинальной коры. (а) – мембранный потенциал для заданного значения тока определялся в начале действия тока, как показано на репрезентативном примере. (б–с) – вольт-амперные характеристики пирамидных клеток (б) и быстроразряжающихся интернейронов (с) в контроле (Ringer, кружок) и после добавления уабаина (Ouabain, треугольник). Данные приведены как среднее значение \pm стандартная ошибка. (д–е) – статистические данные для входного сопротивления мембрани (Rin) и мембранныго потенциала покоя (RMP), парный t-тест, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

При этом деполяризационный блок (DB) возникал при существенно меньшем токе после ингибиции Na^+/K^+ -АТФазы у обоих типов клеток (Рур: $p < 0.001$; FS: $p < 0.01$, рис. 2h). Таким образом, уабайн подействовал схожим образом на входные-выходные функции возбуждающих и тормозных нейронов, а именно сократил диапазон передаточной функции.

1.3. Уабайн дифференциально изменяет форму потенциала действия у пирамидных клеток и интернейронов

После применения уабаина, форма потенциала действия у пирамидных нейронов существенно изменилась: полуширина увеличилась на 20% (парный t-тест, $p < 0.001$, $n = 8$, рис. 3a, c), амплитуда уменьшилась на 15% (рис. 3d), порог генерации потенциала действия понизился после добавления уабаина на 1.5 мВ (рис. 3e), однако следовая гиперполяризация не изменилась (рис. 3f). У быстроразряжающихся интернейронов ($n = 5$) мы не выявили значимых изменений полуширины и амплитуды (рис. 3c–d), однако порог генерации потенциала действия понизился на 2.7 мВ (рис. 3e), а следовая гиперполяризация уменьшилась на 5 мВ (рис. 3f). Таким образом, уабайн существенно изменяет форму спайков как пирамидного, так и быстроразряжающегося нейронов.

1.4. Влияние уабаина на синаптическую передачу

Для оценки влияния уабаина на синаптическую передачу мы применили метод парной стимуляции. Сначала мы зарегистрировали вызванные синаптические то-

