

Л. И. Хожай

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ GLUR2-СУБЪЕДИНИЦЫ ИОНОТРОПНОГО РЕЦЕПТОРА ГЛУТАМАТА В ВЕНТРОЛАТЕРАЛЬНОЙ ЧАСТИ ЯДРА ОДИНОЧНОГО ТРАКТА В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ В НОРМЕ И ПРИ ПРЕНАТАЛЬНОМ ДЕФИЦИТЕ СЕРОТОНИНА

Лаборатория онтогенеза нервной системы (зав. — чл.-кор. РАН В. А. Отеллин), ФГБУН Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

В опытах на крысах Вистар (n=18) изучена динамика экспрессии субъединицы ионотропного рецептора глутамата (GluR2) в респираторных субъядрах (вентральном и латеральном) ядра одиночного пути (ЯОП). Наблюдения проводили в раннем постнатальном периоде (5-, 10-е и 20-е сутки, по 5–6 животных в группе) в норме и при пренатальном снижении содержания серотонина, которое осуществляли путем ингибирования триптофангидроксилазы параклорфенилаланином. Иммуноцитохимическое выявление GluR2 показало, что в ЯОП в ранние постнатальные сроки в респираторных субъядрах уровень его экспрессии примерно одинаков. К ювенильному возрасту происходит значительное повышение экспрессии GluR2 (в латеральном субъядре в 2 раза, в вентральном — в 2,6 раза). Пренатальный дефицит серотонина изменяет экспрессию GluR2 в респираторных субъядрах ЯОП. В ранние сроки имеется значительная задержка экспрессии GluR2, которая на 2-й неделе после рождения повышается до контрольных значений, однако к ювенильному возрасту экспрессия GluR2 ниже (в 2 раза), чем в контроле. Нарушение глутаматергической рецепторной сети в дыхательных ядрах может быть основой респираторных дисфункций.

Ключевые слова: ядро одиночного пути, респираторные субъядра, ионотропные рецепторы глутамата, серотонин

Одной из основных функций ядра одиночного пути (ЯОП) является интеграция информации, поступающей от внутренних органов [3], где респираторные, кардиоваскулярные и другие афферентные импульсы опосредуются глутаматом [5]. Вентральное и латеральное субъядра представляют собой группу дорсальных респираторных ядер и входят в состав бульбарного дыхательного центра. Значительная часть нейронов этих ядер являются инспирированными [3], регуляция взаимодействий между которыми осуществляется, главным образом, через высвобождение глутамата и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). Передача возбуждения, как правило, осуществляется действием глутамата на два основных ионотропных рецептора — NMDA (связывающего N-метил-D-аспартат) и AMPA (2-альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовую кислоту). AMPA является тетрамером, состоящим из субъединиц, сочетание которых определяет структуру, ионную селективность, проводимость и кинетику активации рецептора [22]. Установлено, что проницаемость для кальция AMPA-зависимых ионных каналов определяется наличием в составе рецептора субъединицы (GluR2), причем, как

полагают, приток кальция через синапсы в период активного синаптогенеза является необходимым для формирования и специализации структурных и функциональных свойств нейтральных сетей [9, 12]. Однако данных о динамике экспрессии GluR2 в респираторных субъядрах ЯОП в ранний постнатальный период (т. е. период созревания респираторной системы у млекопитающих и человека) практически нет.

В ЯОП серотонин (5-hydroxytryptamine; 5-HT), наряду с другими трансмисситами, также вовлекается в нейротрансмиссию глутамата из висцеральных афферентных окончаний [17]. В субъядрах ЯОП содержится значительное количество серотониновых волокон, которые, как показано, приходят из медуллярных ядер шва [20]. Установлено, что в ЯОП имеется постоянное спонтанное высвобождение серотонина из терминалей серотонинергических волокон, причем выделение медиатора является регулируемым при помощи системы его обратного захвата [7]. В ЯОП обнаружена самая интенсивная в мозгу экспрессия ионотропных рецепторов 5-HT. Эти пресинаптические рецепторы, активируемые 5-HT, вызывают высвобождение глутамата из афферентных терминалей, кото-

Сведения об авторе:

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

рый, в свою очередь, приводит к возбуждению постсинаптических нейронов в ЯОП [11, 14, 16]. Однако неизвестно, будет ли влиять пренатальное изменение содержания серотонина на экспрессию ионотропных глутаматных GluR2-содержащих рецепторов и, как следствие, на возбудимость нейральной сети. В связи с этим, цель настоящей работы — изучить динамику экспрессии GluR2 в респираторных субъядрах (вентральном и латеральном) ЯОП в ранний постнатальный период в норме и при пренатальном снижении содержания серотонина.

