

Л. И. Хожай и Т. Т. Шишко

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЛЕДНОГО ЯДРА ШВА ПРИ СНИЖЕНИИ СОДЕРЖАНИЯ ЭНДОГЕННОГО СЕРТОНИНА В ПРЕНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ У КРЫС

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

Изучена роль серотонина в развитии бледного ядра шва (БЯШ) и динамика изменений его серотонин-синтезирующих нейронов в разные сроки постнатального периода у крыс Вистар в норме и у животных, развивавшихся внутриутробно на фоне дефицита серотонина. Показано, что в БЯШ присутствуют 2 популяции серотонинергических нейронов, различающихся своими морфологическими характеристиками. На начальных этапах постнатального развития (5-е сутки) серотонин-синтезирующими являются только крупные нейроны, синтетическая активность малых нейронов проявляется позднее — к 10-м суткам. С возрастом в норме размер крупных нейронов и их число увеличиваются, что может свидетельствовать о продолжающемся процессе дифференцировки и/или увеличении функциональной нагрузки. Размер и численность малых нейронов с возрастом практически не изменяются. Дефицит серотонина во время пренатального развития приводит к нарушению структурной организации БЯШ. По сравнению с контролем отмечено уменьшение размеров и численности серотонин-синтезирующих нейронов обеих популяций, с возрастом их размер не изменяется. Часть нейронов подвергаются дегенерации, в результате чего сокращается их численность. Наблюдаемые повреждения будут изменять серотонинергическую иннервацию медуллярных ядер, осуществляющих кардиореспираторный контроль и, таким образом, нарушать деятельность сердечно-сосудистой и дыхательной систем.

Ключевые слова: бледное ядро шва, нейроны, популяции, серотонин

Одним из серотонинергических ядер шва, расположенных в каудальной зоне серотонинергической системы продолговатого мозга млекопитающих, является бледное ядро. Функциональная значимость последнего определяется множеством проекций его нейронов на многочисленные медуллярные центры, контролирующие вегетативную, дыхательную, сердечно-сосудистую системы [2, 6]. Недавние физиологические исследования показали, что бледное ядро шва осуществляет регуляцию деятельности респираторных пейсмейкерных нейронов комплекса пре-Бетцингера, участвуя, таким образом, в ритмогенезе дыхательных циклов [4]. Более того, нейроны этого ядра, проецируясь на моторные нейроны спинного мозга, иннервирующие диафрагмальную мускулатуру, регулируют их активность, а следовательно, степень расширения верхних воздухоносных путей и расслабление дыхательной мускулатуры, что особенно важно в период раннего развития новорожденных [4, 8]. Несмотря на роль этого серотонинергического ядра, до сих пор практически неизвестны особенности его структурной органи-

зации, а также зависимость процессов формирования ядра от содержания эндогенного серотонина в период пренатального развития.

Цель настоящей работы — изучение роли серотонина в развитии бледного ядра шва, динамики и характера изменений его структуры в разные сроки начального постнатального периода у крыс, развивавшихся в нормальных условиях и при дефиците серотонина.

Материал и методы. Работа выполнена на лабораторных крысах линии Вистар в соответствии с «Правилами работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Для снижения у крыс содержания эндогенного серотонина использовали метод ингибирования триптофангидроксилазы (фермента его синтеза) парахлорфенилаланином (пХФА) (Sigma, США), который вводили внутривентрикулярно в дозе 400 мг/кг. Показано, что в этой дозе как у взрослых животных, так и у развивающихся плодов пХФА вызывает длительное снижение содержания эндогенного серотонина (до 50–80%) [3, 5]. Самкам крыс (n=20) пХФА вводили на 16-е сутки беременности, в период формирования у плодов собственной серотонинергической системы [1]. Головной мозг крысят исследовали на 5-, 10-, 12-е и 14-е постнатальные

Сведения об авторах:

Хожай Людмила Ивановна (e-mail: astarta0505@mail.ru), Шишко Тамара Тимофеевна, лаборатория онтогенеза нервной системы, Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 19903, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

сутки. В качестве контроля использовали животных соответствующих сроков развития, полученных от интактных самок, и самок, которым вводили изотонический раствор хлорида натрия на те же сутки беременности. На каждую временную точку использовано по 5–6 крысят как контрольных, так и подопытной групп. Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (pH=7,4), заливали в парафин по общепринятой методике и готовили поперечные серийные срезы продолговатого мозга на уровне Bregma от –12,84 до –13,44 мм толщиной 4–5 мкм, часть из которых после депарафинирования окрашивали метиленовым синим по методу Ниссля. Иммуноцитохимическую реакцию с целью выявления серотонина осуществляли с использованием поликлональных кроличьих антител к серотонину (Novocastra, США), клон — NCL-SERT-p, разведение 1:200 и набора LSAB2+System-HRP (вторичные антитела и конъюгат стрептоидина с пероксидазой) (Dako, Дания). Для визуализации связанных первичных антител использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). После проведения иммуноцитохимической реакции часть срезов докрашивали гематоксилином Майера (БиоВитрум, Россия) и заключали в синтетическую среду Permount (Termo, США). Исследования проводили под световым микроскопом Leica DME (Leica, Германия). Изображения получали при помощи цифровой видеокамеры Leica EC3 (Leica, Германия).

