

УДК 612.832

АГОНИСТЫ 5-НТ<sub>1</sub> И 5-НТ<sub>2</sub>-РЕЦЕПТОРОВ ПО-РАЗНОМУ МОДУЛИРУЮТ ВОЗБУДИМОСТЬ МОТОНЕЙРОНОВ СПИННОГО МОЗГА ЛЯГУШКИ© 2019 г. Н. И. Калинина<sup>1,\*</sup>, А. В. Зайцев<sup>1</sup>, Н. П. Веселкин<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: nkalinina54@mail.ru

Поступила в редакцию 11.02.2019 г.

После доработки 25.02.2019 г.

Принята к публикации 22.03.2019 г.

На препарате изолированного поясничного сегмента спинного мозга лягушки с помощью методики внутриклеточного отведения потенциалов исследовано модулирующее влияние специфических агонистов и антагонистов 5-НТ<sub>1,2</sub>-рецепторов на мембранные свойства поясничных мотонейронов. Апликация агониста 5-НТ<sub>2A,B,C</sub>-рецепторов  $\alpha$ -Me-5-НТ вызывала деполяризацию мембраны мотонейрона. Деполяризация не развивалась при совместной апликации  $\alpha$ -Me-5-НТ со специфическим антагонистом 5-НТ<sub>2B,C</sub>-рецепторов SB206553.  $\alpha$ -Me-5-НТ уменьшал амплитуду mАНР и увеличивал число антидромных потенциалов действия. Этот эффект нивелировался при апликации антагониста SB206553. Агонист 5-НТ<sub>1A/7</sub>-рецепторов 8-ОН-ДРАТ оказывал время-зависимый эффект на количество антидромных ПД, вызывая вначале кратковременное возбуждающее, а позже тормозное действие. Полученные данные свидетельствуют о наличии 5-НТ<sub>1A/7</sub> и 5-НТ<sub>2B,C</sub>-рецепторов на постсинаптической мембране мотонейронов. Мы предполагаем возможную совместную модуляцию аккомодационных свойств мотонейрона двумя типами серотониновых рецепторов 5-НТ<sub>2B,C</sub> и 5-НТ<sub>1A</sub>.

*Ключевые слова:* спинной мозг, мотонейрон, 5-НТ, лягушка

DOI: 10.1134/S0044452919040065

## ВВЕДЕНИЕ

Серотонин (5-НТ) — один из основных нейромедиаторов и нейромодуляторов в ЦНС позвоночных и беспозвоночных животных [1]. Большинство серотонинергических нейронов расположены в ядрах шва и ретикулярной формации ствола мозга. Нисходящие проекции серотонинергических нейронов в спинной мозг обеспечивают модуляцию локомоции, половой функции и мочеиспускания [2, 3]. Согласно гипотезе, предложенной Якобсом и Форнелом, серотонин облегчает моторный выход и подавляет сенсорный вход в спинном мозге [4].

*Принятые сокращения:* МПП — мембранный потенциал покоя; ПД — потенциал действия; 5-НТ — серотонин; fАНР — быстрая фаза следовой гиперполяризации; mАНР — средняя фаза следовой гиперполяризации;  $\alpha$ -Me-5-НТ ( $\alpha$ -Methyl-5-hydroxytryptamine maleate) — специфический агонист 5-НТ<sub>2A,2B,2C</sub>-рецепторов, 8-ОН-ДРАТ ( $\pm$ )-8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin hydrobromide) — агонист 5-НТ<sub>1A/7</sub>-рецепторов, суматриптан (3-[2-(Dimethylamino)ethyl]-N-methyl-1H-indole-5-methanesulfonamide succinate) — агонист 5-НТ<sub>1B/D</sub>-рецепторов, кетансерин (3-[2-[4-(4-Fluorobenzoyl)-1-piperidinyl]ethyl]-2,4[1H,3H]-quinazolinedione tartrate) — селективный антагонист 5-НТ<sub>2A</sub>-рецепторов, SB206553 (3,5-Dihydro-5-methyl-N-3-pyridinylbenzo[1,2-b:4,5-b']dipyrrole-1(2H)-carboxamide hydrochloride) селективный антагонист 5-НТ<sub>2B,2C</sub>-рецепторов.

Многие экспериментальные данные подтверждают эту гипотезу [5–8], однако нейронные и молекулярные механизмы действия серотонина в спинном мозге известны лишь частично.

Серотонин оказывает влияние на нейронную активность посредством 14 генетически, фармакологически и функционально различающихся 5-НТ-рецепторов, принадлежащих семи семействам, 5-НТ<sub>1</sub>–5-НТ<sub>7</sub> [9, 10]. За исключением одного типа (5-НТ<sub>3</sub>), являющегося лиганд-управляемым ионным каналом, все 5-НТ-рецепторы являются метаболитными, связанными с G-белками. В мембране мотонейронов спинного мозга млекопитающих экспрессируются несколько типов серотониновых рецепторов: 5-НТ<sub>1A,B,D</sub>, 5-НТ<sub>2A,B,C</sub> и 5-НТ<sub>5A</sub> [3]. Данные об экспрессии серотониновых рецепторов в спинном мозге у других классов позвоночных животных пока неполные. Описаны некоторые пре- и постсинаптические механизмы модуляции нейронной активности серотонином в спинном мозге низших позвоночных, в частности, у круглоротых [11] и амфибий [12–16]. Недавно мы показали, что серотонин уменьшает частоту глицинергических миниатюрных тормозных постсинаптических потенциалов (мТПСП), не оказывая за-

метного влияния на частоту ГАМКергических мТПСР [17]; этот эффект реализуется посредством активации пресинаптических 5-НТ<sub>1B,D</sub>-рецепторов и приводит к частичному облегчению моторного выхода [18].