Материал и методы. Работа проведена на лабораторных крысах Вистар ($n=18$). Содержание животных и все экспериментальные процедуры проведены в соответствии с «Правилами содержания и проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Для снижения эндогенного содержания серотонина использовали метод ингибирования триптофангидроксилазы (фермента его синтеза) парахлорфенилаланином (пХФА) (Sigma, США), который вводили внутривентриально в дозе 400 мг/кг самкам на 9-е сутки беременности (для длительного снижения эндогенного содержания серотонина до 50–80% в период формирования у плодов ЯОП одиночного пути и собственной серотонинергической системы). Головной мозг у родившихся крысят исследовали на 5-, 10-е и 20-е сутки. В качестве контроля использовали животных соответствующих сроков развития, родившихся у интактных самок (по 5–6 крысят каждого срока как подопытных, так и контрольных). 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 11.88 — 12.00 [15].

Иммуноцитохимическую реакцию выявления ионотропного рецептора глутамата проводили с использованием мышиных моноклональных антител к GluR2 (Abcam, США). В качестве вторичных реагентов для выявления GluR2 использовали реактивы из набора EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США). Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). Клеточная локализация GluR2: плазмолемма, в цитоплазме — мембраны эндоплазматической сети, клеточные контакты — синапсы, постсинаптическая мембрана. Условия проведения иммуноцитохимической реакции были стандартизированы, все процедуры с гистологическими срезами продолговатого мозга, полученными от контрольных и подопытных животных, осуществляли одновременно. После проведения иммуноцитохимической реакции часть срезов докрашивали тионином (Serva, США, Германия) и заключали в синтетическую среду Permount (Thermo Fisher Scientific, США).

Морфологический анализ и количественное исследование проводили на цифровых изображениях серийных срезов, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия). Подсчитывали число иммунопозитивных нейронов на стандартной площади, равной 0,1 мм², и учитывали плотность сплетения терминальных отростков в нейропиле, определяли плотность распределения зерен и крупных гранул (последние, предположительно, считаются терминальными

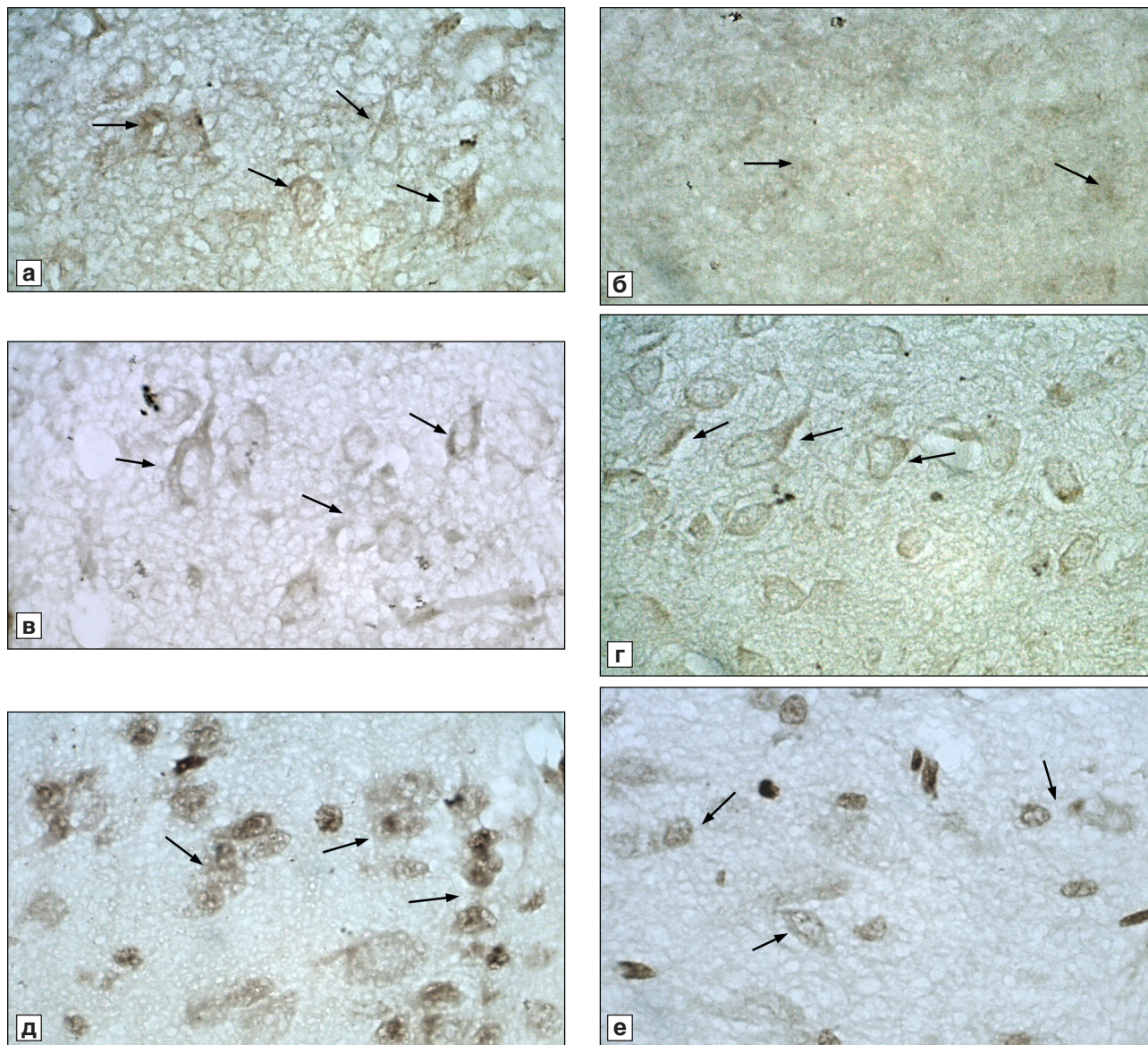
синаптическими структурами и их скоплениями) [10]. Для проведения оценки оптической плотности продукта реакции в цитоплазме нейронов и нейропиле использовали изображения, полученные с помощью цифровой видеокамеры, и программное обеспечение ВидеоТест Мастер Морфология (ООО «Видео Тест», Санкт-Петербург). Вычисляли среднее арифметическое значение и его ошибку, критическим уровнем значимости считали $P<0,05$, статистическую обработку проводили средствами анализа ANOVA (Statistica 7.0, Statsoft Inc., США).

