

Модуляція моносинаптичних рефлекторних розрядів у щурів після децеребрації під впливом гідрокситриптофану

І.В. Верещака¹, Н.В. Булгакова¹, В.В. Корнєєв¹, К.А. Чайковський²,
А.В. Мазниченко¹

¹Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;

²Київський національний університет ім. Тараса Шевченка; e-mail: maznychenko@biph.kiev.ua

Досліджували зміни моносинаптичних рефлекторних розрядів (МСР) спінальних мотонейронів у щурів після децеребрації до та після внутрішньоочеревинного введення попередника серотоніну 5-гідрокситриптофану (5-ГТФ). МСР мотонейронів викликали за допомогою електричної стимуляції дорсальних корінців 5-го поперекового сегмента, а реєстрували від вентральних корінців. Під час стимуляції тваринам внутрішньоочеревинно вводили фізіологічний розчин або 5-ГТФ. У тварин, яким були зроблені ін'єкції 5-ГТФ, зареєстровано значне зростання амплітуд МСР (+169 % та +172 %, $P < 0,001$) порівняно з середньою амплітудою контрольних МСР. Отже, вивільнення серотоніну після системного застосування 5-ГТФ значно посилює збудливість мотонейронів у поперековому відділі спинного мозку, що, можливо, пов'язано з послабленням гальмівного контролю інтернейронів у шляхах передачі збуджувальних впливів від м'язових аферентів до мотонейронів та з позними (антигравітаційними) рефлекторними реакціями, необхідними для ініціації локомоторних рухів. Ключові слова: серотонін; 5-гідрокситриптофан; мотонейрон; моносинаптичні рефлекторні розряди.

ВСТУП

Модуляція передачі сигналу між первинними аферентами та премоторними інтернейронами має потужний вплив на рефлекторну діяльність через їх пряму збуджувальну або гальмівну дію на мотонейрони. [1]. Одна з нейронних систем, задіяних у таку модуляцію – моноамінергічна – діє завдяки вивільненню серотоніну, норадреналіну або дофаміну нейронами низхідного тракту [2, 3].

Відомо, що низхідні сигнали від мозкових моноамінергічних систем відіграють суттєву роль у контролі діяльності спінальних локомоторних центрів у різних регіонах спинного мозку [4–6], а серотонін (5-гідрокситриптамін, (5-ГТ)) є одним із головних нейромедіаторів/модуляторів, який активує спінальні нейрони, в тому числі і ті, які розташовані в центральному спінальному генера-

© І.В. Верещака, Н.В. Булгакова, В.В. Корнєєв, К.А. Чайковський, А.В. Мазниченко

торі. Серотонінергічні аксони дають проєкції в усі ділянки сірої речовини спинного мозку і особливо у поверхневі шари дорсального рога, комісуральну ділянку та вентральний ріг [7]. Важливо, що локомоторна активність викликає вивільнення серотоніну в дорсальному [8] та вентральному рогах [9] спинного мозку. Показано, що у головному та спинному мозку людини і тварин 5-ГТ активує різні типи рецепторів серотоніну, які підрозділяють на 7 типів (5-ГТ₁ – 5-ГТ₇), а деякі типи на підтипи [10]. Також відомо, що при пошкодженні спинного мозку виникає порушення низхідних серотонінергічних проєкцій до спінальних моторних ділянок і, як наслідок, виснаження 5-ГТ, порушення його експресії, підвищення чутливості та аутоактивація специфічних 5-ГТ-рецепторів. Послаблення функції серотонінергічної

системи може призводити до різного ступеня локомоторної дисфункції, навіть викликати параліч [11].

Літературі дані стосовно ролі серотоніну в регуляції мотонейронної активності та його дії на спинний мозок досить суперечливі. Так, деякі автори [12, 13], з одного боку, реєстрували пряму деполяризувальну дію серотоніну на спінальні мотонейрони, посилення їх збудливості [14–16] та пригнічення рефлекторних відповідей, викликаних стимуляцією дорсальних корінців під час впливу серотоніну та його агоністів (5-метоксидиметилтриптамін (5-MeO-DMT) та 8-гідрокси-2-(ди-N-пропіламіно)тетралін (8-OH-DPAT)) [17, 18], а з іншого – полегшення рефлекторних відповідей, викликаних стимуляцією ядер шва, та блокаду цього ефекту при введенні антагоністів 5-ГТФ [15]. Тож питання щодо залучення серотоніну до модулювання мотонейронної активності залишається ще детально не вивченим. Треба відмітити, що серотонін не проникає через гематоенцефалічний бар'єр на відміну від його попередника – 5-гідрокситриптофану (5-ГТФ).

