

УЧАСТИЕ 5-НТ₁ И 5-НТ_{5A} РЕЦЕПТОРОВ В МОДУЛЯЦИИ
СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ И ВНУТРЕННИХ СВОЙСТВ МЕМБРАНЫ
СПИНАЛЬНЫХ МОТОНЕЙРОНОВ ЛЯГУШКИ (*Rana ridibunda*)

© 2022 г. Н. И. Калинина^{1, *}, Н. П. Веселкин^{1, 2}

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: nkalinina54@mail.ru

Поступила в редакцию 31.10.2021 г.

После доработки 15.11.2021 г.

Принята к публикации 15.11.2021 г.

Эндогенный моноамин серотонин (5-НТ) участвует в модуляции моторного выхода у позвоночных животных, взаимодействуя с различными типами 5-НТ рецепторов. Ранее 5-НТ_{5A} рецепторы были обнаружены в поясничных мотонейронах крысы с помощью иммуногистохимических методов, где предполагается их постсинаптическая локализация. Однако сведений о наличии 5-НТ_{5A} рецепторов в поясничном отделе спинного мозга низших позвоночных (в том числе амфибий) мы не обнаружили. В настоящей работе с использованием фармакологического подхода, вне- и внутриклеточной регистрации потенциалов острым электродом исследовано возможное участие 5-НТ_{5A} рецепторов (наряду с 5-НТ₁ рецепторами) в модуляции моторного выхода спинальных мотонейронов лягушки *Rana ridibunda*. Результаты внеклеточного отведения (при аппликации 5-СТ, агониста 5-НТ₁ и 5-НТ_{5A} рецепторов и SB-699551 селективного антагониста 5-НТ_{5A} рецептора) указывают на пространственно-временную модуляцию активности нейронов вентрального рога. Изменение амплитуды полевого антидромного потенциала, пиковой амплитуды вызванного корешкового потенциала и внутриклеточного дорсально-корешкового постсинаптического потенциала, а также изменение частоты внеклеточных спайков и латентности первого внутриклеточного ПД при аппликации 5-СТ были время-зависимыми: в первые минуты наблюдалась потенциация, которая позже сменялась угнетением. Суммарно полученные результаты свидетельствуют об участии 5-НТ_{5A} рецепторов наряду с 5-НТ₁ рецепторами в модуляции моторного выхода спинальных мотонейронов лягушки.

Ключевые слова: лягушка, спинной мозг, мотонейрон, 5-НТ_{5A} рецептор, синаптическая передача

DOI: 10.31857/S0869813922010071

Список сокращений: ДК – дорсальный корешок; ВК – вентральный корешок; ДК-ВК – корешковый потенциал, регистрируемый с ВК при стимуляции ДК; ДК ПСП – внутриклеточный вызванный дорсально-корешковый постсинаптический потенциал; ПД – потенциал действия; ТТХ – тетродотоксин; 5-СТ – 5-Carboxamidotryptamine maleate, агонист 5-НТ_{1A, B/D}, 5-НТ_{5A}, а также 5-НТ₇ рецепторов; MS – метисергид антагонист 5-НТ_{1,2} рецепторов; SB 699551 – селективный антагонист 5-НТ_{5A} рецепторов; АНР – следовая гиперполяризация; fАНР – быстрая фаза следовой гиперполяризации; mАНР – средняя фаза следовой гиперполяризации; МПП – мембранный потенциал покоя.

ВВЕДЕНИЕ

Эндогенный моноамин серотонин (5-НТ) участвует в модуляции моторного выхода, взаимодействуя с различными типами 5-НТ рецепторов [1–6]. Серотонинергические нейроны, локализованные в ядрах шва и ретикулярной формации, дают проекции почти ко всем областям головного и спинного мозга. У млекопитающих нисходящие серотонинергические волокна образуют синапсы на соматодендритной мембране поясничных мотонейронов [7, 3].

В настоящее время различают 7 семейств серотониновых рецепторов 5-НТ_{1–7}, которые объединяют 16 подтипов. За исключением 5-НТ₃ рецепторов, которые представляют собой лиганд-управляемые ионные каналы, все остальные типы 5-НТ рецепторов являются метаботропными, связанными с G-белками [8–10].

Экспрессия различных подтипов 5-НТ рецепторов исследовалась разными методиками, включая *in situ* гибридизацию, фармакологию, иммуногистохимию. В мотонейронах млекопитающих обнаружены 5-НТ_{1A,B/D}, 5-НТ_{2A,B,C} [3] и 5-НТ_{5A} рецепторы [11–13], для остальных подтипов 5-НТ рецепторов данных нет.

Ранее мы показали, что в поясничных мотонейронах лягушки серотонин уменьшает частоту глицинергических миниатюрных тормозных постсинаптических потенциалов (мТПСП), не оказывая заметного влияния на частоту ГАМКергических мТПСП [14]. Этот эффект реализуется посредством активации пресинаптических 5-НТ_{1B/D} рецепторов и приводит к частичному облегчению моторного выхода [15]. Кроме того, мы получили данные, свидетельствующие о наличии 5-НТ_{1A} и 5-НТ_{2B,C} рецепторов на постсинаптической мембране поясничных мотонейронов лягушки, и предположили возможную совместную модуляцию аккомодационных свойств мотонейрона этими двумя типами серотониновых рецепторов [16].

5-НТ_{5A} рецепторы относятся к малоисследованной группе серотониновых рецепторов [9]. Недостаточное понимание роли этого рецептора частично объяснялось отсутствием доступных селективных лигандов 5-НТ_{5A} рецептора [17, 18]. Рецептор 5-НТ_{5A} остается только условно классифицированным в семействе рецепторов 5-НТ (база данных IUPHAR) [10]. Хотя селективного агониста до сих пор нет, разработка его селективного антагониста (SB-699551) [19] позволила детальнее исследовать функциональную роль этого “орфанного” рецептора [20]. Этот малоизученный подтип принадлежит семейству рецепторов, связанных с G-белком, которые отрицательно влияют на аденилатциклазу [21–23]. Его активация приводит к мобилизации внутриклеточного Ca²⁺ [24] и стимуляции внутренне выпрямляющих калиевых каналов [20, 25].