У 3–4 животных каждого срока исследования экспериментальной и контрольных групп на 10 изображений поперечных серийных срезов продолговатого мозга, окрашенных по Ниссля, определяли среднюю площадь тел нейронов на срезах, где эти клетки содержали ядрышко. Кроме того, на этих же срезах подсчитывали количество отдельных популяций серотонинергических нейронов, различающихся по площади и форме тела. Статистическую обработку полученных морфометрических показателей осуществляли при помощи пакета прикладных компьютерных программ Statistica 6.0., ImageScore Color и ORIGIN50. Определяли среднее значение цифровых показателей и его стандартную ошибку. Значимость различий определяли по величине t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $P < 0,001$.

Результаты исследования. Как у контрольных, так и у подопытных животных на 5-е сутки жизни в бледном ядре шва присутствуют 2 популяции нейронов, из которых лишь одна серотонин-иммунопозитивна. Ее нейроны — более крупные (размером 103 ± 7 мкм² и $99,5 \pm 8,7$ мкм² соответственно), преимущественно мультиполярные, с центрально расположенным ядром и небольшим объемом цитоплазмы. Число нейронов такого типа составляет соответственно 11–13 и 7–10 клеток на срезе (здесь и далее об. 20, ок. 10). Нейроны второй популяции — более мелкие (45 ± 4 мкм² в контроле и 25 ± 5 мкм² у подопытных крыс), веретеновидные, серотонин-иммунонегативные, численностью 15–17 и 12–13 клеток на срезе соответственно.

На 10-е сутки у контрольных и животных, развивавшихся при дефиците серотонина, в отличие от предыдущего срока исследования, в бледном ядре шва присутствуют 2 популяции серотонин-

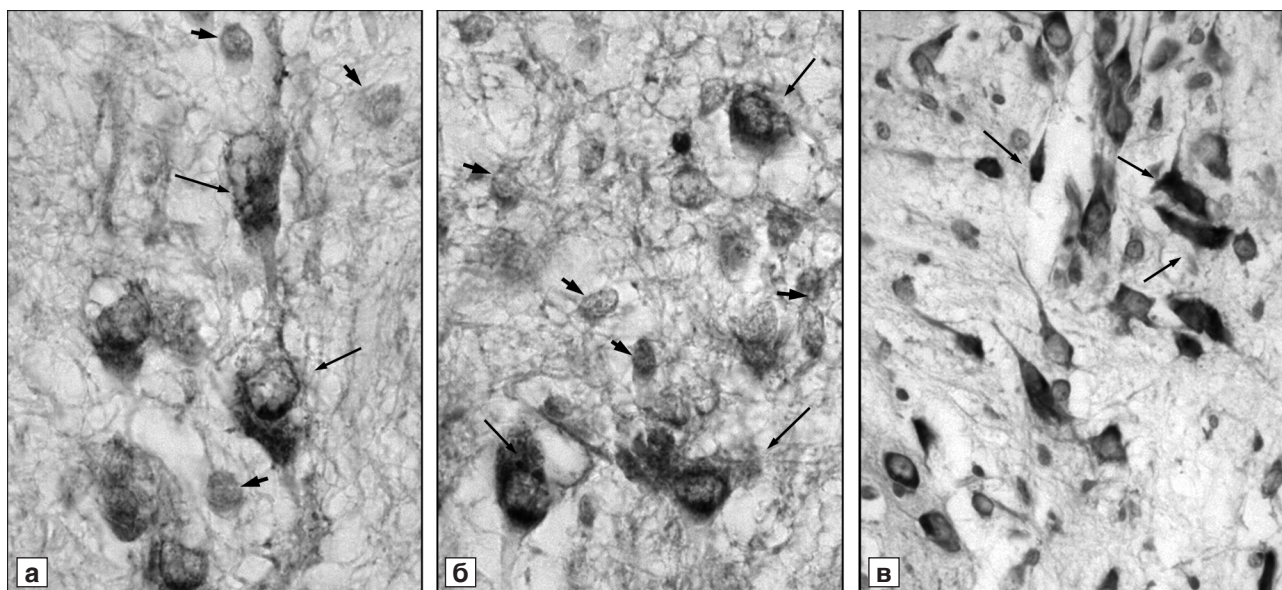
иммунопозитивных нейронов. Более крупные нейроны (111 ± 8 мкм² и 102 ± 6 мкм² соответственно), в основном, мультиполярны, их цитоплазма и отростки интенсивно серотонинпозитивны, число нейронов такого типа в контроле несколько возрастает до 15–16 клеток, а в опыте до 12–13 клеток на срезе. Популяция более мелких нейронов (51 ± 31 мкм² и $26,8 \pm 2,2$ мкм² соответственно), веретеновидной формы с небольшим объемом цитоплазмы, численностью 17–18 клеток на срезе у контрольных и 12 клеток у подопытных крысят.

