

УДК 577.35+612.17

ВЛИЯНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКА СИНТЕЗА СЕРОТОНИНА 5-ОКСИТРИПТОФАНА НА ВПСП, РЕГИСТРИРУЕМЫЕ В ПРЕМОТОРНЫХ ИНТЕРНЕЙРОНАХ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ УСЛОВНОГО ОБОРОНИТЕЛЬНОГО РЕФЛЕКСА

© 2023 г. А. И. Арсланов^{а, *}, Д. И. Силантьева^а, В. В. Андрианов^{а, b},
И. Б. Дерябина^а, Х. Л. Гайнутдинов^{а, b}

^аКазанский федеральный университет, Казань, 420008 Россия

^bКазанский физико-технический институт КазНЦ РАН, Казань, 420029 Россия

*e-mail: arslanov-1999@mail.ru

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.

После доработки 24.05.2023 г.

Принята к публикации 29.05.2023 г.

Проведено количественное исследование подпороговых возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП), регистрируемых внутриклеточно, в гигантских премоторных интернейронах виноградной улитки после формирования условного оборонительного рефлекса пищевой аверзии при повышенном уровне серотонина в организме. Результаты показывают достоверное увеличение количества низкоамплитудных ВПСП с амплитудой от 0.3 до 0.5 мВ в премоторных гигантских интернейронах оборонительного поведения после обучения при повышенном уровне серотонина. Наблюдаемое увеличение количества ВПСП может говорить либо об увеличении количества потенциалов действия в соответствующих пресинаптических нейронах, либо об увеличении амплитуд ВПСП, ранее не поддававшихся обнаружению.

Ключевые слова: нейрон, обучение, ВПСП, синаптическая пластичность, мембранный потенциал, серотонин

DOI: 10.31857/S0233475523050031, **EDN:** OJJWQQ

ВВЕДЕНИЕ

Серотонин является одним из широко распространенных и наиболее изученных медиаторов нервной системы [1, 2]. Он играет важную роль в процессах обучения и формирования памяти, участвует в модуляции силы синаптической связи [3–6]. Целью данной работы было исследование изменений фоновой (подпороговой) электрической активности в гигантских премоторных интернейронах виноградной улитки после ассоциативного обучения при воздействии предшественника синтеза серотонина 5-окситриптофана (5-НТР), приводящего к повышению уровня серотонина в организме.

Регистрация подпороговой фоновой активности нейрона позволяет составить картину суммарной электрической активности входящих синапсов. Для реализации данной цели была поставлена задача: провести анализ изменения фоновой активности премоторных интернейронов при формировании условного рефлекса авер-

зии к определенному виду пищи у виноградной улитки после аппликации 5-НТР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Формирование условного оборонительного рефлекса аверзии к пище (УОР). Для данного эксперимента были выбраны здоровые на вид и подвижные брюхоногие легочные моллюски *Helix pomatia*. До начала эксперимента в течение 14 дней данные животные поддерживались в активном состоянии. Влажность и температура, необходимая для поддержания активного состояния, контролировалась в террариуме с помощью измерительных приборов. В качестве пищи использовалась морковь. За 3 дня до начала и на протяжении всего времени эксперимента животные не получали пищи, что является стандартной процедурой при формировании оборонительного рефлекса аверзии к определенному виду пищи и связано с необходимостью поддержания моллюсков в активном состоянии [4]. Далее животные были поделены на четыре группы: экспериментальная

группа — 5-НТР + УОР, экспериментальная группа — 5-НТР, экспериментальная группа — УОР, контрольная группа (интактные).

Животным первой и второй экспериментальной группы в течение 4 дней инъекцировали предшественник синтеза серотонина 5-НТР ($n = 5$) в концентрации 1 ммоль/л. Фармакологический эффект 5-НТР в организме проявляется в значительном повышении содержания серотонина уже через 30 мин после инъекции с достижением максимальной величины через 1 ч и продолжительностью повышенного содержания серотонина в несколько часов [7].