Рецепторы 5-НТ_{5A} в основном локализируются в коре головного мозга, гиппокампе и мозжечке [26], а также в миндалине, хвостатом ядре, мозжечке, гипоталамусе, черной субстанции, таламусе и спинном мозге [11, 27–30]. 5-НТ_{5A} рецепторы были обнаружены иммуногистохимически в поясничных мотонейронах дорсолатерального ядра и в мотонейронах Lamina IX спинного мозга крысы [11, 31]. Наблюдения, полученные с помощью электронного микроскопа, предполагают постсинаптическую локализацию 5-НТ_{5A} рецепторов [11].

Умеренная экспрессия 5-НТ_{5A} рецепторов во всех группах мотонейронов Lamina IX и в колонке промежуточных дилатеральных клеток (по сравнению с дорсальным рогом и дорсолатеральным ядром L6) предполагает, что 5-НТ_{5A} рецепторы также участвуют в контроле моторных и вегетативных функций [11]. Учитывая это, мы предположили, что 5-НТ_{5A} рецепторы могут играть роль в модуляции моторного выхода у амфибий.

В недавних экспериментах на крысах было показано, что при активации 5-НТ_{5A} рецепторов уменьшаются болевые ощущения в спинном мозге, а 5-НТ и агонист серотонина 5-СТ уменьшают нейропатическую боль посредством активации рецепторов 5-НТ_{5A} и 5-НТ_{1A,B/D}. Эти рецепторы могут быть важной частью нисходящей системы подавления боли у млекопитающих [32–34]. Данных о наличии 5-НТ_{5A} рецепторов в поясничном отделе спинного мозга низших позвоночных (в том числе амфибий) мы не обнаружили. Поэтому в данной работе мы поставили цель проверить наличие 5-НТ_{5A} рецепторов и в случае присутствия исследовать их роль (наряду с ролью 5-НТ₁ рецепторов) в модуляции моторного выхода (синаптической передачи и собственных свойств мембраны) спинальных мотонейронов лягушки *Rana ridibunda*. Для этого мы провели электрофизиологическую регистрацию внеклеточных и внутриклеточных потенциалов мотонейронов в присутствии селективных антагонистов и агонистов 5НТ_{1,5A} рецепторов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приготовление среза спинного мозга

Опыты проводили на препарате поясничного сегмента изолированного спинного мозга лягушки *Rana ridibunda*. Эксперименты выполнялись в соответствии с требованиями Комитета по биоэтике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, разработанными на основе международных рекомендаций European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС). Под эфирным наркозом производили дорсальную ламинэктомию. После снятия оболочки выделяли IX и X сегменты спинного мозга вместе с корешками в виде фронтальных срезов толщиной 2–3 мм (такая толщина позволяет регистрировать в середине среза структурно неповрежденные клетки). Один из них фиксировали в экспериментальной камере ростральной поверхностью вверх. Приготовление препарата, устройство камеры, схема эксперимента подробно описаны ранее [14].

Для перфузии использовали раствор следующего состава (мМ): 100 NaCl, 2 KCl, 0.5 MgCl₂, 5.5 глюкоза, 1.5 CaCl₂, 9 NaHCO₃, 2 Трис, pH 7.4–7.6, аэрируемый газовой смесью (98% O₂ и 2% CO₂) и имеющий температуру 16–18°C. Скорость протока составляла 6 мл/мин, объем ванны 0.5 мл.

Внеклеточная и внутриклеточная регистрация потенциалов

Потенциалы регистрировали с помощью микроэлектродного дифференциального усилителя, разработанного в нашей лаборатории (вед. инж. Б.Т. Рябов), оцифровывали с частотой 10–20 кГц с помощью АЦП NI USB-6211 (National Instruments, США) и записывали на компьютере, используя программу WinWSP (Strathclyde Electrophysiology Software, Великобритания).

Потенциалы отводили от мотонейронов IX или X сегментов как внеклеточно (вблизи ядра поясничных мотонейронов), так и внутриклеточно с помощью острых стеклянных микроэлектродов с диаметром кончика 1–1.5 мкм, заполненных 3М раствором KCl, имевших сопротивление 10–20 МОм. Глубина погружения микроэлектрода, двигавшегося строго вертикально вдоль колонки мотонейронов, составляла от 300 до 1200 мкм от ростральной поверхности среза в зоне неповрежденных клеток. Известно, что поясничный спинальный мотонейрон является самой крупной клеткой спинного мозга, имеющей разветвленное дендритное дерево. Дендриты поясничных мотонейронов лягушки могут распространяться в ростокаудальном направлении спинного мозга на расстояние до 2 мм [35]. Учитывая особенности структуры мотонейронов, неповрежденные клетки можно наколоть

примерно в середине среза, т.е. на указанной выше глубине. Клетки, расположенные в зоне повреждения структуры дендритов (до 300 мкм от ростральной поверхности мозга), имеют отличные от здоровых клеток параметры, что показано нами ранее [36]. Поясничные мотонейроны идентифицировали по наличию антидромного потенциала действия, возникающего при стимуляции IX или X вентрального корешка. В анализ включали мотонейроны с мембранным потенциалом покоя не менее -60 мВ и амплитудой антидромного потенциала действия не менее 70 мВ.

Фармакология

Агонист 5-НТ_{1A,B/D} и 5-НТ_{5A} рецепторов (5-СТ, 5–10 мкМ), антагонист 5-НТ_{1,2} рецепторов (метисергид, MS, 10 мкМ) и селективный антагонист 5-НТ_{5A} рецепторов (SB 699551, 10 мкМ) добавляли в перфузирующий раствор. Все реактивы были приобретены в Sigma-Aldrich или Tocris Bioscience.

Статистическая обработка

Анализ первичных электрофизиологических данных производился с использованием программы Clampfit 10.5 (Molecular Devices, США). Для статистического анализа и графического представления результатов использовали программу Sigma Plot 12.5. Нормальность распределения данных оценивалась по критерию Шапиро–Уилка. Статистическая значимость оценивалась с использованием парного критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующими апостериорными сравнениями средних значений по тесту Тьюки. Все значения приведены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Влияние аппликации агониста 5-НТ_{5A} и антагониста 5-НТ_{1,2} рецепторов на антидромный полевой потенциал (внеклеточная регистрация)

Аппликация 5-СТ, агониста 5-НТ_{1A,B/D} и 5-НТ_{5A} рецепторов достоверно вызывала потенциацию амплитуды антидромного полевого потенциала, регистрируемого внеклеточно вблизи поясничных мотонейронов с 2.3 ± 0.3 мВ до 3.4 ± 0.3 мВ ($n = 6$). Потенциация исчезала при отмывке в нормальном растворе (рис. 1а, слева сверху).