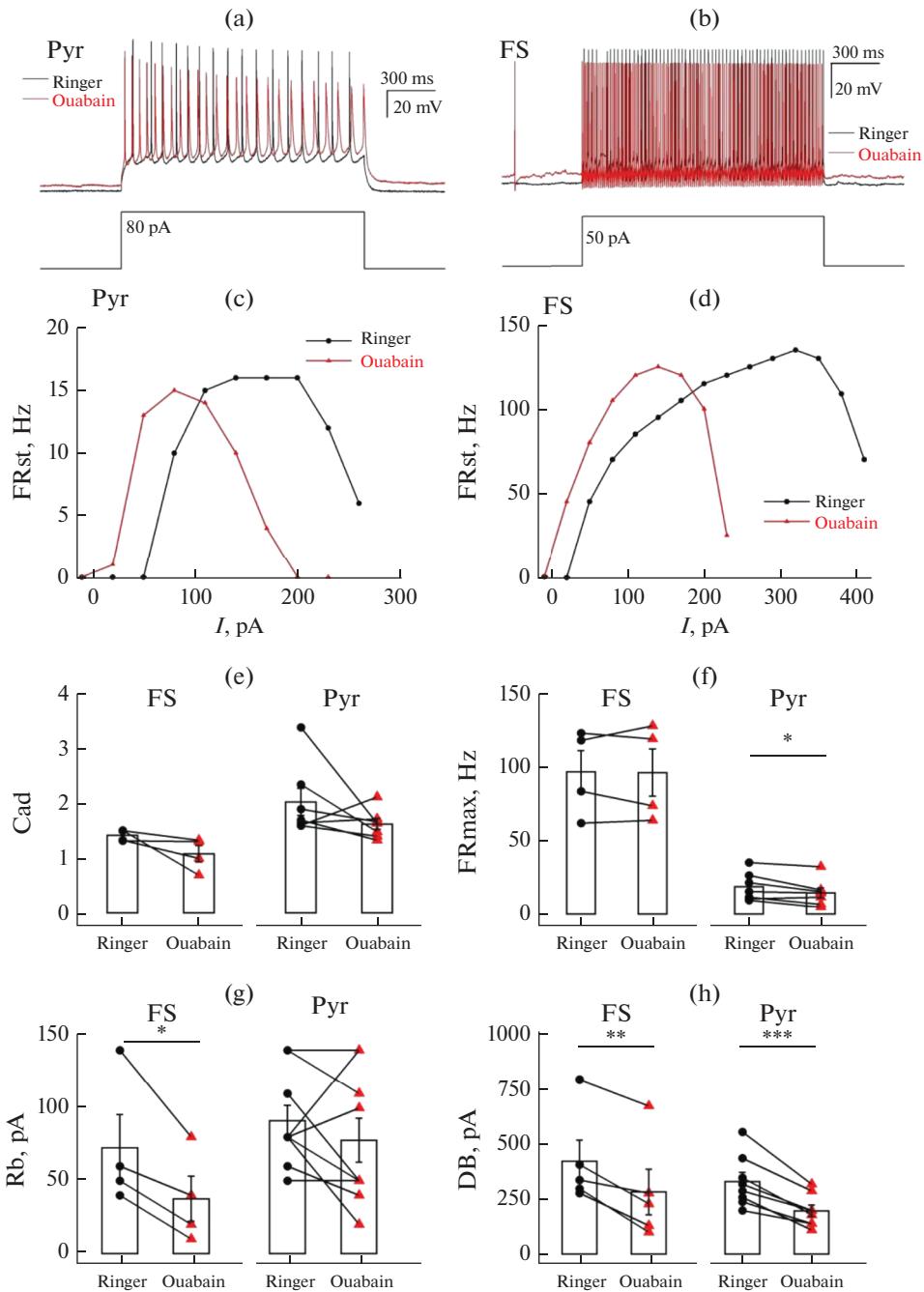


Рис. 2. Эффект уабаина на спайковую активность нейронов. (а–б) – репрезентативные примеры ответов пирамидного (а) и быстроразряжающегося (б) нейронов на ступеньку тока в контрольных условиях (Ringer) и после добавления уабаина. (с–д) – частотно-токовые кривые соответствующих нейронов. (е–г) – статистические данные для коэффициента адаптации (CAd), максимальной стационарной частоты разрядов нейрона (FRmax), тока реобазы (Rb) и деполяризационного блока (DB), парный *t*-тест, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