Мета роботи – дослідити зміни амплітуди моносинаптичних рефлекторних розрядів (МСР), викликаних подразненням дорсальних корінців спинного мозку у нормі та після внутрішньоочеревинного введення прекурсору серотоніну – 5-ГТФ.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на двох групах щурів-самців лінії Вістар масою 350 – 400 г: 1-ша група (n=3) – тварини, яким під час електричної стимуляції дорсальних корінців спинного мозку внутрішньоочеревинно вводили фізіологічний розчин. Щурам 2-ї групи (n=6) за тих самих умов була зроблена внутрішньоочеревинна ін'єкція попередника серотоніну 5-гідрокситриптофану – 5-ГТФ (30 мг/кг, «Sigma», США). При такому дозуванні 5-ГТФ не відбувалося помітних

змін амплітуди електрокардіограми та частоти серцевих скорочень. Усі експериментальні процедури проводили згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р (86/609/ЕЕС) та відповідно до Закону України від 21.02.2006, № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

При підготовці до експерименту тваринам була проведена операція, яка включала в себе: внутрішньоочеревинну наркотизацію сумішшю кетаміну (100 мг/кг «Pfizer», США) та ксилазіну гідрохлориду (10 мг/кг, «Interchemie», Голландія), трахеотомію та підключення до апарату штучної вентиляції легенів, децеребрацію на інтерколікулярному рівні, ламінектомію поперекових сегментів та виділення вентральних і дорсальних корінців спинного мозку на рівні 5-го поперекового сегмента (L5). Після операції щурів закріплювали у стереотаксичному верстаті та встановлювали платинові дротяні біполярні електроди для стимуляції та запису отриманих реакцій. Одна серія стимуляції складалася із 12 парних електричних імпульсів прямокутної форми тривалістю 0,2 мс і перервою між стимулами 30 с. Проводили одну контрольну і дві тестові серії стимулів (з введенням фізіологічного розчину або 5-ГТФ) з проміжками між серіями по 15 хв. Моносинаптичні рефлекторні розряди відводилися від вентральних корінців з одночасною реєстрацією потенціалів дорсальної поверхні (ПДП). Будь-які полісинаптичні рефлекси, що виникали під час стимуляції, ідентифікувалися за тривалістю їх затримки та вилучали під час обробки результатів.

Моносинаптичні рефлекторні розряди та потенціали дорсальної поверхні спинного мозку надходили до АЦП-ЦАП («Power 1401», Cambridge Electronic Design, Англія) і записувалися за допомогою програми «Spike 2». МСР та ПДП усереднювали за 12 стимуляціями. Середні значення амплітуд МСР порівнювали за допомогою однопараметричного статистичного дисперсійного аналізу варіацій (ANOVA). Якщо міжгру-

пові відмінності були знайдені ($P < 0,001$), застосовували апостеріорний критерій Бонферроні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час стимуляції дорсальних корінців середні значення амплітуд МСР були визначені в одному контрольному (безін'єкційному) та двох післяін'єкційних періодах часу (серіях стимуляції) у щурів обох груп. У щурів 1-ї групи достовірної різниці між амплітудами моносинаптичних рефлекторних розрядів мотонейронів у контрольному періоді та двох періодах після внутрішньоочеревинного введення фізіологічного розчину зареєстровано не було (рис. 1, а). У тварин 2-ї групи через 15 хв після ін'єкції 5-ГТФ було зареєстровано значне зростання амплітуд МСР (+169 та +172 %, $P < 0,001$) порівняно з середньою амплітудою контрольних МСР (до введення 5-ГТФ) (див. рис. 1, б). На рис. 2 показані усереднені оригінальні МСР (за 15 хв до введення та після двох серій стимуляції з внутрішньоочеревинною інфільтрацією 5-ГТФ). З рисунку видно, що контрольні значення амплітуди МСР були на рівні $2,6 \pm 0,1$ мВ, а потім стрімко зростали до $4,41 \pm 0,5$ та $4,49 \pm 0,3$ мВ відповідно.

Треба відмітити, що збільшення амплітуд МСР не було пов'язане зі змінами інтенсивності подразнення корінців, оскільки змін амплітуди потенціалу дорсальної поверхні виявлено не було.

