

© Л.И.Хожай, Н.В.Ильичева, 2016
УДК 611.018.8:612.65:636.92

Л.И.Хожай¹, Н.В.Ильичева²

СТАНОВЛЕНИЕ ГАМК-ЕРГИЧЕСКОЙ НЕЙРАЛЬНОЙ СЕТИ В ВЕНТРОЛАТЕРАЛЬНОЙ ЧАСТИ ЯДРА ОДИНОЧНОГО ТРАКТА В НОРМЕ И ПРИ ПРЕНАТАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ СЕРОТОНИНА У КРЫС

¹ Лаборатория онтогенеза нервной системы (зав. — чл.-кор. РАН В.А.Отеллин), ФГБУН Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН; ² группа некодирующей ДНК (руков. — проф. О.И.Подгорная), ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Изучена динамика формирования тормозной нейральной ГАМК-ергической сети в вентральном и латеральном субъядрах ядра одиночного тракта (ЯОТ) в раннем постнатальном периоде у крыс Вистар в норме и при пренатальном дефиците серотонина (n=27). Был применен метод иммуоцитохимического выявления ГАМК-ергических нейронов с использованием кроличьих поликлональных антител к GAD-67. Обнаружено, что в исследованных субъядрах ЯОТ в 1-ю неделю постнатального развития имеет место высокая экспрессия ГАМК, о чем свидетельствует значительное количество GAD-67-иммуопозитивных нейронов, при этом в вентральном субъядре их почти в 1,3 раза больше, чем в латеральном. В течение 2-й и 3-й недели происходит снижение экспрессии ГАМК и одновременно с этим в нейропиле обоих субъядер увеличивается плотность сети терминалей и расположения синаптических структур, содержащих ГАМК. Показано, что пренатальная недостаточность серотонина в вентральном и латеральном субъядрах ЯОТ вызывает резкое снижение экспрессии ГАМК в ранние постнатальные сроки развития. В нейропиле к концу 3-й недели сохраняется рыхлая сеть ГАМК-ергических терминалей и увеличивается плотность расположения синаптических структур.

Ключевые слова: *ядро одиночного тракта, респираторные субъядра, ГАМК, серотонин, ранний постнатальный период*

В каудальной части ядра одиночного тракта (ЯОТ) расположены вентральное и латеральное субъядра, входящие в состав бульбарного дыхательного центра. Значительный объем информации, поступающей в эти субъядра, определяет основную их функцию, заключающуюся в восприятии и обработке поступающих в данную область афферентных сигналов [4]. Основная часть нейронов, составляющих вентральное и латеральное субъядра ЯОТ, являются нейронами типа $R\alpha$, контролирующими процесс вдоха, со снижающейся и $R\beta$ — повышающейся биоэлектрической активностью при растяжении легких. Установлено наличие моносинаптических связей между нейронами ЯОТ и диафрагмальными мотонейронами, непосредственно участвующими в формировании глубины, частоты и ритма дыхания [6]. Функции ЯОТ обеспечиваются комплексом «классических» нейромедиаторов, включая гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), серотонин, глицин, глутамат, пептиды, а также их специфические рецепторы. Одним из основных нейротрансмиттеров является тормозный — ГАМК.

У взрослых животных в ЯОТ ГАМК-ергические нейроны диффузно рассеяны и обнаруживаются на всей площади каудальной части ядра, а непосредственно в вентролатеральной части ЯОТ выявлены ГАМК-ергические терминали и синапсы [2, 3, 7]. Данные, полученные в результате физиологических экспериментов, показали, что передача импульсов, опосредованная ГАМК, оказывает сильное тормозное действие на деятельность нейронов ЯОТ и более того играет важную роль в поддержании нормального ритма дыхания как у взрослых, так и у новорожденных животных [12, 16]. Считают, что вентролатеральная часть ЯОТ играет центральную роль в контроле фаз респираторного цикла, однако мало известно о формировании здесь локальной нейральной тормозной сети в ранний постнатальный период, когда происходит созревание респираторной функции у млекопитающих животных и человека. Установлено, что у взрослых животных ГАМК- и серотонинергическая (5-НТ) системы оказывают влияние на многие популяции нейронов продолговатого мозга, регулируя общий ней-

Сведения об авторах:

