

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 эпендимциты, выстилающие боковые желудочки головного мозга и покрывающие ворсинки их сосудистых сплетений, характеризуются наличием активности ГСДГ, присущей стероидпродуцирующим клеткам. В связи с этим эпендимциты могут быть отнесены к клеткам, вырабатывающим нейростероиды. В работе установлено, что активность ГСДГ в эпендимцитах минимальна в раннем постнатальном периоде, значительно возрастает к препубертатному периоду и сохраняется на этом уровне у взрослых животных.

Ключевые слова: *эпендимциты, 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 — олигодендроциты, 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

ция на ГСДГ была выявлена в небольшом числе нейронов неокортекса, нейронах гиппокампа, клетках Пуркинье коры мозжечка, подтверждая их способность к синтезу нейростероидов, установленную ранее при помощи других методических подходов [10]. Настоящая работа посвящена неисследованному вопросу — изучению активности ГСДГ в клетках эпендимной глии. Ее предпосылками явились, в частности, следующие факты: во-первых, наличие у них секреторной активности [4, 5] и, во-вторых, наличие стероидных гормонов в цереброспинальной жидкости [13]. Хотя данные вещества могут поступать в цереброспинальную жидкость из плазмы крови, это не исключает возможности их образования в эпендимocyтaх. При проведении работы мы учитывали также факты, свидетельствующие о значительных отличиях строения клеток эпендимной глии в разные возрастные периоды [4, 5]. В связи с изложенным целью настоящей работы — изучение ГСДГ в эпендимocyтaх мозга и количественная оценка ее активности у животных разного возраста.

Материалы и методы. ГСДГ исследовали в головном мозгу лабораторных белых крыс-самцов разного возраста: 5–6-суточных (ранний постнатальный период, $n=6$), 45–50-суточных (препубертатный период, $n=12$), 6-месячных (репродуктивный период, $n=15$). Работа выполнена в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Животных декапитировали, сразу извлекали головной мозг, выделяли переднетеменную долю, помещали ее на охлажденный блок для получения криостатных срезов (криостат Leica CM 1850, Германия) толщиной 20–40 мкм, сделанных во фронтальной плоскости. Срезы монтировали на покровные стекла и на них наносили инкубационный раствор для выявления ГСДГ [3]. Использовали реактивы (дегидроэпиандростерон — субстрат, никотинамид-аденин-динуклеотид и нитросиний тетразолий) (Sigma, США). Реакцию проводили в термостате при температуре 37 °C в течение 30 мин. Для контроля часть срезов помещали в инкубационный раствор, не содержащий субстрата (дегидроэпиандростерона), часть срезов инкубировали после обработки кипящей водой. В качестве «положительного контроля» проверяли реакцию на корковом веществе надпочечников. Препараты заключали в глицерин — желатину. Количественную оценку интенсивности реакции проводили на срезах толщиной 20 мкм, приготовленных в строго стандартизированных условиях, одновременно из мозга животных разных возрастных групп. С помощью микроскопа CHBS (Olympus, Япония) исследовали эпендимocyтaы, выстилающие боковые желудочки головного мозга, а также — покрывающие ворсинки их сосудистых сплетений. Количественную оценку интенсивности реакции проводили при помощи цитоспектрофотометрии ($\lambda=550$ нм) на аппарате МЕКОС (Медицинские компьютерные системы, РФ). При этом интенсивность реакции измеряли в мозгу 5–6-суточных ($n=6$), 45–50-суточных ($n=5$) и 6-месячных ($n=5$) животных, в каждом случае — в цитоплазме не менее 25 клеток, выстилающих полость боковых желудочков, и 25 клеток, покрывающих ворсинки сосудистых спле-

тений. Полученные количественные данные обрабатывали при помощи программы Statistica 6.0. Вычисляли среднее арифметическое и его стандартную ошибку. При оценке различий применяли t -критерий Стьюдента, различия считали значимыми при $P<0,05$.

Результаты исследования. У животных всех изученных возрастных групп эпендимocyтaы, покрывающие ворсинки сосудистого сплетения, а также выстилающие полость бокового желудочка мозга, маркировались продуктами гистохимической реакции. При этом на ворсинках клетки располагались в один ряд (рис. 1, а, б), а клетки, выстилающие желудочек мозга, у 45–50-суточных и 6-месячных крыс образовывали обычно от 1 до 2–3 рядов, у 5–6-суточных крысят их число было больше (рис. 2, а, б). В цитоплазме эпендимocyтaов обеих локализаций выявлялось большее или меньшее число мелких, довольно равномерно расположенных гранул формазана фиолетово-синего цвета. В части клеток продуктов реакции больше обнаруживалось в апикальных частях клеток. В ядрах эпендимocyтaов реакция была отрицательной. Строма ворсинок, а также вещество мозга, граничащее с эпендимocyтaами, также не окрашивались продуктами реакции (см. рис. 1, 2).

