

© Л. И. Хожай, В. А. Отеллин, 2012
УДК 612.018:611.817.41:599.323.4

Л. И. Хожай и В. А. Отеллин

УЧАСТИЕ СЕРОТОНИНА В МЕХАНИЗМАХ СТАНОВЛЕНИЯ ДВИГАТЕЛЬНОГО ЯДРА ТРОЙНИЧНОГО НЕРВА

Лаборатория онтогенеза нервной системы (зав. — чл.-кор. РАМН проф. В. А. Отеллин), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И. П. Павлова» РАН, Санкт-Петербург

На 21 самке крыс Вистар изучали становление в раннем постнатальном периоде двигательного ядра тройничного нерва (ДЯТН) у животных, получавших на 16-е сутки внутриутробного развития (период формирования серотонинергической системы) ингибитор синтеза серотонина параклорфенилаланин. Показано, что недостаток серотонина в пренатальный период у крыс приводит к изменениям структурной организации ДЯТН. В начальные сроки постнатального развития имеют место задержка развития нейропиля, уменьшение размеров тел нейронов, в некоторых из них — частичная утрата хроматофильного вещества, присутствие во всех частях ядра и особенно в его вентролатеральной части погибающих нейронов с признаками гиперхроматоза. Далее гибель мотонейронов замедляется, хотя часть из них имеют морфологические отклонения. При увеличении постнатального возраста (к 20-м суткам) происходит снижение численности мотонейронов, видимо, в результате постепенного усиления клеточной гибели. Одновременно с дегенерацией мотонейронов в исследованных частях ДЯТН наблюдается астроцитарный глиоз.

Ключевые слова: двигательное ядро тройничного нерва, моторные нейроны, дегенерация, серотонин

Популяции мотонейронов двигательного ядра тройничного нерва (ДЯТН), находясь в составе сложной системы последнего, образуют несколько частей ядра, осуществляют эфферентную иннервацию ряда мышц (височной, крыловидных, жевательных, челюстно-подъязычных, мышцы мягкого неба и др.) и включаются во многие ритмические орально-моторные движения, такие как сосание (у новорожденных), жевание, глотание и дыхание (через связи с респираторной сетью нейронов продолговатого мозга) [5, 6]. Несмотря на очевидную значимость функциональной координации этих ритмических действий, структурно-пространственная организация и развитие указанной системы остаются не достаточно изученными. Присутствие в ядрах тройничного нерва отдельных серотонинергических нейронов и рецепторов 5-HT_{1A} и 5-HT_{2A} предполагает участие серотонина в модуляции их функций [7], при этом роль серотонина в развитии и становлении ДЯТН практически не изучалась. Цель данной работы — исследование становления ДЯТН у крысят с нарушением развития серотонинергической системы.

Материал и методы. Работа выполнена на потомстве самок лабораторных крыс линии Вистар (n=21), из которых 15 — были экспериментальными и 6 — контрольными (интактными). У экспериментальных животных снижение содержания серотонина обеспечивали применением параклорфенилаланина (пХФА, Sigma, США), ингибирую-

щего ключевой фермент его синтеза — триптофангидроксилазу. пХФА вводили однократно, внутрибрюшинно в дозе 400 мг/кг на 16-е сутки беременности в период формирования у плодов собственной серотонинергической системы, так как ранее было установлено, что при этом у взрослых животных и плодов содержание серотонина снижалось до 50–80% [2, 3]. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Головной мозг потомства исследовали в ранний постнатальный период развития на 5-, 12-е и 20-е сутки (не менее 8 особей каждого срока развития). В качестве контроля использовали мозг крысят соответствующих сроков развития, полученных от интактных самок. Для проведения гистологического исследования мозг крысят фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) в течение 24 ч, обезжизивали и заливали в парафин по общепринятой методике, готовили серийные фронтальные срезы продолговатого мозга (Bregma–9, 48 мм) толщиной 5–7 мкм и окрашивали тионином (Sigma, США) по методу Ниссля. Детально исследовали состояние популяций нейронов разных частей ДЯТН, учитывая развитие нейропиля, размер тел нейронов и их морфологическое состояние в разные сроки постнатального развития. Оценивали плотность расположения астроцитарных глиоцитов в самом ядре и окружающей его области у животных, развивавшихся при дефиците серотонина, и у контрольных. Для выявления астроцитов использовали поликлональные кроличьи антитела к глияльному фибриллярному белку (ГФКБ) (Dako, Дания), набор LSAB2+ System-HRP (вторичные антитела и конъюгат стрептовидаина с пероксидазой) (Dako, Дания), для выявления продукта реакции применяли диаминобензидиновый хромо-

