

СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКАЯ ИННЕРВАЦИЯ СПИННОГО МОЗГА ЛЯГУШКИ И УЧАСТИЕ 5-HT_{5A} РЕЦЕПТОРОВ В МОДУЛЯЦИИ МИНИАТЮРНЫХ ГЛИЦИНЕРГИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ ПОЯСНИЧНЫХ МОТОНЕЙРОНОВ

© 2024 г. Н. М. Чмыхова^{1,*}, Д. С. Васильев¹, Н. П. Веселкин¹

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

* e-mail: nchmykhova@gmail.com

Поступила в редакцию 20.09.2023 г.

После доработки 18.11.2023 г.

Принята к публикации 20.11.2023 г.

Роль серотониновых рецепторов 5-HT_{5A} в модуляции миниатюрной тормозной синаптической активности исследована с помощью внутриклеточной регистрации миниатюрных глицинергических тормозных постсинаптических потенциалов (глимТПСП) в мотонейронах поясничных сегментов изолированного спинного мозга лягушки *Rana ridibunda*. В среде, содержащей ТТх, CNQX, DAP5, bicuculline, аппликация агониста серотониновых рецепторов 5-СТ (10 мкМ) с высокой аффинностью к 5-HT_{5A} приводила к подавлению частоты на 86%, а также исчезновению высокоамплитудных глимТПСП (200–500 мкВ) при сохранении редких потенциалов амплитудой около 100 мкВ, что свидетельствует о возможности пре- и постсинаптического действия 5-СТ в такой концентрации, не исчерпывающегося его действием только на 5-HT_{5A} рецепторы. Добавление в среду метисергида, блокатора 5-HT_{1,2} рецепторов, снижало среднюю частоту глимТПСП на 67%, частоту высокоамплитудных событий в 5 раз и их среднюю амплитуду на 20%, что может свидетельствовать об участии 5-HT_{5A} рецепторов в пре- и постсинаптической модуляции в глимТПСП мотонейронов. Аппликация 1 мкМ 5-СТ приводила к уменьшению частоты глимТПСП на 49% без заметного изменения амплитуды глимТПСП, а последующее введение в раствор SB-699551, селективного антагониста 5-HT_{5A} рецепторов, увеличивало частоту событий на 41%, что подтверждает участие 5-HT_{5A} рецепторов в пресинаптической модуляции глимТПСП. Иммунофлуоресцентное исследование показало, что супра- и интраспинальные 5-HT+ ir нейроны дают обильные ветвления в поясничном отделе с возможностью образования аксосоматических контактов с мечеными мотонейронами и аксодендритных контактов на проксимальных и дистальных участках их дендритов. Также возможно образование контактов в перимедулярном сплетении, пронизанном дистальными дендритами мотонейронов и астроцитарными отростками. Это представляет структурную основу для пост-, пре- и экстрасинаптической модуляции активности мотонейронов серотином. Возможность постсинаптической модуляции активности мотонейронов через 5-HT_{5A} рецепторы подтверждает точечноподобная флуоресценция 5-HT_{5A}Rlike+ сигнала на дендритах и телах меченых мотонейронов, который присутствует в нейропиле, но отсутствует в перимедулярном сплетении. Двойное мечение антителами к 5-HT_{5A} рецептору и Ca²⁺-связывающему белку, парвальбумину (PV+ir), выявило локализацию 5-HT_{5A}Rlike+ в миелиновой оболочке волокон дорсальных и вентромедиальных канатиков. На препаратах после длительной стимуляции вентральных корешков через всасывающие электроды при мечении мотонейронов биоцитином обнаружен яркий 5-HT_{5A}Rlike+ сигнал в миелине моторных аксонов, дорсальнокорешковых волокон, входящих в мозг в области дорсального рога и отдельных волокон вентромедиального канатика. Обсуждается участие экстрасинаптических рецепторов 5-HT_{5A} в функционировании цепей обратной связи активности поясничных мотонейронов, с возможным участием в этих цепях глиальных элементов.

Ключевые слова: спинальный мотонейрон, серотонинергическая иннервация, 5-HT_{5A} рецептор, миниатюрная глицинергическая активность, лягушка

DOI: 10.31857/S0044452924010035, EDN: ZFYBEE

ВВЕДЕНИЕ

Функциональное значение семейств и подтипов серотониновых рецепторов, модулирующих моторный выход спинного мозга изучено недостаточно. Это касается 5-HT₅, одного из семейств се-

ротониновых рецепторов, обнаруженного в конце прошлого столетия [1]. Его два подтипа: 5-HT_{5A}R и 5-HT_{5B}R выявлены у грызунов, у человека описан только один – 5-HT_{5A}R [2–4]. По данным атласа протеинов человека (HRA – The version 21,

www.proteinatlas.org). экспрессия РНК 5-HT_{5A} рецептора присутствует в тормозных и возбуждающих нейронах, а также в глиальных клетках, причем наибольший базовый уровень экспрессии отмечен в мозжечке, наименьший — в спинном мозге.

Распределение 5-HT_{5A}R-like иммунореактивности в разных отделах мозга крысы было успешно картировано иммуногистохимически [5]. С помощью световой и электронной микроскопии в спинном мозгу крыс распределение 5-HT_{5A}R выявлено иммуноцитохимически [6, 7]. Доли с соавторами описано заметное присутствие 5-HT_{5A}R в нейронах дорсальных рогов и редкое — в немиелинизированных и миелинизированных волокнах в области входа дорсальных корешков в мозг. Ими высказана гипотеза, что рецепторы 5-HT_{5A} согласно их обильному распределению в нейронах поверхностных пластин дорсального рога, возможно участвуют в контроле ноцицепции. Кроме экспрессии 5-HT_{5A}R в дорсальных рогах спинного мозга показана экспрессия в дорсолатеральном моторном ядре поясничного сегмента L6. Слабая экспрессия рецептора выявлена во всех группах мотонейронов пластинки IX других сегментов и в интермедиолатеральной области, что предполагает постсинаптическое участие 5-HT_{5A}R в контроле моторных и вегетативных функций [6].

Известно, что успешная расшифровка функции рецепторов возможна с применением селективных лигандов. Ранее была установлена высокая аффинность агониста серотониновых рецепторов 5-СТ (5-carboxamidotryptamine) к 5-HT_{5A}R при изучении его путей сигнализации [3, 8–10], а позже были разработаны селективные антагонисты, SB699551 [11, 12] и ASP5736 [13]. Исследования боли на крысах в моделях с использованием формалинового и других тестов с параллельной оценкой экспрессии 5-HT_{5A}R в спинном мозгу и в спинномозговых ганглиях привели ряд авторов к констатации антиноцицептивной роли 5-HT_{5A}R [14–16]. В результате было сделано заключение, что 5-HT_{5A}R могут служить терапевтической мишенью для разработки анальгетиков.

Другой аспект изучения 5-HT_{5A}R — его функциональное значение при регуляции возбудимости в сенсомоторных цепочках, например, в слуховой цепи при реакции вздрагивания, испуга в ответ на звуковой стимул. Пластичность реакции вздрагивания обычно изучается с помощью определения преимпульсного торможения (PPI) [17]. Дефицит преимпульсного торможения связан с нарушениями обработки информации, особенно при шизофрении [18, 19]. Важно отметить, что при этом заболевании обнаружены вариации генов 5-HT_{5A} рецепторов, которые могут являться потенциальными клиническими мишенями [11, 20]. Сенсомоторные проявления участия 5-HT_{5A}R в регуляции

возбудимости в слуховой цепи успешно анализировались на низших позвоночных: фармакологические и электрофизиологические исследования функции 5-HT_{5A}R с тестированием поведения проводились *in vivo* на золотой рыбе [17]. Экспрессия 5-HT_{5A}R документирована в маунтеровском нейроне рыбки тиляпии [21]. Однако вопросы функционирования 5-HT_{5A}R в нейронных цепях спинного мозга, в CPG (Central Pattern Generator) и их роль в модуляции активности мотонейронов остаются невыясненными.

Попытка раскрыть возможное участие 5-HT_{5A}R в модуляции тормозной глицинергической миниатюрной активности (глимТПСП) мотонейронов поясничного отдела спинного мозга предпринята нами на изолированном спинном мозге одного из представителей наземных тетрапод, взрослой озерной лягушки *Rana ridibunda*.

Мы выполняли исследование с помощью двух подходов: электрофизиологического с внутриклеточной регистрацией миниатюрных глицинергических тормозных постсинаптических потенциалов (глимТПСП) мотонейронов лягушки, модулируемых лигандами серотониновой передачи, и флуоресцентного иммуногистохимического для выявления серотонинергической иннервации, а также возможного присутствия в поясничных сегментах 5-HT_{5A}R.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электрофизиология

Электрофизиологические исследования совместно с фармакологическими тестами проводили на суперфузируемых поясничных сегментах изолированного спинного мозга взрослых озерных лягушек *Rana ridibunda*, животных обоего пола массой тела 70–160 г.

После эфирного наркоза животного проводили дорсальную ламинэктомию до зрительных бугров с непрерывным орошением по ходу операции физиологическим раствором, вырезали костную пластинку со спинным и продолговатым мозгом и погружали в предварительную камеру с охлажденным раствором, где высвобождали корешки 8–10-го поясничных сегментов. Затем переносили мозг в экспериментальную камеру. Поперечными разрезами выделяли сегменты толщиной около 2.5–3 мм, которые использовали последовательно. С помощью тонких иглол тестируемый срез фиксировали в камере с дном, покрытым силгардом, ростральной поверхностью вверх. Нормальный суперфузирующий раствор имел следующий состав в мМ: NaCl 98, KCl 2.0, NaHCO₃ 9.3, MgCl₂ 0.5, глюкоза 5, CaCl₂ 1.1, Трис (pH 7.4–7.6) и постоянно аэрировался карбогеном (98% O₂ и 2% CO₂). Температуру раствора в камере поддерживали в диапазоне 15–18 °C.

Внутриклеточное отведение от мотонейронов производили с помощью стеклянных микроэлектродов из боросиликатных трубочек (SUTTER INSTRUMENT), заполненных 3 М раствором KCl, с диаметром кончика 1–1.5 мкм и сопротивлением 10–20 МОм. Мотонейроны идентифицировали по антидромным потенциалам действия (АПД), вызываемым раздражением вентрального корешка (через всасывающий электрод одиночными стимулами (0.1 мс, 10–15 мкА)). Уровень мембранного потенциала покоя (МПП) измеряли цифровым вольтметром. Потенциалы регистрировали через аналогово-цифровой преобразователь на персональный компьютер с выхода микроэлектродного усилителя с автоматической стабилизацией нулевой линии, разработанного в лаборатории. Записывали пробеги длительностью 250 мс с частотой 1 с⁻¹ при регистрации АПД (5–10 пробегов) и с частотой 3 с⁻¹ при регистрации спонтанной (сПСП) и миниатюрной постсинаптической активности мотонейронов (мПСП) по 300 пробегов. Время отведений активности мотонейронов длилось от одного (в случае быстрого установления стабильных показаний МПП, до двух часов. Обусловленные спонтанным выделением медиаторов мПСП регистрировали в условиях блока проведения импульсов по пресинаптическим волокнам через 15–20 мин после добавления в суперфузирующий раствор 1.0 мкМ тетродотоксина (TTx). Затем для выделения тормозной фракции мПСП в раствор добавляли блокатор NMDA-рецепторов (D-AP5, 50 мкМ) и блокатор АМПА- и кинатных рецепторов (CNQX, 25 мкМ), таким образом исключая возбуждающую синаптическую активность, опосредованную глутаматом. Для выделения глимТПСП апплицировали бикикуллин (20 мкМ) – избирательный антагонист ГАМК_A-рецепторов, для идентификации глимТПСП – стрихнин (Str) (1 мкМ), блокатор глициновых рецепторов.

Для проведения работы использовали следующие вещества от фирмы Sigma (США): TTx, стрихнин – Str, серотонин, (5-hydroxytryptamine) – 5-НТ, (10 мкМ) и лиганды серотониновых рецепторов: агонист 5-НТ рецепторов – 5-СТ с высокой аффинностью к 5-НТ_{5A} рецептору (1 и 10 мкМ); высокоселективный антагонист 5-НТ_{5A} рецепторов – SB699551 (3-cyclopentyl-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-N-[(4'-{[(2-phenylethyl)amino]methyl}-4-biphenyl)methyl]propanamide dihydrochloride), (10 мкМ); антагонист 5-НТ_{1,2} рецепторов – метисергидмалеат (MS) [8β(S)]-9,10-Didehydro-N-[1-(hydroxymethyl)propyl]-1,6-dimethylergoline-8-carboxamide maleate, (10 мкМ).

D-AP5 и CNQX получены от фирмы RBI (США); бикикуллин метаклорид – от фирмы Tocris bioscience (Великобритания).

Анализ параметров потенциалов проводили с помощью компьютерных программ пакета

POTENTL и программы Clampfit 8.2 пакета Pclamp 8.2 Axon instruments. Компьютерный анализ мПСП осуществляли с помощью программы Pick6, являющейся модифицированной программой Анкри [22], дополненной блоком селекции потенциалов по заданным амплитудным и временным характеристикам. Статистический анализ и графические построения выполняли с помощью пакета программ Sigma Plot 2.0 и 12.0. Результаты представлены в виде $m \pm SD$ или $m \pm SE$. Значимость действия лигандов выявляли с помощью *t*-критерия Стьюдента, а также с помощью оценки распределений по Колмогорову–Смирнову.

Иммуногистохимия

Для иммуногистохимического изучения серотониновой иннервации в экспериментальной камере подготавливали не только отдельные сегменты, но и весь препарат изолированного спинного мозга с продолговатым мозгом. Маркирование мотонейронов осуществляли двумя способами: ретроградным и антероградным. Ретроградное маркирование мотонейронов дало возможность выявлять моторные ядра и области распространения дендритов мотонейронов, чтобы в них проследить распределение серотониновых терминальных ветвлений. При ретроградном способе маркеры апплицировали через всасывающий электрод на филаменты вентральных корешков вырезанного поясничного сегмента или одного из сегментов полного препарата изолированного спинного мозга: декстран, конъюгированный с флуоресцирующим родамином (DRh) (Dextran Rhodamine Green, 3000 MW, Invitrogen, Molecular Probes, США), биоцитин (B) (Biocytin, SIGMA, США) или нейробиотин (NB), (Neurobiotin, Vector Labs, Burlingame, CA, США) в концентрации 1–5% в физиологическом растворе. Биоцитин и нейробиотин апплицировали с подачей чередующихся депо- и гиперполяризующих толчков тока через всасывающий электрод. Время аппликации маркеров на вентральный корешок в камере с протоком физиологического раствора составляло от 2-х до 4-х ч.

