

УДК 612.82:576.54:577.3

DOI 10.29039/2413-1725-2025-11-4-186-193

КРАТКОВРЕМЕННАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ ГИППОКАМПА В УСЛОВИЯХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ БЛОКАДЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ

Савотченко А. В.¹, Чуюн Е. Н.²

¹*Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Азовский государственный педагогический университет им. П. Д. Осипенко», Бердянск, Россия*

²*Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь, Республика Крым, Россия*
E-mail: asavotchenko@yandex.ru

Полисиаловые кислоты, локализованные на наружной поверхности клеточной мембранны, широко представлены в нервной ткани. Их взаимодействие с гликолипидами и ганглиозидами имеет важное значение в процессах синаптической пластичности. Нейраминидаза является основным ферментом, регулирующим количество ПСК за счет отсоединения остатков сиаловых кислот от сиалогликоаногидратов. В данной работе мы исследовали влияние ингибирования нейраминидазы на процессы, связанные с обработкой кратковременной памяти. Ранее было показано, что блокада активности этого фермента приводит к выраженному снижению долговременной потенциации и усилению кратковременной депрессии в нейронной сети СА3-СА1 радиального слоя гиппокампа. Для подавления ферментативной активности мы использовали селективный блокатор N-ацетил-2,3-дегидро-2-деокси нейраминовую кислоту (NADNA). Наши результаты продемонстрировали, что фармакологическая блокада нейраминидазы не оказывает влияния на пластичность, индуцированную парной стимуляцией в сети СА3-СА1 гиппокампа, что указывает на отсутствие изменений в вероятности пресинаптического высвобождения медиатора. Вместе с тем было выявлено значительное снижение максимальных значений посттетанической потенциации и долговременной пластичности после короткого тетануса, что позволяет предположить участие постсинаптических механизмов в реализации эффекта нейраминидазы на синаптическую передачу.

Ключевые слова: нейраминидаза, полисиаловые кислоты, гиппокамп, синаптическая пластичность.

ВВЕДЕНИЕ

Полисиаловые кислоты (ПСК) представляют собой отрицательно заряженные цепочки, локализованные на поверхности клеточных мембран, и широко распространены в нервной ткани. Их присутствие в области СА1 гиппокампа было продемонстрировано ранее с использованием методов лектинового окрашивания [1, 2]. Роль ПСК в регуляции нейрональной возбудимости подтверждена на различных моделях эпилептогенеза, зависящем от активности синаптогенеза, и в механизмах синаптической пластичности сетей гиппокампа [3, 4]. Ключевым регулятором концентрации ПСК является эндогенный фермент нейраминидаза. При высоком уровне ее активности количество ПСК на поверхности клеточной мембранны значительно снижается. Экзогенное применение нейраминидазы на срезах

гиппокампа влияет на широкий спектр функций нейронов: от высвобождения нейромедиаторов до процессов памяти, синаптической пластичности, роста аксонов и дифференциации клеток [5]. В то же время использование ингибитора нейраминидазы оказывает противоположное действие – увеличивает количество ПСК и, как следствие, модулирует нейрональное возбуждение, что проявляется в росте частоты и амплитуды спонтанных синхронных колебаний, а также увеличении частоты суммарной нейронной активности в органотипической культуре гиппокампа крыс [1, 6]. Предыдущие исследования показали, что подавление активности нейраминидазы снижает долговременные формы синаптической пластичности как в синапсах CA3-CA1 апикальных дендритов [4], так и в синапсах мицеллярных волокон-пирамидных клеток области CA3 гиппокампа [7].

Цель исследования: определить, каким образом ингибирование нейраминидазы влияет на кратковременные формы синаптической пластичности в нейронных сетях CA3-CA1 пирамидного слоя гиппокампа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали 19–21-дневных самцов крыс линии *Wistar*. Животные получены из питомника «Рапполово» (ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константина» НИЦ «Курчатовский институт»). Крыс содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении, температуре 18–22°C, с доступом к воде и пище *ad libitum*. В качестве подложки применяли субстрат из кукурузных початков («Зилубаг» ООО, Россия), а кормление осуществляли полнорационным гранулированным кормом ЛБК-120 (ЗАО «Тосненский комбикормовый завод», Россия).

