

УДК 612.832

## СЕРТОНИН ПО-РАЗНОМУ МОДУЛИРУЕТ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ПОВРЕЖДЁННЫХ И НЕПОВРЕЖДЁННЫХ МОТОНЕЙРОНОВ СПИННОГО МОЗГА ЛЯГУШКИ

Н. И. Калинина<sup>1,\*</sup>, А. В. Зайцев<sup>1,2,\*\*</sup>, академик РАН Н. П. Веселкин<sup>1,2</sup>

Поступило 22.08.2018 г.

При исследовании препарата изолированного сегмента спинного мозга взрослой лягушки выявили достоверные различия между повреждёнными и неповреждёнными поясничными мотонейронами в величине мембранного потенциала, входного сопротивления, свойствах потенциала действия (амплитуде, длительности, быстрой и средней фазах следовой гиперполяризации), частоте спайков. Серотонин (5-НТ) уменьшал амплитуду следовой гиперполяризации и увеличивал частоту спайков у неповреждённых нейронов, у повреждённых мотонейронов 5-НТ увеличивал амплитуду следовой гиперполяризации и не влиял на частоту разрядов.

*Ключевые слова:* поясничный мотонейрон, спинной мозг, серотонин, лягушка.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524843372-376>

В настоящее время появляется всё больше сведений о роли серотонина в восстановлении моторных функций при травмах спинного мозга [1, 2]. В здоровом мозге нисходящие серотонинергические волокна из ядер шва устанавливают прямые контакты с мотонейронами [3, 4]. При травмах мозга нарушается доставка серотонина к моторным ядрам спинного мозга, а также повреждаются дендриты мотонейронов и премоторных интернейронов [5, 6], на которых находится основная доля синапсов и в модуляции активности которых участвует серотонин. Повреждение дендритов необязательно приводит к гибели мотонейрона, однако функциональные свойства повреждённого мотонейрона могут измениться. Эти изменения важно знать и учитывать при разработке рациональных способов терапии травм спинного мозга.

Цель настоящего исследования — сравнение электрофизиологических свойств у повреждённых и неповреждённых мотонейронов и анализ модулирующего влияния на них серотонина.

Изучение электрофизиологических свойств мотонейронов спинного мозга остаётся методически сложной задачей, так как тонкие срезы спинного мозга взрослых млекопитающих обладают низкой жизнеспособностью [5, 6]. В настоящей работе ис-

пользовали препарат изолированного поясничного сегмента спинного мозга взрослой лягушки (*Rana ridibunda*). Методика приготовления препарата была подробно описано нами ранее [7, 8]. Препарат спинного мозга лягушки имеет ряд преимуществ по сравнению с препаратами млекопитающих. Во-первых, спинальные нейроны лягушки в меньшей степени подвержены гибели по причине гипоксии. Во-вторых, благодаря особенностям морфологии мотонейронов можно просто и надёжно получить повреждённые и неповреждённые мотонейроны на одном препарате. Поясничный мотонейрон — самая крупная клетка спинного мозга лягушки. Он имеет очень разветвлённое дендритное дерево, дендриты поясничных мотонейронов лягушки распространяются в росто-каудальном направлении на расстояние до 2 мм [9]. В экспериментах мы использовали фронтальные срезы толщиной 2–3 мм (рис. 1). При такой толщине среза мотонейроны в середине среза остаются в основном неповреждёнными.

Для перфузии использовали раствор следующего состава (мМ): 100 NaCl; 2 KCl; 0,5 MgCl<sub>2</sub>; 5,5 глюкоза; 1,5 CaCl<sub>2</sub>; 9 NaHCO<sub>3</sub>; 2 трис-НСl-буфер; рН 7,4–7,6, аэрируемый газовой смесью (98% O<sub>2</sub> и 2% CO<sub>2</sub>) и имеющий температуру 16–18 °С. Серотонин (10 мкМ) и блокатор натриевых каналов тетродотоксин (ТТХ, 1 мкМ) добавляли в перфузирующий раствор.