Фармакологічна модуляція серотонінових рецепторів із залученням специфічних агоністів 5-ГТ-рецепторів або застосуванням попередника серотоніну 5-ГТФ призводить до загальної активації 5-ГТ-рецепторів. Стимуляція цих рецепторів при травмах спинного мозку збуджує локомоторний спінальний генератор нижче місця пошкодження та полегшує або покращує якість та частоту рухів, особливо в концепції активації інших моноамінергічних систем або в поєднанні з електричною стимуляцією [11]. За даними деяких авторів [19, 20], в експериментах *in vitro* на спинному мозку новонароджених щурів під впливом серотоніну було зареєстровано пригнічення амплітуди МСР мотонейронів. Однак дослідження *in vivo* на тваринах після децеребрації та деякі експерименти *in vitro* на зрізах спинного мозку демонструють протилежні результати. Так, у праці Jankowska та співавт. [21] показано збільшення амплітуди МСР інтернейронів у спінальних рефлекторних шляхах аферентів груп I та II, а

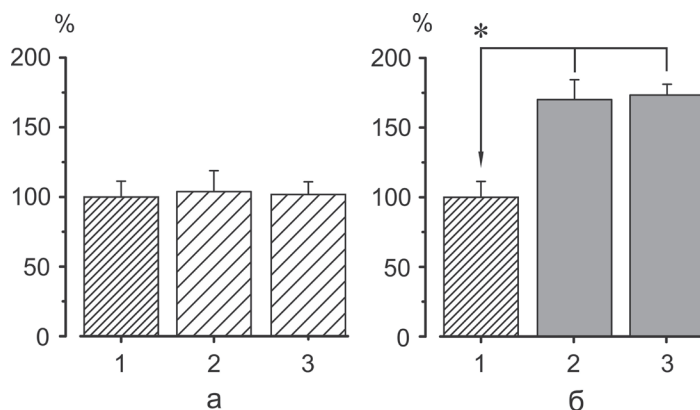


Рис. 1. Зміна амплітуд моносинаптичних рефлекторних розрядів (МСР) мотонейронів, викликаних електричною стимуляцією дорсальних корінців 5-го поперекового сегмента спинного мозку щурів після децеребрації в результаті внутрішньоочеревинного введення фізіологічного розчину (а) або 5-гідрокситриптофану (б): 1 – контрольна стимуляція без введення речовини (середня амплітуда МСР прийнята за 100 %). 2, 3 – перша та друга серії стимуляції після ін'єкції фізіологічного розчину на (а) та 5-гідрокситриптофану (б) відповідно. * $P < 0,001$ відносно контролю

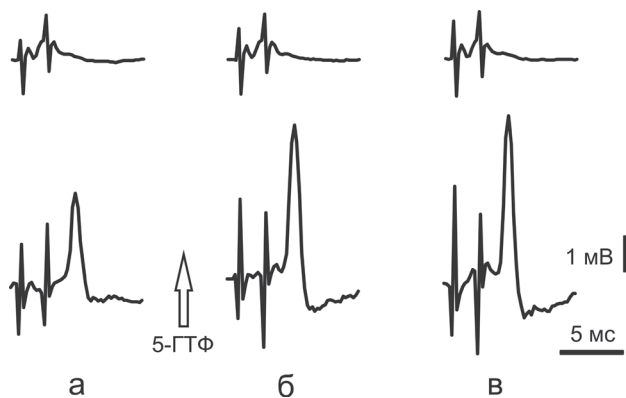


Рис. 2. Моносинаптичні рефлексорні розряди (МСР) мотонейронів 5-го поперекового сегмента щурів після децеребрації, які виникали в результаті електричної стимуляції у контролі (а) та через 15 і 30 хв після внутрішньоочеревинного введення 5-гідрокситриптофану (б, в). Верхній ряд – усереднені потенціали дорсальної поверхні спинного мозку щурів, нижній ряд – усереднені МСР мотонейронів

в експериментах інших авторів [22–25] відмічалось зростання амплітуди МСР мотонейронів в результаті дії агоністів серотоніну (DOI та квіпазіну). Тобто, попередні дослідження показали, що застосування серотоніну може викликати як пригнічення, так і збудження спінальних інтернейронів [21] та мотонейронів [11, 25, 26], а характер впливів залежить не тільки від типу активованих рецепторів та їх розташування на нейронах, а й від пропорції їх розміщення на мембрані [10, 21].

Одержані нами результати свідчать про те, що викликане вивільнення серотоніну після системного застосування 5-ГТФ активує мотонейрони у поперековому відділі спинного мозку, що, можливо, пов'язано з активацією серотонінових рецепторів другого типу [24, 25]. Збільшення активності вказаних нейронів може відбуватись як у результаті прямої дії серотоніну на мотонейрони, так і завдяки послабленню гальмівного контролю інтернейронів у шляхах передачі збуджувальних впливів від м'язових аферентів до мотонейронів. Як відомо [27], у поперековому сегменті L5 розташовані переважно численні ядра мотонейронів м'язів-розгиначів, тому виявлені зміни МСР під впливом 5-ГТФ вказують на причетність мозкової серотонінергічної системи до розвитку позних (антигравітаційних)

рефлексорних реакцій як одного із важливих компонентів, потрібних для ініціації локомоторних рухів.