Результаты исследования. Латеральное субъядро ЯОП. На 5-е сутки у контрольных животных на единице площади выявляются $16,3\pm 1,1$ нейронов со слабо окрашенной цитоплазмой (оптическая плотность равна 0,0751) (рисунк, а). На 9-е сутки число иммунопозитивных нейронов сохраняется — $15,7\pm 1,4$, но интенсивность реакции слегка увеличивается (0,0857) (см. рисунок, в). На 20-е сутки численность иммунопозитивных нейронов возрастает в 2 раза и составляет $31,6\pm 0,9$, а интенсивность реакции (0,0872) практически не меняется (см. рисунок, д). В нейропиле во все исследованные сроки слабо иммунопозитивные отростки образуют рыхлую сеть.

На 5-е сутки у экспериментальных животных в латеральном субъядре на единице площади выявляется $3,1\pm 0,3$ нейрона со слабо иммунопозитивной цитоплазмой (0,0491) (см. рисунок, б). В нейропиле практически нет иммунопозитивных отростков. На 9-е сутки выявляется $12,4\pm 1,2$ иммунопозитивных нейронов, интенсивность окраски цитоплазмы и сети отростков в нейропиле практически не изменяется (0,0489) (см. рисунок, г). На 20-е сутки число иммунопозитивных нейронов — $16,2\pm 1,5$, что в 2 раза меньше, чем в контроле, интенсивность иммунной реакции цитоплазмы и отростков слабая (0,0504) (см. рисунок, е).

Вентральное субъядро ЯОП. На 5-е сутки у контрольных животных в вентральном субъядре на единице площади выявляется $15,5\pm 1,6$ нейронов, имеющих слабую иммунопозитивную реакцию цитоплазмы (0,0714). На 9-е сутки число иммунопозитивных нейронов — $18,5\pm 1,3$ и интенсивность реакции цитоплазмы (0,0796) примерно соответствуют таковым на 5-е сутки. На 20-е сутки численность иммунопозитивных нейронов резко возрастает до $47,6\pm 1,8$ (в 2,6 раза), при этом интенсивность окрашивания увеличивается незначительно (0,0841). В нейропиле во все исследованные сроки слабо окрашенные отростки образуют рыхлую сеть.