В день эксперимента животных анестезировали диэтиловым эфиром с последующей декапитацией с помощью гильотины (ООО «ИнтерЛаб, СПб, Россия). Головной мозг извлекали из черепа и немедленно помещали в охлажденную искусственную спинномозговую жидкость (ИСМЖ), насыщенную карбогеном (95 % O₂/5 % CO₂). Состав ИСМЖ (ммоль/л): NaCl – 119; KCl – 3.5; CaCl₂ – 2; MgCl₂ – 1.3; NaHCO₃ – 26; NaH₂PO₄ – 1; глюкоза – 11 (рН = 7.35). Удаляли мозжечок и фрагмент лобной доли. Оставшуюся ткань мозга фиксировали на столике вибратором (Vibroslice NVSL, «World Precision Instruments Inc.», США). Горизонтальные срезы толщиной 400 мкм получали под углом 30–35°. Для эксперимента отбирали 3–4 переживающих среза дорсального гиппокампа, содержащие также энторинальную кору, субикулюм и неокортические зоны (Te2, Te3). Срезы инкубировали в оксигенированной ИСМЖ при комнатной температуре минимум 90 мин перед использованием. От одного животного брали не более 3х срезов.

Переживающие срезы мозга переносили в регистрационную камеру электрофизиологической установки полностью погружного типа, перфузируемую аэрируемым раствором ИСМЖ (30–32° С) со скоростью 2–4 мл/мин. Отведение вызванных потенциалов производили от пирамидного слоя области CA1 гиппокампа при помощи усилителя переменного тока (PC501A, «Warner Instruments

Сорг.», США) с использованием боросиликатных микроэлектродов (сопротивление 2–3 МОм), заполненных раствором ИСМЖ. Стимуляцию коллатералей Шаффера производили на уровне области САЗ с помощью концентрического биполярного стимулирующего электрода («FHC Inc.», США), подключенного к стимулятору с изолированным выходом (ISO-Flex, «A.M.P. Instruments», Израиль). В начале каждого эксперимента определяли максимальную синаптическую реакцию последовательно повышая силу тока от 25 до 800 мА. Для регистрации базовых условий текущие значения стимуляции устанавливали на уровне 30 % от максимального ответа. Интенсивность стимуляции варьировала от 150 до 400 мА. Раздражение осуществляли каждые 20 с. Протокол стимуляции синаптической пластиичности применялся после 10–20 мин записи стабильной базовой линии. В экспериментах по исследованию парной фасилитации (PPF), 2 стимула подавали на коллатерали Шаффера САЗ-области гиппокампа с интервалом от 25 до 500 мс. Величину PPF определяли как соотношение амплитуды второго ответа к первому (A2/A1). При изучении посттетанической потенциации (ПТП) применяли протокол высокочастотной тетанической стимуляции, состоящий из 15 пульсов, подаваемых с частотой 50 Гц. Посттетанические ответы записывали с той же периодичностью, что и базовую линию, в течение 10 мин. Амплитуда стимуляции оставалась постоянной на протяжении всего эксперимента. Электрофизиологические данные оцифровывали на частоте 10 кГц с использованием аналогово-цифрового преобразователя («National Instruments», США) и сохраняли на компьютер с помощью программы WinWCP («Strathclyde Electrophysiology Software», ВБ).

Срезы мозга инкубировали с блокатором нейраминидазы NADNA на протяжении 2 ч при комнатной температуре, далее интенсивно промывали в растворе ИСМЖ перед регистрацией. Во всех экспериментах мы использовали блокатор NADNA в концентрации 500 мкмоль (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Статистический анализ результатов проводили с помощью программ Clampfit («Axon Instruments», США), Origin 7.5 («OriginLab», США) и GraphPad Prism 8 («GraphPad», США). Первоначально оценивали нормальность распределений с помощью критерия Шапиро-Уилка. Анализ выборок включал определение среднего, стандартного отклонения и ошибки среднего. Для оценки статистической значимости межгрупповой разницы использовали критерий Манна-Уитни. Изменения ПТП рассчитывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с повторными измерениями. Достоверными считались значения при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего; размеры выборки усреднения приведены в скобках.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов мы оценивали влияние фармакологической блокады нейраминидазы на кратковременную синаптическую пластиичность пирамидного слоя области СА1 гиппокампа, используя протокол парной стимуляции. Известно, что в зависимости от вероятности высвобождения нейромедиатора на пресинаптическом сайте парная пластиичность может проявляться как в форме фасилитации, так и депрессии [8].