При антероградном мечении мотонейронов маркер, биоцитин или нейробиотин 3–10% в 2М KCl, инъецировали в мотонейроны с помощью внутриклеточных микроэлектродов с диаметром кончика около 1 мкм. Мечение мотонейронов проводили после антидромной идентификации мотонейронов. Инъекция маркера осуществлялась подачей деполяризующих толчков тока силой 3–5 нА, длительностью 60 мс с частотой 10 Гц или 600 мс с частотой 1 Гц в течение 10–20 мин.

Для дальнейшего транспорта маркера в дистальные отделы дендритного дерева мотонейронов мозг, погруженный в аэрированный физиологи-

ческий раствор, помещали на ночь в холодильник (+4°C), после чего сутки фиксировали в растворе параформальдегида 4% на 0.1 М фосфатном буфере pH 7.4, затем последовательно погружали в 20%, затем 30% раствор сахарозы в 0.1 М фосфатном буфере на 1–3 дня для криопротекции ткани. В изопентане, охлажденном жидким азотом, блоки продолговатого мозга и спинного замораживали. Фронтальные, сагиттальные и горизонтальные срезы толщиной 14–50 мкм, готовили на криостате или на замораживающем микротоме. Реакции проводили либо на тонких (толщиной 14–20 мкм) серийных срезах, смонтированных на стеклах (Superfrost® Plus, Menzel), либо на свободноплавающих (толщиной 40–50 мкм), в отдельных случаях также серийных, для изучения распространения ветвей дендритного дерева мотонейронов. В качестве первичных антител использовали кроличьи поликлональные антитела против серотонина (5-НТ) (Immunostar, cat# 20080, США) в разведении 1:20000 и против 5-НТ_{5A}R (Immunostar, cat# 24429, США) в разведении 1:200/400 в течение 48 часов при t +4°C. В части опытов без мечения мотонейронов для картирования в срезе клеточных элементов в раствор с антителом к 5-НТ добавляли мышинное моноклональное антитело к кальций-связывающему белку, парвальбумину (PV), (Sigma, cat# P3088, США) в разведении 1:1000. В контрольной процедуре без введения первичных антител (негативный контроль) проверяли их специфичность. Вторичные козы антитела против Ig кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 568 (Invitrogen, cat# A-11036, США), применяли для выявления 5-НТ, 5-НТ_{5A}R, для выявления PV – козы антитела против Ig мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (Invitrogen, cat# A-11029, США). Нейробиотин и биоцитин меченых внутриклеточно мотонейронов выявляли для флуоресцентной микроскопии реактивом Alexa- Fluor 488, конъюгированным со стрептавидином (Invitrogen, Molecular Probes, США) или для изучения в световом микроскопе с авидин-биотин-пероксидазным комплексом (ABC; Vector) и реакцией Ni-DAВ [23].

После завершения процедур выявления и промывки свободноплавающие срезы монтировали на стекла, заключали в нефлуоресцирующую среду мовиоль (Mowiol, Calbiochem) или в энтелан под покровное стекло. Классические гистологические методы окрашивания по Нисслю и импрегнации препаратов по Быстрому методу Гольджи [24] применяли для получения общих морфологических характеристик срезов и выявления глиальных элементов (2 животных). Изучение препаратов проводили на микроскопе фирмы Zeiss (AxioImager A1, Germany) и конфокальном микроскопе Leica SP5 MF, (Leica Microsystems, Германия). С помощью программного обеспечения AxioVision AC проводи-

ли морфометрию структурных элементов в срезах мозга. С помощью программы ImageJ оценивали сравнительную плотность распределения 5-НТ ветвлений. Для этого цветные изображения срезов поясничного утолщения толщиной 40 мкм (по три от трех животных) переводили в черно-белый режим. Выбранную площадку 20×50 мкм помещали на белый фон изображения, а затем устанавливали по разным участкам срезов с разной плотностью реакции. Полученные значения плотности в условных единицах уровня серого усредняли по участкам, строили гистограмму для представления контрастной неоднородности серотониновой иннервации поясничного отдела спинного мозга.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Электрофизиология

Результаты исследования участия 5-НТ_{5A} рецепторов в модуляции миниатюрной глицинергической передачи, (глимТПСП) в поясничных мотонейронах получены в 21 эксперименте на срезах спинного мозга 15 животных обоего пола. Мотонейроны идентифицировали по наличию антидромного потенциала (АПД) при раздражении вентрального корешка. В 6 нейронах в выборках по 5–10 пробегов средние значения АПД составляли 71.7 ± 7.5 мВ, ($m \pm SD$, $n = 6$) со средними значениями быстрой (fАНР) и медленной следовой гиперполяризации (sАНР) 11.7 ± 3.7 и -2.4 ± 1.7 мВ, соответственно. В остальных мотонейронах анализ характеристик АПД не проводили. Установившийся МПП мотонейронов перед проведением фармакологических тестов составлял от –60 до –80 мВ, в среднем -67.6 ± 6.0 мВ ($m \pm SD$, $n = 21$).

Исследование модуляции глимТПСП (в суперфузате, содержащем ТТх, CNQX, D-AP5 и бикуккулин) проводили в 4-х сериях экспериментов I, II, III, IV (табл. 1): с вариацией концентрации для сопоставления эффектов 5-СТ: 10 мкМ – серии I и II, 1 мкМ – серия IV; с предварительным, до аппликации 5-СТ, введением в раствор антагониста 5-НТ_{1,2} рецепторов – 10 мкМ метисергид малеата (MS) – серия II; с аппликацией селективного антагониста 5-НТ_{5A} рецепторов, 10 мкМ SB699551-A, после добавления в перфузат 10 мкМ 5-НТ и антагониста 5-НТ_{1,2} рецепторов – 10 мкМ метисергида (MS) – серия III; с аппликацией 1 мкМ 5-СТ и последующей аппликации 10 мкМ SB699551, селективного антагониста 5-НТ_{5A} рецепторов, – серия IV.

Выделенная фракция миниатюрной глициновой активности 13 мотонейронов в сериях экспериментов I и IV представляет собой колебания мембранного потенциала, амплитудой от 80 до 1500 мкВ, в среднем, 117.0 ± 45.5 мкВ ($m \pm SD$, $n = 13$) и частотой событий от 1.0 до 16.8 с⁻¹, в среднем 4.6 ± 4.4 с⁻¹ ($m \pm SD$, $n = 13$) со следующими

Таблица 1. Серии экспериментов (I, II, III, IV) изучения действия лигандов серотониновых рецепторов, 5-СТ и SB-699551, на глимТПСП поясничных мотонейронов (*n* = 21) в срезах изолированного спинного мозга лягушки. Звездочкой обозначаются компоненты суперфузирующего раствора, а числами – концентрация лигандов

Серии экспериментов с числом мотонейронов	Состав раствора				
	TTx, CNQX, D-AP5, bicuculline	TTx, CNQX, D-AP5, MS, bicuculline	TTx, CNQX, D-AP5, 5-HT, MS bicuculline	Агонист 5-HT R 5-СТ (мкМ)	Антагонист 5-HT _{5A} R SB-699551 (мкМ)
I – 6 клеток	*			10	
II – 5 клеток		*		10	
III – 3 клетки			*		10
IV – 7 клеток	*			1	10

значениями характеристик глимТПСП (*m* ± *SD*, *n* = 21): время нарастания (*RT*) 1.5 ± 0.2 мс, полуширина (*HW*) 7.6 ± 1.8 мс; время спада (*DT*) 8.0 ± 1.6 мс, (*m* ± *SD*, *n* = 13). Класс высокоамплитудных миниатюрных потенциалов со средним значением амплитуды 216,9 ± 38.1 мкВ в этой выборке был немногочислен, частота событий составляла в среднем 0.1 ± 0.06 с⁻¹.
В **серии I** определяли действие 10 мкМ 5-СТ на глимТПСП шести поясничных мотонейронов.

Средние значения характеристик миниатюрной глициновой активности мотонейронов не отличались от приведенных выше данных двух серий. Действие раствора, содержащего 10 мкМ 5-СТ, уже в течение 5–10 мин приводило к подавлению глимТПСП с сокращением частоты событий в среднем на 85.7 ± 5.5% (*m* ± *SE*, *n* = 6) (рис. 1а). Через 30 мин продолжения подачи раствора с агонистом наблюдали полное исчезновение высокоамплитудных миниатюрных потенциалов. (рис. 1б, с).

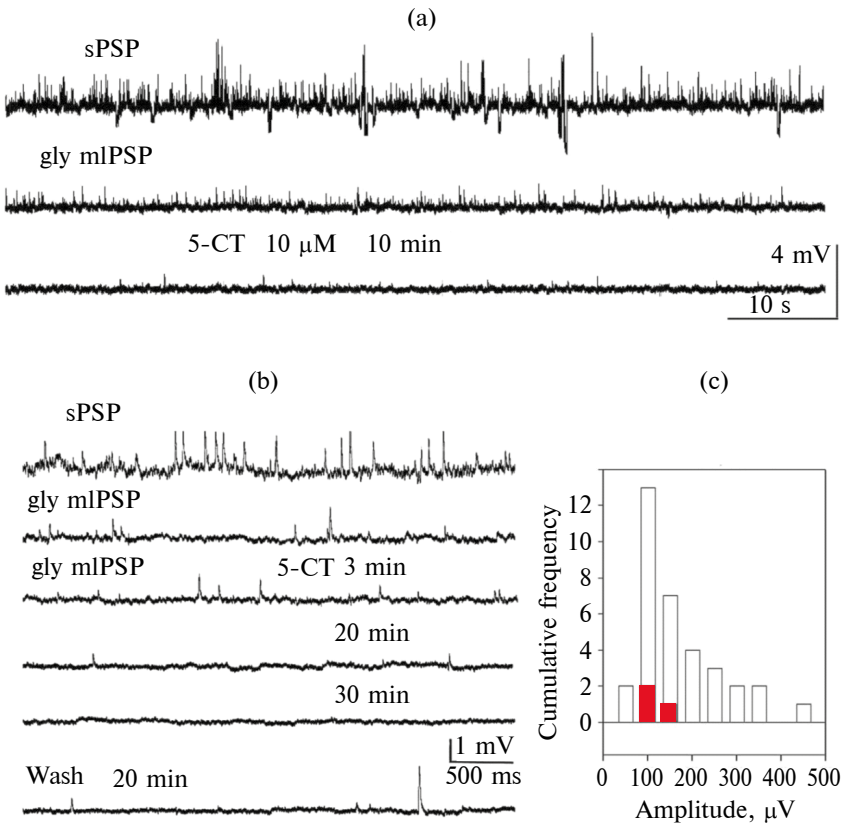


Рис. 1. Параметры глимТПСП мотонейрона, частоты и амплитуды, при аппликации 10 мкМ 5-СТ (экспериментальная **серия I**); (а) – примеры регистрации (полные записи из 300 пробегов) общей спонтанной активности (сПСП), выделенной фракции миниатюрных глициновых тормозных постсинаптических потенциалов (глимТПСП) и глимТПСП через 10 мин аппликации 5-СТ, агониста 5-НТ рецепторов, (10 мкМ) в поясничном мотонейроне спинного мозга лягушки; (б) – фрагменты (4 сек) записей активностей мотонейрона: сПСП, глим ТПСП, их подавления через 20 и 30 минут аппликации 5-СТ и восстановление спонтанной активности с появлением высокоамплитудных событий (более 1 мВ) через 20 мин после смыва экспериментального раствора на нормальный состав; (с) – гистограмма уменьшения числа и амплитуды глимТПСП в мотонейроне при действии 5-СТ (10 мкМ) (красные столбики) по сравнению с контролем (белые столбики).

Последующий отмыв тестового раствора раствором нормального физиологического состава через 15–20 минут привел к появлению редких спонтанных постсинаптических потенциалов амплитудой более 1 мВ.

В следующей **серии II** экспериментов исследовали возможность участия рецепторов семейства 5-HT_1 при действии 5-СТ. После предварительной аппликации 10 мкМ метисергид малеата (MS), смешанного блокатора серотониновых рецепторов 5-HT_1 и 5-HT_2 , аппликация 10 мкМ 5-СТ также приводила к существенному подавлению глимТПСП (рис. 2).

Среднее значение снижения частоты событий в пяти мотонейронах этой серии составляло $-66.8 \pm 4.2\%$ ($m \pm SE$). Редкие высокоамплитудные глимТПСП со средней амплитудой 240.0 ± 31.3 ($m \pm SD$, $n = 5$) и частотой событий $0.1 \pm 0.86 \text{ c}^{-1}$, при действии 5-СТ оставались в незначительном числе, средняя частота событий уменьшалась до 0.02 c^{-1} , средняя амплитуда уменьшалась на 20%, 191.0 ± 38.0 ($m \pm SD$, $n = 5$). Добавление в суперфузирующий раствор стрихнина 1 мкМ, блокатора глицинергической синаптической передачи, приводило к их исчезновению уже через 5 мин протока. Последующая смена раствора, содержащего блокатор передачи импульсов, 4 блокатора ионных

каналов и лиганды серотониновых метаболитных рецепторов, на раствор нормального состава приводила к появлению спонтанных постсинаптических потенциалов мотонейронов.

В экспериментах **серии III** наблюдали влияние селективного антагониста $5\text{-HT}_{5A}R$ — SB699551 10 мкМ на глимТПСП с предварительной аппликацией 10 мкМ 5-НТ и 10 мкМ MS (табл. 1, рис. 3). Этот протокол был выбран для оценки возможного возвращения синаптической активности после действия 5-НТ на глимТПСП при заблокированных рецепторах $5\text{-HT}_1 \setminus 5\text{-HT}_2$ антагонистом MS.