Сведения об авторах:

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

ген DAB+ (Dako, Дания) [1]. После проведения иммуноцитохимической реакции часть срезов докрашивали гематоксилином Джалоли и заключали в синтетическую среду Permount (Dako, Дания).

Для компьютерной морфометрии использовали серийные гистологические фронтальные срезы, окрашенные тионином по методу Ниссля. С помощью цифровой камеры, встроенной в микроскоп, получали изображения, на которых при помощи программы ImageJ (США) исследовали площадь сечения тел нейронов. Измерения проводили на 10 серийных гистологических срезах продолговатого мозга (на каждом 5-м срезе) у животных в экспериментальной и контрольной группах. Определяли среднее арифметическое значение и его стандартную ошибку. Статистическую обработку полученных морфометрических показателей осуществляли при помощи компьютерных программ ImageScope Color и ORIGIN50. О значимости их различий судили по величине t-критерия Стьюдента и считали значимыми при $P < 0,001$.

Исследования проводили под световым микроскопом Leica DME (Leica, Германия). Изображения были получены при помощи цифровой видеокамеры Leica EC3 (Leica, Германия).

Результаты исследования. У животных, развивавшихся при дефиците серотонина, изменения в организации ДЯТН выявлялись на 5-е постнатальные сутки. Близкое расположение нейронов друг к другу косвенно свидетельствовало о недостаточном (по сравнению с контролем) развитии нейропиля. Форма нейронов в основном была округлой, площадь, занимаемая цитоплазмой, и всего клеточного тела была значимо меньше, чем у контрольных крысят (258 ± 17 и 386 ± 13 мкм² соответственно) (рисунок, а, б). В отличие от контроля, где в цитоплазме мотонейронов хроматофильное вещество было распределено равномерно, у подопытных животных оно имело вид крупных глыбок, располагающихся либо по периферии цитоплазмы тела клетки, либо в основании отростков. В части нейронов были отмечены частичная утрата хроматофильного вещества и присутствие мелких вакуолей (см. рисунок, б, д). Во всех частях ДЯТН встречались единичные нейроны с признаками гиперхроматоза (1–2 клетки на срез), при этом в его вентромедиальной части такие нейроны встречались чаще.

На 12-е сутки постнатального развития погибающие мотонейроны с признаками гиперхроматоза наблюдались редко, однако присутствовали нейроны с частичной утратой хроматофильного вещества и незначительной вакуолизацией цитоплазмы. Размеры клеточных тел уступали контрольным и составляли 494 ± 11 и 611 ± 12 мкм² соответственно.