Чтобы выявить, эффект активации конкретных подтипов 5-НТ рецепторов, мы использовали совместное применение 5-СТ с селективным антагонистом 5-НТ_{5A} рецепторов – SB 699551 и селективным антагонистом 5-НТ_{1A,B/D} рецепторов – метисергидом. Потенциация ответа была меньше (2.8 ± 0.5 мВ, $n = 6$) при совместной аппликации 5-СТ и селективного антагониста 5-НТ_{5A} рецепторов SB 699551 (10 мкМ), то есть активация только 5-НТ_{1A,B/D} рецепторов была недостаточна для полной потенциации, вызванной аппликацией 5-СТ (рис. 1а). В то же время при блокировании 5-НТ_{1A,B/D} рецепторов метисергидом (при преимущественной активации 5-НТ_{5A} рецепторов) увеличение амплитуды полевого потенциала сохранялось, составив 3.8 ± 0.4 мВ против 2.6 ± 0.3 мВ в контроле, $n = 6$ (рис. 1б).

Этот результат свидетельствует об участии в потенциации антидромного полевого потенциала как 5-НТ_{1A,B/D}, так и 5-НТ_{5A} рецепторов в разной степени, причем эффект 5-НТ_{5A} рецепторов преобладает.

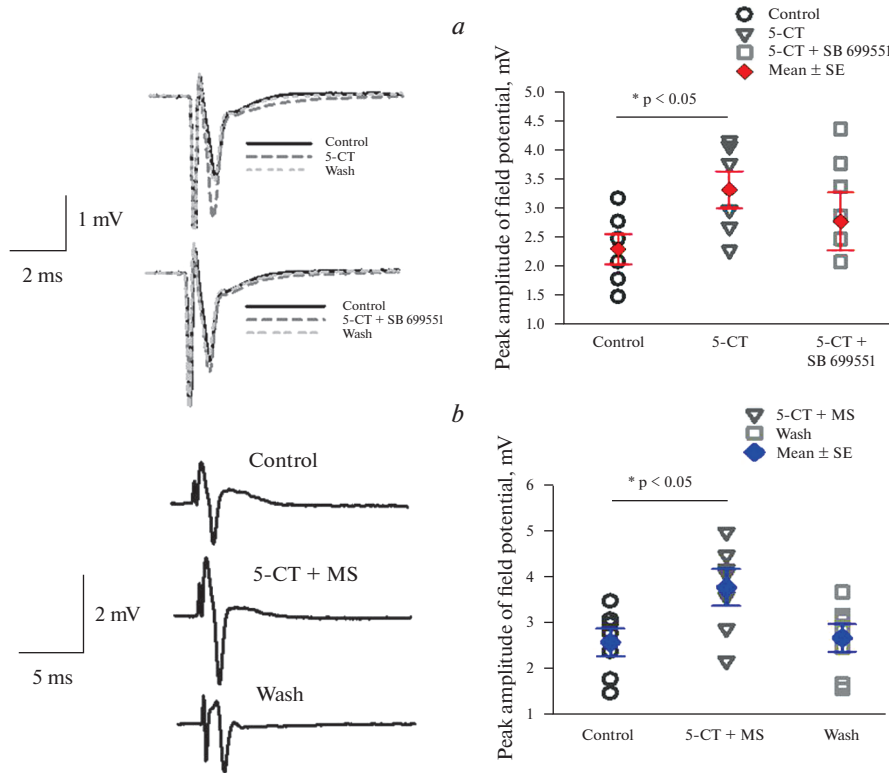


Рис. 1. Действие агониста и антагонистов 5-HT_{1A,B/D}, 5A рецепторов на амплитуду полевого антидромного потенциала. (a) – 5-CT потенцирует (слева сверху), а смесь 5-CT и SB 699551 вызывает меньшую потенциацию (слева внизу), однофакторный дисперсионный анализ ($F_{1,10} = 6.2$), (b) – потенциация амплитуды антидромного полевого потенциала при совместной аппликации 5-CT и метисергида, однофакторный дисперсионный анализ ($F_{2,12} = 4.5$).

2. Модуляция полевого антидромного потенциала по величине и по времени

Действие агониста 5-CT и антагонистов 5HT_{1A,B/D} и 5-HT_{5A} рецепторов на полевой антидромный потенциал отличалось как по величине, так и по времени развития эффекта (рис. 2a). При активации 5-HT_{5A} рецепторов потенциация происходила раньше по времени (через 5–7 мин) и была больше по величине (порядка 47%), в то время как активация 5HT_{1A,B/D} рецепторов вызывала меньшую потенциацию (порядка 22%), развивающуюся медленнее (20–25 мин). При совместной активации 5-HT_{5A} и 5-HT_{1A,B/D} рецепторов потенциация была такая же, как при активации 5-HT_{5A} рецепторов (составляя по величине порядка 46%), но максимальный эффект развивался позже по времени (через 10–12 мин).

3. Эффект совместной аппликации 5-CT и метисергида на частоту вызванных внеклеточных антидромных ПД

При совместной аппликации 5-CT и метисергида, т.е. активации 5-HT_{5A} рецепторов, наблюдалось увеличение амплитуды ПД примерно вдвое, количество внеклеточных ПД, возникающих в ответ на антидромную стимуляцию вентрального