Постсинаптические механизмы действия серотонина ранее исследовались на мотонейронах млекопитающих [19, 20], круглоротых (миноги) [21, 22] и рептилий (черепахи) [3]. Как правило, серотонин уменьшает частотную аккомодацию нейронов из-за уменьшения амплитуды средней фазы следовой гиперполяризации, поэтому мотонейрон разряжается дольше и с более высокой частотой [23]. При использовании селективного агониста 5-НТ<sub>1A/7</sub>-рецепторов 8-ОН-ДРАТ было показано, что реализация данного эффекта на спинальных мотонейронах черепахи [3, 24], крысы [19] и миноги [25] обеспечивается посредством активации 5-НТ<sub>1A</sub>-рецепторов. Показана роль 5-НТ<sub>2</sub>-рецепторов в облегчении постоянных внутренних токов (РТС) в спинальных мотонейронах крыс [26, 27], а также в облегчении кальциевых токов, способствующих поддержанию плато потенциалов в спинальных мотонейронах черепахи [28]. На мотонейронах земноводных подобного рода исследований до настоящего времени не проводилось.

Целью данной работы стало исследование модулирующего действия агонистов и антагонистов серотониновых рецепторов первого и второго типа (5-НТ<sub>1,2</sub>) на мембранные свойства спинальных мотонейронов лягушки.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на препарате изолированного спинного мозга лягушки *Rana ridibunda*. Под эфирным наркозом производили дорсальную ламинэктомию. После снятия оболочки выделяли IX и X поясничные сегменты спинного мозга вместе с корешками в виде фронтальных срезов толщиной 2–3 мм. Один из них фиксировали в экспериментальной камере роstralной поверхностью вверх. Второй помещали в физраствор и оставляли при температуре 4°C и использовали в эксперименте на следующий день. Между перерезкой нисходящих серотонинергических волокон и внутриклеточным отведением от мотонейронов проходило 4–5 ч в первый день и 26–30 ч на второй день эксперимента.

Для суперфузии использовали раствор следующего состава (в мМ): 100 NaCl, 2KCl, 0.5MgCl<sub>2</sub>, 5.5 глюкоза, 1.5CaCl<sub>2</sub>, 9NaHCO<sub>3</sub>, 2 Трис, рН 7.4–7.6, аэрируемый газовой смесью (98% O<sub>2</sub> и 2% CO<sub>2</sub>) и имеющий температуру 16–18°C. Скорость потока составляла 6 мл/мин, объем ванны 0.5 мл. Мотонейроны идентифицировали по антидромному потенциалу действия, возникающему при стимуляции вентрального корешка. Контроль

мембранного потенциала покоя осуществлялся с помощью цифрового вольтметра.

Потенциалы отводили от мотонейронов IX или X сегментов внутриклеточно с помощью острых стеклянных микроэлектродов с диаметром кончика 1–1.5 мкм, заполненных раствором KCl (3 М), имевших сопротивление 5–10 МОм. В части экспериментов (при проверке действия апамина – блокатора Ca<sup>2+</sup>-зависимых калиевых каналов малой проводимости) микроэлектроды заполнялись смесью 3М KCl и 2М CsCl в равных пропорциях. Потенциалы регистрировали с помощью микроэлектродного дифференциального усилителя, разработанного в нашей лаборатории (вед. инженер Б.Т. Рябов), оцифровывали с частотой 10–20 кГц с помощью АЦП NI USB-6211 (National Instruments, США) и записывали на компьютере, используя программу WinWCP (Strathclyde Electrophysiology Software, Великобритания).

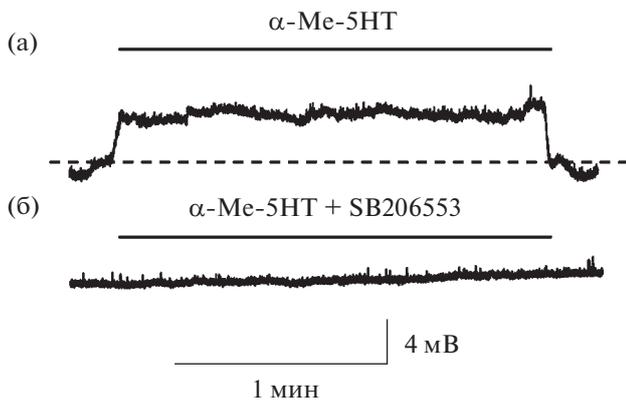
В ходе экспериментов регистрировали мембранный потенциал покоя, входное сопротивление нейрона (по величине изменения потенциала мембраны на инжецируемый постоянный ток), амплитуду и полуширину потенциала действия (ПД), быструю и среднюю фазы следовой гиперполяризации антидромного ПД.

Специфический агонист 5-НТ<sub>2A,2B,2C</sub>-рецепторов  $\alpha$ -Me-5-НТ ( $\alpha$ -Methyl-5-hydroxytryptamine maleate) (10 мкМ), агонист 5-НТ<sub>1A/7</sub>-рецепторов 8-ОН-ДРАТ ( $\pm$ )-8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin hydrobromide (10 мкМ), агонист 5-НТ<sub>1B/D</sub>-рецепторов суматриптан (3-[2-(Dimethylamino)ethyl]-N-methyl-1H-indole-5-methanesulfonamide succinate) (10 мкМ), селективный антагонист 5-НТ<sub>2A</sub>-рецепторов кетансерин (3-[2-[4-(4-Fluorobenzoyl)-1-piperidinyl]ethyl]-2,4[1H,3H]-quinazolinone dione tartrate) (10 мкМ), селективный антагонист 5-НТ<sub>2B,2C</sub>-рецепторов SB206553 (3,5-Dihydro-5-methyl-N-3-pyridinylbenzo[1,2-b:4,5-b']dipyrrole-1(2H)-carboxamide hydrochloride) (10 мкМ), блокатор Ca-зависимых калиевых каналов апамин (100 нМ) добавляли в перфузирующий раствор. Выбор концентраций веществ был основан на данных литературы (Holohean, Hackman, 2004; Hsiao et al., 1997). Время, необходимое для замены раствора в ванне, составляло порядка 40–60 с. Все реактивы были приобретены в Sigma-Aldrich или Tocris Bioscience.