Уже при визуальном изучении препаратов можно было констатировать, что интенсивность

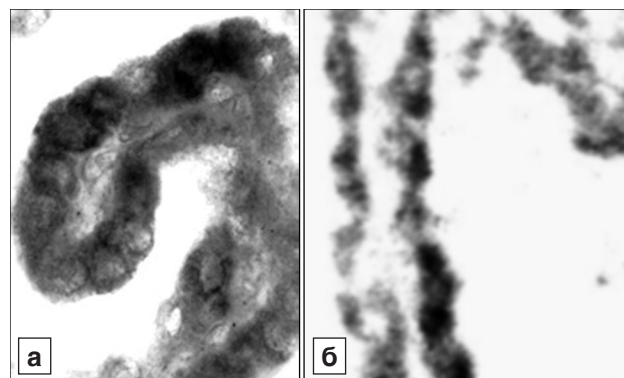


Рис. 1. Эпендимocyтaы ворсинки сосудистого сплетения бокового желудочка мозга взрослой (а) и 5-суточной крысы (б).

Реакция на 3β-гидроксистероиддегидрогеназу. Об. 100, ок. 10.

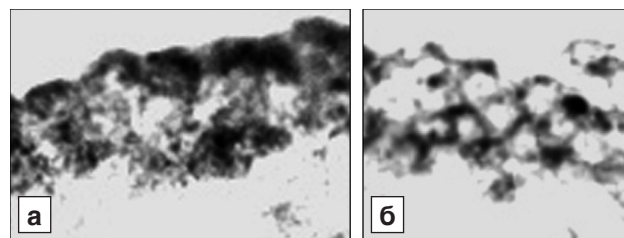


Рис. 2. Эпендимocyтaы выстилки бокового желудочка мозга взрослой (а) и 5-суточной крысы (б).

Реакция на 3β-гидроксистероиддегидрогеназу. Об. 100, ок. 10.

Активность 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы в эпендимоцитах у крыс различного возраста ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, усл. ед.)

Объект исследования	Возраст крыс		
	5–6-суточные	45–50-суточные	6-месячные
Эпендимициты ворсинок сосудистого сплетения бокового желудочка мозга	0,240 $\pm$ 0,011	0,57 $\pm$ 0,04***	0,52 $\pm$ 0,04*
Эпендимоциты выстилки боковых желудочков мозга	0,20 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,05*	0,40 $\pm$ 0,06*

* Различия значимы по сравнению с показателями у 5–6-суточных крыс; ** различия значимы при сравнении с показателями внутри группы.

реакции у 5–6-суточных крыс значительно ниже, чем у животных старших возрастных групп (см. рис. 1, 2). Это было характерно как для эпендимоцитов ворсинок, так и для клеток, выстилающих желудочки мозга.

Цитоспектрофотометрическое исследование также выявило возрастные различия реакции, состоявшие в том, что активность ГСДГ в эпендимоцитах ворсинок у 45–50-суточных и 6-месячных крыс превышала таковую у 5–6-суточных крыс более чем в 2 раза. Это свидетельствует о значительной активации фермента в данных глиоцитах по мере взросления животных. Аналогичная направленность изменений активности ГСДГ регистрировалась и в эпендимоцитах выстилки желудочка мозга, однако эти возрастные изменения были в них менее выражены (таблица). Результаты цитофотометрии, кроме того, свидетельствовали о том, что у 5–6-суточных крыс активность фермента в клетках обеих локализаций не имела статистически значимых различий. У 45–50-суточных животных активность фермента в клетках, покрывающих ворсинки, становилась значительно более высокой, чем в клетках выстилки желудочка ($P < 0,05$), что можно рассматривать как следствие более интенсивного возрастного нарастания активности ГСДГ в эпендимоцитах ворсинок по сравнению с таковой в эпендимоцитах выстилки желудочка. В мозгу взрослых 6-месячных крыс различия активности фермента в эпендимоцитах ворсинок и выстилки желудочка становились меньше, чем в возрасте 45–50 сут, и не были статистически значимыми. При этом активность ГСДГ в клетках обеих исследованных локализаций не имела значимых различий у крыс 45–50-суточного и 6-месячного возраста (см. таблицу).

Обсуждение полученных данных. Полученные результаты свидетельствуют о том, что эпендимоциты желудочков мозга характеризуются наличием активности ГСДГ, т.е. фермента, присущего стероидпродуцирующим клеткам. Данный фермент катализирует образование прогестерона, который является одним из нейростероидов и субстратом для синтеза других стероидных гормонов [9]. В связи с этим эпендимоциты,

подобно таким клеткам глии, как олигодендроциты и астроциты [1, 2, 11, 12, 14], могут быть отнесены к клеткам, вырабатывающим нейростероиды. Представляет интерес тот факт, что эпендимоциты, подобно другим клеткам мозга, способность которых к продукции стероидных гормонов считается доказанной, не имеют особенностей ультраструктуры, характерных для стероидсекретирующих клеток гонад и коркового вещества надпочечников. Показанные в работе возрастные различия активности ГСДГ могут, по-видимому, рассматриваться как часть онтогенетически обусловленных изменений продукции стероидных гормонов в организме в интервале от раннего постнатального до репродуктивного периода, проявляющихся у крыс изменениями концентрации в крови кортикостероидов, андрогенов и эстрогенов [6, 8]. С другой стороны — полученные нами факты согласуются с данными о признаках повышения секреторной активности эпендимоцитов в период полового созревания [4]. При этом уже к препубертатному периоду активность ГСДГ в эпендимоцитах существенно превышает таковую в раннем постнатальном периоде и не имеет статистически значимых различий с активностью у взрослых животных.

Полученные результаты представляются нам заслуживающими внимания в связи с данными о нахождении стероидных гормонов, как в разных отделах мозга, так и в цереброспинальной жидкости, а также — о возможности транспорта ее компонентов через межклеточные пространства головного мозга [6–8, 13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Балашов А. М. Нейростероиды при аддиктивной патологии. Журн. неврол. и психиатр., 2010, т. 110, № 6, с. 106–111.
2. Гончаров Н. П., Каця Г. В. и Нижник А. Н. Нейростероиды и их биологическое значение. Успехи физиол. наук, 2004, т. 35, № 4, с. 3–10.
3. Лойда З., Госсрау Р. и Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. М., Мир, 1982.
4. Мотавкин П. А. Введение в нейробиологию. Владивосток, Медицина ДВ, 2003.
5. Мотавкин П. А., Пиголкин Ю. И. и Каминский Ю. В. Гистофизиология кровообращения в спинном мозге. М., Наука, 1994.

6. Ордян Н. Э., Галеева А. Ю. и Пивина С. Г. Особенности экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в головном мозге крыс в постнатальный период развития. Бюл. exper. биол., 2008, т. 146, № 8, с. 139–143.
7. Отеллин В. А. Межклеточное пространство и несинаптические связи головного мозга млекопитающих. Арх. анат., 1987, т. 93, вып. 9, с. 5–19.
8. Отеллин В. А., Хожай Л. И. и Ордян Н. Э. Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся мозг. Адаптивные механизмы, непосредственные и отсроченные эффекты. СПб., Деятка, 2002.
9. Розен В. Б. Основы эндокринологии. М., Изд-во Московск. ун-та, 1994.
10. Рыжавский Б. Я. и Литвинцева Е. М. Гистохимическое выявление 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы в нейронах головного мозга крысы. Бюл. exper. биол., 2011, т. 152, вып. 9, с. 347–349.
11. Mellon S.H., Griffin L.D. and Compagnone N.A. Biosynthesis and action of neurosteroids. Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons, Brain Res. Rev., 2001. v. 37, № 1–3, p. 3–12.
12. Michele F., Longone P., Romeo E. et al. Decreased plasma and cerebrospinal fluid content of neuroactive steroids in Parkinson's disease. Neurol. Sci., 2003, v. 24, № 3, p. 172–173.
13. Schwarz S. and Pohl P. Steroid hormones and steroid hormone binding globulins in cerebrospinal fluid studied in individuals with intact and with disturbed blood-cerebrospinal

fluid barrier. Neuroendocrinology, 1992, v. 55, p. 174–182.
14. Tsutsui K. Neurosteroid biosynthesis and action during cerebellar development. Cerebellum, 2009, v. 11, № 2, p. 414–415.

Поступила в редакцию 04.05.2012

3 β -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE IN EPENDIMOCYTES OF BRAIN LATERAL VENTRICLE LINING AND VASCULAR PLEXUS VILLI IN RATS OF DIFFERENT AGE

B. Ya. Ryzhavskiy and O. V. Zadvornaya

Using the histochemical method, the activity of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSDH) was studied in the brain of laboratory male albino rats of different age groups: 5–6 days (n=6), 45–50 days (n=12), and 6 months (n=15). The quantitative assessment of reaction intensity was performed with the cytospectrophotometer. The results obtained indicate that the ependimocytes lining the brain lateral ventricles and covering the villi of their vascular plexuses are characterized by the presence of HSDH activity typical to that of steroid-producing cells. In this regard ependimocytes may be attributed to the cells that can produce neurosteroids. It was established that HSDH activity in ependimocytes was minimal in the early postnatal period and considerably increased by the prepuberty period, remaining at this level in adult animals.

Key words: *ependymal cells, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, age*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Far Eastern State Medical University, Khabarovsk