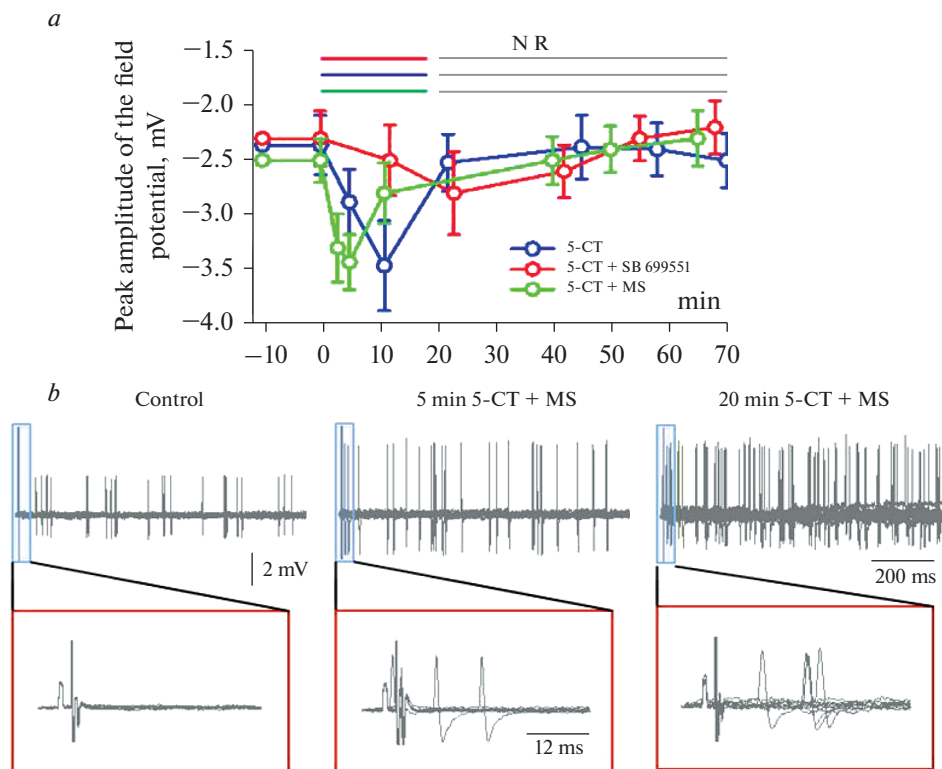


Рис. 2. Модуляция полевого антидромного потенциала по величине и по времени в зависимости от типа активируемых рецепторов (*a*) и модуляция по амплитуде и частоте внеклеточных ПД (*b*). (*b*) – увеличение числа внеклеточных антидромных ПД и амплитуды ПД при совместной аппликации агониста (5-СТ) и антагониста 5-НТ_{1,2} рецепторов метисергида (активация 5-НТ_{5A} рецепторов). Наложение 10 пробегов. На развертке 30 мс (нижние записи) хорошо видна потенциация антидромного полевого потенциала через 5 мин, а через 20 мин – восстановление к исходному уровню, хотя количество ПД при этом продолжает нарастать.

корешка, возросло в 4 раза (рис. 2*b*). Время-зависимый эффект активации серотониновых рецепторов на изменение амплитуды полевого антидромного потенциала сохранялся: вначале наблюдали потенцирующий эффект, который позже сменялся угнетающим (рис. 2*b*). Однако частота генерации ПД продолжала увеличиваться в течение всего эксперимента. Возможным механизмом этого явления может быть активация других нейронов в локальных сетях спинного мозга, однако это предположение требует дополнительной экспериментальной проверки.

4. Действие 5-СТ и MS на вызванные корешковые потенциалы

При активации 5-НТ_{1A,B/D, 5A} рецепторов с помощью агониста 5-СТ (5–10 мкМ) наблюдалось уменьшение амплитуды ранних моно- и дисинаптических компонентов (с латентностью 2–12 мс) до $33 \pm 7\%$ от начального уровня и увеличение на $46 \pm 8\%$ ($n = 6$) амплитуды поздних компонентов (с латентностью 12–200 мс) корешковых потенциалов, регистрируемых от вентрального корешка при стимуляции дорсального корешка (ДК-ВК потенциалов). Соответственно изменялась пло-

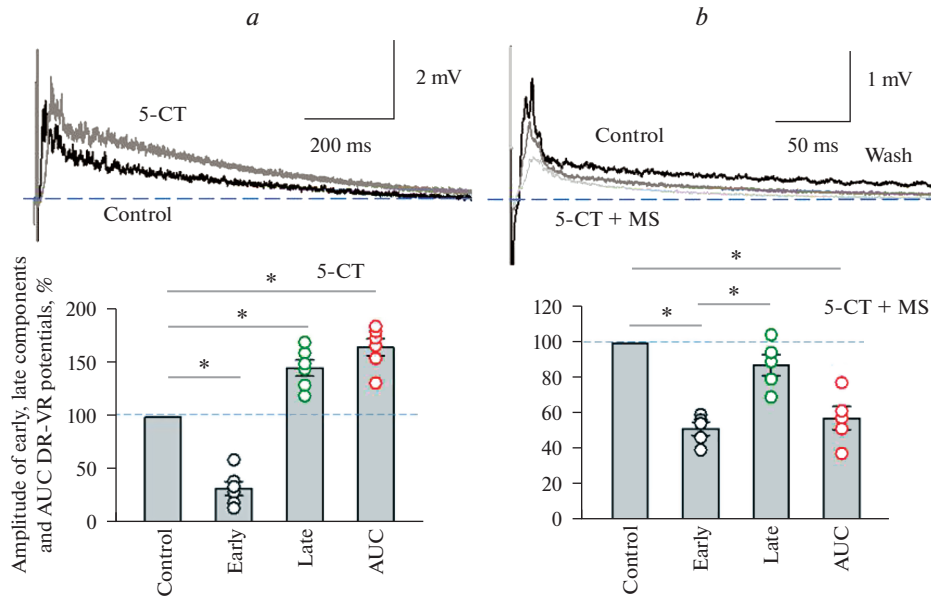


Рис. 3. Действие агониста 5-СТ (активация 5-HT_{1A,B/D} и 5-HT_{5A} рецепторов) (a) и совместное действие 5-СТ и метисергида (MS) (активация 5-HT_{5A} рецепторов) (b) на корешковые ДК-ВК потенциалы. Однофакторный дисперсионный анализ. Для (a): $F_{3,20} = 84.3$; для (b): $F_{3,16} = 23.6$. * $p < 0.001$ (Tukey Test).

щадь под кривой ДК-ВК потенциалов (увеличение на $66 \pm 8\%$, $n = 6$) (рис. 3a). Активации 5-HT_{5A} рецепторов путем аппликации неселективного агониста 5-СТ в условиях блокады 5-HT_{1A,B/D} рецепторов с помощью метисергида вызывала уменьшение амплитуды ранних компонентов в два раза (до $52 \pm 5\%$ от начального уровня, $n = 5$), т.е. в меньшей степени, чем при аппликации одного агониста (5-СТ). Кроме того, исчезал эффект потенциации поздних компонентов ДК-ВК ответа. Амплитуда поздних компонентов и площадь под кривой также уменьшались (до $88 \pm 6\%$ и до $58 \pm 7\%$ соответственно) (рис. 3b). Эти результаты указывают на участие в модуляции вызванной синаптической активности как 5-HT_{1A,B/D}, так и 5-HT_{5A} рецепторов.