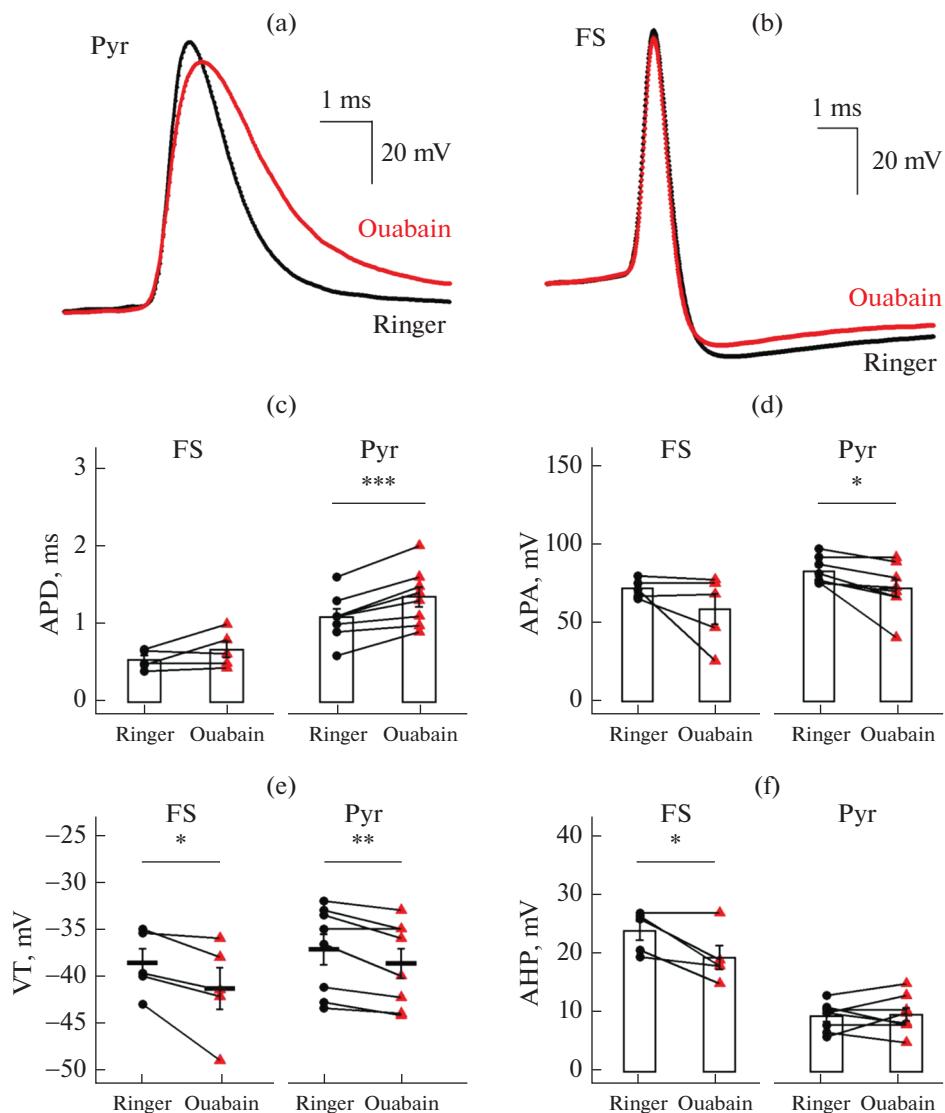


Рис. 3. Убабайн изменяет форму спайка пирамидного (Руг) и быстроразряжающегося (FS) нейронов. (а) – пример первого спайка пирамидной клетки при токе реабазы в контроле (Ringer) и после добавления убабайна (Ouabain); (б) – для FS интернейрона аналогично (а); (с–ф) – статистические данные для электрофизиологических характеристик быстроразряжающихся интернейронов и пирамидных клеток до и после добавления убабайна, длительность (APD) и амплитуда (APA) потенциала действия, порог генерации потенциала действия VT и следовая гиперполяризация (AHP) соответственно. Парный *t*-тест **p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001.

ки в ответ на парную внеклеточную стимуляцию до и спустя 10 мин после аппликации убабайна (5 мкМ) в перфузирующий раствор. Регистрацию ответов проводили при потенциале -77 мВ, что примерно соответствует потенциалу реверсии токов через ГАМКа-рецепторы, и при потенциале $+3$ мВ, что примерно соответствует потенциалу реверсии токов через ионотропные глутаматные рецепторы. Это позволило нам