На 12-е сутки в бледном ядре шва у контрольных и подопытных животных также присутствуют 2 популяции серотонин-синтезирующих нейронов. Размер крупных нейронов у контрольных крыс увеличивается (133 ± 12 мкм²), а их число практически не меняется и составляет 16–18 клеток на срезе. Нейроны, в основном, мультиполярны, хотя иногда встречаются и веретеновидной формы, их цитоплазма интенсивно окрашена, ядра располагаются в центральной части клетки (рисунков, а). Морфологические характеристики малых нейронов, их размер (49 ± 4 мкм²) и численность, 15–18 клеток на срезе, практически не меняются по сравнению с таковыми в предыдущий срок исследования.

На 12-е сутки у животных, развивавшихся на фоне дефицита серотонина, размер более крупных нейронов (94 ± 12 мкм²) практически не меняется, однако их число сокращается и не превышает 7–8 клеток на срезе, они как мультиполярные, так и веретеновидной формы (см. рисунок, б). Морфометрические показатели малых нейронов, имеющих веретеновидную форму (малый объем цитоплазмы, слабо окрашенной при реакции на серотонин, их размер — $30,3 \pm 2,2$ мкм², и численность — 10–12 клеток на срезе), также не изменяются и примерно соответствуют таковым в предыдущий срок исследования.

На 14-е сутки как у контрольных, так и у подопытных животных нейроны обеих серотонин-синтезирующих популяций имеют морфологические и количественные характеристики, схожие с таковыми на 12-е сутки жизни. Однако в этот постнатальный срок у животных, испытывавших дефицит серотонина в пренатальный период, появляются нейроны с признаками гиперхроматоза (см. рисунок, в) крупноядеристой вакуолизацией цитоплазмы и деформацией ядер, приводящими к дегенеративным процессам в бледном ядре шва.

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что у крыс в бледном ядре шва присутствуют 2 популяции серотонинергических нейронов, различающихся своими морфологиче-



Бледное ядро шва продолговатого мозга контрольной крысы (а) и крыс, испытывавших дефицит серотонина в пренатальный период (б, в).

а, б — 12-е сутки; в — 14-е сутки постнатального развития; а, б — нейроны крупного размера (длинные стрелки); нейроны малого размера (короткие стрелки); в — нейроны с признаками гиперхроматоза (стрелки). а, б — иммуноцитохимическая реакция на серотонин; в — окраска метиленовым синим по Нисслю. а, б — об. 100, ок. 10; в — об. 20, ок. 10

скими характеристиками. В ранние постнатальные сроки (5-е сутки) серотонин-синтезирующими являются только крупные нейроны, у малых нейронов синтетическая активность появляется позднее — к 10-м суткам. С возрастом — к 12-м суткам в норме размер крупных нейронов и их число увеличиваются, что может свидетельствовать о продолжающемся процессе дифференцировки и/или увеличении функциональной нагрузки. Размер и численность малых нейронов после 5-х суток с возрастом практически не изменяются.

Дефицит серотонина во время пренатального развития приводит к нарушению структурной организации бледного ядра шва. У подопытных животных отмечено значительное уменьшение по сравнению с контролем размеров и численности серотонин-синтезирующих нейронов обеих популяций, при этом их размер с возрастом остается неизменным. С увеличением постнатального возраста нейроны чаще подвергаются дегенерации, что также способствует сокращению численности популяций серотонинергических нейронов. Такие повреждения, несомненно, будут изменять серотонинергическую иннервацию медуллярных ядер, в частности, комплекса пре-Бетцингера — генератора дыхательного ритма, регулирующего такие параметры, как частота, регулярность и амплитуда дыхания, а также оказывать влияние на проекционные связи с другими ядрами дыхательной системы [2, 4, 6, 7] и в результате приводить

к тяжелым клиническим последствиям в виде нарушения дыхания.