5. Действие 5-СТ и метисергида на вызванные внутриклеточные потенциалы

При внутриклеточной регистрации многокомпонентного ПСП, вызванного стимуляцией дорсального корешка (ДК ПСП), аппликация 5-СТ вызывала время-зависимый эффект: в первые 3–5 мин наблюдалась кратковременная потенциация пиковой амплитуды ДК ПСП на $53 \pm 4.4\%$, а затем, через 10–15 мин, — уменьшение амплитуды ДК ПСП до $76 \pm 4\%$ ($n = 5$, t -test, $p < 0.001$) от исходного ответа (рис. 4a, b). При блокировании 5-HT_{1A,B/D} рецепторов метисергидом время-зависимый эффект не наблюдался, ответ уменьшался, и через 14 мин составлял примерно 20% от исходного в контроле (рис. 4c, d, e). Эти наблюдения указывают на ингибирующую роль 5-HT_{5A} рецепторов на пиковую амплитуду внутриклеточного ДК ПСП.

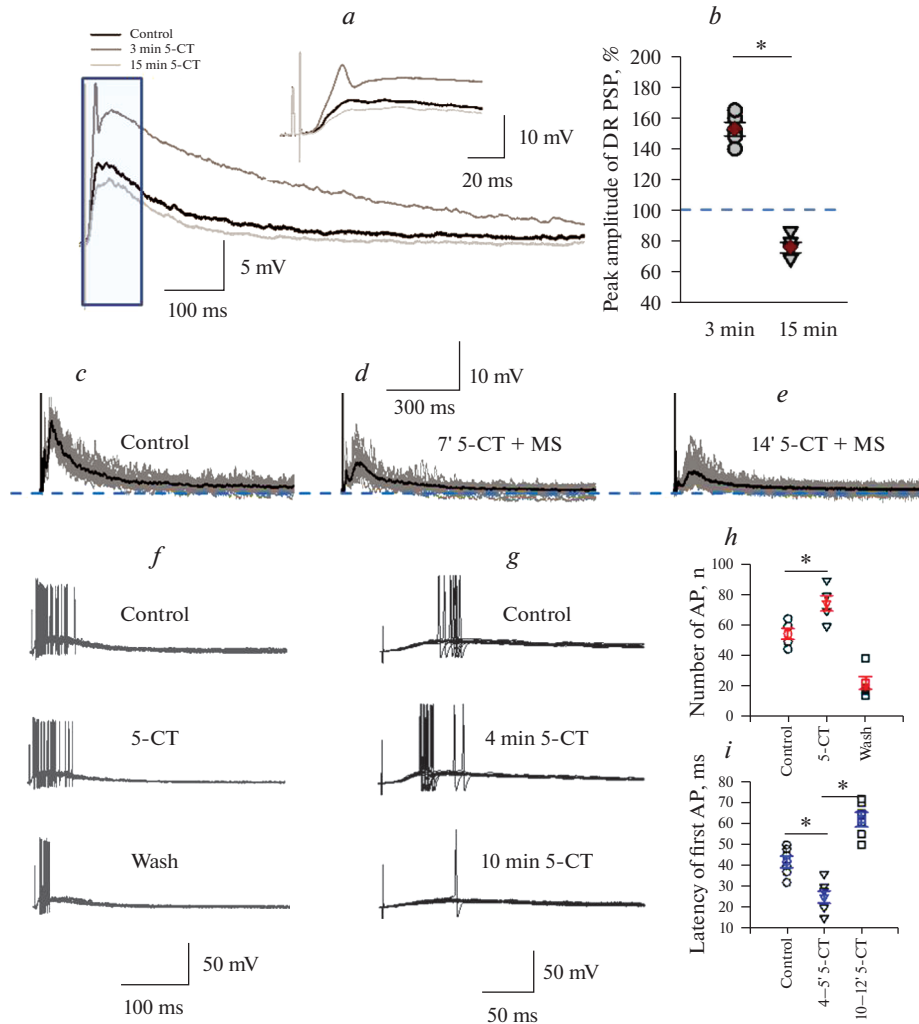


Рис. 4. Время-зависимый эффект 5-СТ на вызванный внутриклеточный ДК ВПСП. (a) – активация 5-НТ₁ и 5-НТ_{5A} рецепторов вызывает первоначальную потенциацию (3 мин аппликации) и последующее угнетение ответа (14 мин аппликации). На вставке показано то же самое при меньшей развертке; (b) – соответствующая столбчатая диаграмма; (c, d, e) – потенциация пропадает при блокировании 5-НТ_{1A,B/D} рецепторов с помощью метисергида (MS): контроль, 7 мин, 14 мин соответственно аппликации смеси 5-СТ + MS. Наблюдается угнетение всего ДК ВПСП (парный *t*-тест Стьюдента, $p < 0.05$). (f) – увеличение количества ПД при аппликации 5-СТ и уменьшение при отмывке ниже исходного уровня; (g) – уменьшение латентности первого ПД при стимуляции ДК через 4 мин и увеличение ее через 10 мин аппликации; (h, i) – соответствующие диаграммы (время-зависимый эффект), для (h): *t*-тест, $p = 0.04$; для (i): однофакторный дисперсионный анализ $p < 0.001$ (тест Тьюки), $F_{2,15} = 34$).

6. Действие 5-СТ на частоту и латентность ПД, вызванных стимуляцией ДК

Поскольку 5-СТ вызывает потенциацию антидромного полевого потенциала (рис. 1a, слева), отражающего синхронный разряд мотонейронов, то можно ожидать увеличение числа внутриклеточных ПД, возникающих в каждом отдельном

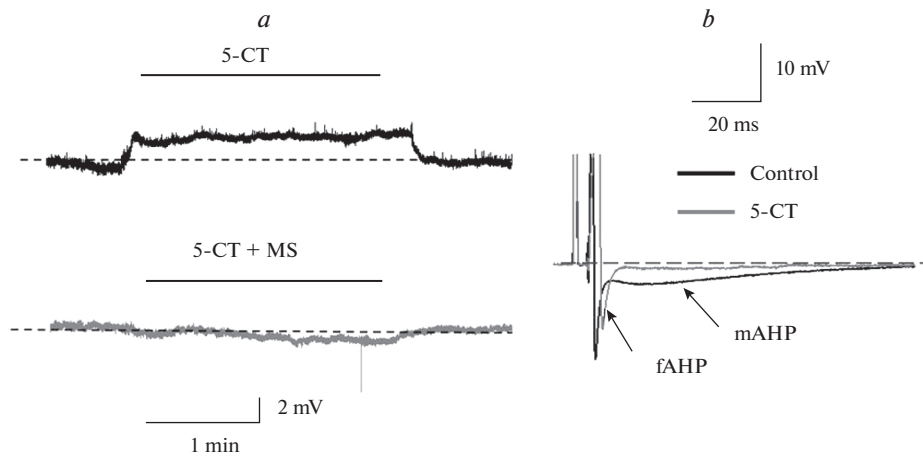


Рис. 5. Действие 5-СТ и смеси 5-СТ + MS на МПП в условиях блока спайковой активности с помощью ТТХ – (a). Действие 5-СТ на кинетические параметры и следовую гиперполяризацию антидромного ПД – (b).