Стимуляция коллатералей Шаффера с интервалом 25 мс вызывала фасилитацию полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (пВПСП) радиального слоя области CA1 гиппокампа после второго стимула. При этом в пирамидном слое часто наблюдалась депрессия популяционного спайка (ПС), что отражает снижение распространения возбуждения к соме и уменьшение активации пирамидных клеток [9]. Инкубация срезов в растворе с NADNA (500 мкмоль, 2 ч) усиливала этот эффект: депрессия второго ПС отмечалась у 53.3 % срезов ($n = 8$ из 15 срезов), тогда как в контроле аналогичное явление наблюдалось лишь в 33.3 % случаев ($n = 4$ из 12 срезов). Мы предполагаем, что снижение второго ПС в срезах, обработанных NADNA, связано с увеличением вероятности высвобождения медиатора после первого стимула. Подобный эффект согласуется с данными о росте эффективности синаптической передачи при ингибиции нейраминидазы.

При парной стимуляции с интервалом 50 мс депрессия ПС наблюдалась реже – у 8.3 % контрольных срезов ($n = 1$ из 12 срезов) и у 26.7 % обработанных NADNA срезов ($n = 4$ из 15 срезов). Однако соотношение амплитуд ПС между экспериментальными группами достоверно не различалось ($p = 0.2$, критерий Манна-Уитни; рис. 1).

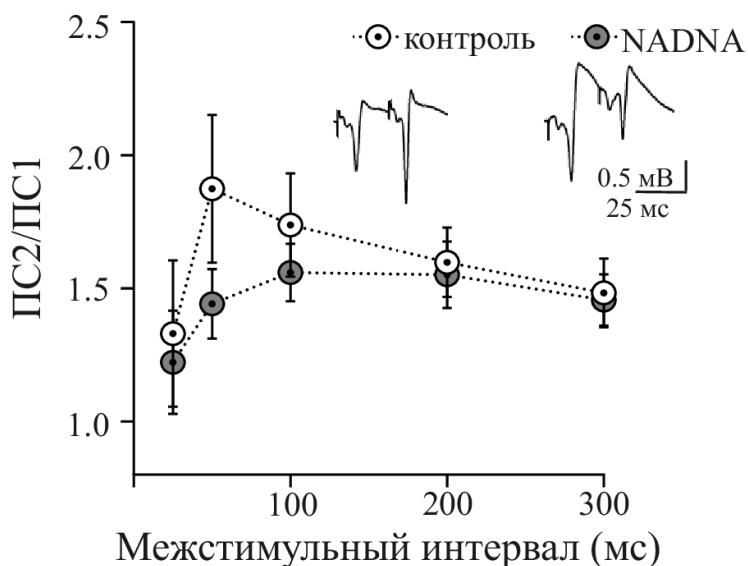


Рис. 1. Фармакологическая блокада нейраминидазы не влияет на парную фасилитацию CA3-CA1 нейронной сети гиппокампа. На верхней панели представлены репрезентативные записи популяционных спайков (ПС) контрольных (белый) и обработанных NADNA (серый) срезов.

Во второй серии опытов мы исследовали влияние блокатора нейраминидазы на ПТП – форму кратковременной синаптической пластичности, зависящую как от пресинаптических, так и постсинаптических механизмов. Краткосрочная

тетаническая стимуляция (15 импульсов с частотой 50 Гц) вызывала характерное кратковременное увеличение амплитуды ПС в обеих экспериментальных группах с последующим постепенным снижением. При этом максимальные значения ПТП были достоверно ниже в срезах, обработанных NADNA ($148.4 \pm 3.9\%$ от исходного уровня, $n = 12$), по сравнению с контролем ($192.4 \pm 7.1\%$, $n = 10$; $F_{1,20} = 36.6$, $p < 0.01$). Более того, величина потенциации, сохранявшейся через 10 мин после стимуляции, также оказалась значительно сниженной в группе NADNA ($115.4 \pm 2.3\%$, $n = 10$) относительно контроля ($137.8 \pm 1.6\%$, $n = 12$, $F_{1,20} = 43.8$, $p < 0.01$, рис. 2).