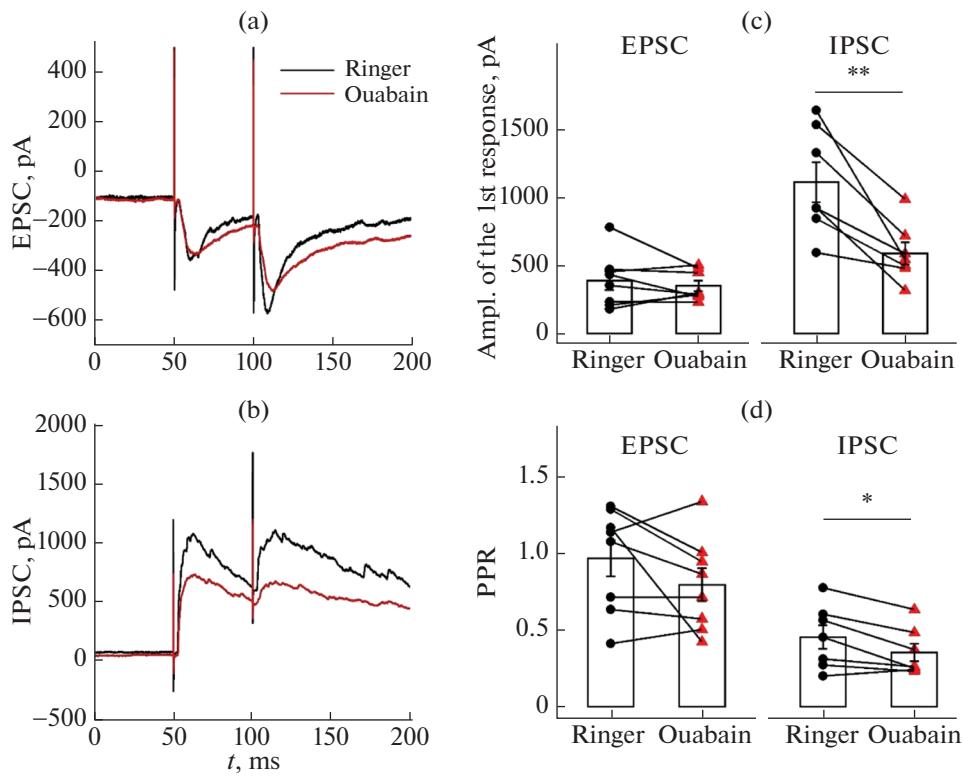


Рис. 4. Тест парных импульсов указал на депрессию тормозной синаптической передачи под действием уабаина. (а) – примеры токов, вызванных двумя электрическими ступеньками, репрезентативного нейрона при фиксации потенциала на уровне -77 мВ (EPSC) в контрольных условиях (Ringer) и после добавления уабаина; (б) – аналогично для тормозных постсинаптических токов (IPSC) при фиксации потенциала на $+3$ мВ. (с–д) – статистические данные для амплитуды первого ответа и коэффициента парных импульсов (КПИ, PPR) соответственно. $* p < 0.05$, $** p < 0.01$.

проанализировать действие уабаина отдельно на возбуждающую и тормозную синаптическую передачу.

Мы не выявили значимого влияния уабаина на возбуждающую синаптическую передачу при анализе вызванных ответов при -77 мВ, не было изменений амплитуды 1-го ответа (парный t -тест, $n = 8$, $p = 0.4$) или КПИ ($p = 0.14$, рис. 4). Однако применение уабаина привело к уменьшению амплитуды первого ответа на 47% ($p < 0.01$, $n = 7$), когда регистрация осуществлялась при $+3$ мВ. КПИ уменьшился на 22% ($p < 0.05$). Эти данные показывают, что ГАМКергическая синаптическая передача ослабляется при ингибиции Na^+/K^+ -АТФазы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе с помощью антагониста Na^+/K^+ -АТФазы уабаина был выявлен ряд изменений в электрофизиологических характеристиках возбуждающих и тормозных нейронов, а также обнаружено ослабление ГАМКергической, но не глутаматергической синаптической передачи. Эти данные могут помочь лучше понять механизмы нарушений баланса возбуждения и торможения в нейронных сетях,

выявленные при ослаблении функции Na^+/K^+ -АТФазы в результате мутаций. Следует, однако, подчеркнуть, что данное исследование имеет определенное ограничение, которое необходимо учитывать при интерпретации полученных результатов. Описанные в данной работе изменения относятся к быстро развивающимся реакциям нейронов на блокаду Na^+/K^+ -АТФазы, все они были зарегистрированы в течение 10–15 мин после воздействия убацина. Так как убацин может влиять на внутриклеточный сигналинг, регулируя различные клеточные функции [19, 20], мы не можем уверенно говорить о том, что эти изменения являются стабильными во времени.