мотонейроне при стимуляции ДК. Этот эффект продемонстрирован на рис. 4f. Аппликация 5-СТ через 5–6 мин увеличивала среднее число ПД от 55 ± 4 до 75 ± 5 ($n = 5$, t -test, $p = 0.04$), при отмывке число ПД снижалось до 23 ± 4 , что ниже исходного в контроле (рис. 4f, h). На рис. 4g проиллюстрировано укорочение латентности первого ПД с 42 ± 3 мс в контроле до 26 ± 3 мс через 4 мин аппликации 5-СТ (начальный эффект) и последующее увеличение через 10–12 мин аппликации 5-СТ до 62 ± 4 мс ($n = 6$).

7. Действие 5-СТ и метисергида на мембранный потенциал покоя, кинетические параметры, быструю и среднюю фазы следовой гиперполяризации антидромного ПД

Чтобы выявить эффект 5-СТ на пассивные свойства мембраны мотонейронов, агонист добавляли в перфузирующий раствор в условиях блока спайковой активности с помощью блокатора натриевых каналов ТТХ (1 мкМ). Аппликация 5-СТ вызывала небольшую деполяризацию мембраны в большинстве случаев на 1.5–2.0 мВ ($n = 4$, парный t -тест, $p < 0.05$, рис. 5a, сверху), деполяризация исчезала при совместной аппликации 5-СТ и антагониста 5-HT_{1,2} рецепторов метисергида (рис. 5a, внизу).

В отсутствие ТТХ аппликация 5-СТ уменьшала амплитуду антидромного ПД (на $18.0 \pm 0.5\%$, $n = 5$) и увеличивала его полуширину более чем в два раза, также снижались амплитуды быстрой (fAHP) и средней (mAHP) фаз следовой гиперполяризации: в среднем на $36.0 \pm 0.2\%$ и на $83.0 \pm 0.3\%$, $n = 5$ соответственно (рис. 5b).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В наших экспериментах при внеклеточной регистрации как совместная, так и раздельная активация 5-HT_{1A,B/D} и 5-HT_{5A} рецепторов в первые несколько минут вызывали потенциацию амплитуды негативной волны полевого антидромного потенциала, отражающего синхронный разряд нейронов, но в различной степени. Следовательно, как 5-HT_{1A,B/D}, так и 5-HT_{5A} рецепторы вызывают потенциацию ан-

тидромного полевого потенциала. При активации 5-НТ_{5A} рецепторов потенциация происходила быстрее по времени и была больше по величине, в то время как активация 5-НТ_{1A,B/D} рецепторов вызывала меньшую потенциацию, развивающуюся медленнее. При совместной активации 5-НТ_{5A} и 5-НТ_{1A,B/D} рецепторов потенциация усиливалась по величине и развивалась быстрее. Эти наблюдения указывают на пространственно-временную модуляцию активности нейронов вентрального рога (как мотонейронов, так, по-видимому, и интернейронов).

Изменение амплитуды полевого антидромного потенциала, пиковой амплитуды вызванных корешкового потенциала и внутриклеточного ДК ПСП, а также изменение частоты внеклеточных спайков и латентности первого внутриклеточного ПД при аппликации 5-СТ были время-зависимыми: в первые 3–5 мин наблюдалась потенциация этих параметров, что свидетельствовало о возбуждающем эффекте, в последующие 10–15 мин потенциация сменялась угнетением. Аналогичный время-зависимый эффект при аппликации агониста 5-НТ_{1A,7} рецепторов 8-ОН-ДРАТ мы наблюдали в наших предыдущих исследованиях [36] при регистрации антидромного полевого потенциала: в первые 3–5 мин – увеличение амплитуды полевого потенциала, а затем снижение ее через 15 мин. 8-ОН-ДРАТ оказывал время-зависимое действие также на частоту и время возникновения антидромного ПД: первоначально увеличивал возбудимость мотонейронов, а затем уменьшал ее. Наблюдаемую нами потенциацию можно объяснить тем, что 5-НТ_{5A} рецепторы могут постсинаптически подавлять тормозные интернейроны [11, 37]. Таким образом, активация рецепторов 5-НТ_{5A}–5-НТ_{1A,7} в тормозных и возбуждающих интернейронах может производить противоположный эффект [32].

В предыдущей работе [16] мы показали, что агонист 5-НТ_{1A,7} рецепторов 8-ОН-ДРАТ не вызывал деполяризацию мембраны и не изменял входное сопротивление. Учитывая это, мы предполагаем, что 5-СТ вызывает деполяризацию, активируя либо 5-НТ_{1B/D}, либо 5-НТ_{5A} рецепторы. Мы не зарегистрировали изменение МП при блокировании 5-НТ_{1A,B/D} рецепторов метисергидом (рис. 5а, внизу), возможно, потому, что понимание индивидуальной роли 5-НТ_{5A} рецепторов и рецепторов 5-НТ₁ типа усложнено, из-за того, что рецепторы 5-НТ_{5A} и 5-НТ_{1A} связываются с множественными системами вторичных мессенджеров, которые могут перекрестно взаимодействовать друг с другом [30, 38].

В статье Goodfellow с соавт. [20] показано, что удаление гена, ответственного за экспрессию 5-НТ_{5A} рецептора у нокаутных мышей, приводит к неожиданно большому увеличению ингибирующих токов 5-НТ_{1A} рецептора. Авторы предполагают, что присутствие тесно связанных рецепторов 5-НТ_{1A} и 5-НТ_{5A} в одних и тех же нейронных клетках может служить биологической защитой, так что нарушение одного рецептора может вызвать компенсаторную активацию другого рецептора [39].