Сравнение средних величин производилось с помощью парного *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Для статистического анализа и построения графиков использовали программы Sigma Plot 11.0 и MS Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Поясничные мотонейроны идентифицировали по наличию антидромного потенциала действия,



**Рис. 1.** Действие агониста и антагониста 5-НТ<sub>2</sub>-рецепторов  $\alpha$ -Ме-5-НТ и SB 206553 соответственно на МПП. а – аппликация  $\alpha$ -Ме-5-НТ (10 мкМ, 2 мин) вызывает деполяризацию в мотонейроне (ТТХ-блок); б – деполяризация исчезает при совместной аппликации  $\alpha$ -Ме-5-НТ и SB 206553 (10 мкМ).

возникающего при стимуляции IX или X вентрального корешка. У всех нейронов измеряли входное сопротивление и характеристики вызванных антидромных ПД. В дальнейший анализ включали мотонейроны с мембранным потенциалом покоя от -60 мВ и амплитудой антидромного потенциала не менее 65 мВ. Средние значения электрофизиологических параметров мотонейронов в контроле и при действии агонистов 5-НТ<sub>1,2</sub>-рецепторов представлены в табл 1.

**Действие агониста 5-НТ<sub>2A,B,C</sub>-рецепторов  $\alpha$ -Ме-5-НТ на электрофизиологические свойства мотонейронов.** Чтобы выявить эффект активации 5-НТ<sub>2</sub>-рецепторов на пассивные свойства мембраны мотонейронов, агонист 5-НТ<sub>2A,B,C</sub>-рецепторов  $\alpha$ -Ме-5-НТ (10 мкМ) добавляли в перфузирующий раствор в условиях блока спайковой активности с помощью ТТХ (1 мкМ).  $\alpha$ -Ме-5-НТ вызывал деполяризацию мембраны поясничных мотоней-

ронов на 0.7–3.4 мВ ( $n = 5$ , парный  $t$ -тест,  $p < 0.05$ , рис. 1а, таблица 1), деполяризация не наблюдалась при совместной аппликации  $\alpha$ -Ме-5-НТ и специфического антагониста 5-НТ<sub>2B,C</sub>-рецепторов SB206553 (рис. 1б) во всех исследованных клетках. Этот факт указывает на то, что в мембране мотонейрона экспрессированы 5-НТ<sub>2B,C</sub>-рецепторы. Входное сопротивление мембраны при аппликации  $\alpha$ -Ме-5-НТ увеличивалось на 20% (табл. 1).

Эффекты активации 5-НТ<sub>2</sub>-рецепторов на активные свойства мембраны мотонейронов изучали на вызванных антидромных ПД. Аппликация  $\alpha$ -Ме-5-НТ вызывала увеличение полуширины антидромного ПД, а также уменьшение амплитуды быстрой фазы следовой гиперполяризации (fАНР) на 25–38% и средней фазы (mАНР) примерно в 2 раза ( $n = 7$ ,  $p < 0.05$ , таблица, рис. 2). При отмывке fАНР восстанавливалась к исходному значению, однако восстановления mАНР не происходило (рис. 2а).

Антагонист 5-НТ<sub>2A</sub>-рецепторов кетансерин (10 мкМ) и селективный антагонист 5-НТ<sub>2B,C</sub>-рецепторов SB 206553 (10 мкМ), добавленные в перфузирующий раствор совместно с агонистом  $\alpha$ -Ме-5-НТ, нивелировали эффект последнего ( $n = 5$ , рис. 2б).

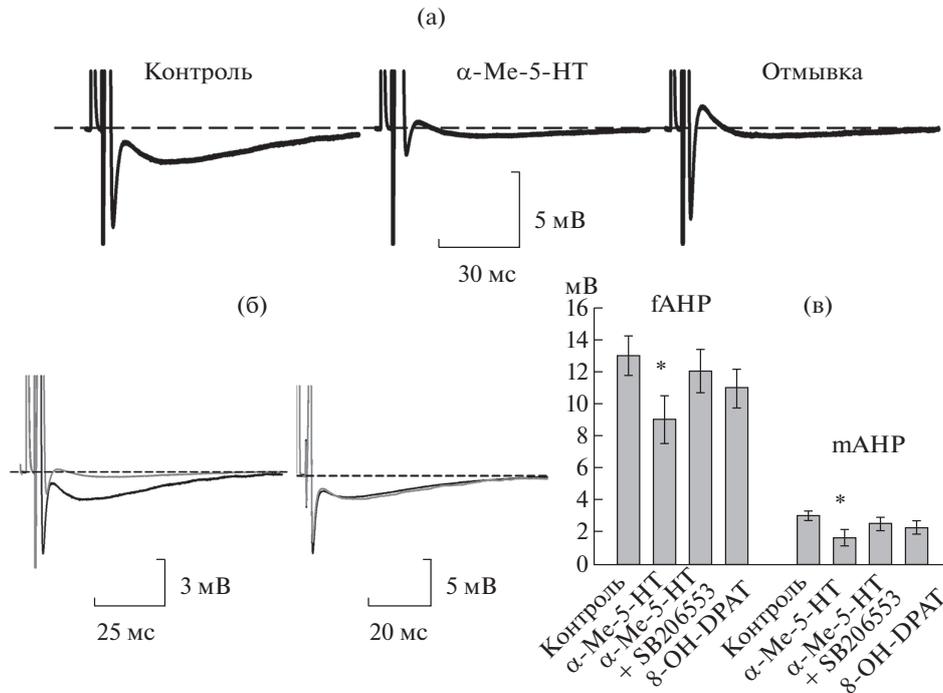
Добавление  $\alpha$ -Ме-5-НТ также увеличивало число вызванных антидромных ПД в несколько раз (рис. 3а, б, регистрации ПД проводилась в течение 1 с,  $n = 5$ ). При совместной аппликации  $\alpha$ -Ме-5-НТ и антагониста 5-НТ<sub>2A</sub>-рецепторов кетансерина наблюдался тот же самый эффект (рис. 3в), в то время как при совместной аппликации  $\alpha$ -Ме-5-НТ и антагониста 5-НТ<sub>2B,C</sub>-рецепторов SB206553 число антидромных ПД не изменялось по сравнению с контролем (рис. 3г).