Ежедневно у животных первой экспериментальной группы через 1 ч после инъекции 5-НТР вырабатывали УОР. У животных третьей группы вырабатывали УОР без предварительной инъекции 5-НТР. УОР вырабатывали с использованием следующей методики: в качестве условного стимула предъявляли кусок огурца, который подносили на металлическом стержне к оральной области улитки. В момент первого жевательного движения виноградной улитки через стержень пропускали ток величиной в 1–2 мА, что служило безусловным стимулом, вызывающим оборонительную реакцию. Между данными сочетаниями пищи и тока делали паузы, длительностью 5–7 мин. В день проводилось 2 сессии по 10 сочетаний в каждой. Для подтверждения сформированности рефлекса животному предоставлялся огурец в течение 3 мин и если улитка отказывалась брать кусок огурца в течение этого периода, то такую реакцию принимали за отказ от данного вида пищи. Рефлекс в среднем вырабатывался после предъявления 80 сочетаний стимулов за 4 дня. Животные контрольной группы сохранялись интактными и содержались в одинаковых условиях с экспериментальными группами.

Исследования были проведены на 22 улитках: 1) группа обученных улиток с аппликацией 5-НТР — группа улиток, которые были инъекцированы 5-НТР и у которых был сформирован рефлекс аверзии на пищу — 5 улиток ($n = 9$ зарегистрированных нейронов); 2) группа с аппликацией 5-НТР — группа улиток, которые были инъекцированы 5-НТР — 5 улиток ($n = 9$ зарегистрированных нейронов); 3) группа обученных улиток — группа улиток, у которых был сформирован условно-оборонительный рефлекс — 5 улиток ($n = 7$ зарегистрированных нейронов); 4) контрольная группа — группа интактных животных — 5 улиток ($n = 7$ зарегистрированных нейронов).

Все экспериментальные процедуры были выполнены с соблюдением правил и норм этического комитета Казанского федерального университета.

Электрофизиологическая установка. Электрофизиологические измерения проводились по

стандартной методике при комнатной температуре с применением одного или двух внутриклеточных стеклянных микроэлектродов, имевших сопротивление 5–25 МОм и заполненных раствором 2.5 М KCl [8–10]. Раствор микроэлектрода соединялся с регистрирующей аппаратурой посредством проводящей ток цепочки “агаровый мостик—хлорсеребряный электрод”. Индифферентный электрод представлял собой симметричную цепочку, агаровый конец которой опускался в омывающий препарат раствор. Подведение микроэлектродов к клеткам проводилось под визуальным контролем с помощью бинокулярного микроскопа. Запись производилась с помощью компьютера со встроенным аналого-цифровым преобразователем.

Для регистрации электрических характеристик нервных клеток используют микроэлектроды. Основным недостаток металлических и графических микроэлектродов при размерах 0.5 мкм — хрупкость или малая жесткость кончика. Это не позволяет использовать их для внутриклеточного введения. Поэтому для внутриклеточной регистрации мембранных электрических характеристик наиболее удобными являются стеклянные микроэлектроды [10, 11].

Стеклянный микроэлектрод представляет собой стеклянную микропипетку с диаметром кончика около 0.5 мкм, которая заполняется раствором электролита (для внутриклеточных электродов — 2.5 М раствора KCl). Микроэлектроды готовили из капилляров с наружным диаметром 1.5 мм на специальной микрокузнице. Пригодность микроэлектрода определяется формой, размерами кончика и электрическим сопротивлением. Существуют различные способы заполнения микроэлектродов. Нами использовался способ заполнения через ствол без дополнительных воздействий. Заполнение происходило быстро благодаря нескольким тонким капиллярам внутри микропипетки. Заполненные электроды имели сопротивление 5–25 МОм.

Параметры фоновой активности интернейронов парietального ганглия виноградной улитки. Электрофизиологические измерения проводились по методике регистрации трансмембранного потенциала, позволяющей обнаружить возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП) с амплитудой от 0.3 мВ. В ходе эксперимента анализировали синаптический приток в премоторных гигантских интернейронах: LPa2, LPa3, RPa2 и RPa3. ВПСП определялись визуально по характерной форме изменения мембранного потенциала [11]. Параметры, способствующие регистрации ВПСП, были связаны с достижением минимальных шумов, усреднением полученных регистраций с необходимыми параметрами усреднения и подбором оптимальных масштабов отображения

