

Вплив блокування нейрамінідази на варіативність польових позаклітинних потенціалів нейронної мережі гіпокампа щурів

А.В. Савотченко¹, О.В. Ісаєва², Д.С. Ісаєв¹

¹ Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;

² Медичний Коледж Вісконсіна, США, Мілуокі; e-mail: savrasova10@gmail.com

Нейрамінідаза є ключовим ферментом у розщепленні негативно заряджених сіалових кислот на поверхні клітинної мембрани. Дисбаланс у метаболізмі нейрамінідази в умовах різних патологічних станів суттєво впливає на нервову активність. Блокування цього ферменту призводить до таких морфологічних змін у гіпокампі щурів, як накопичення залишків сіалових кислот у позаклітинному просторі і синаптогенезу. Питання про функціональність новоутворених синапсів після блокування нейрамінідази залишається нез'ясованим. Із використанням специфічного блокатора нейрамінідази N-ацетил-2,3-дегідро-2-деоксі нейрамінової кислоти (NADNA) ми досліджували вплив пригнічення її активності на синаптичну ефективність нейронних мереж гіпокампа. Суттєве підвищення амплітуди синаптичних відповідей у результаті блокування нейрамінідази, супроводжувалося зменшенням їхньої варіативності. Це свідчить про посилення збуджуючої синаптичної передачі у досліджуваній мережі.

Ключові слова: блокатор нейрамінідази; полісіалові кислоти; гіпокамп; синаптогенез; синаптична ефективність.

ВСТУП

Негативно заряджені полісіалові кислоти (ПСК), які входять до складу глікопротеїдів та гангліозидів зовнішньої поверхні мембрани, беруть участь у різноманітних процесах клітинної сигналізації [1]. У центральній нервовій системі існує два основних носії сіалових кислот: нейронні молекули клітинної адгезії (NCAM) та потенціалкеровані натрієві канали [2, 3]. ПСК впливають на пропускні властивості останніх через створення локального електричного поля біля компартменту каналного рецептора [4, 5]. Комплекс ПСК-NCAM залучений у процеси нейрогенезу, клітинної диференціації, міграції, росту аксонів, синаптогенезу та пластичності [6, 7]. Участь ПСК у широкому спектрі нейронних функцій пов'язана зі здатністю модулювати характер молекулярних взаємодій і щільність

поверхневого заряду мембрани нейронів завдяки негативному потенціалу, об'ємному розміру та зовнішньоклітинному розташуванню [10, 11]. Основним регулятором концентрації сіалових кислот на поверхні клітин є ендогенний ензим нейрамінідаза. Розщеплення ПСК нейрамінідазою призводить до зниження чутливості натрієвих каналів та порога генерації потенціалу дії [4]. На рівні нейронної мережі процес десіалізації впливає на клітинну міграцію, синаптичну пластичність, пригнічує епілептиформну активність [6, 10]. Було показано, що дефіцит ПСК порушує просторову пам'ять та викликає поведінкові відхилення [11]. У свою чергу надлишкова сіалізація через блокування нейрамінідази, стимулює активаційно-залежний синаптогенез та впливає на нервову збудження [4, 12, 13].

Мета нашої роботи полягала у дослідженні функційних можливостей новоутворених

синапсів внаслідок пригнічення активності нейрамінідази в пірамідному шарі ділянки CA1 гіпокампа.

МЕТОДИКА

Всі процедури були виконані відповідно до вимог Директиви Європейського союзу 2010/63/EU про захист тварин, що використовуються у наукових цілях та затверджені комітетом з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Виготовлення свіжоізолюваних зрізів мозку щурів. Дослідження проводили на 19–21-денних щурах лінії Вістар. Анестезовані діетиловим ефіром щури підлягали декапітації. Мозок діставали із черепної коробки і поміщали у льодяний оксигенований (5% CO₂ і 95% O₂) розчин штучної цереброспінальної рідини (ШЦСР) такого складу (ммоль/л): NaCl – 119; KCl – 2,5; CaCl₂ – 2,0; MgSO₄ – 1,3; NaHCO₃ – 26; NaH₂PO₄ – 1,2; глюкоза 11 (рН 7,35). З головного мозку видаляли мозочок та ділянку лобової частки. Отриману частину мозку нарізали товщиною 400 мкм на вібраторі Vibroslice NVSL («World Precision Instruments Inc.», США). Комбіновані зрізи гіпокампа разом із неокортикальними ділянками (Te2 і Te3), енторинальною корою та субікулумом поміщали у оксигенований розчин ШЦСР кімнатної температури, де їх утримували щонайменше 1,5 год. Для експериментів брали 3-4 зрізи з дорсальної частини гіпокампа [14].

Електрофізіологічні дослідження. Зрізи поміщали в інкубаційну камеру електрофізіологічного устаткування, де вони знаходились в умовах постійного потоку розчину ШЦСР (22–24°C) зі швидкістю 2 мл/хв. Реєстрацію позаклітинних польових потенціалів проводили з пірамідного шару ділянки CA1 гіпокампа за допомогою підсилювача змінного струму (PC 501A, «Warner Instruments Corp.», США) із використанням скляних мікроелектродів, заповнених розчином ШЦСР (опір 3-4 МОм). Стимулюючий

та реєструючий електроди розміщували на поверхні зрізу на відстані приблизно 400 мкм один від одного. Викликані постсинаптичні потенціали (ВПСП) були отримані стимуляцією колатералей Шаффера на рівні ділянки CA3 гіпокампа за допомогою концентричного біполярного стимулюючого електрода («FHC Inc.», США), з'єданого зі стимулятором з ізолюваним виходом (ISO-Flex, «A.M.P. Instruments», Ізраїль). Інтенсивність подразнення коливалась у межах від 150 до 400 мкА. На початку кожного експерименту визначали максимальну синаптичну реакцію поступовим збільшенням подразнення. Для реєстрації базових умов поточні значення стимуляції встановлювали на рівні 30% від максимальної відповіді. Стимуляцію наносили кожні 30 с. Сигнали були оцифровані із використанням аналогово-цифрового перетворювача (NI PCI-6221, «National Instruments», США) та зберігались на комп'ютері за допомогою програмного забезпечення WinWCP («Strathclyde Electrophysiology Software», Великобританія).

Блокування нейрамінідази. Зрізи мозку інкубували із блокатором нейрамінідази NADNA протягом 2 год при кімнатній температурі, потім промивали у розчині ШЦСР до початку реєстрації. Ми використовували NADNA у концентрації 500 мкмоль («Sigma-Aldrich», США). Специфічність ефекту NADNA як блокатора нейрамінідази було продемонстровано у гістологічних та електрофізіологічних експериментах в наших попередніх дослідженнях [12, 15].

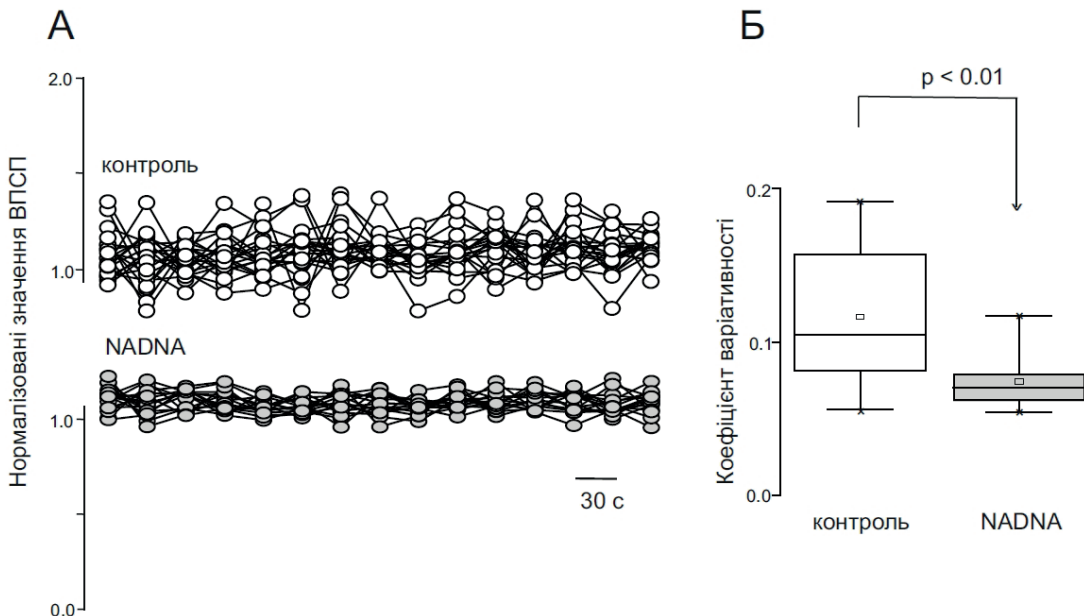
Статистичний аналіз. Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою програм Clampfit («Axon Instruments», США), Origin 7.5 («OriginLab», США) та GraphPad Prism 8 («GraphPad», США). Аналіз вибірок включав визначення середнього, стандартного відхилення та похибки середнього. Коефіцієнт варіативності розраховували як частку стандартного відхилення до середніх значень (SD/mean). Для

оцінки статистичної вірогідності міжгрупових розбіжностей використовували критерій *t* Стьюдента, оскільки результати мали нормальний розподіл при перевірці їх за тестом Шапіро-Уїлка. Вірогідними вважали розбіжності при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ми досліджували ефект блокування нейрамінідази на варіативність польових позаклітинних потенціалів нейронної мережі гіпокампа щурів *У* попередніх працях нами було показано, що пригнічення активності нейрамінідази призводить до збільшення щільності простих та перфорованих синапсів ділянки CA1 гіпокампа [12]. Для дослідження функційних можливостей новоутворених зв'язків, ми здійснювали подразнення колатералей Шаффера та відводили базові і пікові польові позаклітинні потенціали із пірамідного шару ділянки CA1 гіпокампа з контрольних ($n = 20$) та

оброблених блокатором нейрамінідази зрізів ($n = 16$). Визначення максимальної амплітуди популяційних явищ для кожної реєстрації проводили поступовим збільшенням інтенсивності стимуляції до досягнення рівня насичення, коли постсинаптичні потенціали не змінювались у відповідь на підвищення подразнення. Було виявлене суттєве зростання максимальних значень амплітуди популяційних спайків в оброблених NADNA зрізах, порівняно із контролем (NADNA: $2,18 \pm 0,08$ мВ; контроль: $1,45 \pm 0,12$ мВ, $t_{34} = 5,03$, $P < 0,05$; результати не показано). Аналіз базових значень ВПСП, які становили 30% від максимальної амплітуди, показав істотне зменшення коефіцієнта варіативності популяційних явищ у відповідь на блокування нейрамінідази ($1,11 \pm 0,01$ у контрольних зрізах; $0,07 \pm 0,01$ в оброблених NADNA, $t_{34} = 3,5$, $P < 0,01$; рисунок). Польові ВПСП складаються із N-метил-D-аспартатного (NMDA) та non-NMDA-рецепторопосередкованих компонентів. Для з'ясування



Ефект блокування нейрамінідази на варіативність викликаних постсинаптичних потенціалів (ВПСП) у пірамідному шарі CA3-CA1 нейронної мережі гіпокампа; а – варіативність базових значень ВПСП, відведених кожні 30 с у контрольних та оброблених NADNA зрізах. Кожне значення на графіку відображає нормалізовану усереднену амплітуду популяційних спайків з одного зрізу; б – результати статистичного порівняння коефіцієнта варіативності базових ВПСП внаслідок пригнічення активності нейрамінідази

ймовірної різниці впливу NADNA на ці компоненти, ми застосували специфічний антагоніст NMDA-рецепторів D-аміно-5-фосфоновалеріанову кислоту (D-APV) та блокатор non-NMDA-рецепторів 6-ціано-7-нітроквіноксалін-2,3-діон (CNQX). Додавання 50 мкмоль D-APV викликало схоже помірне зниження у показниках базової синаптичної відповіді в обох групах ($91,27 \pm 1,51$ % в контролі, $n = 7$; $91,73 \pm 1,35$ % в оброблених NADNA зрізах, $n = 6$). Залишковий компонент ВПСП був повністю ослаблений після додавання 10 мкмоль CNQX (результати не показано). Отримані результати свідчать, що блокування нейрамінідази однаково впливає як на NMDA-, так і на non-NMDA-компоненти синаптичних відповідей.

Істотне зростання відсотка перфорованих синапсів у ділянці CA1 було продемонстровано у культурі зрізів гіпокампа після блокування нейрамінідазної активності. Зміни у щільності таких синапсів вважаються морфологічною ознакою активаційнозалежного синаптогенезу та були описані за різних фізіологічних та патологічних умов [16, 17]. В нашому дослідженні під дією NADNA ми спостерігали суттєве збільшення постсинаптичних відповідей одночасно зі зниженням їхньої варіативності. Подібний ефект спостерігається під час збільшення нервової збудливості або після індукції довготривалої потенціації [18]. Отримані результати демонструють, що морфологічні зміни, викликані пригніченням активності ендогенної нейрамінідази, збігаються зі зростанням збуджуючих функційних зв'язків мережі CA3-CA1 гіпокампа. Також пряма взаємодія полісіалових кислот із α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонатними (AMPA) рецепторами була нещодавно продемонстрована в експериментах із додаванням бактеріальних коломінових кислот до зовнішньоклітинного розчину [19]. Активність AMPA-рецепторів є основною у реалізації ВПСП, тому ми не можемо

виключати можливість їх підвищення внаслідок потенціації цих рецепторів через збільшення рівня сіалізації після пригнічення активності нейрамінідази.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

A.V. Savotchenko, E.V. Isaeva, D.S. Isaev

EFFECT OF NEURAMINIDASE INHIBITION ON VARIATION OF FIELD EXTRACELLULAR POTENTIALS IN RAT HIPPOCAMPAL NETWORK

¹ *Bogomoletz Institute of Physiology of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;*

² *Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA; e-mail: savrasova10@gmail.com*

Neuraminidase (NEU) is the key enzyme that cleaves negatively charged sialic acids of the cell surface. The results of numerous studies suggest that an imbalance in NEU metabolism due to various pathological conditions significantly affects nervous activity. Thus, it was shown that downregulation of NEU leads to such morphological changes as accumulation of sialic acid residues in the extracellular space and synaptogenesis. However, the functional ability of newly formed synapses remains unclear. Using the specific blocker 2-deoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid (NADNA), we examined the effect of NEU inhibition on synaptic efficacy in the hippocampal CA3-CA1 neuronal network. The significant increase in the amplitude of synaptic responses due to NEU blockage was accompanied by the decrease in their variability, which indicates the enhanced functional excitatory synaptic connectivity in the hippocampal CA3-to-CA1 network.

Key words: neuraminidase blocker; polysialic acids; hippocampus; synaptogenesis; synaptic efficacy.

REFERENCES

1. Rougon G. Structure, metabolism and cell biology of polysialic acids. *Eur J Cell Biol.* 1993; 61(2): 197-207.
2. James W, Agnew W. α -(2-8)-polysialic acid immunoreactivity in voltage-sensitive sodium channel of eel electric organ. *Proc Roy Soc Lond B Biol Sci.* 1989; 1287: 233-45.
3. Zuber C, Lackie P, Catterall W, Roth J. Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *J Biol*

- Chem. 1992; 267: 9965-71.
4. Isaev D, Isaeva E, Shatskih T, Zhao Q, Smits N, Shworak N, Khazipov R, Holmes G. Role of extracellular sialic acid in regulation of neuronal and network excitability in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 2007; 27(43): 11587-94.
 5. Zhang Y, Hartmann H, Satin J. Glycosylation influences voltage-dependent gating of cardiac and skeletal muscle sodium channels. *J Membr Biol.* 1999; 171: 195-207.
 6. Bonfanti L, Theodosis D. Polysialic acid and activity-dependent synapse remodeling. *Cell Adh Migr.* 2009; 3(1): 43-50.
 7. Gascon E, Vutskits L, Kiss J. Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Res Rev.* 2007; 56(1): 101-18.
 8. Ednie A, Bennett E. Modulation of voltage-gated ion channels by sialylation. *Compr Physiol.* 2012; 2(2): 1269-301.
 9. Rutishauser U, Landmesser L. Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci.* 1996; 19(10): 422-7.
 10. Savrasova A, Lushnikova I, Isaeva E, Skibo G, Isaev D, Kostyuk P. The effect of neuraminidase blocker on gabazine-induced seizures in rat hippocampus. *Fiziol Zh.* 2010; 56(4): 14-8.
 11. Venero C, Herrero A, Touyarot K, Cambon K, López-Fernández M, Berezin V, Bock E, Sandi C. Hippocampal up-regulation of NCAM expression and polysialylation plays a key role on spatial memory. *Eur J Neurosci.* 2006; 23(6): 1585-95.
 12. Isaeva E, Lushnikova I, Savrasova A, Skibo G, Holmes G, Isaev D. Blockade of endogenous neuraminidase leads to an increase of neuronal excitability and activity-dependent synaptogenesis in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2010; 32(11): 1889-96.
 13. Usami A, Sasaki T, Satoh N, Akiba T, Yokoshima S, Fukuyama T, Yamatsugu K, Kanai M, Shibasaki M, Matsuki N, Ikegaya Y. Osetamivir enhances hippocampal network synchronization. *J Pharmacol Sci.* 2008; 106(4): 659-62.
 14. Papatheodoropoulos C, Kostopoulos G. Decreased ability of rat temporal hippocampal CA1 region to produce long-term potentiation. *Neurosci Lett.* 2000; 279(3): 177-80.
 15. Savotchenko A, Romanov A, Isaev D, Maximyuk O, Holmes G, Isaeva E. Neuraminidase inhibition primes short-term depression and suppresses long-term potentiation of synaptic transmission in the rat hippocampus. *Neural Plast.* 2015; 2015:1-10.
 16. Noristani H, Meadows R, Olabarria M, Verkhatsky A, Rodríguez J. Increased hippocampal CA1 density of serotonergic terminals in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease: an ultrastructural study. *Cell Death Dis.* 2011; 2(9): 1-11.
 17. Ruan Y, Han X, Shi Z, Lei Z, Xu Z. Remodeling of synapses in the CA1 area of the hippocampus after transient global ischemia. *Neurosci.* 2012; 218: 268-77.
 18. Kerchner G, Nicoll R. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9(11): 813-25.
 19. Vaithianathan T, Matthias K, Bahr B, Schachner M, Suppiramaniam V, Dityatev A, Steinhäuser C. Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid potentiates α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor currents. *J Biol Chem.* 2004; 279(46): 47975-84.

*Матеріал надійшов
до редакції 05.04.2023*