Для антидромного ПД мы не могли измерить латентность, т.к. она маскируется артефактом стимула, но мы могли регистрировать ее у ПД, вызванного стимуляцией дорсального корешка. Средняя

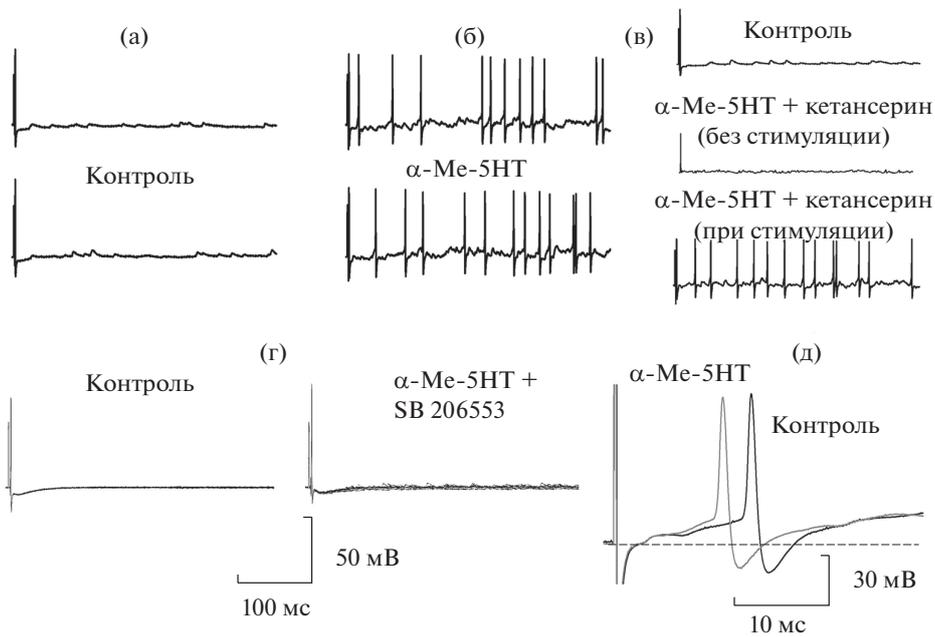
**Таблица 1.** Сравнение свойств мотонейронов в контроле и в присутствии агонистов 5-НТ<sub>1,2</sub>-рецепторов

	Контроль	$\alpha$ -Ме-5-НТ	8-ОН-DPAT
Число мотонейронов ( $n$ )	14	7	5
Мембранный потенциал покоя, мВ	$-67.2 \pm 1.6$	$-63.7 \pm 2.7^*$	$-66.5 \pm 1.2$
Входное сопротивление, МОм	$7.3 \pm 0.7$	$8.8 \pm 0.8^*$	$7.0 \pm 0.6$
Амплитуда антидромного ПД, мВ	$75 \pm 2$	$73 \pm 5$	$75 \pm 2$
Полуширина антидромного ПД, мс	$0.79 \pm 0.03$	$1.1 \pm 0.2^*$	$0.83 \pm 0.02$
Быстрая фаза следовой гиперполяризации (fАНР), мВ	$-12.9 \pm 1.2$	$-8.6 \pm 1.5^*$	$-10.7 \pm 1.3$
Средняя фаза следовой гиперполяризации (mАНР), мВ	$-3.0 \pm 0.2$	$-1.7 \pm 0.5^*$	$-2.5 \pm 0.4$
Число вызванных антидромных ПД за секунду	$1.0 \pm 0.0$	$10.0 \pm 3.0^*$	$2.5 \pm 0.5$ (В) $0.5 \pm 0.5$ (Т)

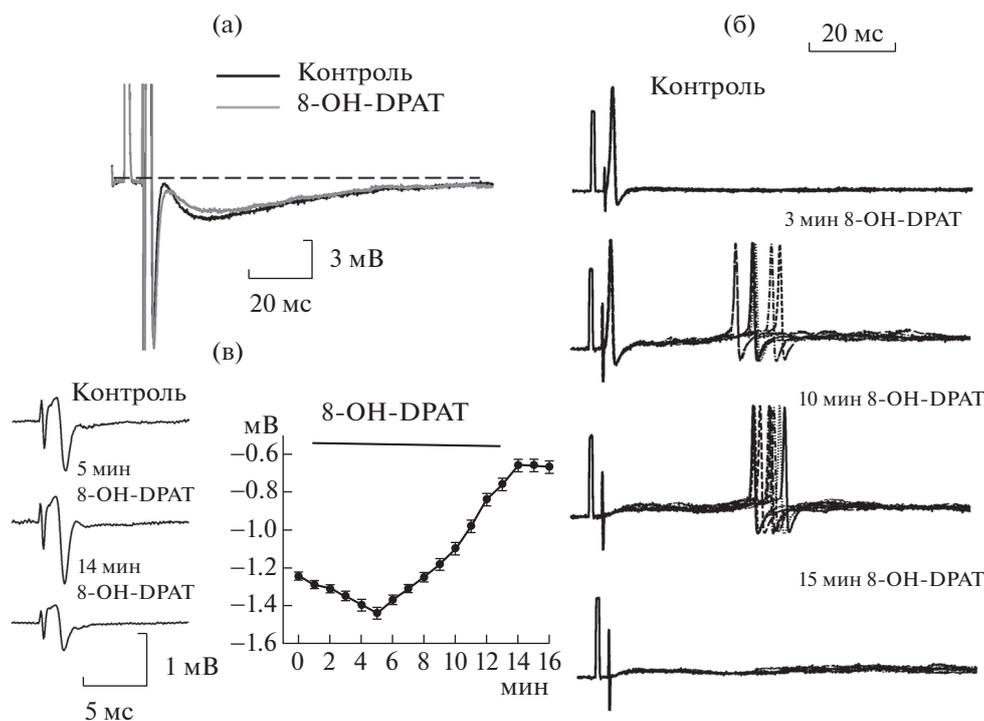
\* Статистически значимое различие ( $p < 0.05$ , парный  $t$ -тест) (В) – возбуждающий эффект, (Т) – тормозной эффект.