Полученные результаты подтверждают наше предположение об участии 5-НТ_{5A} рецепторов наряду с 5-НТ₁ рецепторами в модуляции моторного выхода спинальных мотонейронов лягушки. Однако, учитывая сложные взаимодействия 5-НТ_{5A} рецепторов с 5-НТ₁ и, возможно, с другими типами серотониновых рецепторов, необходимы дополнительные исследования.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН (075-00408-21-00).

ВКЛАД АВТОРОВ

Н.И.К. — планирование эксперимента, сбор данных, обработка данных, написание статьи, Н. П. В. — обсуждение результатов и редактирование статьи.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nakamura K, Wong-Lin K (2014) Functions and computational principles of serotonergic and related systems at multiple scales. *Front Integr Neurosci* 8: 1–2.
<https://doi.org/10.3389/fnint.2014.00023>
2. Ciranna L (2006) Serotonin as a modulator of glutamate and GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology. *Current Neuropharmacol* 4: 101–114.
<https://doi.org/10.2174/157015906776359540>
3. Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong X-W, Feldman JL (2000) Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev* 80 (2): 767–852.
<https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.767>
4. Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72: 165–229.
<https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.165>
5. Schmidt BJ, Jordan LM (2000) The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. *Brain Res Bull* 53: 689–710.
[https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(00\)00402-0](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(00)00402-0)
6. Zhang M (2016) Normal distribution and plasticity of serotonin receptors after spinal cord injury and their impacts on motor outputs. In: *Recovery of motor function following spinal cord injury*, Heidi Fuller and Monte Gates, IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/63759>
7. Alvarez FJ, Pearson JC, Harrington D, Dewey D, Torbeck L, Fyffe REW (1998) Distribution of 5-hydroxytryptamine-immunoreactive boutons on α -motoneurons in the lumbar spinal cord of adult cats. *J Comp Neurol* 393: 69–83.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980330\)393:1<69::AID-CNE7>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980330)393:1<69::AID-CNE7>3.0.CO;2-O)
8. Fink KB, Göthert M (2007) 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol Rev* 59(4): 360–417.
<https://doi.org/10.1124/pr.59.07103>
9. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 533–554.
[https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00746-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00746-8)
10. Hannon J, Hoyer D (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 195: 198–213.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.020>
11. Doly S, Fischer J, Brisorgueil MJ, Vergé D, Conrath M (2004) 5HT_{5A} receptor localization in the rat spinal cord suggests a role in nociception and control of pelvic floor musculature. *J Comp Neurol* 476: 316–329.
<https://doi.org/10.1002/cne.20214>
12. Perrier J-F, Rasmussen HB, Christensen RK, Petersen AV (2013) Modulation of the intrinsic properties of motoneurons by serotonin. *Current Pharmaceutical Design* 19: 4371–4384.
<https://doi.org/10.2174/13816128113199990341>
13. Perrier J-F, Cotel F (2015) Serotonergic modulation of spinal motor control. *Current Opinion Neurobiol* 33: 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.12.008>
14. Kalinina N, Kurchavyi G, Zaitsev A, Veselkin N (2016) Presynaptic serotonergic modulation of spontaneous and miniature synaptic activity in frog lumbar motoneurons. *J Evol Biochem Phys* 52: 359–368.
<https://doi.org/10.1134/S0022093016050045>
15. Kalinina NI, Zaitsev AV, Vesselkin NP (2018) Presynaptic serotonin 5-HT_{1B/D} receptor mediated inhibition of glycinergic transmission to the frog spinal motoneurons. *J Comp Physiol A*. 204 (3): 329–337.
<https://doi.org/10.1007/s00359-017-1244-y>
16. Kalinina NI, Zaitsev AV, Vesselkin NP (2019) Different Effects of 5-HT₁ and 5-HT₂ Receptor Agonists on Excitability Modulation of Motoneurons in Frog Spinal Cord. *J Evol Biochem*

- Phys 55(4): 284–292.
<https://doi.org/10.1134/S0022093019040045>
17. *Thomas DR, Soffin EM, Roberts C, Kew JN, de la Flor RM, Dawson LA, Fry VA, Coggon SA, Faedo S, Hayes PD, Corbett DF, Davies CH, Hagan JJ, Thomas DR* (2006) SB-699551-A (3-cyclopentyl-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-N-[(4'-[(2-phenylethyl)amino]methyl)-4-biphenyl)methyl]propanamide dihydrochloride), a novel 5-HT_{5A} receptor-selective antagonist, enhances 5-HT neuronal function: Evidence for an autoreceptor role for the 5-HT_{5A} receptor in guinea pig brain. *Neuropharmacology* 51(3): 566–577.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.04.019>
 18. *Thomas DR* (2006) 5-HT_{5A} Receptors as a Therapeutic Target. *Pharmacol Ther* 111(3): 707–714.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.12.006>
 19. *Corbett DF, Heightman TD, Moss SF, Bromidge SM, Coggon SA, Longley MJ, Roa AM, Williams JA, Thomas DR* (2005) Discovery of a potent and selective 5-HT_{5A} receptor antagonist by high-throughput chemistry. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 4014–4018.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.06.024>
 20. *Goodfellow NM, Bailey CDC, Lambe EK* (2012) The Native Serotonin 5-HT_{5A} Receptor: Electrophysiological Characterization in Rodent Cortex and 5-HT_{1A}-Mediated Compensatory Plasticity in the Knock-Out Mouse. *J Neurosci* 32(17): 5804–5809.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4849-11.2012>
 21. *Francken BJB, Jurzak M, Vanhauwe JFM, Luyten WHML, Leysen JE* (1998) The human 5-HT_{5A} receptor couples to Gi/Go proteins and inhibits adenylate cyclase in HEK-293 cells. *Eur J Pharmacol* 361: 299–309.
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(98\)00744-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(98)00744-4)
 22. *Francken BJB, Jossen K, Lijnen P, Jurzak M, Luyten WHML, Leysen JE* (2000) Human 5-hydroxytryptamine 5A receptors activate coexpressed Gi and Go proteins in *Spodoptera frugiperda*-9 cells. *Mol Pharmacol* 57: 1034–1044.
 23. *Thomas DR, Larminieb CG, Lyonsc HR, Fosberryc A, Hill MJ, Hayesb PD* (2004) Cloning and pharmacological characterisation of the guinea pig 5-HT_{5A} receptor. *Eur J Pharmacol* 494 (2–3): 91–99.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.04.027>
 24. *Noda M, Yasuda S, Okada M, Higashida H, Shimada A, Iwata N, Ozaki N, Nihikawa K, Shirasawa S, Uchida M, Aoki S, Wada K* (2003) Recombinant human serotonin 5A receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways. *J Neurochem* 84: 222–232.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01518.x>
 25. *Grailhe R, Grabtree GW, Hen R* (2001) Human 5-HT(5) receptors: the 5-HT(5A) receptor is functional but the 5-HT(5B) receptor was lost during mammalian evolution. *Eur J Pharmacol* 418: 157–167.
[https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)00933-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)00933-5)
 26. *Pasqualetti M, Ori M, Marazziti D, Castagna M, Nardi I* (1998) Distribution of 5-HT_{2c} and 5-HT_{5a} receptor mRNA in human brain. *Ann NY Acad Sci* 861: 245.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10202.x>
 27. *Rees S, Daas I, Foord S, Goodson S, Bull D, Kilpatrick G, Lee M* (1994) Cloning and characterisation of the human 5-HT_{5A} serotonin receptor. *FEBS Letters* 355: 242–246.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01209-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01209-1)
 28. *Oliver KR, Kinsey AM, Wainwright A, Sirinathsinghji DJ* (2000) Localization of 5-HT(5A) receptor-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res* 867: 131–142.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02273-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02273-3)
 29. *Kinsey AM, Wainwright A, Heavens R, Sirinathsinghji DJ, Oliver KR* (2001) Distribution of 5-HT(5A), 5-HT(5B), 5-HT(6) and 5-HT(7) receptor mRNAs in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 88: 194–198.
[https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00034-1](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00034-1)
 30. *Garcia-Alcocer G, Rodriguez A, Moreno-Layseca P, Berumen LC, Escobar J, Miledi R* (2010) Serotonin receptor 5-HT_{5A} in rat hippocampus decrease by leptin treatment. *Neurosci Lett* 486: 171–173.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.09.045>
 31. *Xu C, Giuliano F, Sun X-Q, Brisorgueil M-J, Leclerc P, Verge D, Conrath M* (2007) Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{5A} receptors are expressed by different motoneuron populations in rat Onuf's nucleus. *J Comp Neurol* 502: 620–634.
<https://doi.org/10.1002/cne.21344>
 32. *Muñoz-Islas E, Vidal-Cantú GC, Bravo-Hernández M, Cervantes-Durán C, Quiñonez-Bastidas GN, Pineda-Farias JB, Barragán-Iglesias P, Granados-Soto V* (2014) Spinal 5-HT_{5A} receptors mediate 5-HT-induced antinociception in several pain models in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 120: 25–32.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.02.001>