На 5-е сутки у подопытных животных в вентральном субъядре иммунопозитивные нейроны не выявляются. В нейропиле окрашены отдельные отростки. На 9-е сутки число иммунопозитивных нейронов составляет $19,7\pm 1,2$, при этом интенсив-



Латеральное субъядро ядра одиночного пути у крысы на 5- (а, б), 9-е (в, г) и 20-е сутки (д, е), в контроле (а, в, д) и после пренатального дефицита серотонина (б, г, е).

а, б — уровень экспрессии GluR2 у подопытных животных по сравнению с контрольными более низкий; в, г — экспрессия GluR2 у подопытных крыс примерно соответствует таковой у контрольных; д — значительное число нейронов, экспрессирующих GluR2; е — небольшое число нейронов, экспрессирующих GluR2; стрелки — иммунопозитивные нейроны, отростки и гранулы; иммуногистохимическая реакция выявления GluR2. Об. 100, ок. 10

ность окрашивания цитоплазмы нейронов слабая (0,0412).

На 20-е сутки выявляется $17,6 \pm 1,8$ иммунопозитивных нейрона, что в 2,4 раза меньше, чем в контроле, интенсивность иммунной реакции не изменяется (0,0498).

Обсуждение полученных данных. Проведенное исследование показало, что в ЯОП в ранние постнатальные сроки в обоих респираторных субъядрах имеется примерно одинаковый уровень экспрессии GluR2-содержащих рецепторов, об этом свидетельствует как число нейронов, экспрессирующих GluR2, так и интенсивность иммуногистохимической реакции. К ювенильному

возрасту происходит значительное повышение экспрессии GluR2, в латеральном — в 2 раза, в вентральном субъядре — в 2,6 раза, при этом интенсивность реакции повышается незначительно (в 1,1 раза).

Установлено, что в эмбриогенезе у крыс нейроны ЯОП появляются рано между 10-ми и 14-и сутками развития, а афферентные волокна одиночного пути начинают появляться в ЯОП на 15-е сутки [2, 18], при этом слабая возбуждающая синаптическая активность здесь была зарегистрирована на 18-е сутки [23]. Исследования показали, что реакция на GluR2 выявлялась также на 18-е сутки, и места окрашивания практиче-

ски совпадали с точками при реакции на синаптофизин. Более того, локализация синаптических структур при выявлении GluR2, была подтверждена одновременным обнаружением глутаматергических терминалей [13]. Наблюдения показали, что между 18-и сутками внутриутробного развития и началом постнатального периода плотность GluR2-иммунопозитивных структур возрастала приблизительно в 3 раза, а в первую неделю после рождения и до 21-х суток она увеличивалась еще в 2 раза [4].

Полученные результаты подтверждают эти данные и свидетельствуют о том, что к ювенильному возрасту в респираторных субъядрах ЯОП происходит значительное увеличение экспрессии GluR2 (в 2–2,6 раза) по сравнению с таковой в ранний неонатальный срок. Установлено, что AMPA-рецептор является тетрамером, состоящим из различных комбинаций четырех основных субъединиц, называемых GluR1, GluR2, GluR3 и GluR4. AMPA-рецептор, не содержащий GluR2, является высокопроницаемым для ионов кальция [12], при этом присутствие одной GluR2-субъединицы в составе гетеромерного AMPA-рецептора обеспечивает его непроницаемость для ионов кальция [21].

Наблюдения показали, что в ходе раннего развития и формирования синаптических сетей сначала имеет место экспрессия AMPA-рецепторов, не содержащих GluR2-субъединицу, которая, впоследствии постепенно включается в его состав. Отмечено, что во время нейрального развития этот процесс является общим для других областей мозга [8, 12, 19]. Полагают, что в ранние сроки (во время раннего синаптогенеза) внутриклеточный приток кальция через AMPA-зависимые ионные каналы является важным в формировании и созревании синаптических структур, а также подчеркивают роль кальция в процессах, стимулирующих трансформацию самих синапсов [6, 12, 19], которые в результате определяют формирование структурных и функциональных свойств нейральных сетей. Более того, присутствие GluR2 в составе AMPA-рецептора влияет не только на проницаемость AMPA-зависимых каналов для ионов кальция, но и создает молекулярную основу для развития синаптической пластичности [12].