**Рис. 2.** Действие агонистов и антагониста 5-НТ<sub>1,2</sub>-рецепторов на fАНР и mАНР антидромного ПД, а – слева направо: контроль, при аппликации  $\alpha$ -Me-5-НТ, отмывка. Аппликация агониста 5-НТ<sub>2</sub>-рецепторов  $\alpha$ -Me-5-НТ (10 мкМ) вызывает уменьшение fАНР и mАНР антидромного ПД, при отмывке не происходит восстановления mАНР; б – антагонист 5-НТ<sub>2</sub>-рецепторов SB 206553 (10 мкМ) (справа) нивелирует действие агониста (слева). Контроль (черный цвет), вещество (серый цвет); в – диаграммы, иллюстрирующие достоверное уменьшение амплитуды fАНР и mАНР под действием агонистов и антагониста 5-НТ<sub>2</sub>-рецепторов.



**Рис. 3.** Действие агониста и антагонистов 5-НТ<sub>2</sub>-рецепторов  $\alpha$ -Me-5-НТ, кетансерина и SB206553 соответственно на число антидромных ПД. а – контроль (2 отдельных пробега), б – при аппликации  $\alpha$ -Me-5-НТ (10 мкМ) (2 отдельных пробега); в – сверху вниз: контроль, при совместной аппликации  $\alpha$ -Me-5-НТ и кетансерина без стимуляции и при стимуляции (одиночные пробеги); для а–в: калибровка 50 мВ, развертка 1 с; г – контроль (слева), при совместной аппликации  $\alpha$ -Me-5-НТ и SB206553 (10 мкМ) (справа), наложение 10 пробегов; а–в и г – два разных мотонейрона. Заметьте отсутствие повторяющихся разрядов при совместной аппликации  $\alpha$ -Me-5-НТ и SB206553; д – действие  $\alpha$ -Me-5-НТ на латентность первого ПД, вызванной стимуляцией дорсального корешка.



**Рис. 4.** Действие агониста 5-HT<sub>1A,7</sub>-рецепторов 8-OH-DPAT на электрофизиологические параметры мотонейрона. а – действие на амплитуду fАНР и mАНР антидромного ПД; б – время-зависимый эффект 8-OH-DPAT на частоту и время возникновения антидромного ПД. Сверху вниз: контроль, 3, 10 и 15 мин аппликации 8-OH-DPAT (10 мкМ), калибровка 50 мВ; в (слева) – влияние на полевой антидромный потенциал в контроле и через 5 и 14 мин аппликации 8-OH-DPAT; в (справа) – график зависимости средней амплитуды антидромного полевого потенциала (ось у) от времени аппликации агониста (ось x) для индивидуального мотонейрона.

латентность ПД, возникающего на стимуляцию дорсального корешка (считая от артефакта стимула) в контроле составила  $25 \pm 6$  мс, при этом минимальная латентность для первого спайка была 12 мс, и максимальная латентность для последнего спайка – 67 мс. Через 3 мин аппликации  $\alpha$ -Me-5-HT средняя латентность составила  $18.6 \pm 1.4$  мс, минимальная латентность для первого спайка 8 мс (рис. 3д), и максимальная латентность для последнего спайка 29 мс. Этот факт также может свидетельствовать об увеличении возбудимости мембраны мотонейрона.

**Действие агонистов 5-HT<sub>1</sub>-рецепторов на электрофизиологические свойства мотонейронов.** В отличие от  $\alpha$ -Me-5-HT, агонист 5-HT<sub>1A,7</sub>-рецепторов 8-OH-DPAT не вызывал деполяризацию мембраны и не изменял входное сопротивление, однако амплитуда mАНР уменьшилась в трех клетках из пяти (в гораздо меньшей степени, чем от  $\alpha$ -Me-5-HT, таблица и рис. 4а). По-видимому, даже этого незначительного уменьшения было достаточно, чтобы вызвать увеличение числа антидромных ПД в первые минуты аппликации вещества. Но позже развивался тормозный эффект, вплоть до полного угнетения ПД. Агонист 5-HT<sub>1B,D</sub>-рецепторов су-

матриптан ( $n = 4$ ) не оказывал заметного влияния на форму следовой гиперполяризации.

В то же время 8-OH-DPAT оказывал время-зависимый эффект на число спайков и время их возникновения: в первые 3–7 мин аппликации 8-OH-DPAT наблюдалось увеличение числа ПД, затем через 10 мин латентный период возникновения первого вызванного ПД увеличивался на 40–60 мс по сравнению с контролем, а через 15 мин ПД полностью исчезали (рис. 4б). Таким образом, 8-OH-DPAT первоначально увеличивал возбудимость мотонейронов, а затем уменьшал ее. Аналогичный время-зависимый эффект действия 8-OH-DPAT мы наблюдали при регистрации антидромного полевого потенциала: в первые 3–5 мин – увеличение амплитуды полевого потенциала, а затем снижение ее через 15 мин (рис. 4в).