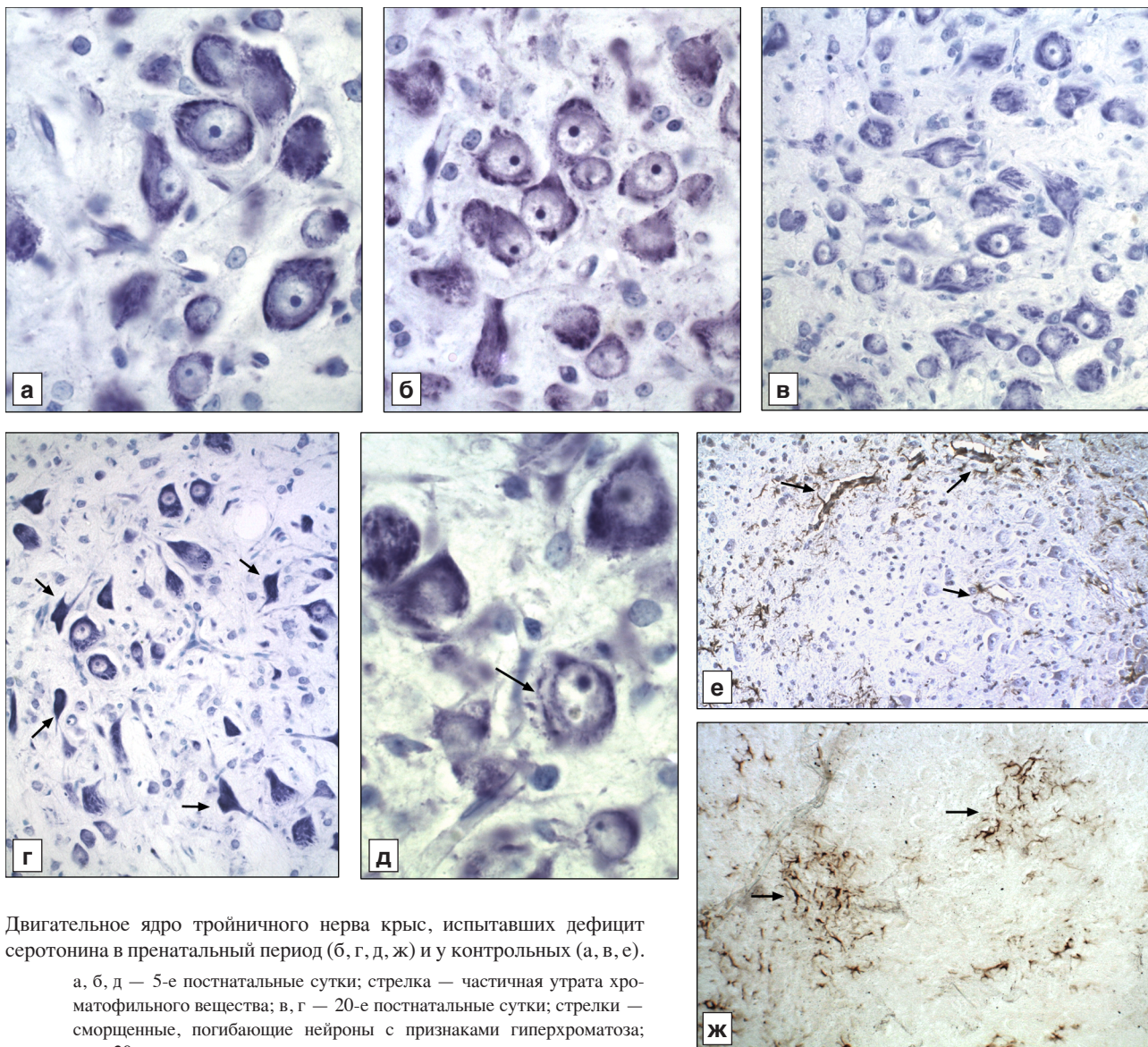
На 20-е сутки в височной жевательной и вентромедиальной частях ДЯТН (билатерально) было обнаружено сокращение числа крупных мотонейронов, разреженное их расположение и присутствие клеток с признаками гиперхроматоза. В некоторых нейронах отмечены частичная

утрата хроматофильного вещества либо его распыление, и редко мелкочаечистая вакуолизация цитоплазмы (см. рисунок, в, г). К этому постнатальному сроку сохранялся значимо меньший размер клеточных тел нейронов по сравнению с контролем (490 ± 16 и 639 ± 15 мкм² соответственно).

Иммуноцитохимическая реакция на ГФКБ показала, что у контрольных животных во всех частях ДЯТН астроциты встречались крайне редко и в основном в области кровеносных сосудов (см. рисунок, е). У крысят, испытавших дефицит серотонина в пренатальный период, в отдельных частях ядра (височной жевательной и вентромедиальной) обнаруживались астроциты и сеть их отростков (см. рисунок, ж). Плотность расположения астроцитов в зоне, окружающей ДЯТН, была выше, чем в контроле.