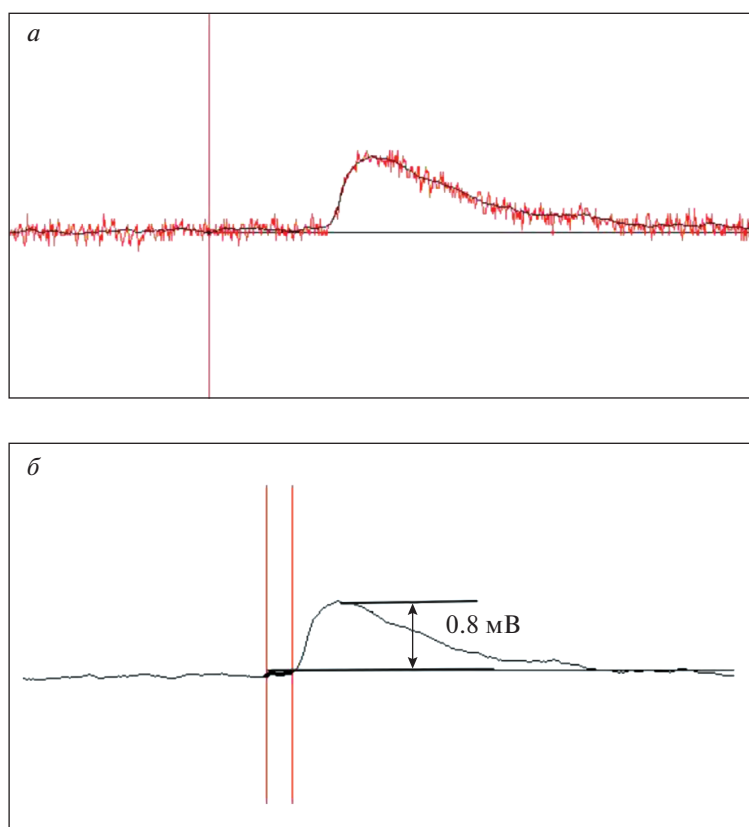


Рис. 1. Пример регистрации ВПСП (а) и способ вычисления его амплитуды (б). Усреднение по 100 точкам при шаге оцифровки сигнала 0.1 мс.

кривых. На основании серий длительных регистраций трансмембранных потенциалов молчащих премоторных нейронов, полученных в эксперименте, была разработана методика, позволяющая количественно оценить суммарный синаптический приток отдельного нейрона на основании регистраций мембранного потенциала длительностью в 30 мин.

Для описания наблюдаемых изменений мембранного потенциала интернейронов были выбраны следующие параметры синаптической фоновой активности интернейронов париетального ганглия: средняя амплитуда и среднее количество ВПСП. В качестве пороговой амплитуды ВПСП была принята величина 0.3 мВ, так как данная величина позволяла уверенно идентифицировать ВПСП на уровне шумов (рис. 1).

Статистическая обработка результатов. В работе приведены средние значения измеряемых величин и стандартные ошибки среднего. Достоверность отличий средних значений параметров между контрольной и экспериментальной группой проверяли при помощи непараметрического критерия Манна–Уитни. Была использована программа SigmaPlot 11. Статистическая значимость оценивалась по $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В фоновой электрической активности премоторных интернейронов наблюдались одиночные ВПСП различной амплитуды. Был проведен анализ частоты появления ВПСП в исследуемых нейронах у групп интактных животных (количество нейронов $n = 7$), у животных с УОР (количество нейронов $n = 7$) животных после инъекции 5-НТР (количество нейронов $n = 9$) и у животных, которых обучали после инъекции 5-НТР (количество нейронов $n = 9$). Все наблюдаемые ВПСП были разделены по величине их амплитуды на интервалы: 1) от 0.3 до 0.5 мВ, 2) от 0.5 до 1.0 мВ, 3) от 1.0 до 1.5 мВ, 4) от 1.5 до 2.0 мВ, 5) от 2.0 мВ до порога. Было найдено, что частота появления ВПСП амплитудой от 0.3 до 0.5 мВ значимо ($p < 0.05$) увеличивается в группе животных, которых обучали после инъекции 5-НТР (рис. 2). Также наблюдается недостоверная тенденция к увеличению количества ВПСП у группы 5-НТР + УОР по сравнению с группами 5-НТР и УОР. Достоверных изменений в частоте появлений ВПСП других амплитуд обнаружено не было (рис. 3–5).