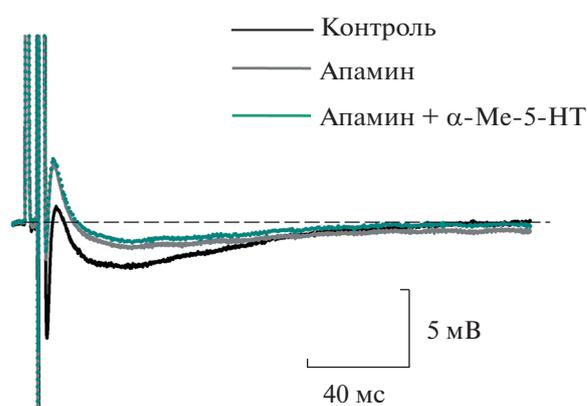
**Увеличение возбудимости мотонейронов реализуется через модуляцию работы Ca<sup>2+</sup>-зависимых калиевых каналов.** Известно, что mАНР опосредуется Ca<sup>2+</sup>-зависимыми K<sup>+</sup>-каналами (СК-каналы), которые блокируются апамином [22, 29, 24, 30]. Уменьшение амплитуды mАНР под действием  $\alpha$ -Me-5-HT может быть обусловлено как ослаблением тока через СК-каналы, вызванным их негативной модуляцией, либо увеличением катионных то-

ков через кальциевые или натриевые каналы, маскирующих mАНР и обеспечивающих следовую деполяризацию. Чтобы выявить механизм действия агонистов серотониновых рецепторов на следовые процессы, мы использовали фармакологический подход. Аппликация апамина (100 нМ) уменьшала амплитуду mАНР, а также выявляла следовую деполяризацию. При совместной аппликации апамина и  $\alpha$ -Me-5-НТ дополнительных эффектов не наблюдалось (рис. 5). Таким образом, активация 5-НТ<sub>2A,B,C</sub>-рецепторов с помощью агониста  $\alpha$ -Me-5-НТ приводит к ослаблению тока через SK-каналы.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В мембране мотонейронов спинного мозга млекопитающих экспрессируются несколько типов серотониновых рецепторов: 5-НТ<sub>1A,B,D</sub>, 5-НТ<sub>2A,B,C</sub> и 5-НТ<sub>5A</sub> (Perrier et al., 2013). В наших экспериментах аппликация агониста 5-НТ<sub>2A,B,C</sub>-рецепторов  $\alpha$ -Me-5-НТ вызывала деполяризацию мембраны мотонейрона, деполяризация не развивалась при совместной аппликации  $\alpha$ -Me-5-НТ со специфическим антагонистом 5-НТ<sub>2B,C</sub>-рецепторов SB206553. В данной работе мы также показали, что  $\alpha$ -Me-5-НТ уменьшает амплитуду mАНР и увеличивает число антидромных ПД. Этот эффект нивелировался при аппликации антагониста SB 206553. Агонист 5-НТ<sub>1A</sub>-рецепторов 8-ОН-DRAT оказывал время-зависимый эффект на количество антидромных ПД, вызывая вначале кратковременное возбуждающее, а позже тормозное действие. Таким образом, наши электрофизиологические и фармакологические данные свидетельствуют о наличии 5-НТ<sub>1A</sub> и 5-НТ<sub>2B,C</sub>-рецепторов на постсинаптической мембране мотонейронов спинного мозга лягушки.

Одним из хорошо известных механизмов действия 5-НТ является уменьшение амплитуды mАНР, которая опосредуется  $Ca^{2+}$ -зависимыми апамин-чувствительными  $K^+$  каналами (SK каналами) [24, 30]. Фармакологические тесты показали, что 5-НТ, добавленный к внеклеточной среде, ингибирует mАНР в спинальных мотонейронах [24], гипоглоссальных мотонейронах [19], тройничных мотонейронах [20] или мотонейронах-закрывателях челюсти, [31]. mАНР играет важную роль в установлении частоты разрядов мотонейронов за счет задержки появления следующего потенциала действия. Таким образом, модуляция mАНР является очевидной мишенью для тонкой настройки активности мотонейронов. Regier и Delgado-Lezama показали, что синаптически высвобождаемый 5-НТ из ядер шва также ингибирует mАНР мотонейронов [32]. В результате частота разрядов сильно возрастает. Большинство исследований согла-



**Рис. 5.** Действие блокатора  $Ca^{2+}$ -зависимых калиевых каналов апамина на АНР (черный цвет – контроль, серый – апамин, зеленый – смесь апамин +  $\alpha$ -Me-5-НТ).  $\alpha$ -Me-5-НТ не оказывает эффекта при совместной аппликации с апамином.

суются с тем, что это действие 5-НТ обусловлено активацией 5-НТ<sub>1A</sub>-рецепторов [24, 19, 25].

Наши результаты хорошо согласуются с экспериментами, проведенными на мотонейронах морской свинки [20], в которых авторами было показано, что аппликация в ванну 10 мкМ 5-НТ снижает максимальную амплитуду mАНР на 51%, что является результатом снижения кальций-зависимого калиевого тока, лежащего в основе mАНР. В наших исследованиях амплитуда mАНР снижалась под действием агониста 5-НТ<sub>2A,B,C</sub>-рецепторов  $\alpha$ -Me-5-НТ, но не агониста 5-НТ<sub>1A</sub>-рецепторов 8-ОН-DRAT, как это было показано на спинальных мотонейронах черепахи [3, 24], крысы [19] и миноги [25]. В исследовании на миноге аппликация агониста 5-НТ<sub>2</sub> рецепторов ( $\alpha$ -CH<sub>3</sub>-5-НТ) также вызывала уменьшение амплитуды mАНР, причем этот эффект нивелировался с помощью антагониста 5-НТ<sub>2A</sub> и D<sub>2</sub> типа дофаминовых рецепторов спиперона, но не специфического антагониста 5-НТ<sub>2A</sub>-рецепторов кетансерина [25]. Возможно, это различие указывает на то, что типы 5-НТ-рецепторов, участвующие в модуляции мембранных свойств мотонейронов, могут различаться между разными видами животных. Можно также предположить, что после перерезки серотонинергических волокон из ядер шва (через 4–30 ч, которые проходят от момента перерезки до регистрации) увеличивается экспрессия 5-НТ<sub>2</sub>-рецепторов, как, например, это было показано для 5-НТ<sub>2C</sub>-рецепторов у мышей, где повреждение спинного мозга вызывало увеличение количества и плотности 5-НТ<sub>2C</sub>-рецепторов в вентральном роге поясничного отдела спинного мозга [33].

В данной работе мы выявили, что агонист 5-НТ<sub>1A</sub>-рецепторов 8-ОН-DRAT оказывал время-зависимый эффект на число ПД, вызывая вначале

кратковременное возбуждающее, а позже тормозное действие (рис. 4). В статье Cotel и соавт. показано, что активация 5-HT<sub>1A</sub>-рецепторов тормозит генерацию ПД [34]. Таким образом, можно предположить совместную модулирующую аккомодационных свойств мотонейрона двумя типами серотониновых рецепторов 5-HT<sub>2B,C</sub> и 5-HT<sub>1A</sub>. Если активация 5-HT<sub>2B,C</sub>-рецепторов усиливает частоту повторяющихся разрядов, то более поздняя активация 5-HT<sub>1A</sub>-рецепторов оказывает тормозный эффект. Полученные данные укладываются в гипотезу, согласно которой одни подтипы 5-HT-рецепторов (в частности, 5-HT<sub>2</sub>), усиливающие реакции фосфорилирования, оказывают возбуждающее действие в ЦНС, а другие подтипы (в частности, 5-HT<sub>1</sub>), ингибирующие реакции фосфорилирования, оказывают тормозное действие [35].

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Результаты исследований получены в рамках государственного задания ФАНО России (рег. номер АААА-А18-118012290372-0). Результаты фармакологических исследований получены при поддержке РФФИ (проект № 18-04-00247).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nakamura K., Wong-Lin K. Functions and computational principles of serotonergic and related systems at multiple scales. *Front. Integr. Neurosci.* 8: 1–2. 2014.
2. Ghosh M., Pearse D. The role of the serotonergic system in locomotor recovery after spinal cord injury. *Frontiers in Neural Circuits*, Article 151. 8: 1–14. 2015. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00151>
3. Perrier J.-F., Rasmussen H.B., Christensen R.K., Petersen A.V. Modulation of the intrinsic properties of motoneurons by serotonin. *Current Pharmaceutical Design*. 19: 4371–4384. 2013.
4. Jacobs B.L., Fornal C.A. 5-HT and motor control: a hypothesis. *Trends Neurosci.* 16: 346–352. 1993.
5. Wallis D.I. 5-HT receptors involved in initiation or modulation of motor patterns: Opportunities for drug development. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 288–292.
6. Takahashi T., Berger A.J. Direct excitation of rat spinal motoneurons by serotonin. *J. Physiol. (Lond)*. 423: 63–76. 1990.
7. Garraway S.M., Hochman S. Modulatory actions of serotonin, norepinephrine, dopamine, and acetylcholine in spinal cord deep dorsal horn neurons. *J. Neurophysiol.* 86: 2183–2194. 2001.
8. Ciranna L. Serotonin as a modulator of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology. *Curr Neuropharmacol.* 4: 101–114. 2006.
9. Fink K.B., Göthert M. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol. Rev.* 59: 360–417. 2007.
10. Hannon J., Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav. Brain Res.* 195: 198–213. 2008.
11. El Manira A., Zhang W., Svensson E., Bussières N.K. 5-HT inhibits calcium current and synaptic transmission from sensory neurons in lamprey. *J. Neurosci.* 17: 1786–1794. 1997.
12. Sillar K.T., Simmers A.J. Presynaptic inhibition of primary afferent transmitter release by 5-hydroxytryptamine at a mechanosensory synapse in the vertebrate spinal cord. *J. Neurosci.* 74: 2636–2647. 1994.
13. Holohean A.M., Hackman J.C., Davidoff R.A. Changes in membrane potential of frog motoneurons induced by activation of serotonin receptor subtypes. *Neuroscience*. 34: 555–564. 1990.
14. Holohean A.M., Hackman J.C., Shope S.B., Davidoff R.A. Activation of 5-HT<sub>1C/2</sub> receptors depresses polysynaptic reflexes and excitatory amino acid-induced motoneuron responses in frog spinal cord. *Brain Res.* 579: 8–16. 1992.
15. Holohean A.M., Hackman J.C. Mechanisms intrinsic to 5-HT<sub>2B</sub> receptor-induced potentiation of NMDA receptor responses in frog motoneurons. *Br. J. Pharmacol.* 143 (3): 351–360. 2004.
16. Ovsepian S.V., Vesselkin N. Serotonergic modulation of synaptic transmission and action potential firing in frog motoneurons. *Brain Research*, 1102: 71–77. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.04.035>
17. Калинина Н.И., Курчавый Г.Г., Зайцев А.В., Веселкин Н.П. Пресинаптическая серотонинергическая модуляция спонтанной и миниатюрной синаптической активности в поясничных мотонейронах лягушки. *Ж. эвол. биох. и физиол.* 52 (5): 328–336. 2016. [Kalinina N.I., Kurchavyi G.G., Zaitsev A.V., Veselkin N.P. Presynaptic serotonergic modulation of spontaneous and miniature synaptic activity in frog lumbar motoneurons. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 52 (5): 359–368. 2016.]
18. Kalinina N.I., Zaitsev A.V., Vesselkin N.P. Presynaptic serotonin 5-HT<sub>1B/D</sub> receptor mediated inhibition of glycinergic transmission to the frog spinal motoneurons. *J. Comp. Physiol. A.* 204 (3): 329–337. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00359-017-1244-y>
19. Bayliss D.A., Umemiya M., Berger A.J. Inhibition of N- and P-type calcium currents and the after-hyperpolarization in rat motoneurons by serotonin. *J. Physiol.* 485: 635–47. 1995.
20. Hsiao C.F., Trueblood P.R., Levine M.S., Chan S.H. Multiple effects of serotonin on membrane properties of trigeminal motoneurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 77: 2910–2924. 1997.
21. Wallen P., Buchanan J.T., Grillner S., Hill R.H., Christenson J., Hokfelt T. Effects of 5-hydroxytryptamine on the afterhyperpolarization, spike frequency regulation, and oscillatory membrane properties in lamprey spinal cord neurons. *J. Neurophysiol.* 61: 759–768. 1989.

22. *Meer D.P., Buchanan J.T.* Apamin reduces the late after-hyperpolarization of lamprey spinal neurons, with little effect on fictive swimming. *Neurosci. Lett.* 143: 1–4. 1992.
23. *Miles G.B., Sillar K.T.* Neuromodulation of vertebrate locomotor control networks. *Physiology.* 26: 393–41. 2011. <https://doi.org/10.1152/physiol.00013.2011>
24. *Grunnet M., Jespersen T., Perrier J.-F.* 5-HT<sub>1A</sub> receptors modulate small-conductance Ca<sub>2</sub>-activated K channels. *J. Neurosci. Research.* 78: 845–854. 2004. <https://doi.org/10.1002/jnr.20318>
25. *Wikstrom M., Hill R., Hellgren J., Grillner S.* The action of 5-HT on calcium-dependent potassium channels and on the spinal locomotor network in lamprey is mediated by 5-HT<sub>1A</sub> like receptors. *Brain Res.* 678 (1–2): 191–199. 1995. doi: 0006-8993 (95)00183-Q.
26. *Harvey P.J., Li X., Li Y., Bennett D.J.* 5-HT<sub>2</sub> receptor activation facilitates a persistent sodium current and repetitive firing in spinal motoneurons of rats with and without chronic spinal cord injury. *J. Neurophysiol.* 96 (3): 1158–1170. 2006. <https://doi.org/10.1152/jn.01088.2005>
27. *Murray K.C., Stephens M.J., Ballou E.W., Heckman C.J., Bennett D.J.* Motoneuron excitability and muscle spasms are regulated by 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptor activity. *J. Neurophysiol.* 105: 731–748. 2011.
28. *Perrier J.F., Hounsgaard J.* 5-HT<sub>2</sub> receptors promote plateau potentials in turtle spinal motoneurons by facilitating an L-type calcium current. *J. Neurophysiol.* 89: 954–959. 2003.
29. *Sah P.* Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *TINS.* 19 (4): 150–154. 1996. <https://doi.org/10.1016/S0166-2236>
30. *Li X., Bennett D.J.* Apamin-sensitive calcium-activated potassium currents (SK) are activated by persistent calcium currents in rat motoneurons. *J. Neurophysiol.* 97: 3314–3330. 2007.
31. *Inoue T., Itoh S., Kobayashi M., Kang Y., Matsuo R., Wakisaka S., Morimoto T.* Serotonergic modulation of the hyperpolarizing spike afterpotential in rat jaw-closing motoneurons by PKA and PKC. *J. Neurophysiol.* 82: 626–637. 1999.
32. *Perrier J.F., Delgado-Lezama R.* Synaptic release of serotonin induced by stimulation of the raphe nucleus promotes plateau potentials in spinal motoneurons of the adult turtle. *J. Neurosci.* 25: 7993–7999. 2005.
33. *Husch A., Van Patten G.N., Hong D.N., Scaperotti M.M., Cramer N., Harris-Warrick R.M.* Spinal cord injury induces serotonin supersensitivity without increasing intrinsic excitability of mouse V2a interneurons. *J. Neuroscience.* 32: 13145–13154. 2012.
34. *Cotel F., Exley R., Cragg S.J., Perrier J.-F.* Serotonin spill-over onto the axon initial segment of motoneurons induces central fatigue by inhibiting action potential initiation. *PNAS Early Edition.* 1–6. 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216150110>
35. *Hochman S., Garraway S.M., Machacek D.W., Shay B.L.* 5-HT receptors and the neuromodulatory control of spinal cord function. *Motor Neurobiology of the Spinal Cord / Ed Timothy C. Cope.* CRC Press. 47–88. 2001. <https://doi.org/10.1201/9781420042641.ch3>

## 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> Receptor Agonists Differently Modulate the Excitability of the Frog Spinal Cord Motoneurons

N. I. Kalinina<sup>a, #</sup>, A. V. Zaitsev<sup>a</sup>, and N. P. Veselkin<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

<sup>b</sup> *Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: nkalinina54@mail.ru*

The effects of 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptor agonists and antagonists on the membrane properties of motoneurons in the isolated lumbar segment of the frog spinal cord were investigated using the intracellular recordings. The application of 5-HT<sub>2A,B,C</sub> receptor agonist  $\alpha$ -Me-5-HT caused depolarization of the motoneuron membrane. Depolarization did not develop in case of the joint application of  $\alpha$ -Me-5-HT with a specific 5-HT<sub>2B</sub> antagonist SB206553.  $\alpha$ -Me-5-HT reduced the amplitude of medium afterhyperpolarization and increased the number of antidromic action potentials (APs). The application of an antagonist SB206553 abolished these effects. The 5-HT<sub>1A/7</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT had a time-dependent effect on the number of antidromic APs, causing a short-term excitatory and later inhibitory effect. The data obtained indicate the presence of 5-HT<sub>1A/7</sub> and 5-HT<sub>2B,C</sub> receptors on the postsynaptic membrane of motoneurons. We suggested a possible combined modulation of the accommodative properties of motoneurons by two types of serotonin receptors 5-HT<sub>2B,C</sub> and 5-HT<sub>1A</sub>.

*Keywords:* spinal cord, motoneuron, 5-HT, frog