Потенциалы отводили внутриклеточно с помощью острых стеклянных микроэлектродов с диаметром кончика 1–1,5 мкм и сопротивлением 10–20 МОм, заполненных раствором KCl (3М). Потен-

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии

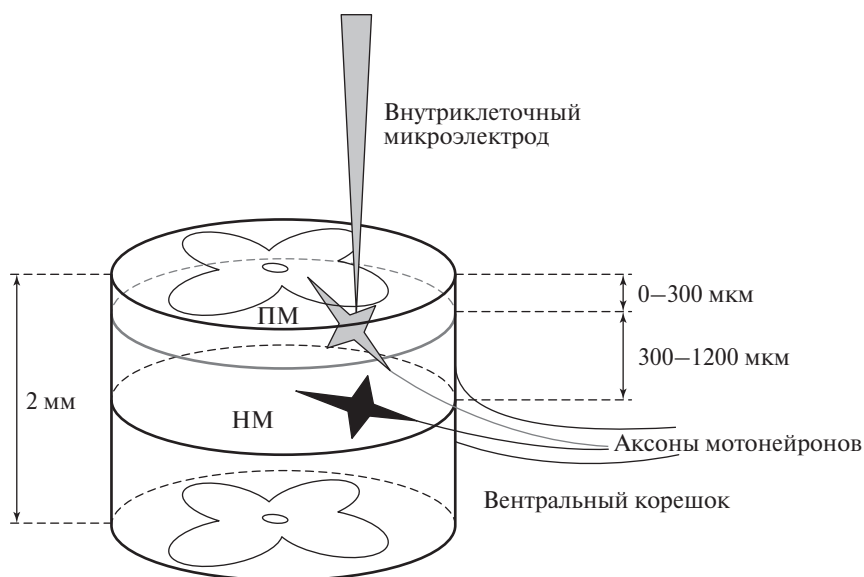
и биохимии им. И.М. Сеченова

Российской Академии наук, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет

\*E-mail: [nkalinina54@mail.ru](mailto:nkalinina54@mail.ru)

\*\*E-mail: [aleksey\\_zaitsev@mail.ru](mailto:aleksey_zaitsev@mail.ru)



**Рис. 1.** Схема эксперимента. Изоллированный поясничный сегмент спинного мозга лягушки *Rana ridibunda* (фронтальный срез толщиной 2–3 мм), НМ — неповреждённый мотонейрон, находящийся на глубине 300–1200 мкм от роstralной поверхности среза, ПМ — повреждённый мотонейрон с частично отрезанными дендритами, находящийся на глубине до 300 мкм.

циалы регистрировали с помощью микроэлектродного дифференциального усилителя, оцифровывали с частотой 10–20 кГц с помощью АЦП NIUSB-6211 (“National Instruments”, США) и записывали на компьютере, используя программу WinWCP (“Strathclyde Electrophysiology Software”, Великобритания). Мотонейроны идентифицировали по антидромному потенциалу действия (ПД), возникающему при стимуляции вентрального корешка.