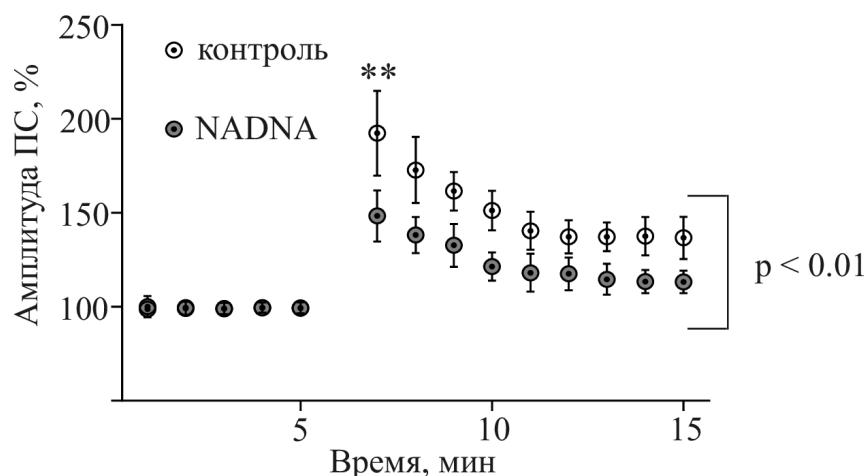


Рис. 2. Изменения посттетанической потенциации после ингибиования нейраминидазы: усредненные, нормализованные амплитуды популяционных спайков до и после 50 Гц тетанической стимуляции из 15 пульсов в контрольных (белый) и обработанных NADNA (серый) срезах.

Основным результатом настоящего исследования является то, что, несмотря на выраженный эффект блокады нейраминидазы на ПТП, она не оказывает влияния на синаптическую пластичность, индуцированную парной стимуляцией. Наши данные согласуются с результатами предыдущих работ, где экзогенное применение нейраминидазы, направленное на снижение концентрации ПСК на поверхности клеточной мембраны, также не вызывало изменений кратковременной пластичности. Подобным образом применение другого ингибитора нейраминидазы – осельтамивир-карбоксилата, активной формы противовирусного препарата Тамифлю, – не приводило к изменениям парной пластичности популяционных спайков в области CA1 гиппокампа [10]. В тоже время на синапсах от мицтых волокон к пирамидным нейронам области CA3 обработка NADNA вызывала ослабление PPF [7]. Эти результаты указывают на то, что механизмы индукции синаптической пластичности в синапсах мицтые волокна – CA3 отличается от таковых в синапсах CA3-CA1.

Поскольку PPF является индикатором вероятности высвобождения медиатора [8], мы выдвинули предположение, что фармакологическая блокада активности нейраминидазы не оказывает влияния на пресинаптические механизмы выброса. Обнаруженное снижение ПТП в срезах после предварительной обработки NADNA свидетельствует о том, что в её проявлении задействованы постсинаптические механизмы. Так как блокада нейраминидазы вызывает десиализацию клеточной мембранны, это может изменять её поверхностные свойства. Ранее было показано, что усиление сиализации мембранны или снижение активности нейраминидазы существенно изменяют нейрональную активность. Возможный механизм нарушений длительных форм синаптической пластичности при десиализации может заключаться во временном снижении синаптической силы, обусловленном истощением везикул, десенситизацией постсинаптических рецепторов или зависящей от активности интернализацией рецепторов [11, 12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашего исследования показали снижение ПТП в срезах, обработанных NADNA, что указывает на участие постсинаптических механизмов в реализации эффекта, тогда как вероятность пресинаптического высвобождения медиатора остаётся неизменной. Эти данные согласуются с представлениями о роли сиаловых кислот и нейраминидазы в регуляции возбудимости нейронов и процессов синаптической пластичности.

Таким образом, нейраминидаза может рассматриваться как важный регулятор долговременной потенциации в синапсах гиппокампа за счёт модификации постсинаптических свойств. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов, связанных с десиализацией мембранны, способно пролить свет на фундаментальные основы процессов обучения и памяти, а также открыть перспективы для разработки новых подходов к коррекции когнитивных нарушений.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства Просвещения РФ по теме «Развитие естественнонаучной грамотности обучающихся с использованием ресурсной и методической базы педагогического Кванториума» (OTGE-2025-0019, рег. № 1024122400023-5-5.3.1) и программы исследований № AAAA-A21-121011990099-6 «Физиологические механизмы биологического действия факторов разной природы и интенсивности» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского».

Список литературы

1. Sato Y. Location of sialoglycoconjugates containing the Sia(alpha)2-3Gal and Sia(alpha)2-6Gal groups in the rat hippocampus and the effect of aging on their expression / Y. Sato, Y. Akimoto, H. Kawakami [et al.] // J. Histochem. Cytochem. – 2001 – Vol. 49. – P. 1311–1319.
2. Isaev D. Role of extracellular sialic acid in regulation of neuronal and network excitability in the rat hippocampus / D. Isaev, E. Isaeva, T. Shatskikh [et al.] // J. Neurosci. – 2007. – Vol. 27. – P. 11587–11594.
3. Isaeva E. Blockade of endogenous neuraminidase leads to an increase of neuronal excitability and activity-dependent synaptogenesis in the rat hippocampus / E. Isaeva, I. Lushnikova, A. Savrasova [et al.] // Eur. J. Neurosci. – 2010. – Vol. 32. – P. 1889–1896.

4. Savotchenko A. Neuraminidase inhibition primes short-term depression and suppresses long-term potentiation of synaptic transmission in the rat hippocampus / A. Savotchenko, A. Romanov, D. Isaev [et al.] // Neural Plast. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–10.
5. Bonfanti L. The PSA-NCAM-Positive "Immature" Neurons: An Old Discovery Providing New Vistas on Brain Structural Plasticity / L. Bonfanti, T. Seki // Cells. – 2021. – Vol. 10. – P. 2542.
6. Usami A. Oseeltamivir enhances hippocampal network synchronization / A. Usami, T. Sasaki, N. Satoh [et al.] // J. Pharmacol. Sci. – 2008. – Vol. 106. – P. 659–662.
7. Minami A. Role of sialidase in long-term potentiation at mossy fiber-CA3 synapses and hippocampus-dependent spatial memory / A. Minami, M. Saito, S. Mamada [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol. 11. – P. 1–13.
8. Zucker R. Short-term synaptic plasticity / R. Zucker, W. Regehr // Ann. Rev. Physiol. – 2002. – Vol. 64. – P. 355–405.
9. Izumi Y. Neuroexcitatory actions of Tamiflu and its carboxylate metabolite / Y. Izumi, K. Tokuda, K. O'Dell [et al.] // Neurosci. Lett. – 2007. – Vol. 426. – P. 54–58.
10. Izumi Y. Synaptic and behavioral interactions of oseltamivir (Tamiflu) with neurostimulants / Y. Izumi, K. Tokuda, K. O'Dell [et al.] // Hum. Exp. Toxicol. – 2008. – Vol. 27. – P. 911–917.
11. Heine M. Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission / M. Heine, L. Groc, R. Frischknecht [et al.] // Science. – 2008. – Vol. 320. – P. 201–205.
12. Gambrill A. Dynamic regulation of NMDA receptor transmission / A. Gambrill, G. Storey, A. Barria // J. Neurophysiol. – 2011. – Vol. 105. – P. 162–171.

SHORT-TERM PLASTICITY OF THE HIPPOCAMPUS UNDER PHARMACOLOGICAL BLOCKADE OF NEURAMINIDASE

Savotchenko A. V.¹, Chuyan E. N.²

¹*Azov State Pedagogical University, Berdyansk, Russia*

²*V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia*

E-mail: asavotchenko@yandex.ru

Polysialic acids (PSA), negatively charged chains, are localized on the outer surface of the cell membrane, are widely distributed in the neuronal tissue. Previously the PSA appearance in the CA1 hippocampus was demonstrated using SNA-I lectin staining. Their interaction with glycolipids and gangliosides plays a crucial role in synaptic plasticity. The role of PSA on the excitability was shown in the different models of epileptogenesis, activity-dependent synaptogenesis and synaptic plasticity of the hippocampal neuronal networks. Neuraminidase is the key enzyme regulating the amount of PSA by removing sialic acid residues from sialoglycoconjugates. High concentrations of neuraminidase significantly decrease the level of PSA on membrane surface. Neuraminidase applied to the hippocampus influences many neural functions including neurotransmitter release, memory, synaptic plasticity, axon outgrowth and neural differentiation. Neuraminidase blocker has an opposite effect on the PSA cluster quantity and respectively on neuronal excitability: increases the firing frequency and amplitude of spontaneous synchronous oscillations, and the frequency of multiple unit activity in cultured rat hippocampal slices. In the present study, we investigated the role of neuraminidase inhibition in hippocampal short-term memory processing. Previous studies have shown that blockade of ne activity

results in a pronounced reduction of long-term potentiation and facilitation of short-term depression within the CA3–CA1 network of the hippocampal *stratum radiatum*. To suppress enzymatic activity, we employed the selective inhibitor N-acetyl-2,3-dehydro-2-deoxyneuraminic acid (NADNA). Our findings demonstrated that pharmacological inhibition of neuraminidase does not affect plasticity induced by paired-pulse stimulation in the CA3-to-CA1 hippocampal circuits, indicating no changes in presynaptic release probability. At the same time, we observed a significant reduction in both the maximal values of post-tetanic potentiation and long-term plasticity following a brief tetanus, suggesting the involvement of postsynaptic mechanisms in mediating the effects of neuraminidase on synaptic transmission.

Keywords: neuraminidase, polysialic acids, hippocampus, synaptic plasticity.

References

1. Sato Y., Akimoto Y., Kawakami H. [et al.]. Location of sialoglycoconjugates containing the Sia(alpha)2-3Gal and Sia(alpha)2-6Gal groups in the rat hippocampus and the effect of aging on their expression, *J. Histochem. Cytochem.*, **49** (2001).
2. Isaev D., Isaeva E., Shatskikh T. [et al.]. Role of extracellular sialic acid in regulation of neuronal and network excitability in the rat hippocampus, *J. Neurosci.*, **27** (2007).
3. Isaeva E., Lushnikova I., Savrasova A. [et al.]. Blockade of endogenous neuraminidase leads to an increase of neuronal excitability and activity-dependent synaptogenesis in the rat hippocampus, *Eur. J. Neurosci.*, **32** (2010).
4. Savotchenko A., Romanov A., Isaev D. [et al.]. Neuraminidase inhibition primes short-term depression and suppresses long-term potentiation of synaptic transmission in the rat hippocampus, *Neural Plast.*, **2015** (2015).
5. Bonfanti L., Seki T. The PSA-NCAM-Positive "Immature" Neurons: An Old Discovery Providing New Vistas on Brain Structural Plasticity, *Cells*, **10** (2021).
6. Usami A., Sasaki T., Satoh N. [et al.]. Oseltamivir enhances hippocampal network synchronization, *J. Pharmacol. Sci.*, **106** (2008).
7. Minami A., Saito M., Mamada S. [et al.]. Role of sialidase in long-term potentiation at mossy fiber-CA3 synapses and hippocampus-dependent spatial memory, *PLoS One*, **11** (2016).
8. Zucker R., Regehr W. Short-term synaptic plasticity, *Ann. Rev. Physiol.*, **64** (2002).
9. Izumi Y., Tokuda K., O'Dell K. [et al.]. Neuroexcitatory actions of Tamiflu and its carboxylate metabolite, *Neurosci. Lett.*, **426** (2007).
10. Izumi Y., Tokuda K., O'Dell K. [et al.]. Synaptic and behavioral interactions of oseltamivir (Tamiflu) with neurostimulants, *Hum. Exp. Toxicol.*, **27** (2008).
11. Heine M., Groc L., Frischknecht R. [et al.]. Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission, *Science*, **320** (2008).
12. Gambrill A., Storey G., Barria A. Dynamic regulation of NMDA receptor transmission, *J. Neurophysiol.*, **105** (2011).