Хожай Людмила Ивановна (e-mail: astarta0505@mail.ru), лаборатория онтогенеза нервной системы, Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

Ильичева Надежда Викторовна (e-mail: nad9009@yandex.ru), группа некодирующей ДНК, Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

ротрансмиттерный гомеостаз в этой области [15, 18]. Показано, что не только ГАМК регулирует активность нейронов вентролатеральной части ЯОТ, участвующих в респираторном процессе, но и непосредственно серотонин через проекции из каудальных 5-НТ-ергических ядер шва с вовлечением рецепторного звена 5-НТ1А и 5-НТ1В [15, 18]. Однако крайне мало известно о влиянии серотонина на становление тормозной ГАМК-ергической сети и механизмах синтеза ГАМК, а также контроля передачи его опосредованных импульсов в респираторных ядрах в период раннего развития. В связи с этим целью настоящей работы было изучить динамику формирования тормозной ГАМК-ергической системы в раннем постнатальном периоде в норме и при пренатальном дефиците серотонина.

Материал и методы. Исследование проведено на крысах линии Вистар. Содержание животных и все экспериментальные процедуры осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Уровень эндогенного серотонина снижали путем ингибирования триптофангидроксилазы (фермента его синтеза) пара-хлорфенилаланином (пХФА) (Sigma, США). пХФА в дозе 400 мг/кг самкам крыс вводили внутривентрикулярно на 9-е сутки беременности, при этом снижение содержания серотонина до 50–80% происходило в период формирования у плодов собственной серотонинергической системы [1, 14]. Головной мозг у родившихся крысят исследовали на 5-, 9-е и 20-е сутки. В качестве контроля использовали животных соответствующих сроков развития, полученных от интактных самок (по 4–5 как контрольных, так и подопытных крысят каждого срока развития — всего 27). Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (рН 7,4), заливали в парафин по общепринятой методике и готовили серийные поперечные срезы продолговатого мозга толщиной 5 мкм на уровне Bregma –12,24, –12,36 мм [17].

Иммуноцитохимическую реакцию для выявления ГАМК-ергических нейронов проводили с использованием кроличьих поликлональных антител к GAD-67 (Spring Bioscience, США). В качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США). Для визуализации продукта реакции применяли хромоген DAB+ (Dako, Дания). После проведения иммуноцитохимической реакции часть срезов докрашивали тионином (Serva, США, Германия) и заключали в синтетическую среду Permaunt (Termo, США). Иммуноцитохимические реакции у контрольных и подопытных животных осуществляли одновременно.