Обсуждение полученных данных. Результаты исследования показали, что недостаток серотонина в пренатальный период у крыс приводит к изменениям структурной организации ДЯТН. В ранние сроки постнатального развития имеют место задержка развития нейропиля, уменьшение размеров клеточных тел, в отдельных нейронах наблюдались частичная утрата хроматофильного вещества, присутствие во всех частях ядра и особенно в его вентромедиальной части погибающих нейронов с признаками гиперхроматоза. Далее (к 12-м суткам) гибель мотонейронов замедлялась, хотя часть из них имели морфологические отклонения. При увеличении постнатального возраста (к 20-м суткам) происходило снижение численности мотонейронов, видимо, в результате постепенного усиления клеточной гибели. Одновременно с дегенерацией мотонейронов в исследованных частях ДЯТН наблюдался астроцитарный глиоз.

Показано, что в норме у млекопитающих в ядрах тройничного нерва присутствуют отдельные серотонинергические нейроны [4], которые, как полагают, могут активно осуществлять регуляцию их функций [7], при этом серотонин оказывает на мотонейроны как возбуждающее, так и тормозное действие [5, 6]. В раннем постнатальном периоде (7 сут развития) в ДЯТН достигается пик экспрессии рецепторов серотонина (5-HT_{1A}), а также значительно увеличивается плотность расположения серотонин-позитивных терминалей [5], что свидетельствует о функциональной значимости этого медиатора для нейронов ДЯТН в ранний постнатальный период. Полученные данные свидетельствуют о том, что серотонин играет важную роль и в период становления ДЯТН, которая может выражаться в осуществлении как трофики развивающихся мотонейронов,



Двигательное ядро тройничного нерва крыс, испытывавших дефицит серотонина в пренатальный период (б, г, д, ж) и у контрольных (а, в, е).

а, б, д — 5-е постнатальные сутки; стрелка — частичная утрата хроматофильного вещества; в, г — 20-е постнатальные сутки; стрелки — сморщенные, погибающие нейроны с признаками гиперхроматоза; е — 20-е постнатальные сутки, астроциты около кровеносных сосудов (стрелки); ж — глиоз (стрелки) в области жевательной и вентромедиальной частей двигательного ядра тройничного нерва, 20-е постнатальные сутки; а — д — окраска тионином по Нислю; е, ж — иммуноцитохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок; а, б, д — об. 100, ок. 10; в, г — об. 40, ок. 10; е — об. 10, ок. 10; ж — об. 20, ок. 10.

так и стимуляции их конечной дифференцировки. Наблюдаемая дегенерация мотонейронов в постнатальный период, вероятно, может быть вызвана нарушением этих процессов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-00658.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коржевский Д. Э. и Отеллин В. А. Иммуноцитохимическое выявление астроцитов в срезах головного мозга в сочетании с окраской по Нислю. Морфология, 2004, т. 125, вып. 3, с. 100–102.
2. Попова Н. К., Никулина Э. М., Арав В. Н. и Кудрявцева Н. Н. О роли серотонина в одном из видов агрессивного поведения. Физиол. журн., 1975, т. 61, № 2, с. 183–186.

3. Хожай Л. И., Пучков В. Ф. и Отеллин В. А. Влияние дефицита серотонина на эмбриональное развитие млекопитающих. Онтогенез, 1995, т. 26, № 5, с. 350–356.
4. Lazarov N. E. Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. Prog. Neurobiol., 2002, v. 66, p. 19–59.
5. Nakamura M., Yasuda K., Hasumi-Nakayama Y. et al. Colocalization of serotonin and substance P in the postnatal rat trigeminal motor nucleus and its surroundings. Int. J. Dev. Neurosci., 2006, v. 24, № 1, p. 61–64.
6. Tanaka-Gomi N., Yasuda K., Nakamura M. et al. Postnatal changes in 5HT and NK1 receptors in rat trigeminal motor nucleus and surroundings. Int. J. Dev. Neurosci., 2007, v. 25, № 7, p. 427–432.
7. Yeung L. Y., Kung H. F. and Yew D. T. Localization of 5-HT1A and 5-HT2A positive cells in the brainstems of control age-matched and Alzheimer individuals. Age, 2010, v. 32, № 4, p. 483–495.