Установлено, что в ЯОП возбуждающие глутаматные ионотропные GluR2-содержащие рецепторы появляются в конце пренатального периода [13]. Результаты данного исследования показали, что в респираторных субъядрах ЯОП на ранних этапах перинатального периода экспрессия GluR2 начинает повышаться, а в постнатальный период к ювенильному возрасту значительно увеличивается. Вероятно, первые 3 нед постнатального раз-

вития в респираторных субъядрах ЯОП являются критическим периодом в формировании и созревании глутаматергической синаптической сети.

Установлено, что в ЯОП серотонин играет роль в трансмиссии глутамата. Его возбуждающее действие проявляется через активацию своих ионотропных рецепторов (5-НТ₃), локализующихся в основном пресинаптически на афферентных терминалях волокон одиночного пути [14, 16], что приводит к высвобождению глутамата, который, в свою очередь, вызывает активацию ионотропных постсинаптических AMPA-рецепторов и возбуждение нейронов ЯОП [11].

Результаты исследования показали, что в респираторных субъядрах ЯОП в ранний постнатальный период пренатальный дефицит серотонина изменяет экспрессию GluR2. В ранние сроки имеет место либо задержка экспрессии GluR2, либо незначительная его экспрессия. На 9-е сутки экспрессия GluR2 повышается и примерно соответствует таковой в контроле, однако, к ювенильному возрасту она не изменяется и оказывается в 2 раза ниже контрольных значений.

Такое снижение экспрессии GluR2, вероятно, может быть вызвано нарушением процессов синтеза рецепторных белков и сокращением их количества, что в результате будет приводить к нарушению формирования синапсов и возбуждающей глутаматергической рецепторной сети в постнатальный период, также одной из причин может быть уменьшение числа постсинаптических мишеней для афферентных волокон одиночного пути, являющееся результатом структурных нарушений развития самого ЯОП.

С другой стороны, вероятно, пренатальное снижение содержания серотонина может приводить к уменьшению количества серотониновых волокон, приходящих от медуллярных ядер шва, и, как следствие, вызывать вторичное снижение уровня высвобождаемого в ЯОП серотонина, а также к нарушению развития иннервации респираторных органов и уменьшению числа афферентных волокон, приходящих от них в ЯОП и, как результат, резкому снижению содержания рецепторов серотонина, локализующихся на их терминалях и участвующих в высвобождении глутамата.

Проведенное исследование показало, что в респираторных субъядрах ЯОП первые 3 нед постнатального периода развития являются критическими для формирования возбуждающей рецепторной сети. Выявленное снижение экспрессии возбуждающих глутаматных ионотропных GluR2-содержащих рецепторов, вызванное пренатальным дефицитом серотонина [1], будет несомненно нарушать нормальный баланс воз-