Таким образом, наши эксперименты показали, что инъекция 5-НТР с последующим обучением у

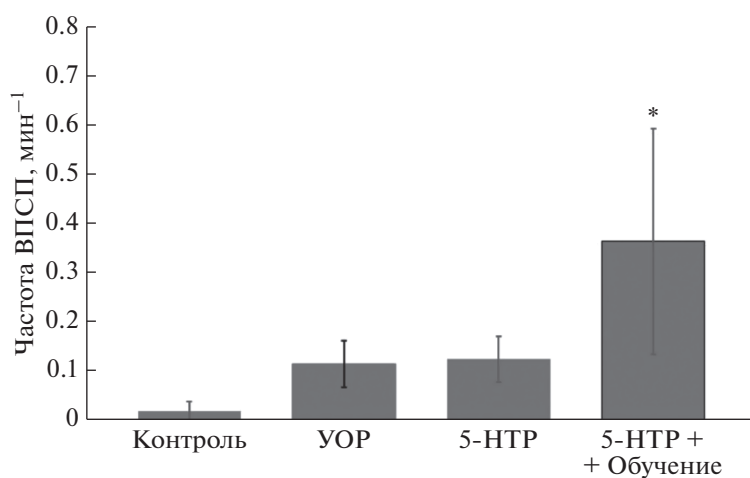


Рис. 2. Среднее значение количества одиночных ВПСР с амплитудой от 0.3 до 0.5 мВ; * — статистически значимое отличие группы от контроля при $p < 0.05$.

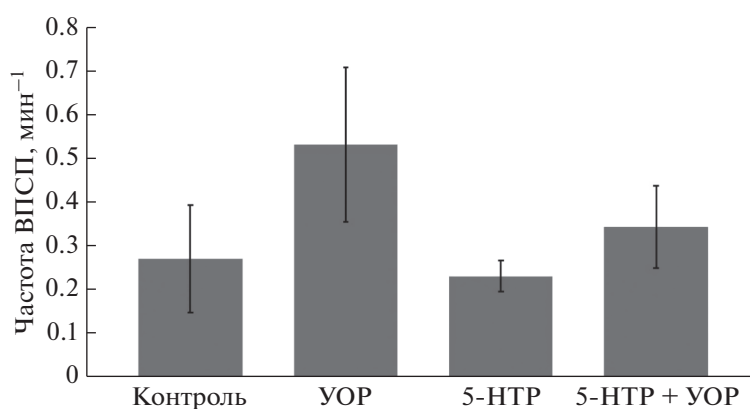


Рис. 3. Среднее значение количества одиночных ВПСР с амплитудой от 0.5 до 1 мВ.

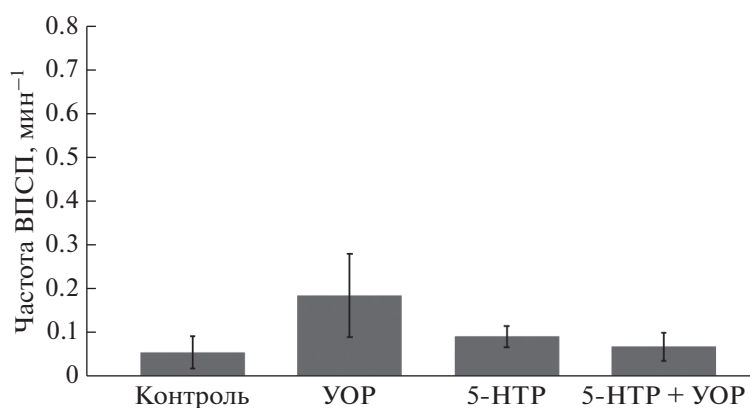


Рис. 4. Среднее значение количества одиночных ВПСР с амплитудой от 1 до 1.5 мВ.

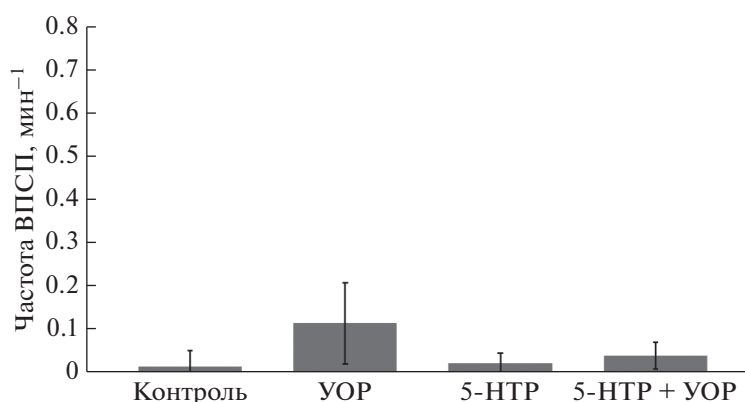


Рис. 5. Среднее значение количества одиночных ВПСП с амплитудой от 1.5 до 2 мВ.