Поступила в редакцию 15.06.2012

PARTICIPATION OF SEROTONIN IN THE MECHANISMS OF THE FORMATION OF TRIGEMINAL MOTOR NUCLEUS

L. I. Khozhai and V. A. Otellin

The formation of trigeminal motor nucleus (TMN) was studied in the early postnatal period in 21 female Wistar rats which received the serotonin biosynthesis inhibitor para-chloro-phenyl-alanine at prenatal Day 16 (the period of serotonergic system formation). It was shown that the serotonin deficit during the prenatal period in rats resulted in the changes of TMN structural organization. In the early postnatal period, the delay of neuropil development, the reduction of cell body size with the partial

loss of Nissl substance in some of the neurons, the presence of degenerating neurons with the signs of hyperchromatosis in all the parts of the nucleus, especially in TMN ventromedial part, were detected. At later stages, the destruction of motoneurons became slower, though some of them had morphological abnormalities. With the increase of the postnatal age (by Day 20) the number of motor neurons decreased, apparently, as a result of the gradual intensification of cell death. Simultaneously with the motor neuron degeneration in TMN parts studied, the astrocytic gliosis was observed.

Key words: *trigeminal motor nucleus, motor neurons serotonin, degeneration, serotonin*

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

© Б. Я. Рыжавский, О. В. Задворная, 2012
УДК 612.015.1:611.018:612.65:599.323.4

Б. Я. Рыжавский и О. В. Задворная

3 β -ГИДРОКСИСТЕРОИДДЕГИДРОГЕНАЗА В ЭПЕНДИМОЦИТАХ ВЫСТИЛКИ БОКОВЫХ ЖЕЛУДОЧКОВ МОЗГА И ВОРСИНКАХ СОСУДИСТОГО СПЛЕТЕНИЯ У КРЫС РАЗЛИЧНОГО ВОЗРАСТА

Кафедра гистологии (зав. — проф. Б. Я. Рыжавский), ГБОУ ВПО «Дальневосточный государственный медицинский университет Минздравсоцразвития РФ», г. Хабаровск

С использованием гистохимического метода исследована активность 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы (ГСДГ) в головном мозгу лабораторных белых крыс-самцов разного возраста: 5–6- (n=6), 45–50-суточных (n=12) и 6-месячных (n=15). Количественную оценку интенсивности реакции проводили при помощи цитоспектрофотометрии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что эпендимокциты, выстилающие боковые желудочки головного мозга и покрывающие ворсинки их сосудистых сплетений, характеризуются наличием активности ГСДГ, присущей стероидпродуцирующим клеткам. В связи с этим эпендимокциты могут быть отнесены к клеткам, вырабатывающим нейростероиды. В работе установлено, что активность ГСДГ в эпендимокцитах минимальна в раннем постнатальном периоде, значительно возрастает к препубертатному периоду и сохраняется на этом уровне у взрослых животных.

Ключевые слова: *эпендимокциты, 3 β -гидроксистероиддегидрогеназа, возраст*

В последние десятилетия значительное внимание исследователей привлечено к изучению образования в нервной системе стероидных гормонов, получивших название нейростероиды. Методами биохимии, иммуноцитохимии, гибридизации *in situ* показано, что их продуцентами являются различные нейроны, а также клетки нейроглии — олигодендрокциты, астроциты [1, 2, 11, 12, 14]. Показано также, что выявление нейронов, продуцирующих

стероидные гормоны, может быть осуществлено методом гистохимии, при применении реакции на 3 β -гидроксистероиддегидрогеназу (ГСДГ), участвующую в синтезе стероидных гормонов. Этот фермент катализирует образование прогестерона из прегненолона, т.е. реакцию, проходящую при синтезе разных групп стероидных гормонов: гестагенов, эстрогенов, андрогенов, глюко- и минералокортикоидов [8]. Положительная реак-

Сведения об авторах:

Рыжавский Борис Яковлевич (e-mail: nauka@fesmu.ru), Задворная Ольга Викторовна (e-mail: zadvornaya.87@mail.ru), кафедра гистологии, ГБОУ ВПО «Дальневосточный государственный медицинский университет Минздравсоцразвития РФ», 680000 Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35