И.В. Верещака, Н.В. Булгакова, В.В. Корнеев, К.А. Чайковский, А.В. Мазниченко

МОДУЛЯЦИЯ МОНОСИНАПТИЧЕСКИХ РЕФЛЕКТОРНЫХ РАЗРЯДОВ У КРЫС ПОСЛЕ ДЕЦЕРЕБРАЦИИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИДРОКСИТРИПТОФАНА

Исследовали влияние серотонина на моносинаптические рефлексорные разряды (МСР) спинальных мотонейронов крыс после децеребрации в контроле и после внутрибрюшинного введения предшественника серотонина 5-гидрокситриптофана (5-ГТФ). МСР мотонейронов спинного мозга получали с помощью электрической стимуляции дорсальных корешков 5-го поясничного сегмента. Во время стимуляции животным внутрибрюшинно вводили физиологический раствор или 5-ГТФ. У животных, которым были сделаны инъекции 5-ГТФ, зарегистрирован значительный рост амплитуд МСР (+169% и +172%, $P < 0,001$) по сравнению со средней амплитудой контрольных МСР. Таким образом, вызванное высвобождение серотонина после системного применения 5-ГТФ значительно усиливает возбудимость мотонейронов в поясничном отделе спинного мозга, что, возможно, связано с ослаблением тормозного контроля интернейронов в путях передачи возбуждающих влияний от мышечных аферентов к мотонейронам, а также с позными (антигравитационными) рефлексорными реакциями, необходимыми для инициации локомоторных движений.

Ключевые слова: серотонин; 5-гидрокситриптофан; мотонейрон; моносинаптические рефлексорные разряды.

I.V. Vereshchaka¹, N.V. Bulgakova¹, V.V. Kornieiev¹,
K.A. Chaikovskii², A.V. Maznychenko¹

MODULATION OF THE MONO-SYNAPTIC REFLEX POTENTIALS IN THE DECEREBRATED RATS UNDER THE INFLUENCE OF HYDROXYTRYPTOPHAN

We studied the serotonin effect on monosynaptic reflex potentials (MSR) of spinal motoneurons in the decerebrated rats in control and after intraperitoneal administration of serotonin precursor – 5-Hydroxytryptophan (5-HTP). MSR of motoneurons in the lumbar spinal cord were registered using electrical stimulation of dorsal root of the 5th lumbar section. During stimulation physiological saline or 5-hydroxytryptophan was injected intraperitoneally. In comparison with average amplitude of the control MSR there were registered significant increase in amplitudes of the MSR (169% and +172%, $P < 0,001$) in animals with injection 5-HTP. These data suggest that serotonin release after 5-HTP administration leads to activation of motoneurons in the lumbar spinal cord. The mechanism of this activation may be related to the weakening of the inhibitory control of interneurons in the transmission pathways of the excitatory influences from muscle afferent to motoneurons and to the postural (antigravity) reflex reactions which necessary for the initiation of locomotion.

Key words: serotonin; 5-Hydroxytryptophan; motoneurons; monosynaptic reflex potential.