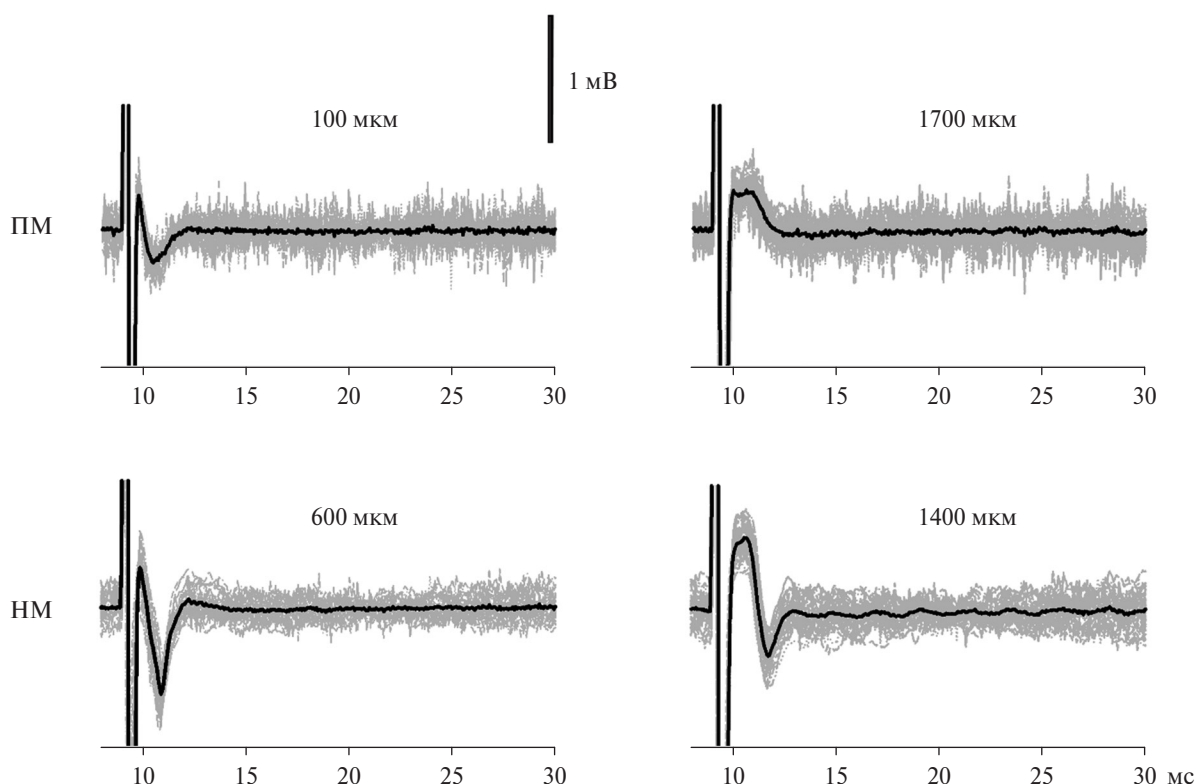
Для статистического анализа и построения графиков использовали программы SigmaPlot 11.0 и MS Excel. Достоверность различий между группами мотонейронов оценивали с помощью непарного критерия *t* Стьюдента, влияние 5-НТ — с помощью парного критерия *t*.

Чтобы определить область нахождения повреждённых мотонейронов в срезе мозга толщиной 2 мм, мы измерили антидромный полевой потенциал, вызванный стимуляцией вентрального корешка, при продвижении микроэлектрода вертикально вниз от роstralной поверхности вдоль колонки мотонейронов с шагом 100 мкм (рис. 2). Обнаружили, что в роstralной (0–300 мкм) и каудальной (1700–2000 мкм) частях среза антидромный полевой потенциал был значительно меньше по амплитуде и площади, чем в середине среза (400–1600 мкм), что обусловлено отсечением дендритов мотонейронов в роstralном/каудальном слоях. Средние значения площади под кривой для антидромных полевых потенциалов в поверхностном

слое составили  $0,26 \pm 0,10$  (здесь и далее  $M \pm m$ ,  $n = 5$ ), в глубине среза —  $0,5 \pm 0,2$  мВ · мс ( $p < 0,05$ ).

Основываясь на этом наблюдении, мы разделили все исследованные мотонейроны на две группы: неповреждённые мотонейроны (НМ), сома которых располагалась на глубине 300–1200 мкм ( $n = 13$ ), и повреждённые мотонейроны (ПМ), локализованные на глубине до 300 мкм от поверхности среза ( $n = 7$ ). Потенциал покоя у НМ был меньше ( $-67,2 \pm 1,6$  мВ), чем у ПМ ( $-55,0 \pm 1,4$  мВ,  $p < 0,01$ ). Входное сопротивление составило  $7,3 \pm 0,7$  МОм у НМ, тогда как у ПМ сопротивление было в 2,5 раза выше ( $17,1 \pm 2,5$  МОм,  $p < 0,01$ ), что обусловлено уменьшением площади поверхности мембраны, так как многие дендриты были обрезаны при приготовлении препарата. Пиковая амплитуда антидромного спайка, измеренная от потенциала покоя до пика, составила  $60 \pm 3$  мВ у ПМ и была на 25% выше у НМ ( $75,1 \pm 1,9$  мВ,  $p < 0,01$ ). Амплитуды быстрой (fАНР) и средней (mАНР) фаз следовой гиперполяризации были больше у НМ ( $-12,9 \pm 1,2$  и  $-3,0 \pm 0,2$  мВ соответственно), чем у ПМ ( $-8,4 \pm 0,8$  и  $-0,8 \pm 0,1$  мВ,  $p < 0,05$ ). Также достоверно различались значения полуширины ПД, составившие  $0,8 \pm 0,3$  мс у НМ и  $1,6 \pm 0,1$  мс у ПМ ( $p < 0,05$ ).

Влияние 5-НТ (10 мкМ) исследовали на 8 НМ и 6 ПМ. Аппликация 5-НТ в перфузирующий раствор вызвала в течение 3–5 мин небольшую деполаризацию у НМ (на  $3,4 \pm 0,5$  мВ) и ПМ ( $2,0 \pm 0,3$  мВ), которая сохранялась в условиях блока спайковой активности с помощью ТТХ. Мы не вы-



**Рис. 2.** Примеры регистрации антидромного полевого потенциала в зонах расположения мотонейронов с частично повреждённой (вверху) и с неповреждённой (внизу) структурой. Цифрами указана глубина погружения микроэлектрода от ростральной поверхности среза толщиной 2 мм. Серым цветом показаны индивидуальные пробеги, чёрным — усреднение 30 пробегов.

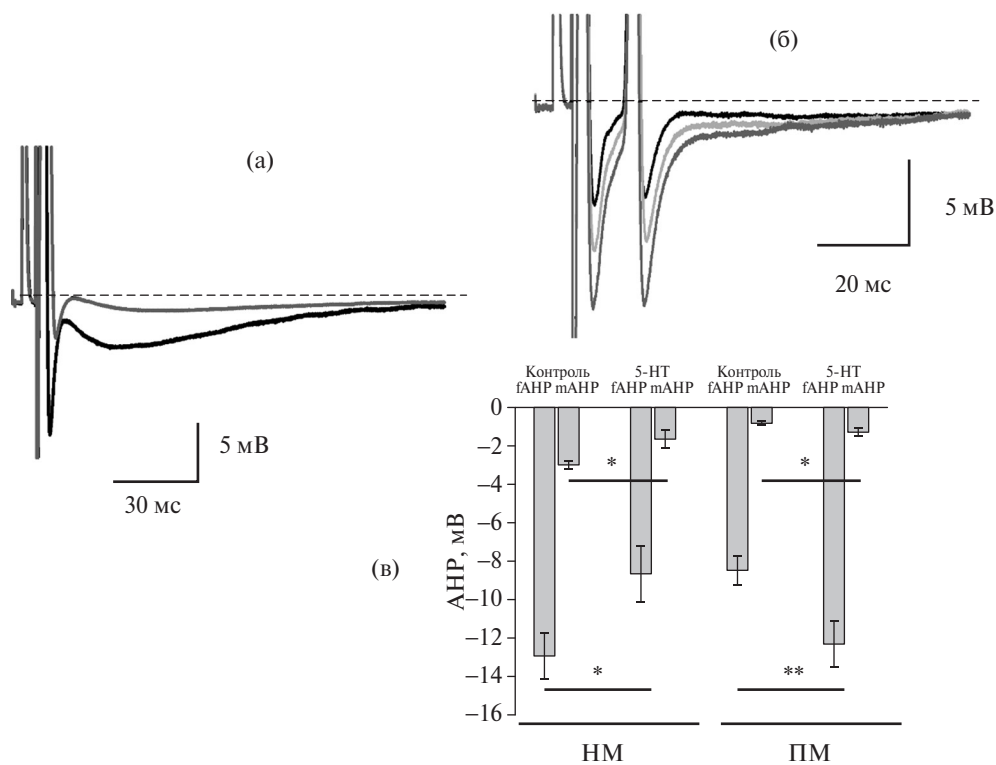
явили существенного влияния 5-НТ на амплитуду и полуширину антидромного ПД у НМ и ПМ. Однако мы обнаружили значимый и разнонаправленный эффект 5-НТ на следовую гиперполяризацию у ПМ и НМ. В НМ 5-НТ уменьшил амплитуду  $f$ АНР на 33% с  $-12,9 \pm 1,2$  до  $-8,6 \pm 1,5$  мВ ( $p < 0,05$ ), а амплитуду  $m$ АНР — на 43% с  $-3,0 \pm 0,2$  до  $-1,7 \pm 0,5$  мВ ( $p < 0,05$ , рис. 3а). У ПМ 5-НТ увеличил амплитуду  $f$ АНР в полтора раза с  $-8,4 \pm 0,8$  до  $-12,3 \pm 1,1$  мВ ( $p < 0,01$ ), а  $m$ АНР — на 62% с  $-0,8 \pm 0,1$  до  $-1,3 \pm 0,2$  мВ ( $p < 0,05$ , рис. 3б). Увеличение  $f$ АНР под действием 5-НТ было тем больше, чем ближе к ростральной поверхности среза находился ПМ, т.е. имела место зависимость увеличения  $f$ АНР от степени повреждения дендритов клетки.

Поскольку изменение свойств АНР влияет на частоту спайков [10], то мы определили, как меняется количество антидромных ПД, вызванных однократной стимуляцией вентрального корешка, после добавления 5-НТ в перфузирующий раствор. Мы обнаружили, что 5-НТ увеличивает число спайков, зарегистрированных в течение 1 секунды с  $2,1 \pm 0,5$  до  $8,2 \pm 0,4$  спайков у НМ, тогда как у ПМ число спайков не изменилось (рис. 4).

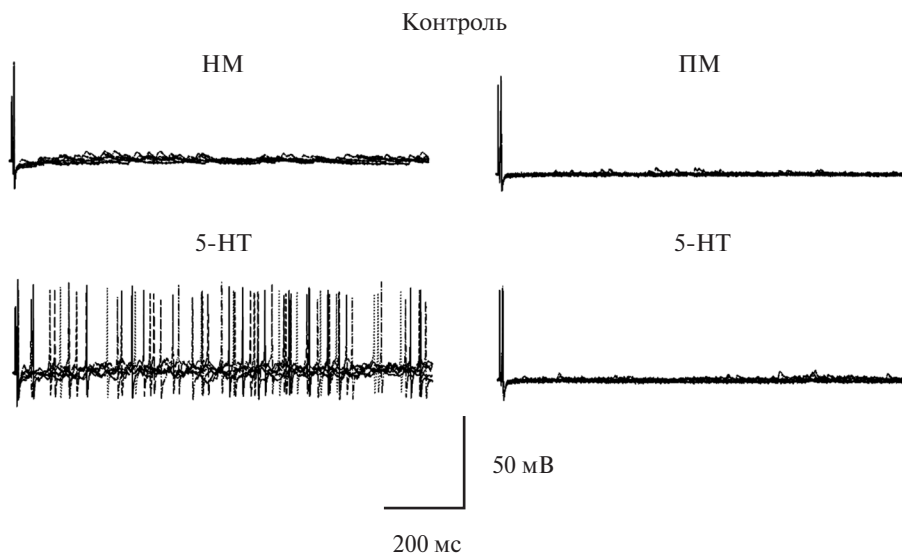
Таким образом, результаты проведённого исследования показывают, что свойства мотонейронов и влияние на них нейромодуляторов, например 5-НТ, могут коренным образом изменяться после повреждений. У НМ 5-НТ уменьшает  $m$ АНР, что было показано на разных видах животных: морской свинке, мышах, черепахах [10, 11, 13]. Фаза  $m$ АНР обусловлена работой апаминчувствительных  $Ca^{2+}$ -зависимых  $K^+$ -каналов [10, 14]. При уменьшении  $m$ АНР снижается спайковая аккомодация и мотонейрон разряжается дольше и с более высокой частотой [12]. Таким образом, модуляция  $m$ АНР определяет настройки выхода мотонейронов [13]. Интересно, что на ПМ 5-НТ оказывал противоположное действие. Амплитуды  $f$ АНР и  $m$ АНР возрастали, а частота разрядов не увеличивалась. Ослабление активности ПМ, возможно, предохраняет их от гибели.

Какие конкретно молекулярные механизмы участвуют в данном ответе ПМ, пока не выяснено. В доступной литературе мы не нашли сведений о действии 5-НТ на ПМ, поэтому необходимо проведение специальных экспериментов.

Различия в параметрах ПД при регистрации неповреждённых и частично повреждённых мо-



**Рис. 3.** Действие 5-НТ на fAHP и mAHP антидромного ПД в неповреждённом (а) и повреждённом (б) мотонейроне. Контроль (чёрный цвет), при аппликации 5 и 10 мкМ 5-НТ (светло-серый и тёмно-серый цвет соответственно). (v) — диаграммы, иллюстрирующие достоверное уменьшение обеих фаз АНР при аппликации 5-НТ в НМ ( $n = 8$ ) и увеличение их в ПМ ( $n = 6$ ),  $M \pm m$ ,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ .



**Рис. 4.** Действие 5-НТ на количество антидромных ПД в НМ и отсутствие его влияния в ПМ. Калибровочный толчок — 50 мВ, 1 мс. Наложение 6 пробегов. Контроль — верхние записи, при аппликации 5-НТ — нижние записи.

тонеионов свидетельствуют о том, что экспериментальные результаты, полученные на тонких срезах, для крупных ветвистых клеток должны интерпретироваться с учётом их возможного повреждения.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема по ПФНИ ГАН-63 “Нейрофизиологические механизмы регуляции функций и их эволюция” АААА-А18-118012290372-0) и частично поддержана грантом РФФИ 18-04-00247.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmidt B.J., Jordan L.M. // Brain Res. Bull. 2000. V. 53. № 5. P. 689–710.
2. Murray K.C., Stephens M.J., Ballou E.W., et al. // J. Neurophysiol. 2011. V. 105. P. 731–748.
3. Alvarez F.J., Pearson J.C., Harrington D., et al. // J. Comp. Neurol. 1998. V. 393. P. 69–83.
4. Xia Y., Chen D., Xia H., et al. // Neurosci. Lett. 2017. V. 649. P. 70–77.
5. Davies M.L., Kirov S.A., Andrew R.D. // J. Neurosci. Methods. 2007. V. 166. P. 203–216.
6. Carp J.S., Tennissen A.M., Mongeluzi D.L., et al. // J. Neurophysiol. 2008. V. 100. P. 474–481.
7. Kalinina N.I., Kurchayvi G.G., Zaitsev A.V., Vesselkin N.P. // J. Evolut. Biochem. Physiol. 2016. V. 52. № 5. P. 359–368.
8. Kalinina N.I., Zaitsev A.V., Vesselkin N.P. // J. Comp. Physiol. A. 2018. V. 204. № 3. P. 329–337.
9. Dityatev A.E., Chmykhova N.M., Dityateva G.V., et al. // J. Comp. Neurol. 2001. V. 430. P. 433–447.
10. Diaz-Rios M., Dombeck D.A., Webb W.W., Harris-Warrick R.M. // J. Neurophysiol. 2007. V. 98. P. 2157–2167.
11. Hsiao C.F., Trueblood P.R., Levine M.S., Chandler S.H. // J. Neurophysiol. 1997. V. 77. P. 2910–2924.
12. Miles G.B., Sillar K.T. // Physiology. 2011. V. 26. P. 393–441.
13. Perrier J-F., Rasmussen H.B., Christensen R.K., Petersen A.V. // Curr. Pharm. Des. 2013. V. 19. № 24. P. 4371–4384.
14. Sah P. // TINS. 1996. V. 19. № 4. P. 150–154.

## SEROTONIN DIFFERENTIALLY MODULATES THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF DAMAGED AND INTACT MOTONEURONS OF THE FROG SPINAL CORD

N. I. Kalinina, A. V. Zaitsev, Academician of the RAS N. P. Vesselkin

Received August 22, 2018

The role of serotonin in the recovery of motor functions in spinal cord injuries is intensively studied, but the mechanism of its action remains unclear. In this work, we used the preparation of an isolated segment of the spinal cord of an adult frog to compare the electrophysiological properties of damaged and intact lumbar motoneurons and the modulating effect of serotonin (5-HT) on them. Due to specific morphology of the motoneurons (a very branched dendritic tree), we could reliably obtain damaged (on the surface of the slice) and intact motoneurons (in the depth of the slice). Using intracellular recording, we found significant differences between these groups of neurons in the resting membrane potential, input resistance, properties of the action potential (amplitude, duration, fast and medium phases of the afterhyperpolarization), the frequency of spikes. We found that 5-HT reduced the amplitude of the afterhyperpolarization and increased the frequency of spikes in intact neurons, whereas in damaged motoneurons, 5-HT increased the amplitude of the afterhyperpolarization and did not affect the frequency of discharges. The results of the study show that the properties of the motoneurons and the effect of neuromodulators on them, in particular, 5-HT, can change after damage.

*Keywords:* lumbar motoneuron, spinal cord, serotonin, frog.