В данной работе мы сравнили эффекты убацина на быстроразряжающиеся интернейроны и пирамидные клетки. Убацин обладает разной аффинностью к $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ -изоформам Na^+/K^+ -АТФазы [5, 6]. Ранее также было показано, что $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ -изоформы Na^+/K^+ -АТФазы неравномерно распределены между различными классами нейронов в разных отделах нервной системы [6, 21–23]. Например, в гиппокампе и коре основной $\alpha 3$ -экспрессирующей популяцией являются парвальбумин-содержащие интернейроны [9, 23]. Так, Murata и соавт. изучили распределение изоформ α -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы в разных типах клеток, оценив экспрессию матричной РНК генов *Atp1a1*, *Atp1a2*, и *Atp1a3*. В парвальбумин-положительных интернейронах гиппокампа и соматосенсорной коры авторы зарегистрировали низкий уровень экспрессии гена $\alpha 1$ -субъединицы и высокий уровень $\alpha 3$ -субъединицы [23]. Richards и соавт. использовали убацин в разных концентрациях, чтобы определить распределение α -изоформ по разным типам клеток субикулума. Авторы показали с помощью фармакологических и иммуногистохимических методов, что $\alpha 1$ -изоформа чаще присутствует в пирамидных клетках субикулума, а $\alpha 3$ -изоформа – в GAD-65 интернейронах [22]. Большинство парвальбумин-содержащих интернейронов коры головного мозга относится к быстроразряжающимся интернейронам, а быстроразряжающиеся интернейроны обычно являются парвальбумин-позитивными [24–26].

В этой работе мы использовали концентрацию убацина 5 мКМ, которая полностью подавляла активность $\alpha 2$ - или $\alpha 3$ -изоформ Na^+/K^+ -АТФазы, но, вероятно, относительно слабо воздействовала на $\alpha 1$ -изоформу Na^+/K^+ -АТФазы [5]. Учитывая это, мы предполагали, что эффект убацина на электрофизиологические свойства быстроразряжающихся интернейронов будет более выраженным по сравнению с его действием на пирамидные клетки. Наши предположения, однако, получили лишь частичное подтверждение. Согласно полученным данным, убацин не влияет на входное сопротивление ни пирамидных нейронов, ни быстроразряжающихся интернейронов энторинальной коры взрослой мыши. К такому же выводу пришли Anderson и соавт. [15], изучив эффект дигидроубацина на пирамидные клетки и быстроразряжающиеся интернейроны сенсомоторной коры ювенильных крыс. Однако в другом исследовании отмечалось, что кардиогликозиды строфантидин и дигидроубацин увеличивали входное сопротивление пирамидных нейронов CA1 гиппокампа на 12% [27]. В этой же работе авторы определили, что кардиогликозиды деполяризовали мембранный потенциал покоя пирамидных нейронов на 6 мВ. Согласно нашим данным, убацин деполяризует пирамидные нейроны энторинальной коры на 5 мВ, а быстроразряжающиеся интернейроны на 3 мВ, что, вероятно, отражает электрогенную составляющую мембранныго потенциала покоя. Согласно расчетам Dobretsov и Stimers от 9 до 45% значения мембранныго потенциала покоя обусловлено электрогенной активностью Na^+/K^+ -АТФазы [10].

При действии убацина уменьшился ток реобазы интернейронов и максимальная частота спайков пирамидных клеток, а также уменьшилось значение тока, при котором происходит деполяризационный блок у обоих типов клеток. Порог генерации потенциала действия также понизился у обоих типов клеток. Кроме того, уба-

ин уменьшал амплитуду и увеличивал ширину спайка пирамидного нейрона, а также уменьшал следовую гиперполяризацию быстроразряжающегося интернейрона. В целом, уабайн сильнее повлиял на форму спайка пирамидной клетки, чем быстроразряжающихся интернейронов. Эти изменения электрофизиологических характеристик нейронов могут быть обусловлены несколькими причинами. Помимо частичной деполяризации мембранные, блокада Na^+/K^+ -АТФазы ведет к изменению активности других ионных каналов и транспортеров в нейронах коры головного мозга и гиппокампа. Например, было показано, что блокада Na^+/K^+ -АТФазы может нарушать активность $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника по следующему механизму. Ингиби-рование Na^+/K^+ -АТФазы приводит к повышению уровня Na^+ в цитоплазме, что ре-версирует работу $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника. Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} вызывает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных кальциевых депо, что приводит к дальнейшему увеличению уровня этого катиона в цитоплазме [28, 29].