¹*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine;*

²*Kyiv Taras Shevchenko National University*

REFERENCES

- Rudomin P, Romo R, Mendell L. Presynaptic inhibition and neural control. New York: Oxford University Press. 1998.
- Calvillo O, Ghignone M, Madrid J. Effects of alpha 1 adrenoceptor activation on the excitability of primary afferent terminals of the sural nerve in the spinal cord of the cat. *Synapse*. 1988;2:326-28.
- Lopez-Garcia JA, King AE. Pre- and post-synaptic actions of 5- hydroxytryptamine in the rat lumbar dorsal horn in vitro: implications for somatosensory transmission. *Eur J Neurosci*. 1996;8:2188-97.
- Musienko P, van den Brand R, Märzendorfer O, Roy RR, Gerasimenko Y, Edgerton V, Courtine G. Controlling specific locomotor behaviors through multidimensional monoaminergic modulation of spinal circuitries. *J Neurosci*. 2011;31(25):9264-78.
- Noga BR, Johnson DM, Riesgo MI, Pinzon A. Locomotor-activated neurons of the cat. Serotonergic innervation and co-localization of 5-HT7, 5-HT2A, and 5-HT1A receptors in the thoraco-lumbar spinal cord. *J Neurophysiol*. 2009;102:1560-76.
- Schmidt BJ, Jordan LM. The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. *Brain Res Bull*. 2000;53(5):689-710.
- Marlier L, Teilhac JR, Cerruti C, Privat A. Autoradiographic mapping of 5-HT1, 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT2 receptors in the rat spinal cord. *Brain Res*. 1991;550: 15-23.
- Gerin C, Teilhac JR, Smith K, Privat A. Motor activity induces release of serotonin in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord. *Neurosci Lett*. 2008;436(2):91-5.
- Gerin CG., Hill A, Hill S, Smith K, Privat A. Serotonin release variations during recovery of motor function after a spinal cord injury in rats. *Synapse*. 2010;64(11):855-61.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;71:533-54.
- GhoshM, PearseDD. The role of the serotonergic system in locomotor recovery after spinal cord injury. *Frontiers in Neural Circuits*. 2015;8:151.
- Wang MY, Dun NJ. 5-hydroxytryptamine responses in neonate rat motoneurons in vitro. *J Physiol*. 1990;430:87-103.
- Elliott P, Wallis DI. The action of 5-hydroxytryptamine on lumbar motoneurons in neonatal rat spinal cord in vitro. *J Physiol*. 1990;426(suppl):54.
- Ahlman A, Grillner S, Udo M. The effect of 5-htp on the static fusimotor activity and the tonic stretch reflex of an extensor muscle. *Brain Res*. 1971;27:393-6.
- Barasi S, Roberts MHT. The modification of lumbar motoneurone excitability by stimulation of a putative 5-hydroxytryptamine pathway. *Br J Pharmacol*. 1974;52:339-48.
- Roberts MHT, Davies M, Girdlestone D, Foster GA. Effects of 5-hydroxytryptamine agonists and antagonists on the responses of rat spinal motoneurons to raphe obscurus stimulation. *Br J Pharmacol*. 1988;95:437-48.
- Saito K, Ito S, Kitazawa T, Ohga A. Selective inhibition by methysergide of the monosynaptic reflex discharge in the isolated spinal cord of the newborn rat. *Brain Res*. 1982;251:117-25.
- Nagano N, Ono H, Fukuda H. Functional significance of subtypes of 5-HT receptors in the rat spinal reflex pathway. *Gen Pharmacol*. 1988;19:789-93.
- Crick H, Wallis DI. Inhibition of reflex responses of neonate rat lumbar spinal cord by 5-hydroxytryptamine *Br J Pharmacol*. 1991;103:1769-75.
- Iwasaki T, Otsuguro K, Kobayashi T, Ohta T, Ito S. Endogenously released 5-HT inhibits A and C fiber-evoked synaptic transmission in the rat spinal cord by the facilitation of GABA/glycine and 5-HT release via 5-HT2A and 5-HT3 receptors. *Eur J Pharmacol*. 2013;702:149-57.
- Jankowska E, Hammar I, Chojnicka B, Hedén CH. Effects of monoamines on interneurons in four spinal reflex pathways from group I and/or group II muscle afferents. *Eur J Neurosci*. 2000;12(2):701-14.
- Gajendiran M. In vivo evidence for serotonin 5-HT2C receptor-mediated long-lasting excitability of lumbar spinal reflex and its functional interaction with 5-HT1A receptor in the mammalian spinal cord. *Brain Res Bull*.

- 2008;75(5):674-80.
23. Machacek DW, Garraway SM, Shay BL, Hochman S. Serotonin 5-HT₂ receptor activation induces a long-lasting amplification of spinal reflex actions in the rat. *J Physiol.* 2001;537(Pt 1):201-7.
24. Shay BL, Sawchuk M, Machacek DW, Hochman S. Serotonin 5-HT₂ receptors induce a long-lasting facilitation of spinal reflexes independent of ionotropic receptor activity. *J Neurophysiol.* 2005;94(4):2867-77.
25. Chopek JW, MacDonell CW, Gardiner K, Gardiner PF. Daily passive cycling attenuates the hyperexcitability and restores the responsiveness of the extensor monosynaptic reflex to quipazine in the chronic spinally transected rat. *J Neurotrauma.* 2014;31(12):1083-7.
26. Gackière F, Vinay L. Serotonergic modulation of post-synaptic inhibition and locomotor alternating pattern in the spinal cord. *Front Neural Circuits.* 2014;8:102.
27. Vejsada R, Palecek J, Hník P. Permanent alterations of spinal cord reflexes following nerve lesion in newborn rats. *Physiol Res.* 1999;48(6):483-9.

*Матеріал надійшов до
редакції 02.09.2015*