виноградной улитки приводит к достоверному увеличению частоты появлений ВПСП амплитудой от 0.3 до 0.5 мВ. При этом наблюдалась недостоверная тенденция к увеличению количества ВПСП этого интервала амплитуд после отдельной выработки условного оборонительного рефлекса аверсии на пищу, а также в группе с отдельными инъекциями 5-НТР. Это увеличение количества низкоамплитудных одиночных ВПСП может говорить либо об увеличении количества потенциалов действия в соответствующих пресинаптических нейронах, либо об увеличении амплитуды ВПСП, ранее не поддававшихся обнаружению. Предпринятый нами анализ подпороговой фоновой активности молчащих премоторных интернейронов оборонительного поведения виноградной улитки позволил найти изменения в синаптическом входе, связанные с воздействием предшественника синтеза серотонина 5-НТР, а также с выработкой условного оборонительного рефлекса пищевой аверсии на фоне аппликации 5-НТР.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Соответствие принципам этики. Все экспериментальные процедуры были выполнены с соблюдением правил и норм этического комитета Казанского федерального университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Losonczy A., Makara J.K., Magee J.C. 2008. Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. *J. Nature*. **27** (452), 436–441.
2. Lisman J., Cooper K., Sehgal M., Silva A.J. 2018. Memory formation depends on both synapse-specific modifications of synaptic strength and cell-specific increases in excitability. *Nat. Neurosci.* **21** (3), 309–314.
3. Bliss T.V., Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* **2** (232), 331–356.
4. Балабан П.М., Коршунова Т.А. 2011. Сетевые, клеточные и молекулярные механизмы пластичности в простых нервных системах. *Успехи физиол. наук.* **42** (4), 3–19.
5. Гайнутдинов Х.Л., Андрианов В.В., Гайнутдинова Т.Х. 2011. Изменение возбудимости нейрональной мембраны как клеточный механизм обучения и памяти. *Успехи физиол. наук.* **42** (1), 33–50.
6. Andrianov V.V., Bogodvid T.K., Deryabina I.B. 2015. Modulation of defensive reflex conditioning in snails by serotonin. *Front. Behav. Neurosci.* **9**, 279.
7. Науменко Е.В., Попова Е.К. 1975. Серотонин и мелатонин в регуляции эндокринной системы. Новосибирск: Наука. 220 с.
8. Гайнутдинов Х.Л., Андрианов В.В., Гайнутдинова Т.Х., Тарасова Е.А. 1998. Электрические характеристики командных и моторных нейронов при выработке условного оборонительного рефлекса и формирования долговременной сенситизации у улиток. *Журн. высш. нервн. деят.* **48** (6), 1004–1013.
9. Deryabina I.B., Muranova L.N., Andrianov V.V., Gainutdinov K.L. 2018. Impairing of serotonin synthesis by *p*-chlorphenylalanine prevents the forgetting of contextual memory after reminder and the protein synthesis inhibition. *Front. Pharmacol.* **9**, 607.
10. Палихова Т.А., Маракуева И.В., Аракелов Г.Г. 1992. Моно- и полисинаптические связи между идентифицированными нейронами в системе пассивно-оборонительного рефлекса виноградной улитки. *Журн. высш. нервн. деят.* **42** (6), 1170–1179.
11. Балабан П.М., Захаров И.С. 1992. *Обучение и развитие. Общая основа двух явлений.* М.: Наука. 150 с.

Action of Serotonin Precursor Synthesis 5-Oxytryptophan on EPSP Recorded in Premotor Interneurons of Snail after Formation of Conditioned Defensive Reflex

A. I. Arslanov^{1, *}, D. I. Silantyeva¹, V. V. Andrianov^{1, 2}, I. B. Deryabina¹, Kh. L. Gainutdinov^{1, 2}

¹Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

²Zavoisky Physical-Technical Institute of the Federal Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Kazan, 420029 Russia

*e-mail: arslanov-1999@mail.ru

A quantitative study of subthreshold excitatory postsynaptic potentials (EPSP) recorded intracellularly in giant premotor interneurons of the terrestrial snail was carried out after the formation of a conditioned defensive reflex of food aversion in snails with increased level of serotonin. The results showed a significant increase in the number of low-amplitude EPSP with an amplitude from 0.3 to 0.5 mV in the giant premotor interneurons of defensive behavior after learning and increasing the level of serotonin. The observed increase in the number of EPSP may indicate either an increase in the number of action potentials in the corresponding presynaptic neurons or an increase in the amplitudes of the EPSP that were previously undetectable.

Keywords: neuron, training, EPSP, synaptic plasticity, membrane potential, serotonin