буждения и торможения в респираторных субъядрах уже в ранние сроки развития и приводить к респираторным дисфункциям.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-02167.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хожай Л.И., Шишко Т.Т. Изменение структурной организации бледного ядра шва при снижении содержания эндогенного серотонина в пренатальный период развития у крыс // Морфология. 2013. Т. 143, вып. 2. С. 75–78.
2. Altman S., Bayer S.A. Development of the brain stem in the rat. I. Thymidine-autoradiographic study of the origin of neurons of the lower medulla // J. Comp. Neurol. 1980. Vol. 194. P. 1–25.
3. Andresen M.C., Kunze D.L. Nucleus tractus solitarius-gateway to neural circulatory control // Annu. Rev. Physiol. 1994. Vol. 56. P. 93–116.
4. Balland B., Lachamp P., Strube C. et al. Glutamatergic synapses in the rat nucleus tractus solitarius develop by direct insertion of calcium-impermeable AMPA receptors and without activation of NMDA receptors // J. Physiol. 2006. Vol. 574, № 1. P. 245–61.
5. Baude A., Strube C., Tell F., Kessler J.P. Glutamatergic neurotransmission in the nucleus tractus solitarius: structural and functional characteristics // J. Chem. Neuroanat. 2009. Vol. 38. P. 145–153.
6. Bregestovski P., Spitzer N. Calcium in the function of the nervous system: new implications // Cell Calcium. 2005. Vol. 37. P. 371–374.
7. Daws L.C. Unfaithful neurotransmitter transporters: focus on serotonin uptake and implications for antidepressant efficacy // Pharmacol. Ther. 2009. Vol. 121. P. 89–99.
8. Furuta A., Martin L.J. Laminar segregation of the cortical plate during corticogenesis is accompanied by changes in glutamate receptor expression // J. Neurobiol. 1999. Vol. 39. P. 67–80.
9. Geiger J.R., Melcher T., Koh D.S. et al. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca^{2+} permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS // Neuron. 1995. Vol. 15. P. 193–204.
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. Jeggo R.D., Kellett D.O., Wang Y. et al. The role of central 5-HT₃ receptors in vagal reflex inputs to neurones in the nucleus tractus solitarius of anaesthetized rats // J. Physiol. 2005. Vol. 566. P. 939–953.
12. Kumar S.S., Bacci A., Kharazia V., Huguenard J.R. A developmental switch of AMPA receptor subunits in neocortical pyramidal neurons // J. Neurosci. 2002. Vol. 22. P. 3005–3015.
13. Lachamp P., Crest M., Kessler J.P. Vesicular glutamate transporters type 1 and 2 expression in axon terminals of the rat nucleus of the solitary tract // Neuroscience. 2006. Vol. 137. P. 73–81.
14. Leslie R.A., Reynolds D.J.M., Andrews P.L.R. et al. Evidence for presynaptic 5-hydroxytryptamine₃ recognition sites on vagal afferent terminals in the brainstem of the ferret // Neuroscience. 1990. Vol. 38. P. 667–673.
15. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th edn. Sydney: Acad. Press, 2004.
16. Pratt G.D., Bowery N.G. The 5-HT₃ receptor ligand, [³H]BRL 43694, binds to presynaptic sites in the nucleus tractus solitarius of the rat // Neuropharmacology. 1989. Vol. 28. P. 1367–1376.
17. Ramage A.G., Villalón C.M. 5-Hydroxytryptamine and cardiovascular regulation // Trends Pharmacol. Sci. 2008. Vol. 29. P. 472–481.
18. Rinaman L., Levitt P. Establishment of vagal sensorimotor circuits during fetal development in rats // J. Neurobiol. 1993. Vol. 24. P. 641–659.
19. Rohrbough J., Spitzer N.C. Ca^{2+} -permeable AMPA receptors and spontaneous presynaptic transmitter release at developing excitatory spinal synapses // J. Neurosci. 1999. Vol. 19. P. 8528–8541.
20. Schaffar N., Kessler J.P., Bosler O., Jean A. Central serotonergic projections to the nucleus tractus solitarius: evidence from a double labeling study in the rat // Neuroscience. 1988. Vol. 26. P. 951–958.
21. Washburn M.S., Numberger M., Zhang S., Dingledine R. Differential dependence on GluR2 expression of three characteristic features of AMPA receptors // J. Neurosci. 1997. Vol. 17. P. 9393–9406.
22. Wu G., Malinow R., Cline H.T. Maturation of a central glutamatergic synapse // Science. 1996. Vol. 274. P. 972–976.
23. Zhang L.L., Ashwell K.W. The development of cranial nerve and visceral afferents to the nucleus of the solitary tract in the rat // Anat. Embryol. 2001. Vol. 204. P. 135–151.

Поступила в редакцию 22.02.2017

DYNAMICS OF THE EXPRESSION OF IONOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR GLUR2 SUBUNIT IN THE VENTROLATERAL PART OF A SOLITARY TRACT NUCLEUS IN THE EARLY POSTNATAL PERIOD IN NORM AND IN PRENATAL SEROTONIN DEFICIENCY

L.I. Khozhai

In the experiments on Wistar rats (n=18), the dynamics of ionotropic glutamate receptor GluR2 subunit expression was studied in respiratory subnuclei (ventral and lateral) of the solitary tract nucleus (STN). The observations were performed in the early postnatal period (days 5, 10 and 20; 5–6 animals in each group) in norm and after prenatal serotonin depletion, which was achieved by inhibition a tryptophan hydroxylase by para-chlorophenylalanine. Immunocytochemical demonstration of GluR2 has shown that its expression was approximately equal in both respiratory subnuclei during the early postnatal period. By the juvenile age, there was a significant increase of GluR2 expression (2-fold in lateral subnuclei and 2,6-fold in ventral subnuclei). Prenatal serotonin deficiency changed the expression of GluR2 in respiratory subnuclei of STN. In the early postnatal period, the significant delay of GluR2 expression, that raised to control values by the second postnatal week, however by juvenile age the expression of GluR2 was twice lower than in the control. Disturbances of glutamatergic receptor network in the respiratory subnuclei can be the basis for the respiratory dysfunctions.

Key words: *solitary tract nucleus, respiratory subnuclei, ionotropic glutamatergic receptors, serotonin*

Laboratory of the Nervous System Ontogenesis, RAS I.P.Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg