



Check for updates

Экспериментальные статьи

УДК 612.085.2+612.822.3+57.086.83+57.086.164 <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-96-101>

## Возможная физиологическая функция эндогенного уабаина

В. А. Пеннийнен<sup>✉1</sup>, В. Б. Плахова<sup>1</sup>, С. А. Подзорова<sup>1</sup>, С. Г. Терехин<sup>1</sup>, Б. В. Крылов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6

### Сведения об авторах

Валентина Альбертовна  
Пеннийнен,  
SPIN-код: 6610-3718,  
Scopus AuthorID: 6603501257,  
ORCID: 0000-0003-3936-8681,  
e-mail: pvalentina2@yandex.ru

Вера Борисовна Плахова,  
SPIN-код: 4184-7669,  
Scopus AuthorID: 6603237137,  
ORCID: 0000-0002-1983-852X,  
e-mail: verapl@mail.ru

Светлана Александровна  
Подзорова,  
SPIN-код: 3974-3430,  
Scopus AuthorID: 6602224180,  
ORCID: 0000-0003-0003-9338,  
e-mail: sveap@yandex.ru

Станислав Георгиевич Терехин,  
SPIN-код: 6993-1862,  
Scopus AuthorID: 57191375298,  
ORCID: 0000-0002-8180-9391,  
e-mail: stasok32@yandex.ru

Борис Владимирович Крылов,  
SPIN-код: 3946-6408,  
Scopus AuthorID: 7004655760,  
ORCID: 0000-0001-5258-1597,  
e-mail: krylov@infran.ru

### Для цитирования:

Пеннийнен, В. А., Плахова, В. Б.,  
Подзорова, С. А., Терехин, С. Г.,  
Крылов, Б. В.

(2021) Возможная  
физиологическая функция  
эндогенного уабаина.

*Интегративная физиология*, т. 2,  
№ 1, с. 96–101.

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-96-101>

**Получена** 21 января 2021; прошла  
рецензирование 31 января 2021;  
принята 1 февраля 2021.

**Финансирование:** Данное  
исследование выполнено в рамках  
реализации Программы НЦМУ  
и при финансовой поддержке  
Минобрнауки РФ (соглашение  
№ 075-15-2020-921 от 13.11.2020).

**Права:** © Авторы (2021).  
Опубликовано Российским  
государственным педагогическим  
университетом им. А. И. Герцена.  
Открытый доступ на условиях  
лицензии CC BY-NC 4.0.

**Аннотация.** Наши результаты свидетельствуют о том, что эндогенный уабаин запускает два разных сигнальных процесса. Первый, быстрый процесс, приводит к модуляции активационного воротного устройства каналов  $Na_v1.8$ , что снижает их функциональную активность. Вторым, медленным процессом, ведет к снижению плотности каналов  $Na_v1.8$  в мембране первичного сенсорного нейрона. Мы предполагаем, что в этом случае эндогенный уабаин запускает внутриклеточный каскад, ведущий к снижению экспрессии гена *SCN10A*, продуцирующего каналы  $Na_v1.8$ . Можно заключить, что эндогенный уабаин выполняет важнейшую функцию модуляции функциональной активности каналов  $Na_v1.8$  при взаимодействии с первичным сенсорным нейроном. В соответствии с нашими данными, эндогенный уабаин может являться эндогенным анальгетиком. Практическим результатом проведенного исследования стало предположение, согласно которому доставка уабаина в качестве лекарственной субстанции к мембране ноцицептивного нейрона в наномолярной концентрации должна приводить к безопасному и эффективному антиноцицептивному действию этого агента на уровне организма.

**Ключевые слова:** ноцицептивные нейроны, каналы  $Na_v1.8$ , метод локальной фиксации потенциала, метод органотипической культуры ткани, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, эндогенный уабаин.

# Possible physiological function of endogenous ouabain

V. A. Penniyaynen<sup>✉1</sup>, V. B. Plakhova<sup>1</sup>, S. A. Podzorova<sup>1</sup>, S. G. Terekhin<sup>1</sup>, B. V. Krylov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, 6 Makarova Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

## Authors

Valentina A. Penniyaynen,  
SPIN: 6610-3718,  
Scopus AuthorID: 6603501257,  
ORCID: 0000-0003-3936-8681,  
e-mail: [pvalentina2@yandex.ru](mailto:pvalentina2@yandex.ru)

Vera B. Plakhova,  
SPIN: 4184-7669,  
Scopus AuthorID: 6603237137,  
ORCID: 0000-0002-1983-852X,  
e-mail: [verapl@mail.ru](mailto:verapl@mail.ru)

Svetlana A. Podzorova,  
SPIN: 3974-3430,  
Scopus AuthorID: 6602224180,  
ORCID: 0000-0003-0003-9338,  
e-mail: [sveap@yandex.ru](mailto:sveap@yandex.ru)

Stanislav G. Terekhin,  
SPIN: 6993-1862,  
Scopus AuthorID: 57191375298,  
ORCID: 0000-0002-8180-9391,  
e-mail: [stasok32@yandex.ru](mailto:stasok32@yandex.ru)

Boris V. Krylov,  
SPIN: 3946-6408,  
Scopus AuthorID: 7004655760,  
ORCID: 0000-0001-5258-1597,  
e-mail: [krylov@infran.ru](mailto:krylov@infran.ru)

## For citation:

Penniyaynen, V. A., Plakhova, V. B.,  
Podzorova, S. A., Terekhin, S. G.,  
Krylov, B. V.

(2021) Possible physiological  
function of endogenous ouabain.

*Integrative Physiology*, vol. 2, no. 1,  
pp. 96–101.

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-1-96-101>

**Received** 21 January 2021;

reviewed 31 January 2021;

accepted 1 February 2021.

**Finding:** This study is part of the  
World-Class Research Center  
Programme. It was supported  
by the Ministry of Science and  
Higher Education of the Russian  
Federation (agreement no. 075-15-  
2020-921 of 13.11.2020).

**Copyright:** © The Authors (2021).  
Published by Herzen State  
Pedagogical University of Russia.  
Open access under [CC BY-NC](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)  
License 4.0.

**Abstract.** Our results suggest that endogenous ouabain triggers two different signaling processes. The first, fast process, modulates the activation gating device of the Na<sub>v</sub>1.8 channels, thereby reducing their functional activity. The second, slow process, decreases the density of Na<sub>v</sub>1.8 channels in the membrane of the primary sensory neuron. We assume that in this case, endogenous ouabain triggers a downstream cascade leading to a decrease in the expression of the SCN10A gene that produces Na<sub>v</sub>1.8 channels. It can be concluded that endogenous ouabain, when it interacts with the primary sensory neuron, performs important function of modulating functional activity of Na<sub>v</sub>1.8 channels. The practical result of the study was the assumption that the delivery of ouabain as a drug substance to the membrane of a nociceptive neuron in nanomolar concentration should lead to a safe and effective antinociceptive action of this agent at the organismal level.

**Keywords:** nociceptive neurons, Na<sub>v</sub>1.8 channels, patch-clamp method, organotypic nerve culture method, confocal laser scanning microscopy, endogenous ouabain.

## Введение

Na,K-АТФаза — это электрогенная транс- мембранная АТФаза, находящаяся во внешней плазматической мембране клеток (Skou 1957). Этот фермент создает разность потенциалов между наружной и внутренней сторонами

мембраны благодаря поддержанию градиентов концентраций ионов натрия и калия между вне- и внутриклеточной средой клетки. В настоящее время появилось большое количество данных о том, что этот белок также выполняет еще и трансдукторную функцию (Askari 2019; Cui, Xie 2017; Kometiani et al. 1998;

Krylov et al. 1999; Lichtstein et al. 2018; Xie, Askari 2002). Специфические модуляторы Na,K-АТФазы, кардиотонические стероиды, известные как эндогенные дигиталисоподобные вещества, влияют на ферментативную активность Na,K-АТФазы, что проявляется в регуляции пролиферации, дифференцировки, в стимулировании аутофагии, апоптоза. Эти эффекты различаются в зависимости от типа клеток, а также от концентрации кардиотонических стероидов.

Эндогенный убаин (ЭУ) обнаружен в кровотоке и в гипоталамусе теплокровных животных в наномолярной концентрации (Hamlyn et al. 1991; Kawamura et al. 1999). Молекулярный механизм его влияния в таких низких концентрациях на ноцицептивную систему остается малоизученным. Выяснению возможной физиологической роли ЭУ посвящена настоящая работа. Нами использованы особо чувствительные методы для прижизненных исследований молекулярных механизмов модуляции ответов первичного сенсорного нейрона, где Na,K-АТФаза, выступая в качестве трансдуктора сигнала, способна модулировать потенциалочувствительность каналов  $Na_v1.8$ , ответственных за кодирование ноцицептивных сигналов (Krylov et al. 1999; 2017; Penniyaunen et al. 2019).

## Методы исследования

### Метод локальной фиксации потенциала

Эксперименты выполнены с использованием модифицированного метода краткосрочного культивирования диссоциированных изолированных сенсорных нейронов дорзальных ганглиев крыс линии *Wistar*, который был подробно описан ранее (Krylov et al. 1999; 2017; Penniyaunen et al. 2019; Plakhova et al. 2019). Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp method) был использован в конфигурации «регистрация активности целой клетки» («whole-cell recording») (Hamill et al. 1981). В работе использовались стандартные растворы (Pennyunen et al. 2019; Plakhova et al. 2019). Реактивы приобретались в фирме Sigma (США). Количественное измерение эффективного заряда ( $Z_{eff}$ ), переносимого активационной воротной системой при открывании каналов  $Na_v1.8$ , осуществляли путем построения логарифмической потенциалочувствительности  $L(E)$  (Krylov et al. 1999; 2017; Penniyaunen et al. 2019; Plakhova et al. 2019), используя метод Алмерса (Almers 1978).

### Органотипическая культура нервной ткани

Применяемый нами метод подробно описан в наших предыдущих работах (Lopatina et al. 2012; Penniyaunen et al. 2019; Plakhova et al. 2019). Объектами исследования были эксплантаты спинальных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов. Экспериментальные эксплантаты культивировали в присутствии убаина (Sigma, США) в концентрации 0,1 нмоль/л в течение трех суток. Эксплантаты спинальных ганглиев исследовали с помощью метода лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Для этого проводили иммуоцитохимическое окрашивание эксплантатов.

### Имуоцитохимический метод

Для визуализации эксплантатов и дальнейшей иммуофлуоресцентного анализа проводили иммуоцитохимическое окрашивание органотипической культуры спинальных ганглиев к маркеру каналов  $Na_v1.8$  и нейрофиламентам. Использовали следующие первичные и вторичные антитела: anti-sodium channel  $Na_v1.8$ , anti-neurofilament 200, anti-rabbit-TRITC и anti-rabbit-FITC. Антитела, используемые в работе, приобретались в фирме Sigma (США). Эксплантаты фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида (pH 7.4) в фосфатно-солевом буфере (PBS; Sigma, США) в течение 3 минут, затем промывали PBS. После проводили пермеабиллизацию в 0,3%-ном растворе Triton X-100 в PBS в течение 15 минут при комнатной температуре с дальнейшей отмывкой образцов, затем клетки инкубировали в 10%-ном растворе фетальной сыворотки коровы в PBS при комнатной температуре в течение 1 часа. Эксплантаты инкубировали с первичным антителом в течение ночи при 4 °С. После этого промывали клетки раствором PBS 3 раза. Инкубировали культуру клеток со вторичными антителами 1 час в темноте при 37 °С. Для визуализации ядер эксплантаты окрашивали DAPI (Sigma, США). Препараты хранили при 4 °С, затем их использовали для дальнейших исследований.

### Имуофлуоресцентный метод

Для оценки результатов иммуоцитохимического окрашивания и 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 про-



граммного обеспечения ZEN\_2012 (Carl Zeiss, Германия). Интенсивность флуоресценции количественно регистрировали в относительных единицах (о. е.). Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Конфокальная микроскопия» Института физиологии им. И. П. Павлова РАН.

### Статистическая обработка

Статистическую обработку полученных результатов выполняли в программе STATISTICA 10.0 (StatSoft, США) с использованием *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Различия принимали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Данные, полученные методом локальной фиксации потенциала, показали, что после приложения 1 нмоль/л убаина в наружный раствор величина эффективного заряда снижалась с контрольного значения заряда  $Z_{\text{eff}} = 6,7 \pm 0,4$  ( $n = 15$ ) до  $4,8 \pm 0,5$  ( $n = 15$ ). Обнаруженный эффект не устранялся предварительным действием неспецифического блокатора опиоидных рецепторов налтрексона (50 мкмоль/л). Этот факт свидетельствует о непосредственном взаимодействии убаина с соответствующим сайтом Na,K-АТФазы, а не с опиоидоподобными рецепторами, связь которых с медленными натриевыми каналами была обнаружена ранее (Krylov et al. 1999; 2017). Специфичность обнаруженного механизма проявляется еще и в том, что другой сердечный гликозид, дигоксин, не влияет на потенциалочувствительность медленных натриевых каналов. Приложение 100 нмоль/л дигоксина с наружной стороны мембраны не изменяло величину эффективного заряда активационной воротной системы медленных натриевых каналов. Отметим, что особенности химической структуры молекулы дигоксина не позволяют ему, в отличие от убаина, способного хелатировать свободные ионы кальция с участием гидроксильных групп стероидной части молекулы, активировать трансдукторный сайт связывания молекулы Na,K-АТФазы мембраны исследуемого ноцицептивного нейрона.

Детальное исследование эффектов низких концентраций убаина показало, что влияние этого агента на эффективный заряд и, как следствие, на трансдукторную функцию Na,K-АТФазы носит монотонный дозозависимый характер в диапазоне от 1 пмоль/л до 1000 нмоль/л. Даль-

нейшее повышение концентрации убаина приводило к нарушению монотонности концентрационной зависимости. Этот эффект может трактоваться как результат воздействия чрезвычайно низких (эндогенных) концентраций убаина именно на трансдукторную, а не на насосную функцию Na,K-АТФазы. Эта зависимость может быть аппроксимирована с помощью уравнения Хилла ( $K_D = 3$  нмоль/л). Именно она отражает процесс лиганд-рецепторного связывания «эндогенного» убаина, приложенного в наномолярных концентрациях, с трансдукторным сайтом Na,K-АТФазы. Очевидно, что узнавание атакующей молекулы «трансдукторным» сайтом может происходить в соответствии с наличием дополнительного фактора. Этим фактором, согласно нашему предположению, служит способность убаина хелатировать свободные ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , находящиеся в примембранном пространстве с наружной стороны мембраны ноцицептивного нейрона. Только хелатный комплекс убаин- $\text{Ca}^{2+}$  способен активировать трансдукторный сайт Na,K-АТФазы, свободный убаин этим сайтом не узнается. Вероятно, важнейшим фактором лиганд-рецепторного связывания является образование ион-ионных связей между хелатным комплексом убаин- $\text{Ca}^{2+}$  и трансдукторным сайтом. Подчеркнем, что, согласно нашему предположению, свободная молекула убаина (без кальция) неспособна активировать этот сайт.

Интенсивность флуоресценции была изменена методом конфокальной лазерной микроскопии на эксплантатах спинальных ганглиев, как в контрольных опытах, так и после воздействия ЭУ в концентрации 0,1 нмоль/л. Применение исследуемого агента в субнаномолярной концентрации приводило к ингибированию роста нейритов сенсорных нейронов спинальных ганглиев, что было визуализировано с использованием антител к каналам  $\text{Na}_v1.8$  и нейрофиламентам и оценено путем измерения флуоресценции антител к каналам  $\text{Na}_v1.8$  (рис.). Интенсивность флуоресценции антител к каналам  $\text{Na}_v1.8$  в мембране сенсорных нейронов спинальных ганглиев измеряли в относительных единицах (о. е.). После воздействия ЭУ она составляла  $4,0 \pm 0,6$  о. е. ( $n = 16$ ), а в контрольных опытах —  $5,2 \pm 0,4$  о. е. ( $n = 17$ ). Результаты иммунофлуоресцентного анализа свидетельствуют о статистически достоверном снижении уровня флуоресценции антител к каналам  $\text{Na}_v1.8$  после воздействия ЭУ.

Наши результаты свидетельствуют о том, что ЭУ запускает два разных сигнальных процесса. Первый, быстрый процесс, приводит к модуляции

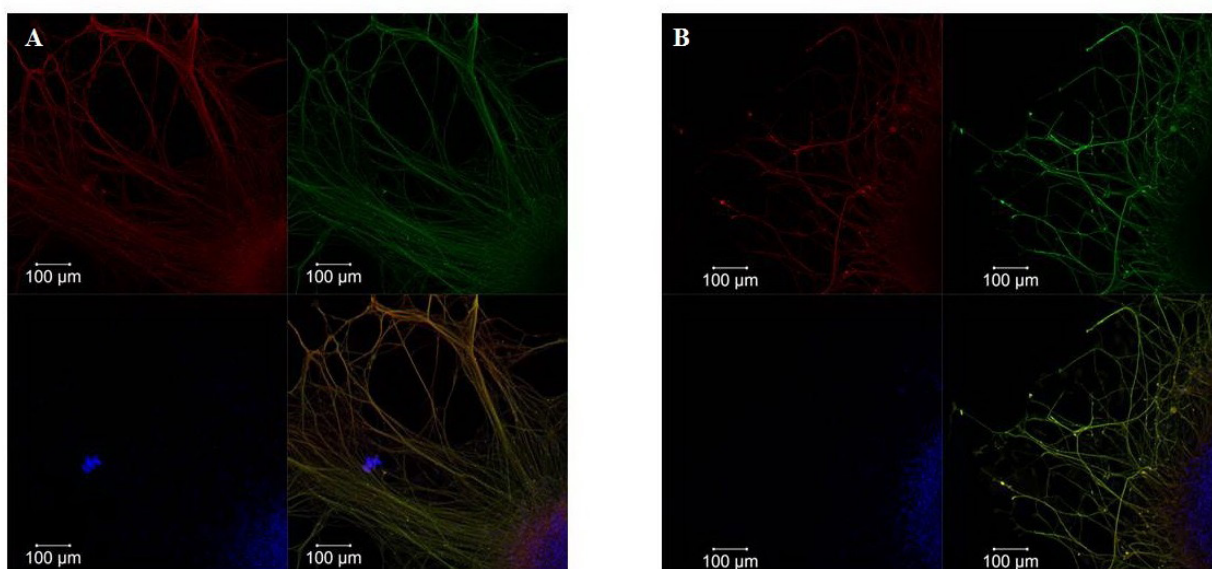


Рис. Влияние эндогенного убаина (ЭУ) на плотность каналов  $\text{Na}_v1.8$  в органотипической культуре нервной ткани. Фрагмент зоны роста эксплантата спинальных ганглиев. А — контроль; В — после воздействия ЭУ. Окраска антителами к нейрофиламентам (красный), каналам  $\text{Na}_v1.8$  (зеленый) и ядра DAPI (синий),  $\times 10$

Fig. Effect of endogenous ouabain (EO) on the density of  $\text{Na}_v1.8$  channels in organotypic nerve tissue culture. Fragment of the explant growth zone of the dorsal root ganglia (third day of culturing). A — control; B — EO-treated explant. Immunostaining with antibodies to neurofilaments (red),  $\text{Na}_v1.8$  channels (green) and DAPI nuclei (blue),  $\times 10$

активационного воротного устройства каналов  $\text{Na}_v1.8$ , что снижает их функциональную активность. Второй, медленный процесс, ведет к снижению плотности каналов  $\text{Na}_v1.8$  в мембране первичного сенсорного нейрона. Мы предполагаем, что в этом случае ЭУ запускает внутриклеточный каскад, ведущий к снижению экспрессии гена  $\text{SCN10A}$ , продуцирующего каналы  $\text{Na}_v1.8$ . Можно заключить, что эндогенный убаин выполняет важнейшую функцию модуляции функциональной активности каналов  $\text{Na}_v1.8$  при взаимодействии

с первичным сенсорным нейроном. В соответствии с нашими данными, ЭУ может являться эндогенным анальгетиком. Практическим результатом проведенного исследования стало предположение, согласно которому доставка убаина в качестве лекарственной субстанции к мембране ноцицептивного нейрона в наномолярной концентрации должна приводить к безопасному и эффективному антиноцицептивному действию этого агента на уровне организма.

## References

- Almers, W. (1978) Gating currents and charge movements in excitable membranes. In: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 82. Berlin: Springer Publ., pp. 96–190. <https://www.doi.org/10.1007/BFb0030498> (In English)
- Askari, A. (2019) The sodium pump and digitalis drugs: Dogmas and fallacies. *Pharmacology Research & Perspectives*, vol. 7, no. 4, article e00505. <https://www.doi.org/10.1002/prp2.505> (In English)
- Cui, X., Xie, Z. (2017) Protein interaction and Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Molecules*, vol. 22, no. 6, article 990. <https://www.doi.org/10.3390/molecules22060990> (In English)
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E. et al. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv — European Journal of Physiology*, vol. 391, no. 2, pp. 85–100. <https://www.doi.org/10.1007/BF00656997> (In English)
- Hamlyn, J. M., Blaustein, M. P., Bova, S. et al. (1991) Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 14, pp. 6259–6263. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.88.14.6259> (In English)
- Kawamura, A., Guo, J., Itagaki, Y. et al. (1999) On the structure of endogenous ouabain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 12, pp. 6654–6659. <https://www.doi.org/10.1073/pnas.96.12.6654> (In English)

- Kometiani, P., Li, J., Gnudi, L. et al. (1998) Multiple signal transduction pathways link Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes: The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 24, pp. 15249–15256. <https://www.doi.org/10.1074/jbc.273.24.15249> (In English)
- Krylov, B. V., Derbenev, A. V., Podzorova, S. A. et al. (1999) Morfin umen'shaet chuvstvitel'nost' k potentsialu medlennykh natrievykh kanalov [Morphine decreases the voltage sensitivity of the slow sodium channels]. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal imeni I. M. Sechenova — Russian Journal of Physiology*, vol. 85, no. 2, pp. 225–236. (In Russian)
- Krylov, B. V., Rogachevskii, I. V., Shelykh, T. N., Plakhova, V. B. (2017) *Frontiers in pain science. Vol. 1. New non-opioid analgesics: Understanding molecular mechanisms on the basis of patch-clamp and chemical studies*. Sharjah: Bentham Science Publ., 203 p. (In English)
- Lichtstein, D., Ilani, A., Rosen, H. et al. (2018) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase signaling and bipolar disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 8, article 2314. <https://www.doi.org/10.3390/ijms19082314> (In English)
- Lopatina, E. V., Yachnev, I. L., Penniyaynen, V. A. et al. (2012) Modulation of signal-transducing function of neuronal membrane Na<sup>+</sup>,K by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief. *Medicinal Chemistry*, vol. 8, no. 1, pp. 33–39. <https://www.doi.org/10.2174/157340612799278531> (In English)
- Penniyaynen, V. A., Plakhova, V. B., Rogachevskii, I. V. et al. (2019) Molecular mechanisms and signaling by comenic acid in nociceptive neurons influence the pathophysiology of neuropathic pain. *Pathophysiology*, vol. 26, no. 3–4, pp. 245–252. <https://www.doi.org/10.1016/j.pathophys.2019.06.003> (In English)
- Plakhova, V. B., Penniyaynen, V. A., Yachnev, I. V. et al. (2019) Src kinase controls signaling pathways in sensory neuron triggered by low-power infrared radiation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 97, no. 5, pp. 400–406. <https://www.doi.org/10.1139/cjpp-2018-0602> (In English)
- Skou, J. C. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 23, pp. 394–401. [https://www.doi.org/10.1016/0006-3002\(57\)90343-8](https://www.doi.org/10.1016/0006-3002(57)90343-8) (In English)
- Xie, Z., Askari, A. (2002) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase as a signal transducer. *European Journal of Biochemistry*, vol. 269, no. 10, pp. 2434–2439. <https://www.doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02910.x> (In English)