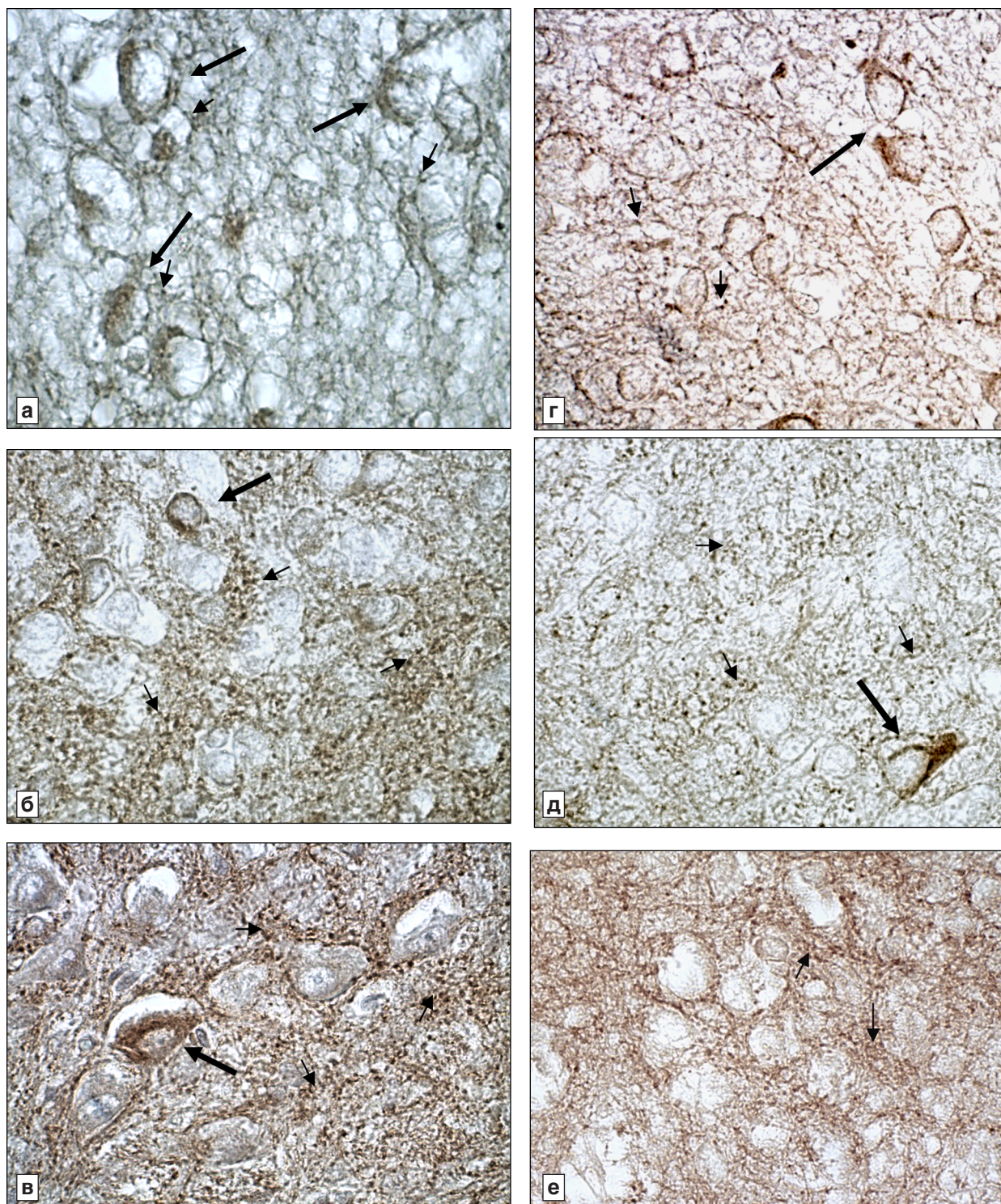
Морфологический анализ и морфометрическое исследование проводили на цифровых изображениях серийных срезов, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия). GAD-67-иммунопозитивные (ИП) нейроны подсчитывали на 8–10 серийных срезах продолговатого мозга (вентролатеральной части ЯОТ), на стандартной площади гистологического среза, равной 0,105 мм² при об. 40, учитывали плотность сети ИП-терминальных отростков в нейропиле и плотность распределения ИП-гранул, которые

принято считать синаптическими структурами, их скопления, а также присутствие терминальных варикозных расширений, свидетельствующих о незрелости терминалей [10]. Статистическую обработку полученных показателей осуществляли при помощи прикладных компьютерных программ Statistica 6.0., ImageScope Color и ORIGIN50. Значимость различий определяли по величине t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. У контрольных животных в вентральном субъядре ЯОТ на 5-е сутки на срезе выявляется $6,3 \pm 0,8$ GAD-67-ИП-нейронов. В нейропиле присутствуют рыхлая сеть ИП-терминалей и одиночные крупные гранулы, располагающиеся как на отростках, так и на телах нейронов (рисунк, а). На 9-е сутки число ИП-нейронов значимо снижается до $1,8 \pm 0,6$ на срезе. В нейропиле плотность расположения ИП-отростков и гранул немного повышается (см. рисунок, б). Встречаются группы крупных гранул (по 3–4) как на поверхности отростков, так и на телах нейронов. На 20-е сутки число ИП-нейронов невелико и практически соответствует таковому в предыдущий срок исследования — $1,5 \pm 0,3$ на срезе. В нейропиле присутствуют плотная сеть ИП-отростков и крупные гранулы, которые локализуются на поверхности тел нейронов и на отростках преимущественно группами (см. рисунок, в).

В латеральном субъядре ЯОТ на 5-е сутки имеются небольшое число GAD-67-ИП-нейронов ($4,9 \pm 0,8$ на срезе), в нейропиле — рыхлая сеть ИП-отростков, мелкие и одиночные крупные гранулы, расположенные на отростках и телах нейронов. На 9-е сутки число ИП-нейронов снижается до $1,1 \pm 0,3$ на срезе. В нейропиле ИП-отростки образуют более плотную сеть, чем на 5-е сутки, повышается и плотность расположения крупных ИП-гранул, они располагаются как одиночно, так и группами по 3–5 как на отростках, так и на телах нейронов. На 20-е сутки в субъядре насчитывается $0,9 \pm 0,7$ ИП-нейронов. В нейропиле выявляется плотная сеть ИП-отростков, увеличивает и плотность расположения крупных гранул, локализующихся на поверхности тел нейронов и в нейропиле, где встречаются преимущественно их группы.

У животных с пренатальной недостаточностью серотонина на 5-е сутки как в вентральном, так и в латеральном субъядрах ЯОТ на срезе присутствуют $1,7 \pm 0,8$ GAD-67-ИП-нейронов, в нейропиле — рыхлая сеть ИП-отростков, единичные крупные гранулы, встречаются терминальные варикозные расширения (см. рисунок, г). На телах отдельных нейронов присутствуют от 1–3 гранул. На 9-е сутки в обоих субъядрах на срезе выявляются $1,2 \pm 0,6$ ИП-нейронов. В ней-



Вентральное субъядро ядра одиночного тракта мозга крысы в контроле (а–в) и при пренатальном дефиците серотонина (г–е) на 5- (а, г), 9-е (б, д) и 20-е (в, е) сутки после рождения.

Длинные стрелки — GAD-67-иммунопозитивные нейроны; короткие стрелки — крупные иммунопозитивные гранулы и их скопления. Иммуноцитохимическая реакция на GAD-67. Об. 100, ок. 10

ропиле — рыхлая сеть ИП-отростков (см. рисунок, д), также, как и в предыдущий срок исследования, встречаются варикозные расширения терминальных отростков, при этом повышается плотность расположения крупных гранул как в

нейропиле, так и на телах нейронов. На 20-е сутки в обоих субъядрах ЯОТ ИП-нейроны единичны. В нейропиле — рыхлая сеть ИП-отростков, однако, плотность расположения крупных гранул близка к таковой в контроле, встречаются они

как одиночные, так и образующие группы — по 3–6. На телах почти всех нейронов располагаются группы по 8–10 крупных гранул.

Обсуждение полученных данных. Проведенное исследование показало, что в вентральном и латеральном субъядрах ЯОТ в 1-ю неделю постнатального развития имеет место экспрессия ГАМК, о чем свидетельствует присутствие GAD-67-ИП-нейронов, при этом в вентральном субъядре их в 1,3 раза больше, чем в латеральном и, вероятно, интенсивность экспрессии в нем также выше. В течение 2-й и 3-й недели происходит снижение числа GAD-67-ИП-нейронов и, видимо, можно предположить снижение экспрессии ГАМК. Одновременно с этим в нейропиле в обоих субъядрах происходит увеличение как плотности сети ИП-терминалей, так и расположения синаптических структур, преимущественно группами локализующихся на отростках и телах нейронов. Полученные данные сравнимы с результатами исследования динамики формирования ГАМК-ергической сети во вкусовых субъядрах, располагающихся в ростральной части ЯОТ [11, 13]. Эти исследователи обнаружили, что в первые 2 нед постнатального развития ГАМК присутствует в цитоплазме многих нейронов субъядер и их отростков, но в нейропиле выявляется незначительное количество терминалей и синапсов, содержащих ГАМК, и предположили, что избыток экспрессии ГАМК и недостаток ГАМК-ергических терминалей и синапсов свидетельствуют о том, что в ранние сроки постнатального развития ЯОТ ГАМК может выполнять не транзиттерную, а нейротрофическую функцию. Результаты ряда наблюдений [8, 19] показали, что в 1-ю и 2-ю неделю постнатального развития имеет место незрелость ГАМК-ергических синаптических структур. Такая незрелость синапсов в ранние сроки развития была подтверждена электрофизиологическими данными.

Установлено, что в ростральной части ЯОТ к концу 3-й недели (к 20-м суткам) общий объем экспрессируемой ГАМК снижается, а плотность сети терминалей и плотность расположения синаптических структур, содержащих ГАМК, увеличиваются и соответствуют таковым у взрослых [5, 11]. Результаты нашего исследования согласуются с этими данными и на их основании можно полагать, что формирование тормозной ГАМК-ергической сети в ростральной (вкусовые субъядра) и каудальной (респираторные субъядра) частях ЯОТ происходит сходным образом.

Было показано [9], что в ЯОТ элементы тормозной ГАМК-ергической системы появляются еще в пренатальный период. Отдельные ГАМК-

ергические аксонные терминали регистрировались на 20-е сутки внутриутробного развития. Впоследствии происходило постепенное повышение плотности расположения тормозных аксонных терминалей в нейропиле до конца 2-й недели постнатального развития. Появление ГАМК-ергических синаптических структур было отмечено только после рождения, и затем в течение первых недель постнатального развития происходило увеличение плотности их расположения как в нейропиле, так и на телах нейронов, что также подтверждают наши наблюдения.

Результаты нашего исследования показали, что пренатальная недостаточность серотонина оказывает влияние на формирование тормозной системы и в вентральном и латеральном субъядрах. В 1-ю неделю постнатального развития, по сравнению с контролем, присутствует значительно меньшее число GAD-67-ИП-нейронов, следовательно, можно полагать, что и экспрессия ГАМК будет существенно ниже, чем у контрольных животных. В нейропиле к концу 3-й недели, в отличие от контроля, сохраняется рыхлая сеть ИП-терминалей, однако, плотность распределения ГАМК-ергических синаптических структур несколько увеличивается только к концу 3-й недели. Вероятно, дефицит серотонина в пренатальный период может вызывать либо задержку, либо нарушение миграции предшественников ГАМК-ергических нейронов, а также задержку их дифференцировки и, как следствие, формирования сети терминалей и синаптических структур. Более того, у крысят через 2 нед постнатального развития в отличие от контроля обнаруживаются варикозные расширения аксонных терминалей, что свидетельствует о их незрелости [10]. В результате этих изменений, вероятно, происходят снижение экспрессии тормозного транзиттера ГАМК и значительное нарушение его передачи. Полученные результаты дают основание предположить, что дисфункция серотонин-ергической системы в пренатальный период может быть причиной реорганизации тормозной ГАМК-ергической системы в дыхательных субъядрах ЯОТ в ранний постнатальный период, являющийся критическим для развивающейся респираторной системы у млекопитающих, и впоследствии вызывать функциональные респираторные нарушения.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-02167.

ЛИТЕРАТУРА

1. Попова Н.К., Никулина Э.М., Арав В.Н., Кудрявцева Н.Н. О роли серотонина в одном из видов агрессивного поведения // Физиол. журн. 1975. Т. 61, № 2. С. 183–186.

2. Austgen J.R., Fong A.Y., Foley C.M. et al. Expression of group I metabotropic glutamate receptors on phenotypically different cells within the nucleus of the solitary tract in the rat // *Neuroscience*. 2009. Vol. 159, № 2. P. 701–716.
3. Bailey T.W., Appleyard S.M., Jin Y.H., Andresen M.C. Organization and properties of GABAergic neurons in solitary tract nucleus (NTS) // *J. Neurophysiol.* 2008. Vol. 99, № 4. P. 1712–1722.
4. Bonham A.C., McCrimmon D.F. Neurons in the discrete region of the nucleus tractus solitarius are required for the Hering-Breuer reflex in rat // *J. Physiol.* 1990. Vol. 427. P. 261–280.
5. Brown M., Renahan W.E., Schweitzer L. Changes in GABA-immunoreactivity during development of the rostral subdivision of the nucleus of the solitary tract (rNST) // *Neuroscience*. 2000. Vol. 100. P. 849–859.
6. Castro D., Lipaki T., Kanihan R. et al. Electrophysiological study of dorsal respiratory neurons in the medulla oblongata of the rat // *Brain Res.* 1994. Vol. 639, № 1. P. 49–56.
7. Chan R.K., Sawchenko P.E. Organization and transmitter specificity of medullary neurons activated by sustained hypertension: implications for understanding baroreceptor reflex circuitry // *J. Neurosci.* 1998. Vol. 18, № 1. P. 371–387.
8. Du J., Bradley R.M. Effects of GABA on acutely isolated neurons from the gustatory zone of the rat nucleus of the solitary tract // *Chem. Senses*. 1998. Vol. 23. P. 683–688.
9. Dufour A., Tell F., Baude A. Perinatal development of inhibitory synapses in the nucleus tractus solitarius of the rat // *Eur. J. Neurosci.* 2010. Vol. 32, № 4. P. 538–549.
10. Guthmann A., Fritschy J.M., Ottersen O.P. et al. GABA, GABA transporters, GABA (A) receptor subunits and GAD mRNAs in the rat parabrachial and Kölliker-Fuse nuclei // *J. Comp. Neurol.* 1998. Vol. 400, № 2. P. 229–243.
11. Heck W.L., Basaraba A.M., Slusarczyk A., Schweitzer L. Early GABA-A receptor clustering during the development of the rostral nucleus of the solitary tract // *J. Anat.* 2003. Vol. 202, № 4. P. 387–396.
12. Kuwana S., Okada Y., Sugawara Y. et al. Disturbance of neural respiratory control in neonatal mice lacking GABA synthesizing enzyme 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase // *Neuroscience*. 2003. Vol. 120, № 3. P. 861–870.
13. Lauder J.M., Liu J., Devaud L., Morrow L.A. GABA as a trophic factor for developing monoamine neurons // *Perspect. Dev. Neurobiol.* 1998. Vol. 5. P. 247–259.
14. Lauder J.M., Towle A.C., Patrick K. et al. Decreased serotonin content of embryonic raphe neurons following maternal administration of p-chlorophenylalanine: a quantitative immunocytochemical study // *Dev. Brain Res.* 1985. Vol. 20, № 1. P. 107–114.
15. Liu Q., Wong-Riley M.T. Postnatal changes in the expressions of serotonin 1A, 1B, and 2A receptors in ten brain stem nuclei of the rat: implication for a sensitive period // *Neuroscience*. 2000. Vol. 165. P. 61–78.
16. McDougall S.J., Bailey T.W., Mendelowitz D., Andresen M.C. Propofol enhances both tonic and phasic inhibitory currents in second-order neurons of the solitary tract nucleus (NTS) // *Neuropharmacology*. 2008. Vol. 54, № 3. P. 552–563.
17. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th edn. Sydney: Academic Press, 2004.
18. Serrats J., Mengod G., Cortes R. Expression of serotonin 5-HT_{2C} receptors in GABAergic cells of the anterior raphe nuclei // *J. Chem. Neuroanat.* 2005. Vol. 29. P. 83–91.
19. Wang L., Bradley R.M. Influence of GABA on neurons of the gustatory zone of the rat nucleus of the solitary tract // *Brain Res.* 1993. Vol. 616. P. 44–153.

Поступила в редакцию 18.04.2016

FORMATION OF THE GABAERGIC NEURAL NETWORK IN VENTROLATERAL PARTS OF THE OF SOLITARY TRACT NUCLEUS IN NORM AND AFTER PRENATAL SEROTONIN DEFICIENCY

L.I. Khozhai¹, N.V. Ilyichyova²

Dynamics of formation of inhibitory GABAergic network in ventral and lateral subnuclei of a solitary tract nucleus (STN) in the early postnatal period was studied under normal conditions and with prenatal deficiency of serotonin. To detect GABAergic neurons, immunocytochemical method was applied, with the use of rabbit polyclonal antibodies against GAD-67. It was found that in the first postnatal week, ventral and lateral STN subnuclei demonstrated high GABA expression as suggested by a significant number of GAD-67-immunopositive neurons; their number in the ventral subnucleus was almost 1,3 times higher than in the lateral one. During the second and third weeks, GABA expression decreased and, simultaneously, the density of terminals and synaptic structures containing GABA in neuropil of both subnuclei increased. It was shown that prenatal deficiency of serotonin in ventral and lateral STN subnuclei resulted in sharp decrease of GABA expression in the early postnatal period. By the end of the third week, a loose network of GABAergic terminals remained in the neuropil, and the density of synaptic structures increased.

Key words: solitary tract nucleus, respiratory nuclei, GABA, serotonin, early postnatal period

¹ Laboratory of Ontogenesis of Nervous System, RAS I.P. Pavlov of Institute of Physiology; ² Group of Noncoding DNA, RAS Institute of Cytology, St. Petersburg