В первые минуты суперфузии раствором с селективным антагонистом 5-HT_{5A} рецепторов 10 мкМ SB-699551 регистрировали его значительное подавляющее действие на частоту глимТПСП: $-85.3 \pm 7.8\%$ ($m \pm SE$, $n = 3$), с заметным уменьшением числа высокоамплитудных событий в одном мотонейроне от 0.38 c^{-1} до 0.02 c^{-1} и их исчезновением в двух других. При дальнейшей суперфузии этим раствором отрицательная модуляция сменялась положительной, что видно на регистрациях миниатюрной активности мотонейрона через 15 мин (рис. 3а, регистрации 7 и 8).

В семи экспериментах **серии IV**, без предварительной аппликации MS, как и в серии I, вводили

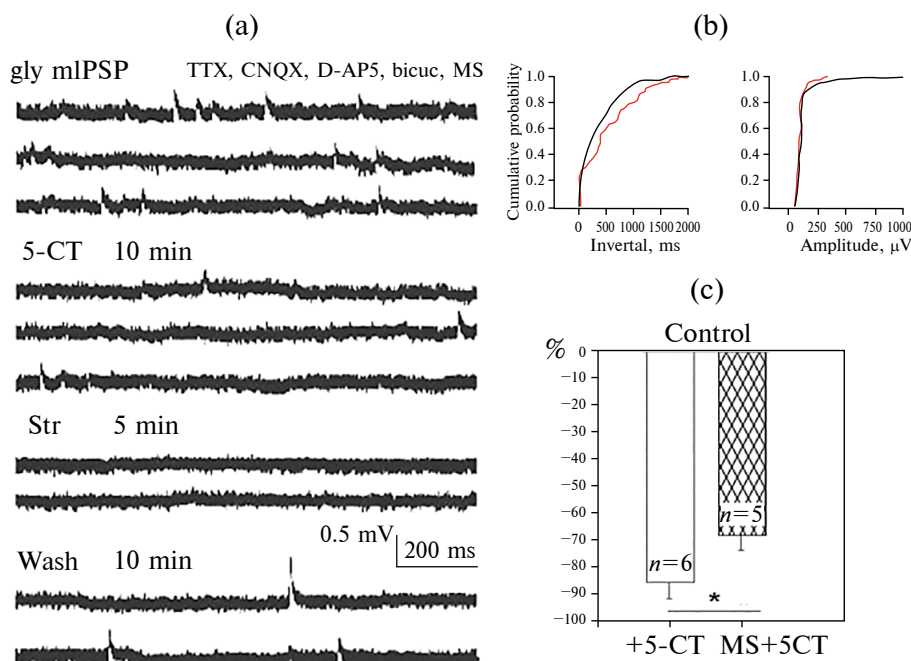


Рис. 2. Действие 5-СТ (10 мкМ) на глимТПСП при дополнительном введении в суперфузирующий раствор антагониста $5\text{-HT}_{1,2}$ рецепторов метисергида (MS) (10 мкМ) (экспериментальная **серия II**). (а) — регистрации глимТПСП в одном из пяти мотонейронов. В растворе с 5-СТ наблюдается уменьшение числа глимТПСП, которые блокируются при последующем введении в раствор стрихнина (Str). Отмыв препарата раствором нормального состава приводит к появлению спонтанной синаптической активности мотонейрона. (б) — распределение вероятностей встречаемости различных интервалов частоты и амплитуды глимТПСП мотонейрона до- (Контроль-черная линия) и при действии 5-СТ (10 мкМ) (красная линия) в условиях присутствия метисергида в суперфузирующем растворе. (с) — сравнение действия 5-СТ (10 мкМ) в экспериментах без присутствия в растворе метисергида и с метисергидом показывает достоверное различие в подавлении частоты глимТПСП в поясничных мотонейронах ($p < 0.05$, непарный критерий t — Стьюдента).

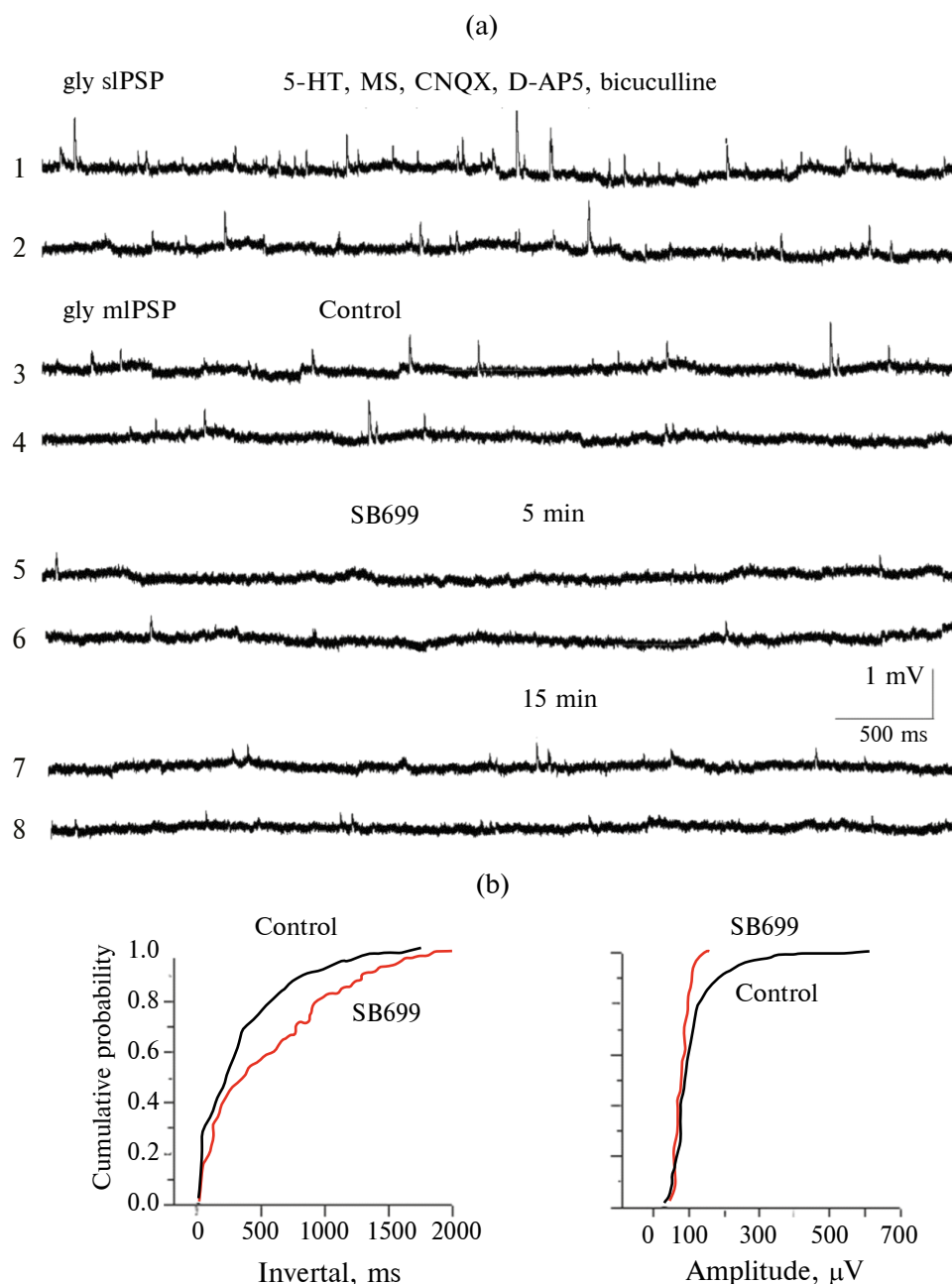


Рис. 3. Действие SB-699551, антагониста 5-HT_{5A} рецепторов, на глимТПСР мотонейрона при суперфузии раствором без 5-СТ, содержащим 5-НТ (10 мкМ) и метисергид (экспериментальная серия III). (а) — фрагменты регистраций в мотонейроне: 1, 2 — бурной спонтанной глициновой активности; 3, 4 — глимТПСР после добавления в раствор ТТх — контроль; 5–8 — глимТПСР при действии аппликации SB-699551 — в первые 5 мин и через 15 мин. (б) — распределения вероятностей встречаемости различных интервалов частоты и амплитуды глимТПСР в контроле (черная линия) и через 5 мин действия антагониста SB-699551 (красная линия).

5-СТ, но в концентрации на порядок меньшей — 1 мкМ. По сравнению с результатом экспериментов **серии I**, это приводило к меньшему снижению частоты событий глимТПСР ($-48.6 \pm 8.0\%$, $m \pm SE$) (рис. 4).

Высокоамплитудные события присутствовали во всех 7 случаях, что видно на записи регистраций глимТПСР и отражено на графике накопленных вероятностей частоты и амплитуды событий. При

последующей аппликации в раствор антагониста 5-HT_{5A} рецепторов SB-699551 в пяти экспериментах частота глимТПСР вырастала (от 10 до 112%) относительно значений уменьшенной частоты глимТПСР под действием 5-СТ (рис. 4а, 5). Действие антагониста 5-HT_{5A} рецепторов SB-699551, увеличивающее частоту глимТПСР мотонейронов в этой серии экспериментов, в среднем составило 41.0 ± 16.4 ($m \pm SE$).

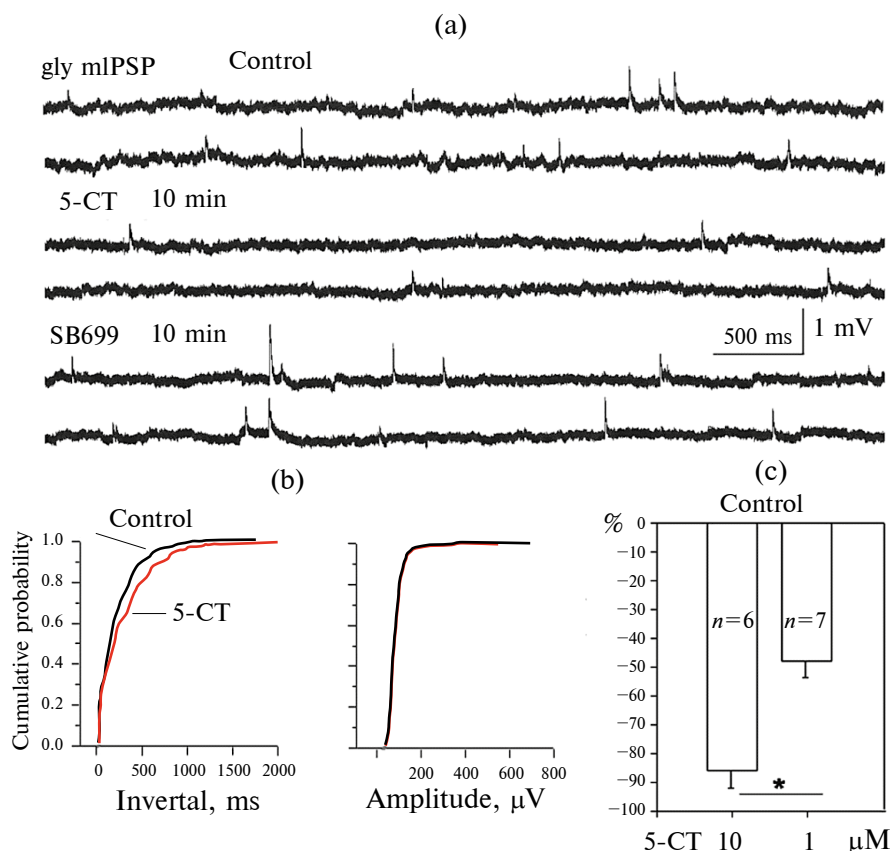


Рис. 4. Действие 5-СТ и введенного в раствор антагониста 5-НТ_{5A} рецепторов SB-699551 на глимТПСР (экспериментальная серия IV). (а) — 5-СТ в малой концентрации (1 мкМ) также подавляет частоту глимТПСР с незначительным влиянием на амплитуду глимТПСР, а антагонист 5-НТ_{5A} рецепторов восстанавливает тормозную активность (две нижние записи глимТПСР). (б) — распределение вероятностей встречаемости различных интервалов частоты и амплитуды глимТПСР в контроле (черная линия) и через 10 мин введения в раствор 5-СТ гистограмма (красная линия). (с) — снижение частоты глимТПСР при действии агониста серотониновых рецепторов 5-СТ в концентрациях 10 и 1 мкМ ($n = 6$ и 7 соответственно) с достоверным различием эффектов ($p < 0.05$, непарный критерий t –Стьюдента).

Иммуногистохимия

Результаты иммуногистохимического исследования серотониновой иннервации в спинном мозге лягушки получены на 16 животных обоего пола. С помощью иммуофлуоресцентного метода выявлены серотониниммунореактивные нейроны озерной лягушки: 5-НТ+ ir супраспинальные нейроны ядра шва продолговатого мозга и интраспинальные 5-НТ+ ir нейроны спинного мозга (ISN). На горизонтальных срезах дна ромбовидной ямки продолговатого мозга вдоль медиальной линии видны 2 ряда мелких 5-НТ+ ir нейронов (рис. 6а, б). Они окружены многочисленными 5-НТ+ ir терминальными ветвлениями. Латеральнее располагаются крупные нейроны гигантоклеточного ретикулярного ядра, имеющие PV+ir и 5-НТ⁻ir (рис. 6а, с). Все 5-НТ+ ir структуры в продолговатом мозгу были также PV⁻ir.

Интраспинальные серотониновые нейроны (ISN) обнаружены в вентромедиальной области серого вещества спинного мозга (рис. 6д – л). Они расположены вентральнее центрального канала на

100–200 мкм и латерально от медиальной линии на 50–200 мкм. Число ISN в ростокаудальном направлении мозга варьирует. В цервикальном сегменте III – единичные нейроны, в сегментах грудного отдела (IV–VII сегменты) они встречаются часто, в 1 мм протяженности мозга в ростокаудальном направлении до сотни. Они располагаются в горизонтальном срезе мозга в виде 2х цепочек по обе стороны медиальной линии мозга без строгой симметрии (рис. 6д). Зачастую можно видеть тесно расположенные несколько клеток, есть удаленные друг от друга до 100 мкм.

В поясничном утолщении на 1 мм длины сегментов их насчитывается меньше, от 10 до 30 (рис. 6h). Как и супраспинальные 5-НТ+ ir нейроны ядер шва, ISN не имеют положительного сигнала парвальбумина (PV⁻ir) (рис. 6g). Это мелкие округлые клетки, средний диаметр сомы которых составляет 18.2 ± 3.07 мкм ($n = 90$) (рис. 6f). Крупное ядро с хорошо различимым ядрышком занимает большую часть сомы ISN (рис. 6i). На тонких поперечных срезах мозга толщиной 14 мкм видны

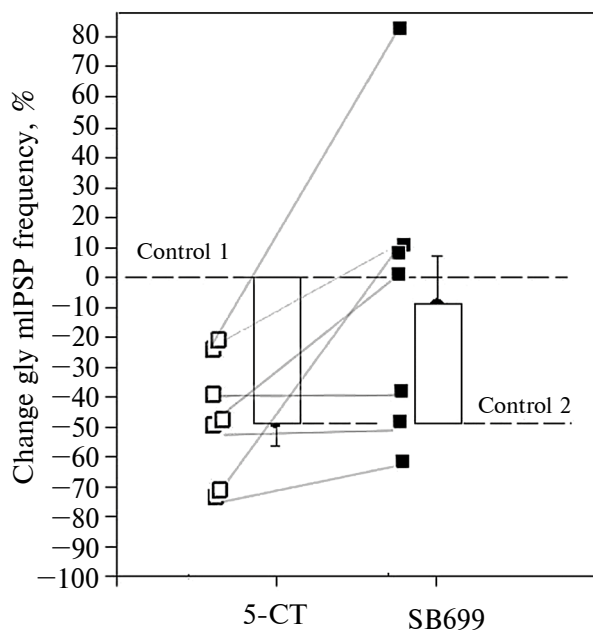


Рис. 5. Гистограммы, представляющие действие лигандов серотониновых рецепторов на частоту или мПСП (Контроль 1) семи мотонейронов. Агонист 5-HT_{5A}рецепторов 5-CT в концентрации (1 мкМ) уменьшает частоту в среднем на $-48.6 \pm 8.0\%$ (Контроль 2), антагонист 5-HT_{5A} рецепторов SB-699551 восстанавливает частоту событий в среднем на $41.0 \pm 16.4\%$ ($m \pm SE$).

иногда 1–2 дендрита. На срезах мозга разной ориентации толщиной 40–50 мкм, можно видеть их мультиполярными с 4–5 первичными дендритами, отходящими от сомы в разных направлениях и делящихся на ветви высших порядков (рис. 6j, k). Идентифицировать аксон с его терминальными разветвлениями было затруднительно или не представлялось возможным. Следует отметить, что сома и проксимальные дендриты ISN окружены многочисленными 5-HT+ иг волокнами и утолщениями (рис. 6g, j, k).

Серотониновые терминальные ветвления обильно пронизывают спинной мозг (рис. 7).

На фронтальных срезах поясничного отдела легко выделяются области с преобладающей серотониновой иннервацией: в перимедулярном сплетении и в области вентральной комиссуры (рис. 7b, c). На препаратах с поясничными мотонейронами, выявленными внутриклеточной инъекцией нейробиотина и реакцией Ni-DAB, прослеживаются тонкие дистальные дендриты мотонейронов в этих областях (рис. 7d). На препаратах с двойным флуоресцентным иммуномечением 5-HT+ иг ветвлений и маркированных мотонейронов видно распределение серотониновых терминалей в моторном ядре вдоль профилей сом (рис. 7e, f). На сомах и проксимальных дендритах мотонейронов 5-HT+ иг бугорки встречаются с разной частотой (рис. 7e – h). Отмечаются возможные контакты серотониновых волокон с вентромедиальными дендритами

(рис. 7i), направленными к центральному каналу, реже с дендритами, идущими в латеральном канатике. Обнаружено, что контакты утолщений серотониновых волокон с мотонейронами возможны с высокой степенью вероятности в области перимедулярного плексуса, самой богатой области ветвления серотониновых окончаний. Сюда вступают, идут вдоль поверхности мозга, извиваясь и переплетаясь, тончайшие дистальные дендриты мотонейронов (рис. 7j).

Так как у низших позвоночных животных документирована экспрессия 5-HT_{5A}R [21, 25, 26], а присутствие 5-HT_{5A}R в спинальных мотонейронах показано у крыс, мышей [6, 7], мы применили кроличье поликлональное антитело 5-HT_{5A}R в экспериментах с двойным флуоресцентным иммуномечением на препаратах с моноклональным антителом к кальцийсвязывающему белку парвальбумину (PV) и с ретро- или anterogradно маркированными мотонейронами. Это пробное применение поликлонального антитела для 5-HT_{5A}R без предварительной расшифровки аминокислотной последовательности протеина у озерной лягушки, без использования животных с нокаутом гена 5-HT_{5A}R. Сигнал флуоресценции в срезах мозга лягушки будет обозначен как положительный 5-HT_{5A}Rlike+ сигнал.

На фронтальных срезах поясничного утолщения с двойным иммуномечением, к 5-HT_{5A}R и PV, сигнал 5-HT_{5A}Rlike+ обнаружен в срезах с большей яркостью в белом веществе. Заметная флуоресценция видна в миелине волокон, идущих в белом веществе дорсальных и вентральных канатиков (рис. 8).

Совмещенное изображение 2х сигналов иммунореактивностей четко представляет PV + иг аксоплазму волокон, окруженную кольцами миелина с ярким 5-HT_{5A}Rlike+сигналом.

На меченных биоцитином телах мотонейронов выявлен положительный 5-HT_{5A}Rlike+ сигнал в виде точек (рис. 9a – c).

На дорсально направленных дендритах мотонейронов также можно различить в виде точек или зерен 5-HT_{5A}Rlike+ сигналы (рис. 9g, h, i), которые присутствуют и в нейропиле. Яркие, контрастные 5-HT_{5A}Rlike+ сигналы обнаружены после ретроградного мечения мотонейронов биоцитином с длительной антидромной стимуляцией вентрального корешка во время аппликации. Они отмечены стрелками на рис. 9a, d. Яркий сигнал виден в вентральном канатике в миелиновых оболочках аксонов мотонейронов на всем пути до их выхода из мозга. Кроме того, в отдельных волокнах медиального канатика заметно выделяются миелиновые колечки с красным 5-HT_{5A}Rlike+ сигналом.

Неожиданно яркая флуоресценция видна в дорсальном роге в области входа афферентов в мозг,

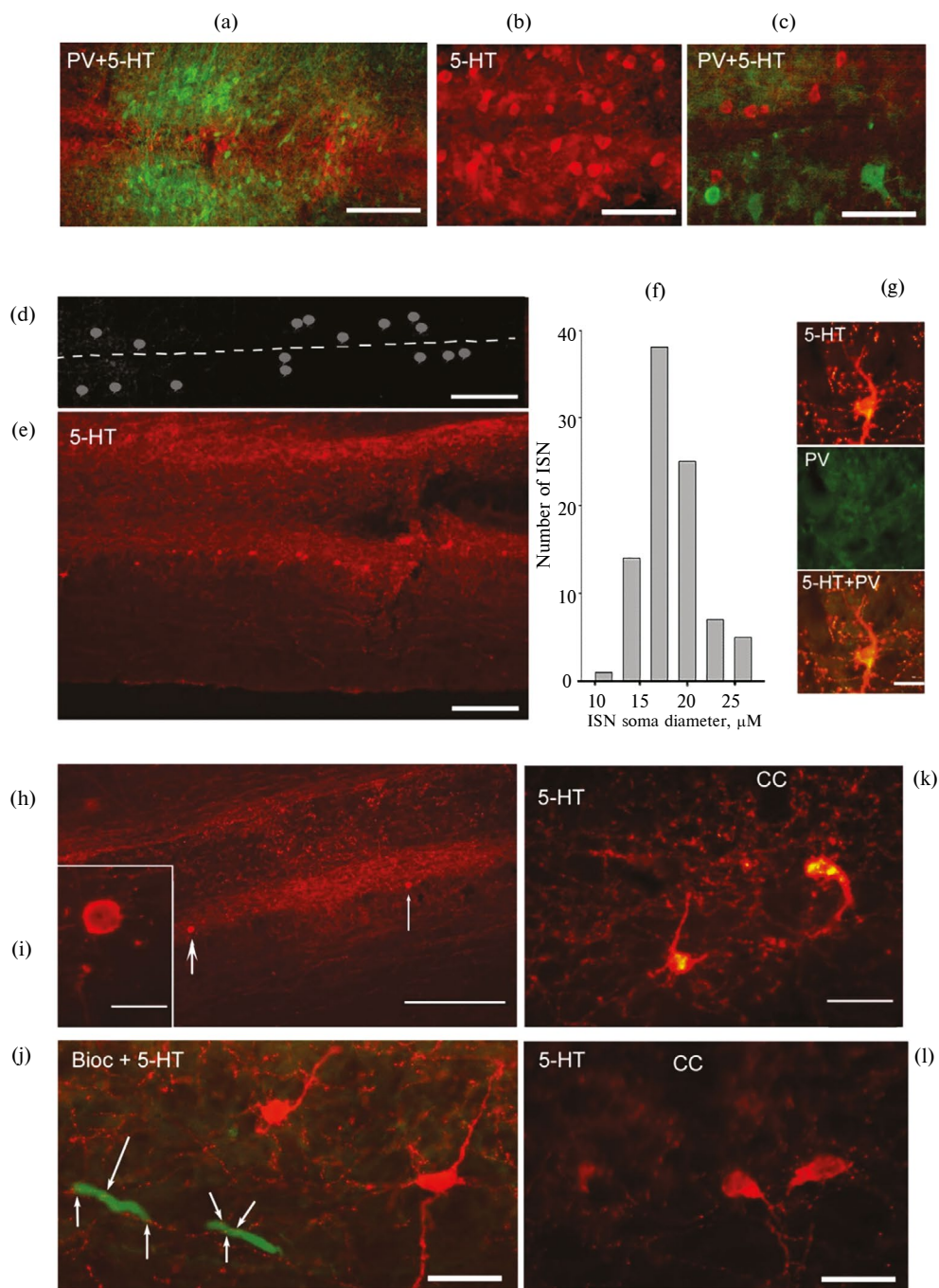


Рис. 6. Серотониниммунореактивные (5-HT+ir) нейроны в продолговатом и спинном мозге лягушки *Rana ridibunda*: (a – c) – три горизонтальных среза продолговатого мозга с двойным иммуномечением к 5-HT (красный) и к PV (зеленый), представляющие расположение и сравнительные размеры 5-HT+ir нейронов и нейронов ретикулярного ядра парвальбуминиммунореактивных (PV+ir) без иммунореактивности к серотонину (5-HT – ir); (d) – схема-пример расположения интраспинальных серотониновых нейронов (ISN) в одном из горизонтальных срезов грудного отдела спинного мозга (горизонтальный план); (e) – сагиттальный срез грудного отдела спинного мозга с цепочкой часто повторяющихся ISN; (f) – гистограмма среднего диаметра сом ISN в грудных и поясничных сегментах; (g) – вентромедиальный участок фронтального среза поясничного сегмента с ISN, имеющим ветвящиеся дорсальный и вентральный дендриты. Множество 5-HT+ir терминалей окружают нейрон. Как и супраспинальные серотониновые нейроны, ISN не имеет сигнала иммунореактивности к PV (PV-ir); (h) – расположение ISN в сагиттальном срезе поясничного утолщения (2 стрелки указывают на тела ISN); (i) – изображение одного из ISN (жирная стрелка на рис. 6h) с хорошо различимыми крупным ядром и ядрышком; (j) – расположения двух ISN в сагиттальном срезе поясничного утолщения и фрагменты идущих рядом дендритов мотонейрона, меченого биоцитином (зеленый цвет). Стрелками отмечены возможные контакты 5-HT+ir терминалей с дендритами мотонейрона; (k, l) – расположения нескольких ISN на фронтальных срезах поясничного сегмента толщиной 14 и 40 мкм: по одному нейрону в половинах мозга или по два в одной и третьим в другой половине (cc – canalalis centralis). Масштаб: (a), (d), (e), (h) – 200 мкм; (b), (c) – 100 мкм; (j), (k), (l) – 40 мкм; (i) – 30 мкм; (g) – 20 мкм.

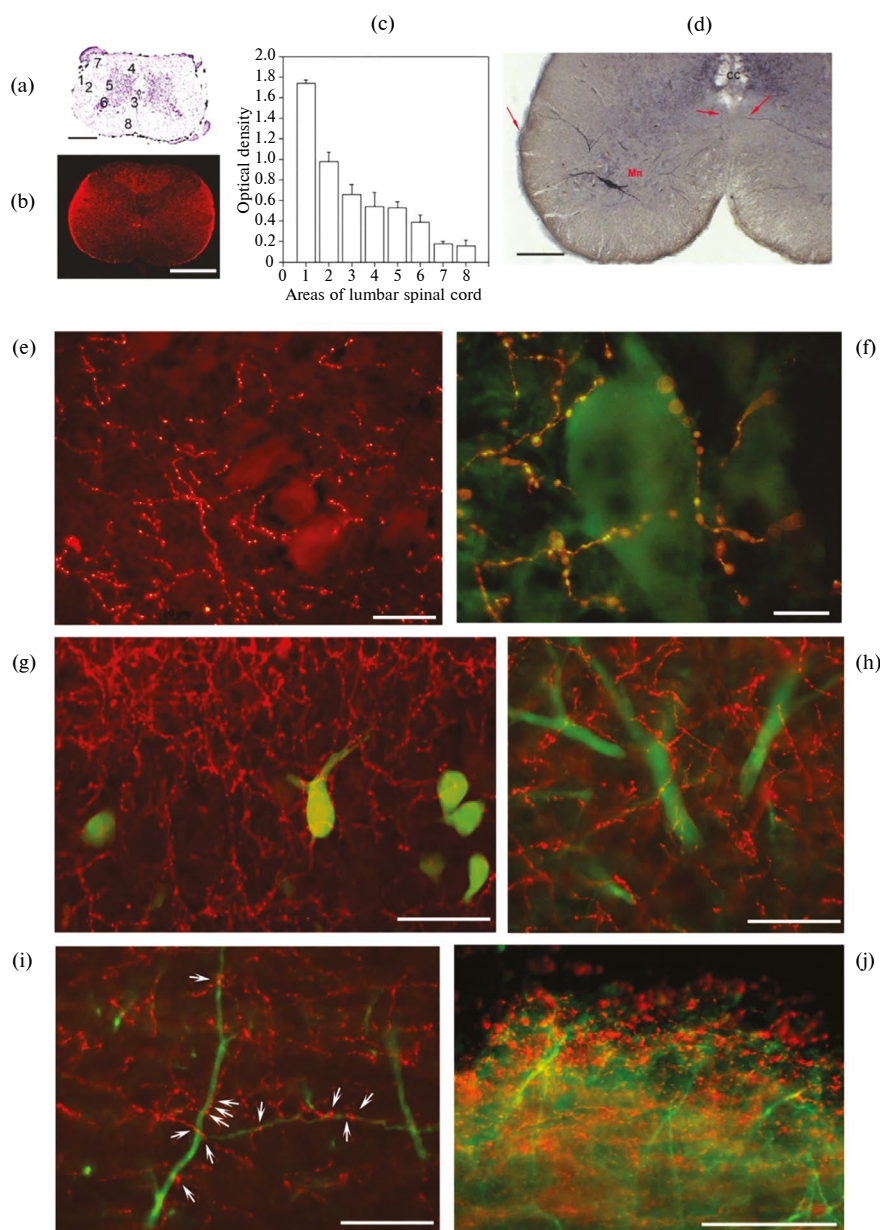


Рис. 7. Распределение серотониниммунореактивных элементов в поясничных сегментах и возможные контакты 5-HT+ir терминалей с мотонейронами, меченными внутриклеточно инъекцией нейробиотина или аппликацией маркеров на вентральный корешок: (a) – фронтальный срез поясничного сегмента IX, окрашенный по Нисслю, для сравнительной ориентации участков срезов с 5-HT иммунореакцией (b); (b) – фронтальный срез X поясничного сегмента с 5-HT+ir; (c) – гистограмма интенсивностей (в условных единицах от 0 до 2.0) сигнала 5-HT+ir участков (1–8) поясничного утолщения спинного мозга: 1 – перимедулярное сплетение (маргинальный плексус); 2 – латеральный канатик; 3 – вентральная комиссура; 4 – дорсальный рог; 5 – интермедиальная зона; 6 – моторное ядро; 7 – область входа дорсальнокорешковых волокон; 8 – вентромедиальный канатик; (d) – изображение фрагмента поясничного сегмента IX с мотонейронами, меченными внутриклеточной инъекцией нейробиотина и последующим выявлением DAB реакции. Реконструкция по двум фронтальным серийным срезам. Слева видна сома мотонейрона с проксимальными и дистальными участками его дендритного дерева. Справа от медиальной линии видны дендриты мотонейрона, меченного внутриклеточно в правой половине мозга. Тончайшие дистальные дендриты мотонейрона слева ветвятся в перимедулярном плексусе (область 1 на гистограмме рис. 7c). В вентральной комиссуре (область 3 – на гистограмме), где располагаются ISN, простираются дендриты мотонейронов, регистрируемых в обеих половинах спинного мозга; (e) – редкие 5-HT+ir терминальные ветвления в моторном ядре фронтального тонкого среза мозга поясничного сегмента; (f) – 5-HT+ir ветвления в моторном ядре на фронтальном срезе мозга толщиной 40 мкм другого препарата. Их возможные контакты видны на теле мотонейрона, меченного ретроградно декстран-родомином; (g – j) – участки сагиттальных срезов поясничного утолщения с возможными контактами 5-HT+ir терминальных ветвлений на телах меченых биоцитином мотонейронов (g), проксимальных дендритах (h), дендритах высших порядков (i). Область наивысшей интенсивности 5-HT+ir, перимедулярный плексус (j), пронизана тонкими дистальными дендритами многих мотонейронов, где предполагается высокая вероятность контактов с серотониниммунореактивными синаптическими бутонами. Масштаб: (a), (b) – 500 мкм; (d) – 200 мкм; (g) – 100 мкм; (e), (h – j) – 50 мкм; (f) – 20 мкм.

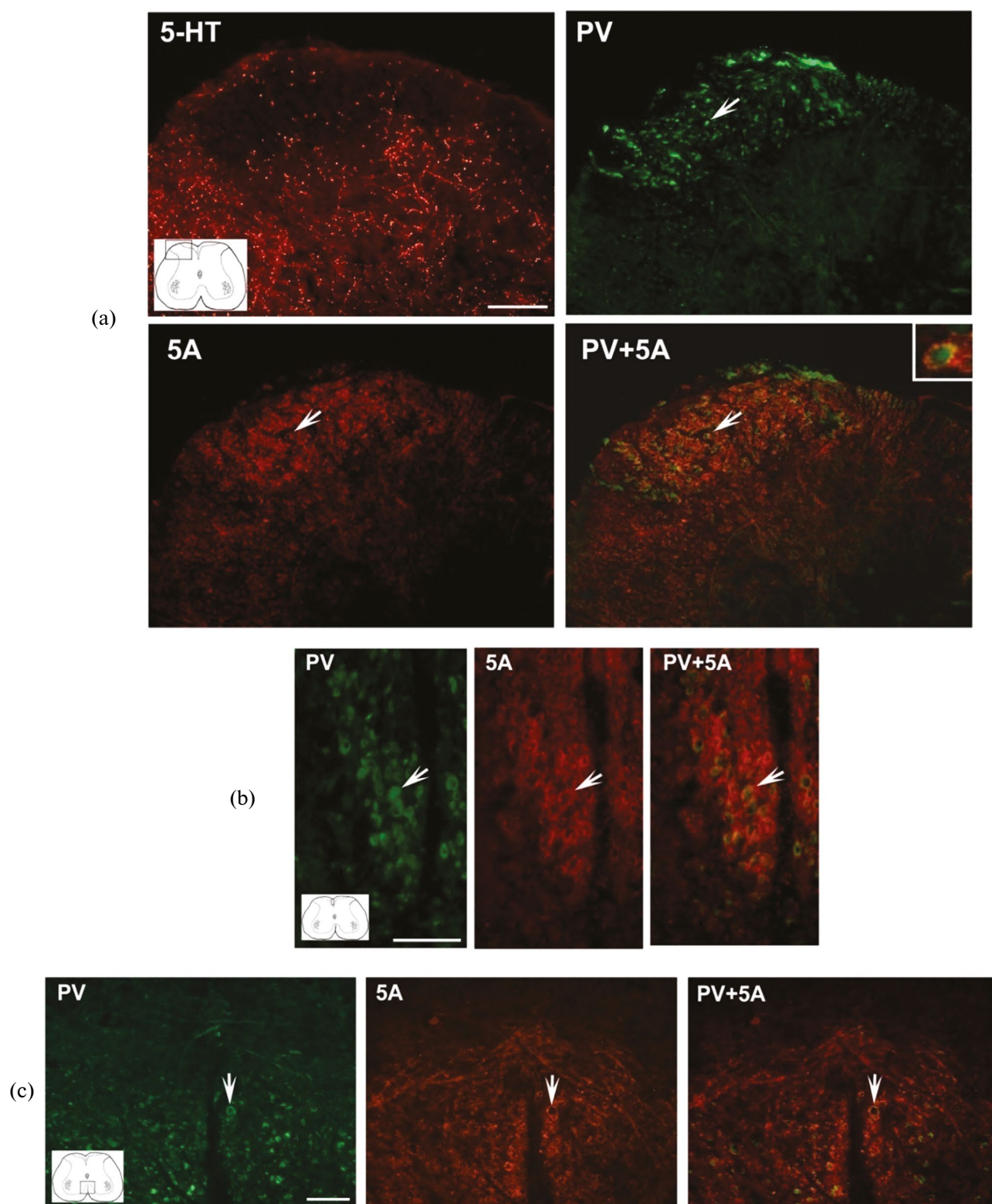


Рис. 8. Обнаружение 5-НТ_{5A}Rlike+ сигнала иммунореактивности в поясничном утолщении спинного мозга лягушки (области срезов представлены на схемах): (а) — область входа волокон дорсального корешка в спинной мозг, где мало терминалей с 5-НТ+ ir, но видны отчетливые профили PV+ ir афферентных волокон (зеленый цвет) и повышенная интенсивность 5-НТ_{5A}Rlike+ сигнала (красный). Стрелки указывают на сечение аксоплазмы одного из крупных афферентов с PV+ ir (зеленый цвет), на сечение его миелиновой оболочки в виде кольца (красное) и на колокализацию двух изображений со вставкой увеличенного изображения профиля аксона; (б, в) — композиции изображений медиальной области дорсального канатика (б) и медиальной области вентрального канатика (в) также представляют присутствие 5-НТ_{5A}Rlike+ сигнала в миелине волокон с PV+ ir (указано стрелками). Масштаб — 50 мкм.

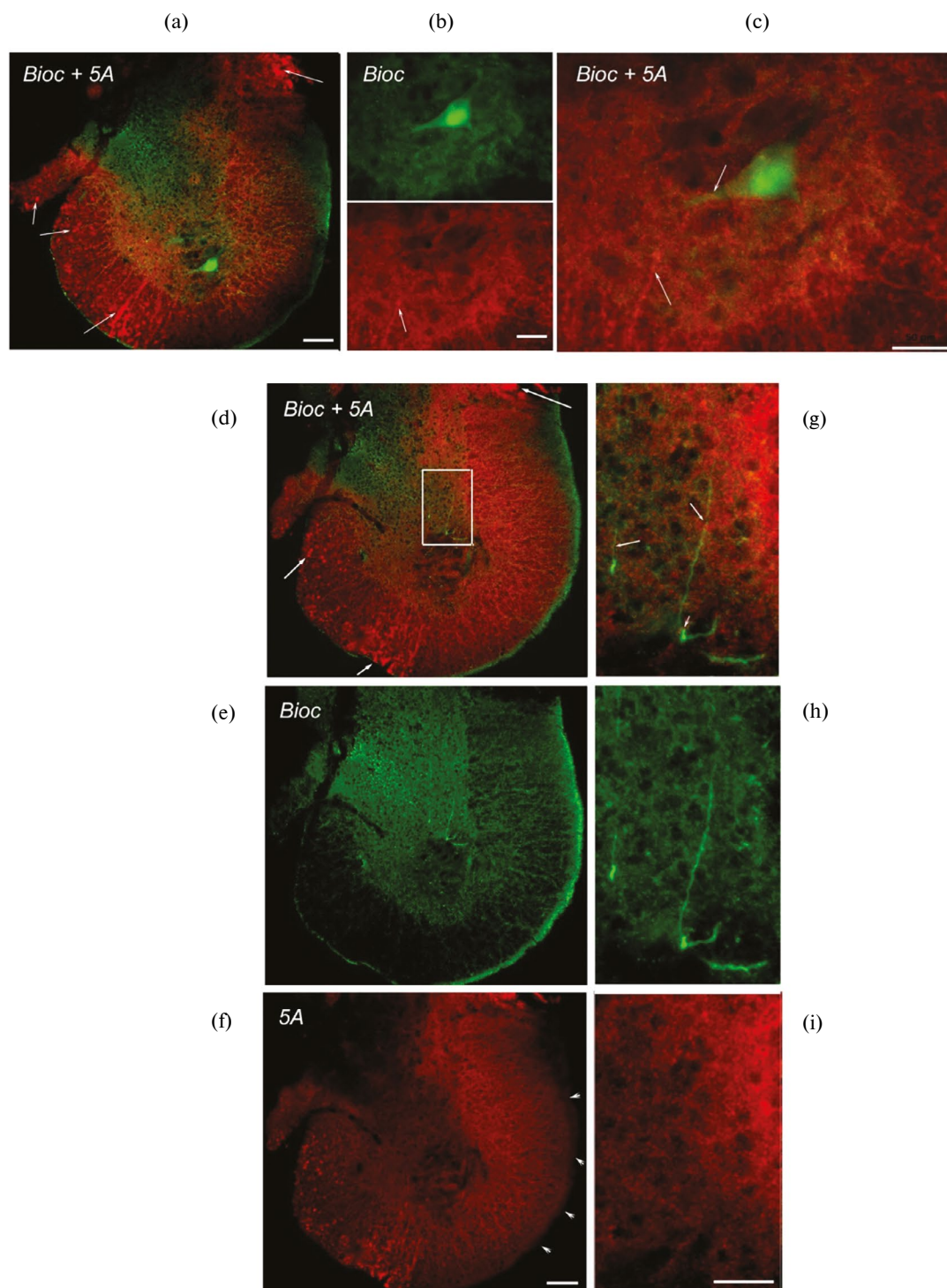


Рис. 9. Ретроградно меченные биоцитином мотонейроны поясничных сегментов и 5-HT_{SA}Rlike+ иммунореактивность на фронтальных срезах поясничного сегмента X: (a) — фронтальный срез мозга при малом увеличении объектива с двумя сигналами флуоресценции: меченного биоцитином мотонейрона (зеленый) и 5-HT_{SA}Rlike+ сигнала (красный) в нейропиле. Яркий контрастный 5-HT_{SA}Rlike+ сигнал (стрелки) виден в виде колец в медиальном канатике, в виде пятен, колец, полосок — в области входа афферентных волокон в дорсальный рог, в вентральном канатике по ходу моторных аксонов; (b) — отдельные изображения участка с флуоресцирующим маркированным мотонейроном и 5-HT_{SA}Rlike+ флуоресценцией; (c) — на совмещенном изображении видно присутствие 5-HT_{SA}Rlike+ сигнала в виде зерен на соме и первичном вентральном дендрите мотонейрона (стрелка), в вентральной части серого вещества с яркой полоской миелиновой оболочки аксона мотонейрона; (d – i) — композиция изображений другого среза с выделенной областью (g, h, i) дорсально направленных дендритов меченного мотонейрона. На совмещенном изображении (g) можно видеть 5-HT_{SA}Rlike+ сигнал в виде зерен на тонких дендритах мотонейрона (стрелки). В перимедулярном сплетении 5-HT_{SA}Rlike+ сигнал отсутствует (f – малые стрелочки). Масштаб: (a), (d), (e), (f) — 100 мкм; (b), (c), (g), (h), (i) — 50 мкм.

сходная по яркости с таковой миелина моторных аксонов (рис. 9а, d, f). Ширина светящихся полос, пятен миелина с 5-HT_{5A}Rlike+ сигналом в дорсальном роге, (плоскость среза совпадает с траекторией входящих афферентов) достигает 10–15 мкм, что соответствует диаметру крупных дорсальнокорешковых волокон, входящих в спинной мозг лягушки.

Не обнаружено структур, имеющих 5-HT_{5A}Rlike+ сигнал, с характерной формой астроцитов, детально описанных ранее в спинном мозге бесхвостых амфибий, [27, 28] и выявленных нами на гистологических препаратах с серебрением спинного мозга *Rana ridibunda*. Нет положительной 5-HT_{5A}Rlike+ флуоресценции в богатом астроцитарными отростками перимедулярном сплетении (рис. 9f), хотя в этой области нами показаны многочисленные переплетения дистальных дендритов меченых мотонейронов и самая высокая плотность 5-HT+ ir терминальных ветвлений серотониновых волокон. (рис. 7b, c, j).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Электрофизиологические эксперименты

Рецептор 5-HT_{5A}, для которого пока не существует селективных агонистов, остается наименее изученным рецептором серотонина [29, 30]. Данные нашего комбинированного исследования присутствия и функции 5-HT_{5A} рецепторов в спинном мозге бесхвостых амфибий получены впервые, можно сделать выводы об их эволюционном значении.

Мы применили лиганды серотониновых рецепторов, 5-СТ для активации 5-HT_{5A}R и для их блокирования -SB-69955. 5-СТ — известный агонист серотониновых рецепторов, который несмотря на то, что он имеет аффинность к другим типам 5-HT рецепторов, и в настоящее время успешно служит инструментом для расшифровки структуры 5-HT_{5A}R [30]. SB-699551, коммерческий антагонист 5-HT_{5A}R широко используется для исследования его функции при многих неврологических расстройствах, включая боль [11, 14–16].

В нашей работе электрофизиологические эксперименты с фармакологическими тестами в серии I в первые 5 минут аппликации 10 мкМ агониста 5-СТ в суперфузирующий раствор показали быстрое уменьшение частоты глимТПСР поясничных мотонейронов и через 20–30 минут полное исчезновение высокоамплитудных миниатюрных потенциалов, свидетельствующее о действии агониста на **пре- и постсинаптические** 5-HT_{5A} рецепторы. По литературным данным у крыс 5-HT_{5A} рецепторы присутствуют в дорсальном роге и в мотонейронах спинного мозга [6, 7], но столь быстрый и значительный эффект агониста возможно

вызван кооперативным действием 5-СТ на другие 5-HT рецепторы. 5-СТ проявляет разную селективность для Gi/o-связанных серотониновых рецепторов: высока аффинность к 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} и 5-HT_{1D} (pKi = 7.9–8.1) и относительно слабая к 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, а также к 5-HT_{5A} (pKi = 5.4–7.0) [30]. В работе Калининой с соавт. показано подавляющее пресинаптическое действие 5-HT_{1B/D} рецепторов на глим ТПСР поясничных мотонейронов спинного мозга лягушки [31]. На основании результатов этого исследования были проведены исследования с блокированием этих рецепторов.

Вторая серия (II) экспериментов с предварительным введением в раствор метисергида, смешанного антагониста 5-HT_{1,2} рецепторов, и последующей аппликации такой же концентрации 5-СТ дала не столь мощное подавление частоты глимТПСР по сравнению с результатом первой серии (86% и 67%). Значительное подавление частоты высокоамплитудных событий отмечалось вновь, в 5 раз по сравнению с контрольным значением, а уменьшением их амплитуды, в среднем на 20%.

Сравнение действия агониста серотониновых рецепторов 5-СТ в экспериментах серий I (без метисергида в растворе) и II (с метисергидом) на частоту событий показало статистически значимое различие средних величин при блокировании 5-HT₁, что может являться свидетельством **пресинаптического** механизма подавления глимТПСР поясничных мотонейронов именно 5-HT_{5A} рецепторами (рис. 2в). Относительно исчезновения высокоамплитудных глимТПСР или уменьшения их амплитуды можно предположить участие **постсинаптических** 5-HT_{5A} рецепторов.

Аппликацию высокоселективного антагониста 5-HT_{5A} рецептора, SB-699551, мы проводили для предварительной проверки возможности его применения в экспериментах, так как при разработке химического зонда для исследования функции 5-HT_{5A} рецептора при неврологических расстройствах, включающих боль, Капланом с сотрудниками были отмечены существенные сложности молекулы SB-699551 [29]. В наших трех опытах без введения в раствор 5-СТ вектор действия SB-699551 (10 мкМ) на глимТПСР поясничных мотонейронов, регистрируемых в растворе с 5-HT, был время зависимым (серия III): в первые 5 минут после аппликации антагониста наблюдали резкое сокращение числа событий, но через 15–20 минут предполагаемая для него функция блокирования подавляющего действия 5-HT_{5A} рецепторов на глимТПСР мотонейронов появлялась. Обнаруженные нами, а также Калининой и Веселкиным [32] свидетельства физиологической (функциональной) активности применяемого антагониста 5-HT_{5A} рецептора в препарате спинного мозга

лягушки подтвердили возможность его использования в следующей серии экспериментов (IV). На порядок уменьшение концентрации 5-СТ в серии IV по сравнению с концентрацией агониста в серии I привело к меньшему подавлению частоты глимТПСП ($85.7 \pm 5.5\%$ и $-48.6 \pm 8.0\%$) и без значимого изменения их средней амплитуды. Последующая аппликация в раствор антагониста 5-НТ_{5A}R, SB-69955, увеличивала частоту глимТПСП в среднем на $41.0 \pm 16.4\%$, что также может указывать на участие **пресинаптических** 5-НТ_{5A}R в торможении глимТПСП.

Таким образом, эксперименты с 10 мкМ 5-СТ в растворе свидетельствуют о пре- и постсинаптическом участии 5-НТ_{5A}R в подавлении глимТПСП мотонейронов, а меньшая концентрация агониста с последующим введением антагониста SB-69955 о пресинаптическом участии 5-НТ_{5A}R в модуляции глициновых миниатюрных событий.

Обсуждения требует временная зависимость действия лигандов на глимТПСП. Уже в первые минуты суперфузии срезов мозга раствором с 10 мкМ агониста или антагониста 5-НТ_{5A}R регистрируются эффекты. Наблюдаемые эффекты одной направленности. Если действие агониста сразу оказывается подавляющим глимТПСП, что не противоречит предполагаемым механизмам его действия, то также подавляющая функция антагониста в начальный период действия остается тайной. Ранее обнаружена гетерологичная десенсибилизация другого серотонинового рецептора человека, 5-НТ₇ [33]. Она вызывается стимуляцией как агонистом, так и антагонистом 5-НТ₇R. Подобных сведений для НТ_{5A}R не имеется. Более того, при анализе фармакологических средств и биологических реакций, чувствительных к фармакологическим обратным агонистам/антагонистам некоторые серотониновые рецепторы, 5-НТ_{5A}R в том числе, не рассматривали, так как их молекулярная фармакология *in vitro* в системе коэкспрессии неясна [34].

Ожидаемые эффекты антагониста НТ_{5A}R появляются позже, через 15–20 минут его аппликации в раствор: увеличение частоты глициновых миниатюрных событий. Относительно быстрого начального действия обоих лигандов на миниатюрную активность мотонейронов можно предположить, что оно возможно осуществляется в поверхностных структурах мозга лягушки — в перимедулярном сплетении. В этой области, где множество обильных дистальных ветвлений дендритного дерева мотонейронов, а по литературным данным имеются и классические синаптические контакты на тончайших дендритах [35], вполне вероятно пре- и постсинаптическое участие 5-НТ_{5A} рецепторов в модуляции глимТПСП мотонейронов. Такое предположение было выдвинуто нами по завершению серий фармакологических тестов

и выполнению первых иммуногистохимических экспериментов.

Иммуногистохимия

К настоящему времени накопилось большое число исследований серотониновой иннервации спинного мозга земноводных (Urodella, Anurae). Трейсерные методы, флуоресцентная гистохимия, применение антител к серотонину выявили распределение серотониновой иннервации в спинном мозге *Rana catesbiana*, *R. pipiens*, *Xenopus laevis* [36]. Однако на рисунках-схемах расположения и плотности серотониновых ветвлений в спинном мозге обнаруживаются различия. Места обитания земноводных животных, питание, размножение различны. Это приводит к разнообразным адаптационным приспособлениям особей разных видов, в том числе бесхвостых земноводных. Адаптации связаны с изменениями электрических характеристик нейронов, связей и их модуляций. Проведенное нами флуоресцентное иммуногистохимическое исследование распределения 5-НТ+ir элементов в спинном мозге озерной лягушки выявило картину, отражающую возможное интенсивное 5-НТ влияние на функционирование нервных цепей, составляющих центральные паттерн генераторы (CPG) и на активность мотонейронов.

Нами показаны источники серотонина не только супраспинальные, 5-НТ+ir нейроны ядер шва, но и интраспинальные 5-НТ+ir нейроны (ISN). Их значительное число располагается в торакальных сегментах, меньшее — в поясничном утолщении, как и у иглистого тритона *Pleurodeles waltl* [37]. На основании распределения ISN в спинном мозге тритона, авторы сделали вывод, что их высокая плотность в торакальном отделе не коррелирует с появлением конечностей, т. е. ISN тритона участвуют в модуляции сокращения туловищных мышц (axial CPGs). По нашим данным у озерной лягушки *R. ridibunda* на одном срезе области вентральной комиссуры поясничного отдела ISN встречаются по два, имеют разветвленные отростки в вентромедиальной области спинного мозга. Эта область пронизана дендритами и аксонами поясничных мотонейронов, маркированных хлоридом кобальта, пероксидазой хрена, нейробиотином или биоцитином [38–40]. Однако контакты немаркированных ISN с мотонейронами или интернейронами в нашей работе идентифицировать не представлялось возможным.

Схема распределения терминальных полей нервных волокон, содержащих индоламин и выявленных с помощью флуоресцентной иммуногистохимии в поясничном сегменте спинного мозга лягушки *R. pipiens*, приведена Соллером [41]. Его сравнительная оценка уровня интенсивности

флуоресценции представлена в пределах относительных значений 0–4. Мы, используя реактив фирмы Immunostar (anti-5-НТ) и применяя программу ImageJ для анализа и оценки яркости флуоресценции, получили данные о более контрастных её градациях в поясничном отделе спинного мозга *R. ridibunda*. Например, измерен в 10 раз более яркий сигнал в латеральном перимедулярном сплетении по сравнению с сигналом в вентромедиальном канатике и в 4 раза — с сигналом области моторного ядра (рис. 7b, c). Высоковероятной зоной контактов 5-НТ+ir волокон с поясничными мотонейронами, с их тончайшими дистальными дендритами, может являться перимедулярное сплетение (рис. 7j). Эту область спинного мозга *R. esculenta* изучал Антал с соавт., реконструировал классические синаптические контакты неидентифицированных терминалей с дендритами меченых мотонейронов по серийным ультратонким срезам [35]. Кроме возможных контактов 5-НТ+ir волокон с дистальными участками в перимедулярном сплетении мозга *R. ridibunda* 5-НТ+ir утолщения или бутоны видны на телах мотонейронов, проксимальных дендритах и дендритах высших порядков ветвления в латеральном и вентральном канатике (рис. 7). По нашим наблюдениям присутствие утолщений 5-НТ волокон на соматической мембране разных мотонейронов неравномерно: у одних — редкие или почти их нет, другие окружены их цепочками.

Детальные трехмерные реконструкции расположения серотониновых бутонов на идентифицированных мотонейронах шейных мышц кошки были выполнены Монтанж и Маратта [42, 43]. Среднее число 5-НТ контактов на мотонейроне экстензора составляло 1586 при общей средней длине дендритов 87 мм (87296 мкм) и площади мембраны мотонейронов 0,5 мм² (529002 мкм²) [42]. Позже Маратта на трехмерных реконструкциях мотонейронов шейной мышцы флексора привел меньшее среднее число 5-НТ контактов — 793 при средней общей длине дендритов 74 мм (74.005 мкм), а площади мембраны мотонейронов также около 0,5 мм² (541921 мкм²) [43]. На удаленных участках дендритного дерева мотонейронов мышцы-флексора кошки (от 1500 до 1750 мкм от сомы) рассчитано большее нормализованное число плотности контактов — 1.5 по сравнению с зонами в радиусе до 250 мкм от сомы — 0.93. Наши трехмерные реконструкции меченых пероксидазой хрена и нейробиотином поясничных мотонейронов лягушки показали подобное значение средней длины дендритов 4-х клеток около 82 мм (81750 мкм), а так как значительная доля дендритных деревьев — тончайшие веточки, то площадь поверхностной мембраны, соответственно, в 2,5 раза меньше около 0,2 мм² (0.1972 мм²) [40]. Число и плотность распре-

деления 5-НТ окончаний на мембране мотонейрона лягушки неизвестно. По результатам нашего иммуногистохимического исследования при высокой флуоресценции 5-НТ ветвлений в области перимедулярного плексуса закономерно предполагать высокую вероятность **постсинаптического** влияния 5-НТ также на дистальных дендритах мотонейронов лягушки. Есть основание предполагать и участие в серотониновой модуляции множества астроцитарных отростков, заполняющих эту область, но никаких данных о 5-НТ рецепторной оснащенности её у амфибий нет.

По литературным данным в сетчатке лягушки показано большое разнообразие различных типов рецепторов серотонина, 5-НТ_{5A} рецептор в том числе, не только в волокнах, нейронах, фоторецепторах, но и в глии [26]. Многочисленность рецепторов дает авторам основание считать, что сетчатка чрезвычайно чувствительна к серотонину: “создается впечатление, что сетчатка устроена так, чтобы “улавливать” каждую высвободившуюся молекулу серотонина”. Селада с соавт. по результатам многих исследований на млекопитающих представляет различное распределение двух других подтипов 5-НТ рецепторов на пирамидном нейроне медиальной префронтальной коры: апикальные дендриты обогащены рецепторами 5-НТ_{2A}, где они могут способствовать входу АМПА, а на аксонном холмике локализуются рецепторы 5-НТ_{1A}, возможно, вместе с ГАМК_A-рецепторами. [44].

Известно, что применение иммуногисто- и цитохимических методов исследования может давать противоречивые результаты на одном животном, в одних и тех же структурах мозга, в зависимости от используемых антител [45]. Важно также отметить, что после работ 2-х групп исследователей распределения 5-НТ_{5A} рецепторов в спинном мозге крысы [6, 7], эти методы не применялись на других позвоночных. Вероятно, и данные о незначительном содержании мРНК рецепторов 5-НТ_{5A} в спинном мозге человека не вдохновляли исследователей на решение задач об участии 5-НТ_{5A} рецептора в модуляции моторного выхода (НРА-2021). На рыбке тилапии с использованием транскриптомики продемонстрировано, что можно собирать мРНК высокого качества из одиночных Маутнеровских нейронов [21]. Было показано, что у этого высокосоциального позвоночного с регулируемым импульсным торможением в слуховой цепи при реакции испуга и убегания среди подмножества подтипов 5НТ рецепторов в латеральном дендрите Маутнеровского нейрона экспрессируется 5-НТ_{5A} рецептор.

В нашей работе применение кроличьих поликлональных антител против 5-НТ_{5A}R не показало положительную иммунореактивность в самой богатой зоне 5-НТ иннервации, перимедулярном

сплетении спинного мозга лягушки (рис. 9a, d, f). Сомы и дендриты меченых биоцитином мотонейронов, которые можно проследить на срезах, имеют редкую в виде точек или зерен 5-HT_{5A}Rlike+ флуоресценцию (рис. 9b — c, g), возможный морфологический субстрат для экспрессии 5-HT_{5A} рецепторов на мотонейронах лягушки и постсинаптического участия в подавлении глимТПСР. Общая 5-HT_{5A}Rlike+ зернистость видна в нейропиле серого и белого вещества, как возможное присутствие в глиальных клетках, со значительным превышением плотности сигнала в белом веществе (рис. 9). Обнаруживается четкий сигнал в отдельных миелиновых кольцах PV+ig волокон в дорсальном роге, дорсомедиальном и вентральном канатике (рис. 8). Полоски и кольца миелина ещё более контрастно и ярко выделяются на препаратах с ретроградным маркированием мотонейронов биоцитином через всасывающий электрод с длительной стимуляцией вентрального корешка. 5-HT_{5A}Rlike+ миелиновые профили видны не только в вентральном канатике, но и в дорсальном роге, в области входа дорсальнокорешковых афферентов в спинной мозг (рис. 9a, d, f).

Возможно, такой способ маркирования мотонейронов выявил результат их опасной стимуляции, включающей цепь обратной связи через возвратные коллатерали мотонейронов. Возвратные коллатерали в спинном мозгу лягушек были выявлены [46], детально прослежены для их трехмерной реконструкции [44, 47, 48]. По возвратным коллатералям сигналы поступают не только росто-каудально в моторную колонну, но и дорсально, в интермедиальную область серого вещества спинного мозга. Показано, что у крыс в этой области расположено множество тормозных глицинергических интернейронов [49]. Тормозные интернейроны V1 и V2b основные участники-компоненты CPG, который координирует активность флексор — экстензор мотонейронов [50].

В электронномикроскопическом исследовании синапсов в спинном мозге лягушки *Rana temporaria* с помощью метода двойной иммунной метки в сочетании с двумя антителами к гамма-аминомасляной кислоте (ГАМК) и глицину показан высокий процент распределения из найденных тормозных синапсов на соммах, дендритах мотонейронов, первичных афферентных аксонах, иммунореактивных к обеим аминокислотам [51]. Экспрессия 5-HT_{5A} рецепторов в этих синапсах могла бы являться структурным базисом **пресинаптического** модулирующего влияния на глимТПСР в поясничных мотонейронах, выявленное нами в фармакологических тестах на срезах-сегментах спинного мозга лягушки.

Присутствие яркого сигнала именно в миелине можно объяснить, обратившись снова к цепям об-

ратной связи активности мотонейронов в спинном мозге. Известно, что по ним не только передаются сигналы о параметрах активности мотонейронов в высшие центры, но и сигналы, вызывающие изменение активности дорсальнокорешковых афферентных волокон в случае опасности или бесполезности совершаемого движения. Модуляция возбудимости может осуществляться через сложный путь аксо-аксональных контактов афферентных волокон [52]. На личинках рыб *Danio rerio* с помощью кальциевого имиджининга показано критическое участие радиальной астроглии для остановки неэффективного действия и дальнейшего изменения поведения особи [49]. Другие исследования также указывают на то, что глиальные клетки являются ключевыми регуляторами функции нервной цепи, а среди них и миелинизирующая глия в ЦНС, олигодендроциты [53–55]. Суммируйте с соавторами приводят схему-таблицу аксональных субдоменов, их возможные модификации и предполагаемые эффекты на физиологию аксона [54]. Олигодендроциты реагируют на активность нейронов, и, в свою очередь, настраивают нейрофизиологическую функцию, изменяя коренным образом проводящие свойства аксонов. Показано, что в нодальной-паранодальной зоне длина перехвата Ранвье и плотность ионных каналов могут меняться при изменениях в миелине. Обобщающие схемы представляют эту область аксона с экспрессией ионных каналов, транспортеров, щелевых контактов, паранодальных и околопаранодальных протеинов, нейрофасцина, контактина и протеина, связанного с контактином (Caspr). Caspr2 точно локализуется в околопаранодальной области аксона с Shaker-подобными K⁺ каналами, где специфически связывается с Kv1.1, Kv1.2 и их субъединицей Kvβ2 [56]. Калво с соавт. исследовал состав и распределение калиевых каналов шейкерного типа (каналы Kv1) в пределах перехватов Ранвье миелинизированных аксонов после повреждения [57]. Они показали, что экспрессия в норме каналов Kv1.1 и 1.2, локализованных в околопаранодальном участке, после повреждения была заметно снижена. Напротив, Kv1.4 и 1.6, которые едва обнаруживались в наивном состоянии, демонстрировали повышенную экспрессию в околопаранодальном и паранодальном участках после повреждения как у крыс, так и у людей.

Впервые о регистрации спонтанной синаптической активности первичных афферентов спинного мозга озерной лягушки, ди- и полисинаптически связанных с мотонейронами, было доложено в работах Шаповалова и Ширяева [58, 59]. Но только значительно позже стали уделять внимание этой стороне функционирования аксонов в ЦНС, признавая наряду с цифровой сигнализацией “все или ничего”, аналоговую [60]. Обнаруженный на-

ми яркий сигнал 5-HT_{5A}Rlike+ в миелине волокон в дорсальном роге, а также в вентральном и медиальном канатиках спинного мозга после длительной стимуляции вентрального корешка мог появиться через сработавшую цепь обратной связи активности мотонейронов. Возможно, в норме рецепторы 5-HT_{5A} в олигодендроцитах и миелине в спинном мозге лягушки экспрессированы интернализированными. При функционально опасных сигналах цепей рецепторы 5-HT_{5A} миелина принимают активную форму, меняющую мембранные свойства чувствительных волокон в пара- и околопаранодальных областях. В гиппокампе на мышах показано, что парвальбуминовые интернейроны экспрессируют функционально молчащие рецепторы 5-HT_{5A}, которые транслоцируются на клеточную мембрану и становятся активными при хроническом, но не остром лечении селективным ингибитором обратного захвата серотонина [61]. Таким образом, 5-HT_{5A} рецептор активно включается в арсенал фармакологических мишеней. Создается основанный на структуре дизайн набора химических зондов для серотонинового рецептора 5-HT_{5A} [29].

В нашей работе обнаружена реакция в миелине входящих в спинной мозг дорсальнокорешковых афферентных волокон на опасную вызванную активность мотонейронов появлением яркого 5-HT_{5A}Rlike+ сигнала. Подобный сигнал-ответ также виден в миелине моторных аксонов, длительно стимулируемых через вентральный корешок, и в миелине отдельных волокон вентромедиального канатика, где локализованы нисходящие вестибуло-спинальные тракты амфибий. Появилась информация о новых подходах исследователей к характеристике и нарушению миелина в контексте управляемых нейронных цепей по мере их созревания на модели личинки *Danio rerio* [55]. Включение тормозящих сигналов через модуляцию при опасности или при бесполезных попытках совершить действие дает путь к новому поведению животного, подстраиванию к возникшей ситуации [49]. На примере беспозвоночных животных Лиллвис и Катц [62] обсуждают роль нейромодуляции в эволюции механизмов поведения, поскольку она способна обеспечить различные результаты совместного использования компонентов нейронных цепей нейронов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показана комбинированная вовлеченность изучаемого подтипа серотониновых рецепторов (5-HT_{5A}) в подавлении глимТПСР в поясничных мотонейронах на пре-, постсинаптическом уровне. Результаты иммуофлуоресцентного исследования обильной серотониновой

иннервации спинного мозга лягушки и обнаружения 5-HT_{5A}Rlike+ сигнала на соме и дендритах поясничных мотонейронов подтверждают постсинаптическое распределение 5-HT_{5A} рецепторов. Обсуждается участие экстрасинаптических рецепторов 5-HT_{5A} в функционировании цепей обратной связи активности поясничных мотонейронов, возможно, с глиальными посредниками.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Н.М.Ч. — планирование экспериментов, сбор данных, обработка данных, приготовление графиков, рисунков, написание статьи, Д.С.В. — обсуждение результатов, редактирование статьи, Н.П.В. — идея работы, обсуждение результатов и редактирование статьи.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике ИЭФБ РАН (протокол 6–3/2022 от 23 июня 2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена по теме государственного задания НИР 075–00967–23–00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Plassat JL, Boschert U, Amlaiky N, Hen R (1992) The mouse 5HT₅ receptor reveals a remarkable heterogeneity within the 5HT_{1D} receptor family. EMBO J 11: 4779–4786. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05583.x>
2. Rees S, den 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 Lett 355: 242–246. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01209-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01209-1)
3. Grailhe R, Grabtree GW, Hen R (2001) Human 5-HT₅ 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)
4. Barnes NM, Ahern GP, Becamel C, Bockaert J, Camilleri M, Chaumont-Dubel S, Claeysen S, Cunningham KA, Fone KC, Gershon M, Di Giovanni G, Goodfellow NM,

- Halberstadt AL, Hartley RM, Hassaine G, Herrick-Davis K, Hovius R, Lacivita E, Lambe EK, Leopoldo M, Levy FO, Lummis SCR, Marin P, Maroteaux L, McCreary AC, Nelson DL, Neumaier JF, Newman-Tancredi A, Nury H, Roberts A, Roth BL, Roumier A, Sanger GJ, Teitler M, Sharp T, Villalón CM, Vogel H, Watts SW, Hoyer D (2021) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CX. Classification of Receptors for 5-hydroxytryptamine; Pharmacology and Function. *Pharmacol Rev* 73: 310–520.
<https://doi.org/10.1124/pr.118.015552>
5. Oliver K, Kinsey A, Wainwright A, Sirinathsinghi 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)
 6. Doly S, Fischer J, Brisorgueil M-J, Vergé D, Conrath M (2004) 5-HT_{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>
 7. Xu C, Giuliano F, Sun XQ, Brisorgueil M-J, Leclerc P, Vergé 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>
 8. Hurley PT, McMahon RA, Fanning P, O'Boyle KM, Rogers M, Martin F (1998) Functional coupling of a recombinant Human 5-HT_{5A} receptor to G-proteins in HEK-293 cells. *Br J Pharmacol* 124: 1238–1244.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701928>
 9. 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)
 10. Francken BJ, Jossion K, Lijnen P, Jurzak M, Luyten WH, Leysen JE (2000) Human 5-hydroxytryptamine(5A) receptors activate coexpressed G(i) and G(o) proteins in *Spodoptera frugiperda* 9 cells. *Mol Pharmacol* 57: 1034–1044.
 11. Thomas D (2006) 5-HT_{5A} receptors as a therapeutic target. *Pharmacol Ther* 111: 707–714.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.12.006>
 12. Thomas DR, Soffin EM, Roberts C, Kew JNC, de la Flor RM, Dawson LA, Fry VA, Coggon SA, Faedo S, Hayes PD, Corbett DF, Davies CH, Hagan JJ (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. *Neuropharmacology* 51: 566–577.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.04.019>
 13. Yamazaki M, Harada K, Yamamoto N, Yarimizu J, Okabe M, Shimada T, Ni K, Matsuoka N (2014) ASP5736, a novel 5-HT_{5A} receptor antagonist, ameliorates positive symptoms and cognitive impairment in animal models of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 24: 1698–1708.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.07.009>
 14. Muñoz-Islas E, Vidal-Cantú GC, Bravo-Hernández M, Cervantes-Durán C, Quiñonez-Bastidas GN, Pineda-Farías 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>
 15. 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>
 16. 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>
 17. Curtin PCP, Medan V, Neumeister H, Bronson DR, Preuss T (2013) The 5-HT_{5A} Receptor Regulates Excitability in the Auditory Startle Circuit: Functional Implications for Sensorimotor Gating. *J Neurosci* 33: 10011–10020.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4733-12.2013>
 18. Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR (2001) Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology (Berl)* 156: 234–258.
<https://doi.org/10.1007/s002130100810>
 19. Braff DL (2010) Prepulse Inhibition of the Startle Reflex: A Window on the Brain in Schizophrenia. pp 349–371.
 20. Arias B, Collier D, Gastó C, Pintor L, Gutiérrez B, Vallès V, Fañanás L (2001) Genetic variation in the 5-HT_{5A} receptor gene in patients with bipolar disorder and major depression. *Neurosci Lett* 303: 111–114.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01701-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01701-3)
 21. Whitaker KW, Neumeister H, Huffman LS, Kidd CE, Preuss T, Hofmann HA (2011) Serotonergic modulation of startle-escape plasticity in an African cichlid fish: a single-cell molecular and physiological analysis of a vital neural circuit. *J Neurophysiol* 106: 127–137.
<https://doi.org/10.1152/jn.01126.2010>
 22. Ankri N, Legendre P, Faber DS, Korn H (1994) Automatic detection of spontaneous synaptic responses in central neurons. *J Neurosci Methods* 52: 87–100.
[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90060-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90060-4)
 23. Hancock MB (1984) Visualization of peptide-immunoreactive processes on serotonin-immunoreactive cells using two-color immunoperoxidase staining. *J Histochem Cytochem* 32: 311–314.
<https://doi.org/10.1177/32.3.6198359>
 24. Romeis B (1953) Microscopische technik. M Issue FL, Transl 414–415.
 25. Kreiling JA, Stephens RE, Reinisch CL (2005) A mixture of environmental contaminants increases cAMP-dependent protein kinase in *Spisula* embryos. *Environ Toxicol Pharmacol* 19: 9–18.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.02.007>
 26. Liliya V, Desislava Z, Petia K (2017) Tryptophan Hydroxylase and Serotonin Receptors 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{3A},

- 5-HT₄, 5-HT_{5A}, 5-HT₆ and 5-HT₇ in Frog and Turtle Retina: an Immunofluorescence Study. *J Adv Mol Biol* 1. <https://doi.org/10.22606/jamb.2017.11003>
27. *Stensaas LJ, Stensaas SS* (1967) Astrocytic neuroglial cells, oligodendrocytes and microgliaocytes in the spinal cord of the toad. *Zeitschrift für Zellforsch und Mikroskopische Anat* 84: 473–489. <https://doi.org/10.1007/BF00320863>
28. *Stensaas LJ, Stensaas SS* (1968) Astrocytic neuroglial cells, oligodendrocytes and microgliaocytes in the spinal cord of the toad. *Zeitschrift für Zellforsch und Mikroskopische Anat* 86: 184–213. <https://doi.org/10.1007/BF00348524>
29. *Levit Kaplan A, Strachan RT, Braz JM, Craik V, Slocum S, Mangano T, Amabo V, O'Donnell H, Lak P, Basbaum AI, Roth BL, Shoichet BK* (2022) Structure-Based Design of a Chemical Probe Set for the 5-HT_{5A} Serotonin Receptor. *J Med Chem* 65: 4201–4217. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c02031>
30. *Tan Y, Xu P, Huang S, Yang G, Zhou F, He X, Ma H, Xu HE, Jiang Y* (2022) Structural insights into the ligand binding and Gi coupling of serotonin receptor 5-HT_{5A}. *Cell Discov* 8: 50. <https://doi.org/10.1038/s41421-022-00412-3>
31. *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: 329–337. <https://doi.org/10.1007/s00359-017-1244-y>
32. *Калинина НИ, Веселкин НП* (2022) Участие 5-HT₁ и 5-HT_{5A} рецепторов в модуляции синаптической передачи и внутренних свойств мембраны спинальных мотонейронов лягушки (*Rana ridibunda*). *Российский физиологический журнал им И М Сеченова* 108: 85–97. <https://doi.org/10.31857/S0869813922010071>
33. *Krobert KA, Andressen KW, Levy FO* (2006) Heterologous desensitization is evoked by both agonist and antagonist stimulation of the human 5-HT₇ serotonin receptor. *Eur J Pharmacol* 532: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.11.039>
34. *De Deurwaerdere P, Bharatiya R, Chagraoui A, Di Giovanni G* (2020) Constitutive activity of 5-HT receptors: Factual analysis. *Neuropharmacology* 168: 107967. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107967>
35. *Antal M, Kraftsik R, Székely G, Van Derloos H* (1986) Distal dendrites of frog motor neurons: a computer-aided electron microscopic study of cobalt-filled cells. *J Neurocytol* 15: 303–310. <https://doi.org/10.1007/BF01611433>
36. *ten Donkelaar HJ* (1998) Anurans. In: *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer Berlin Heidelberg. Berlin. Heidelberg. 1151–1314.
37. *Branchereau P, Rodriguez JJ, Delvolvé I, Abrous DN, Le Moal M, Cabelguen JM* (2000) Serotonergic systems in the spinal cord of the amphibian urodele *Pleurodeles waltl*. *J Comp Neurol* 419: 49–60. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(20000327\)419:1<49::aid-cne3>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(20000327)419:1<49::aid-cne3>3.0.co;2-#)
38. *Székely G* (1976) The morphology of motoneurons and dorsal root fibers in the frog's spinal cord. *Brain Res* 103: 275–290. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90799-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90799-X)
39. *Birinyi A, Antal M, Wolf E, Székely G* (1992) The Extent of the Dendritic Tree and the Number of Synapses in the Frog Motoneuron. *Eur J Neurosci* 4: 1003–1012. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1992.tb00127.x>
40. *Dityatev AE, Chmykhova NM, Dityateva G V, 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)
41. *William Soller R* (1977) Monoaminergic inputs to frog motoneurons: An anatomical study using fluorescence histochemical and silver degeneration techniques. *Brain Res* 122: 445–458. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90456-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90456-5)
42. *Montague SJ, Fenrich KK, Mayer-Macaulay C, Maratta R, Neuber-Hess MS, Rose PK* (2013) Nonuniform distribution of contacts from noradrenergic and serotonergic boutons on the dendrites of cat splenius motoneurons. *J Comp Neurol* 521: 638–656. <https://doi.org/10.1002/cne.23196>
43. *Maratta R, Fenrich KK, Zhao E, Neuber-Hess MS, Rose PK* (2015) Distribution and density of contacts from noradrenergic and serotonergic boutons on the dendrites of neck flexor motoneurons in the adult cat. *J Comp Neurol* 523: 1701–1716. <https://doi.org/10.1002/cne.23765>
44. *Chmykhova NM, Adanina VO, Karamian OA, Kozhanov VM, Vesselkin NP, Clamann H-P* (2005) Comparative study of spinal motoneuron axon collaterals. *Brain Res Bull* 66: 381–386. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2004.08.008>
45. *Geurts FJ, De Schutter E, Timmermans J-P* (2002) Localization of 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT_{5A} and 5-HT₇ receptor-like immunoreactivity in the rat cerebellum. *J Chem Neuroanat* 24: 65–74. [https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(02\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(02)00020-0)
46. *Grantyn R, Shapovalov AI, Shiriaev BI* (1984) Tracing of frog sensory-motor synapses by intracellular injection of horseradish peroxidase. *J Physiol* 349: 441–458. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015166>
47. *Chmykhova NM, Babalian AL* (1992) [A light microscopic study of the axonal collaterals of the lumbar motoneurons in the spinal cord of the frog *Rana ridibunda*]. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 28: 244–253.
48. *Chmykhova NM, Babalian AL* (1993) Structure of recurrent axon collaterals of frog lumbar motoneurons as revealed by intracellular HRP labelling. *Brain Res* 603:289–295. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91250-v](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91250-v)
49. *Hossaini M, French PJ, Holstege JC* (2007) Distribution of glycinergic neuronal somata in the rat spinal cord. *Brain Res* 1142: 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.078>

50. Zhang J, Lanuza GM, Britz O, Wang Z, Siembab VC, Zhang Y, Velasquez T, Alvarez FJ, Frank E, Goulding M (2014) V1 and V2b Interneurons Secure the Alternating Flexor-Extensor Motor Activity Mice Require for Limbed Locomotion. *Neuron* 82: 138–150. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.013>
51. Adanina VO, Rio JP, Adanina AS, Reperant J, Veselkin NP (2010) GABA- and glycine-immunoreactive synapses in spinal cord of frog *Rana temporaria*. *Cell tissue biol* 4: 380–390. <https://doi.org/10.1134/S1990519X10040115>
52. Ashrafi S, Betley JN, Comer JD, Brenner-Morton S, Bar V, Shimoda Y, Watanabe K, Peles E, Jessell TM, Kaltschmidt JA (2014) Neuronal Ig/Caspr Recognition Promotes the Formation of Axoaxonic Synapses in Mouse Spinal Cord. *Neuron* 81: 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.060>
53. Mu Y, Bennett D V, Rubinov M, Narayan S, Yang C-T, Tanimoto M, Mensh BD, Looger LL, Ahrens MB (2019) Glia Accumulate Evidence that Actions Are Futile and Suppress Unsuccessful Behavior. *Cell* 178: 27–43.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.050>
54. Nelson AD, Jenkins PM (2017) Axonal Membranes and Their Domains: Assembly and Function of the Axon Initial Segment and Node of Ranvier. *Front Cell Neurosci* 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00136>
55. Suminaite D, Lyons DA, Livesey MR (2019) Myelinated axon physiology and regulation of neural circuit function. *Glia* 67: 2050–2062. <https://doi.org/10.1002/glia.23665>
56. Auer F, Schoppik D (2022) The Larval Zebrafish Vestibular System Is a Promising Model to Understand the Role of Myelin in Neural Circuits. *Front Neurosci* 16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.904765>
57. Poliak S, Gollan L, Martinez R, Custer A, Einheber S, Salzer JL, Trimmer JS, Shrager P, Peles E (1999) Caspr2, a New Member of the Neurexin Superfamily, Is Localized at the Juxtaparanodes of Myelinated Axons and Associates with K⁺ Channels. *Neuron* 24: 1037–1047. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81049-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81049-1)
58. Calvo M, Richards N, Schmid AB, Barroso A, Zhu L, Ivulic D, Zhu N, Anwandter P, Bhat MA, Court FA, McMahon SB, Bennett DL (2016) Altered potassium channel distribution and composition in myelinated axons suppresses hyperexcitability following injury. *Elife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.12661>
59. Shapovalov AI, Shiriaev BI (1979) Spontaneous miniature potentials in primary afferent fibres. *Experientia* 35: 348–349. <https://doi.org/10.1007/BF01964345>
60. Tamarova ZA, Shapovalov AI, Shiriaev BI (1981) [Synaptic effects in the endings of individual primary afferent fibers mono- and polysynaptically connected to spinal motor neurons]. *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova* 67: 1511–1520.
61. Debanne D, Campanac E, Bialowas A, Carlier E, Alcaraz G (2011) Axon Physiology. *Physiol Rev* 91: 555–602. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2009>
62. Sagi Y, Medrihan L, George K, Barney M, McCabe KA, Greengard P (2020) Emergence of 5-HT_{5A} signaling in parvalbumin neurons mediates delayed antidepressant action. *Mol Psychiatry* 25: 1191–1201. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0379-3>
63. Lillvis JL, Katz PS (2013) Parallel Evolution of Serotonergic Neuromodulation Underlies Independent Evolution of Rhythmic Motor Behavior. *J Neurosci* 33: 2709–2717. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4196-12.2013>

SEROTONINERGIC INNERVATION OF THE FROG SPINAL CORD AND INVOLVEMENT OF 5-HT_{5A} RECEPTORS IN THE MODULATION OF MINIATURE GLYCINERGIC POSTSYNAPTIC POTENTIALS OF LUMBAR MOTONEURONS

N. M. Chmykhova^{a, #}, D. S. Vasilev^a and N. P. Veselkin^a

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[#] *e-mail: nchmykhova@gmail.com*

The role of serotonin 5-HT_{5A} receptors in the modulation of miniature inhibitory synaptic activity was studied using intracellular recording of miniature glycinergic inhibitory postsynaptic potentials (glymIPSPs) in the lumbar motoneurons of the isolated spinal cord of the frog *Rana ridibunda*. In a medium containing TTx, CNQX, DAP5, bicuculline, application of the serotonin receptor agonist 5-CT (10 μM) with high affinity for 5-HT_{5A} led to a suppression of frequency by 86%, as well as the disappearance of high-amplitude glymIPSPs (200–500 μV) at preservation of rare potentials with an amplitude of about 100 μV. This effect indicates the possibility of pre- and postsynaptic action of 5-CT at such a concentration, not limited to its effect only on 5-HT_{5A} receptors. The addition of methysergide, a blocker of 5-HT_{1,2} receptors, to the medium reduced the average frequency of glymIPSPs by 67%, the frequency of high-amplitude events by 5 times and their average amplitude by 20%, which may indicate the participation of 5-HT_{5A} receptors in pre- and postsynaptic modulation in glymIPSPs of motoneurons. Application of 1 μM 5-CT led to a decrease in the frequency of glymIPSPs by 49% without a noticeable change in the amplitude of glymIPSPs, and the subsequent introduction of SB-699551, a selective antagonist of 5-HT_{5A} receptors, into the solution increased the frequency of events by 41%, which confirms the involvement of

5-HT_{5A} receptors in presynaptic modulation of glymIPSPs. Immunofluorescence study showed that supra- and intraspinal 5-HT⁺ neurons produce abundant branching in the lumbar region with the possibility of forming axosomatic contacts with labeled motoneurons and axodendritic contacts on the proximal and distal portions of their dendrites. It is also possible to form contacts in the perimedullary plexus, penetrated by the distal dendrites of motoneurons and astrocytic processes. This represents the structural basis for post-, pre- and extrasynaptic modulation of motoneuron activity by serotonin. The possibility of postsynaptic modulation of motoneuron activity through 5-HT_{5A} receptors is confirmed by the point-like fluorescence of the 5-HT_{5A}Rlike⁺ signal on the dendrites and bodies of labeled motoneurons, which is present in the neuropil but absent in the perimedullary plexus. Double labeling with antibodies to the 5-HT_{5A} receptor and the Ca²⁺-binding protein, parvalbumin, revealed 5-HT_{5A}Rlike⁺ localization in the myelin sheath of dorsal and ventromedial funiculi fibers. In preparations after long-term stimulation of the ventral roots through suction electrodes when labeling motor neurons with biocytin, a bright 5-HT_{5A}Rlike⁺ signal was detected in the myelin of motor axons, dorsal root fibers entering the brain in the region of the dorsal horn and individual fibers of the ventromedial funiculus. The participation of extrasynaptic 5-HT_{5A} receptors in the functioning of feedback circuits of lumbar motoneuron activity, with the possible participation of glial elements in these circuits, is discussed.

Key words: spinal motoneuron, serotonin innervation, 5-HT_{5A} receptor, miniature glycinergic activity, frog