33. Avila-Rojas SH, Velázquez-Lagunas I, Salinas-Abarca AB, Barragán-Iglesias P, Pineda-Farías JB, Granados-Soto V (2015) Role of spinal 5-HT_{5A} and 5-HT_{1A/1B/1D} receptors in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Brain Res* 1622: 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.06.043>
34. Vidal-Cantú GC, Jiménez-Hernández M, Rocha-González HI, Villalón CM, Granados-Soto V, Muñoz-Islas E (2016) Role of 5-HT_{5A} and 5-HT_{1B/1D} receptors in the antinociception produced by ergotamine and valerenic acid in the rat formalin test. *Eur J Pharmacol* 781: 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.04.009>
35. Dityateva AE, Chmykhova NM, Dityateva GV, Babalian AL, Kleinle J, Clamann HP (2001) Structural and Physiological Properties of Connections Between Individual Reticulospinal Axons and Lumbar Motoneurons of the Frog. *J Comp Neurol* 430: 433–447. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20010219\)430:4<433::AID-CNE1041>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20010219)430:4<433::AID-CNE1041>3.0.CO;2-Z)
36. Kalinina NI, Zaitsev AV, Veselkin NP (2019) Serotonin Modulates Differently the Functional Properties of Damaged and Intact Motoneurons in the Frog Spinal Cord. *Dokl Biol Sci* 484: 5–9. <https://doi.org/10.1134/S0012496619010046>
37. Barber RP, Vaughn JE, Roberts E (1982) The cytoarchitecture of GABAergic neurons in rat spinal cord. *Brain Res* 238: 305–328. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90107-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90107-X)
38. Noda M, Higashida H, Aoki S, Wada K (2004) Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors. *Mol Neurobiol* 29: 31. <https://doi.org/10.1385/MN:29:1:31>
39. Gingrich JA, Hen R (2000) The broken mouse: the role of development, plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice. *Curr Opin Neurobiol* 10: 146–152. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(99\)00061-6](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(99)00061-6)

Involvement of 5-HT₁ and 5-HT_{5A} Receptors in Modulation of Synaptic Transmission and Internal Properties of the Membrane of Spinal Frog Motoneurons (*Rana ridibunda*)

N. I. Kalinina^{a, *} and N. P. Veselkin^{a, b}

^aSechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

^bSaint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

*e-mail: nkalinina54@mail.ru

The endogenous monoamine serotonin (5-HT) modifies motor output in vertebrates by interacting with different types of 5-HT receptors. Previously, 5-HT_{5A} receptors were detected in rat lumbar motoneurons by immunohistochemical methods, where their postsynaptic localization is assumed. However, we found no information about the presence of 5-HT_{5A} receptors in the lumbar spinal cord of lower vertebrates (including amphibians). In the present work, we investigated the possible involvement of 5-HT_{5A} receptors (along with 5-HT₁ receptors) in the modulation of motor output of spinal motoneurons of the frog *Rana ridibunda* using a pharmacological approach, extra- and intracellular recording of potentials. Results of extracellular recordings (with the application of 5-CT, an agonist of 5-HT₁ and 5-HT_{5A} receptors, and SB-699551, a selective 5-HT_{5A} receptor antagonist) indicate spatiotemporal modulation of the activity of ventral horn neurons. Furthermore, changes in the amplitude of the field antidromic potential, the peak amplitude of the evoked medullary potential and the intracellular dorsal medullary postsynaptic potential, as well as changes in the frequency of extracellular spikes and latency of the first intracellular action potential during the 5-CT application, were time-dependent: potentiation was observed in the first minutes, which was later followed by depression. Taken together, the results indicate the involvement of 5-HT_{5A} receptors along with 5-HT₁ receptors in the modulation of motor output of frog spinal motoneurons.

Keywords: frog, spinal cord, motoneuron, 5-HT_{5A} receptor, synaptic transmission