Так как используемая нами концентрация уабаина подавляла в большей степени $\alpha 3$ -изоформу Na^+/K^+ -АТФазы по сравнению с $\alpha 1$ -изоформой, то и эффект уабаина должен проявляться в условиях, когда преобладает активность $\alpha 3$ -изоформы. Так как $\alpha 3$ -изоформа имеет низкую аффинность к ионам Na^+ – $K_{0.5} = 25–50 \text{ мМ}$ [4, 7, 8], то эта изоформа Na^+/K^+ -АТФазы эффективно работает при высокой активности нейронов. Поэтому при пачечной активности нейронов в условиях ча-стичной блокады Na^+/K^+ -АТФазы повышение внутриклеточного кальция может оказаться более существенным, и нарушения кальций-зависимых механизмов в нейроне могут быть более выраженным. Эти причины могут обуславливать более раннее возникновение деполяризационного блока у нейронов при действии уабаина. Аналогичный механизм может лежать в основе изменений синаптических функций, так как выделение медиатора – это кальций-зависимый процесс [30]. Кроме то-го, описан еще один интересный механизм взаимодействия Na^+/K^+ -АТФазы и ионотропных глутаматных рецепторов. Так как активация AMPA- и NMDA-рецеп-торов приводит ко входу в клетку катионов Na^+ , то это может усиливать работу Na^+/K^+ -АТФазы. Логично предположить наличие взаимодействия между этими рецепторами и Na^+/K^+ -АТФазой. Интересно, что Na^+/K^+ -АТФаза в изобилии при-существует в синаптических участках и колокализована с AMPA-рецепторами [16]. Уа-байн может нарушать это взаимодействие, что скорее всего будет особенно сильно проявляться при пачечной активности нейронов. Однако в данной работе эти из-менения экспериментально не изучались.

Ослабление функций Na^+/K^+ -АТФазы может сопровождаться развитием эпи-лепсии у человека [11–13], тогда как положительная модуляция функциональной активности Na^+/K^+ -АТФазы, согласно численным расчетам на математической модели Эпилептор-2 [31], может оказывать противоэпилептический эффект. Наша экспериментальная работа показывает, что частичная блокада Na^+/K^+ -АТФазы действитель-но вызывает существенное изменение электрофизиологических харак-теристик, приводящих к повышению возбудимости нейронов в энторинальной ко-ре и смещающих баланс возбуждения и торможения в нейронных сетях. Эти дан-ные позволяют лучше понять механизмы эпилептизации мозга при ослаблении функций Na^+/K^+ -АТФазы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследо-ваниях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным право-

выми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комитета по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, проект № 19-315-60016.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.Ю.П. – планирование эксперимента, сбор данных, обработка данных, написание и редактирование статьи, Д.С.С. – сбор данных и редактирование статьи, А.В.З. – обсуждение результатов и редактирование статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pietrini G, Matteoli M, Banker G, Caplan MJ* (1992) Isoforms of the Na,K-ATPase are present in both axons and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8414–8418.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.18.8414>
- Boldyrev AA* (1993) Functional activity of Na^+ , K^+ -pump in normal and pathological tissues. *Mol Chem Neuropathol* 19: 83–93.
<https://doi.org/10.1007/BF03160170>
- Kaplan JH* (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 71: 511–535.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218>
- Clausen MV, Hilbers F, Poulsen H* (2017) The structure and function of the Na,K-ATPase isoforms in health and disease. *Front Physiol* 8.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00371>
- Juhaszova M, Blaustein MP* (1997) Na^+ pump low and high ouabain affinity α subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1800–1805.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1800>
- Berrebi-Bertrand I, Maixent JM, Christe G, Lelièvre LG* (1990) Two active Na^+/K^+ -ATPases of high affinity for ouabain in adult rat brain membranes. *Biochim Biophys Acta* 1021: 148–156.
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90027-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90027-1)
- Zahler R, Zhang Z-T, Manor M, Boron WF* (1997) Sodium Kinetics of Na,K-ATPase α Isoforms in Intact Transfected HeLa Cells. *J Gen Physiol* 110: 201–213.
<https://doi.org/10.1085/jgp.110.2.201>
- Crambert G, Hasler U, Beggah AT, Yu C, Modyanov NN, Horisberger JD, Lelièvre L, Geering K* (2000) Transport and pharmacological properties of nine different human Na,K-ATPase isoforms. *J Biol Chem* 275: 1976–1986.
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.1976>
- Dobretsov M, Hayar A, Kockara NT, Kozhemyakin M, Light KE, Patyal P, Pierce DR, Wight PA* (2019) A Transgenic Mouse Model to Selectively Identify $\alpha 3$ Na,K-ATPase Expressing Cells in the Nervous System. *Neuroscience* 398: 274–294.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.07.018>
- Dobretsov M, Stimers JR* (2005) Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase. *Front Biosci* 10: 2373–2396.
<https://doi.org/10.2741/1704>
- Vanmolkot KRJ, Kors EE, Hottenga J-J, Terwindt GM, Haan J, Hoefnagels WAJ, Black DF, Sandkuyl LA, Frants RR, Ferrari MD, Ferrari MD, Van den Maagdenberg AMJM* (2003) Novel mutations in the Na^+, K^+ -ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. *Ann Neurol* 54: 360–366.
<https://doi.org/10.1002/ana.10674>
- Ishihara N, Inagaki H, Miyake M, Kawamura Y, Yoshikawa T, Kurashiki H* (2019) A case of early onset life-threatening epilepsy associated with a novel ATP1A3 gene variant. *Brain Dev* 41: 285–291.
<https://doi.org/10.1016/j.braindev.2018.10.008>
- de Lores Arnaiz GR, Ordieres MGL* (2014) Brain Na^+, K^+ -ATPase Activity In Aging and Disease. *Int J Biomed Sci* 10: 85–102.

14. Clapcote SJ, Duffy S, Xie G, Kirshenbaum G, Bechard AR, Schack VR, Petersen J, Sinai L, Saab BJ, Lerch JP, Vilse B, Roder JC (2009) Mutation 1810N in the $\alpha 3$ isoform of Na^+/K^+ -ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 14085–14090.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0904817106>
15. Anderson TR, Huguenard JR, Prince DA (2010) Differential effects of Na^+/K^+ -ATPase blockade on cortical layer V neurons. *J Physiol* 588: 4401–4414.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.191858>
16. Zhang D, Hou Q, Wang M, Lin A, Jarzylo L, Navis A, Raissi A, Liu F, Man H-Y (2009) Na,K -ATPase activity regulates AMPA receptor turnover through proteasome-mediated proteolysis. *J Neurosci* 29: 4498–4511.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6094-08.2009>
17. Proskurina EY, Zaitsev AV (2021) Photostimulation activates fast-spiking interneurons and pyramidal cells in the entorhinal cortex of Thy1-ChR2-YFP line 18 mice. *Biochem Biophys Res Commun* 580: 87–92.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.10.002>
18. Smirnova EY, Amakhin DV, Malkin SL, Chizhov AV, Zaitsev AV (2018) Acute Changes in Electrophysiological Properties of Cortical Regular-Spiking Cells Following Seizures in a Rat Lithium–Pilocarpine Model. *Neuroscience* 379: 202–215.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.03.020>
19. Therien AG, Blostein R (2000) Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.3.c541>
20. Silva E, Soares-da-Silva P (2012) New insights into the regulation of Na^+/K^+ -ATPase by ouabain. *Int Rev Cell Mol Biol* 294: 99–132.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394305-7.00002-1>
21. Jiao S, Johnson K, Moreno C, Yano S, Holmgren M (2022) Comparative description of the mRNA expression profile of Na^+/K^+ -ATPase isoforms in adult mouse nervous system. *J Compar Neurol* 530: 627–647.
<https://doi.org/10.1002/cne.25234>
22. Richards KS, Bommert K, Szabo G, Miles R (2007) Differential expression of Na^+/K^+ -ATPase alpha-subunits in mouse hippocampal interneurones and pyramidal cells. *J Physiol* 585: 491–505.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.144733>
23. Murata K, Kinoshita T, Ishikawa T, Kuroda K, Hoshi M, Fukazawa Y (2020) Region- and neuronal-subtype-specific expression of Na,K -ATPase alpha and beta subunit isoforms in the mouse brain. *J Comp Neurol* 528: 2654–2678.
<https://doi.org/10.1002/cne.24924>
24. Hu H, Gan J, Jonas P (2014) Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin⁺ GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science* 345: 1255263.
<https://doi.org/10.1126/science.1255263>
25. Zaitsev AV, Povysheva NV, Gonzalez-Burgos G, Rotaru D, Fish KN, Krimer LS, Lewis DA (2009) Interneuron Diversity in Layers 2–3 of Monkey Prefrontal Cortex. *Cerebr Cortex* 19: 1597–1615.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhn198>
26. Proskurina EY, Chizhov AV, Zaitsev AV (2022) Optogenetic Low-Frequency Stimulation of Principal Neurons, but Not Parvalbumin-Positive Interneurons, Prevents Generation of Ictal Discharges in Rodent Entorhinal Cortex in an In Vitro 4-Aminopyridine Model. *Int J Mol Sci* 24: 195.
<https://doi.org/10.3390/ijms24010195>
27. McCarren M, Alger BE (1987) Sodium-potassium pump inhibitors increase neuronal excitability in the rat hippocampal slice: Role of a Ca^{2+} -dependent conductance. *J Neurophysiol* 57: 496–509.
<https://doi.org/10.1152/jn.1987.57.2.496>
28. Pivovarov AS, Calahorro F, Walker RJ (2018) Na^+/K^+ -pump and neurotransmitter membrane receptors. *Invert Neurosci* 19: 1.
<https://doi.org/10.1007/s10158-018-0221-7>
29. Blaustein MP, Juhaszova M, Golovina VA, Church PJ, Stanley EF (2002) Na/Ca exchanger and PMCA localization in neurons and astrocytes: functional implications. *Ann N Y Acad Sci* 976: 356–366.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04762.x>
30. Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27: 509–547.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
31. Chizhov AV, Zefirov AV, Amakhin DV, Smirnova EY, Zaitsev AV (2018) Minimal model of interictal and ictal discharges “Epileptor-2.” *PLoS Comput Biol* 14: e1006186.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006186>

The Na^+/K^+ -ATPase Inhibitor Ouabain Has Different Effects on the Electrophysiological Properties of Excitatory and Inhibitory Neurons in the Entorhinal Cortex E**E. Yu. Proskurina^{a, b, *}, D. S. Sinyak^b, and A. V. Zaitsev^b***^aAlmazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia**^bSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of RAS, Saint Petersburg, Russia***e-mail: elena.yu.proskurina@gmail.com*

Na^+/K^+ -ATPase maintains the neuron's resting potential and the transmembrane gradient of K^+ and Na^+ cations, thus regulating ion transport and cellular volume. Mutations in Na^+/K^+ -ATPase genes that impair its function can cause significant impairments in the nervous system function, including the development of epilepsy, if not lethal. Different forms of Na^+/K^+ -ATPase are expressed in various classes of neurons and exhibit different characteristics. Thus, the impaired function of Na^+/K^+ -ATPase may differentially affect the functioning of inhibitory and excitatory neurons. This study aims to determine the effects of the Na^+/K^+ -ATPase antagonist ouabain on the electrophysiological characteristics of pyramidal cells and fast-spiking interneurons, as well as its impact on synaptic transmission. The results indicate that exposure to 5 μM ouabain results in depolarization of the resting membrane potential by 5 mV, as well as decreased amplitude and increased duration of the action potential of pyramidal neurons. Furthermore, ouabain caused a decrease in the amplitude of afterhyperpolarization in fast-spiking interneurons. Moreover, both types of neurons exhibited a decrease in the threshold of action potential generation and the current at which depolarization block occurs. The addition of ouabain did not alter other electrophysiological characteristics of neurons. Furthermore, ouabain rapidly attenuates GABAergic transmission without affecting excitatory synaptic transmission. These new findings on the effects of ouabain on excitatory pyramidal neurons and inhibitory interneurons contribute to the understanding of the mechanism underlying changes in the balance of excitation and inhibition in neural networks under Na^+/K^+ -ATPase function impairment.

Keywords: ouabain, Na^+/K^+ -ATPase, entorhinal cortex, pyramidal neurons, fast-spiking interneurons, action potential