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-00658.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Hodges R. and Richerson G. B. The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO₂ chemoreception, and thermoregulation. J Appl. Physiol., 2010, v. 108, p. 1425–1432.
3. Keller H. H. Depletion of cerebral monoamines by p-chlorophenylalanine in the cat. Experientia, 1972, v. 28, № 2, p. 177–178.
4. Kobayashi S., Fujito Y., Matsuyama K. and Aoki M. Raphe modulation of the pre-Botzinger complex respiratory bursts in in vitro medullary half-slice preparations of neonatal mice. J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol., 2010, v. 196, № 8, p. 519–528.
5. Lauder J. M., Towle A. C. and Patrick K. Decreased serotonin content of embryonic raphe neurons following maternal administration of p-chlorophenylalanine: a quantitative immunocytochemical study. Develop. Brain Res., 1985, v. 20, № 1, p. 107–114.
6. Manaker S. and Verderame H. M. Organization of serotonin 1A and 1B receptors in the nucleus of the solitary tract. J. Comp. Neurol., 1990, v. 301, № 4, p. 535–553.
7. Underwood M. D., Arango V., Bakalian M. J. et al. Dorsal raphe nucleus serotonergic neurons innervate the rostral ventrolateral medulla in rat. Brain Res., 1999, v. 824, p. 45–55.
8. Yu S. Y., Wang G.M., Wang H. et al. Raphe pallidus modulates Botzinger complex-induced inhibition of the phrenic nerve activity in rat. Eur. J. Neurosci., 2011, v. 34, № 7, p. 1113–1120.

Поступила в редакцию 11.02.2013

CHANGES OF THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE NUCLEUS RAPHE PALLIDUS AFTER THE DECREASE OF ENDOGENOUS SEROTONIN LEVEL IN THE PRENATAL PERIOD OF DEVELOPMENT IN RATS

L. I. Khozhai and T. T. Shishko

The role of serotonin in the nucleus raphe pallidus (NRP) development and the dynamics of its serotonin-producing neurons were studied during various time points of the postnatal period in normal Wistar rats and in animals developing prenatally under the conditions of serotonin deficiency. It was shown that NRP contained 2 populations of serotonergic neurons with different morphological characteristics. At the initial stages of postnatal development (Day 5) serotonin-producing neurons included only large neurons, while the synthetic activity of small

neurons appeared later (by Day 10). With age, under normal conditions, the size of large neurons and their number were increased which is indicative of continuing process of differentiation and/or functional load augmentation. The size and number of small neurons were practically unchanged with age. Serotonin deficiency during prenatal development lead to the disturbance of NRP structural organization. In comparison with the control animals, the size and the number of serotonin-producing neurons of both populations was decreased, their size remained unchanged with the age. Part of the neurons underwent degeneration, resulting in the reduction of their numbers. The damage observed may change the serotonergic innervation of the medullary nuclei, responsible for the cardiorespiratory the control, thus causing the disturbances of cardio-vascular and respiratory systems.

Key words: *nucleus raphe pallidus, neurons, populations, serotonin*

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

© Е. Г. Сухорукова, 2013
УДК 612.398:611.815.41.018.13

Е. Г. Сухорукова

ЯДЕРНЫЙ БЕЛОК NeuN В НЕЙРОНАХ ЧЕРНОГО ВЕЩЕСТВА ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы (зав. — д-р мед. наук Д. Э. Коржевский), отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Проведено иммуноцитохимическое исследование экспрессии белка NeuN в нейронах черного вещества (ЧВ) головного мозга человека (n=14, возраст 27–78 лет). Слабая позитивная реакция на белок NeuN определяется в части нейронов ЧВ, тогда как в остальных нейронах он отсутствует. В целом, реакция на белок NeuN в нейронах ЧВ головного мозга человека выражена слабее, чем в расположенных на тех же срезах нейронах красного ядра.

Ключевые слова: *головной мозг, черное вещество, ядерный белок NeuN, человек*

Известно, что ядерный белок NeuN локализуется в ядрах и перинуклеарной цитоплазме большинства нейронов ЦНС млекопитающих [6]. Вместе с тем, определены ряд типов нейронов, в ядрах которых, по неизвестной пока причине, этот белок не обнаружен. Так, к нейронам, в норме не синтезирующим NeuN, относятся клетки Кахаля—Ретциуса в неокортексе, многие клетки мозжечка (клетки Пуркинье, корзинчатые и

звездчатые клетки, клетки Гольджи, униполярные щетинковые нейроны, клетки Лугаро, нейроны зубчатого ядра), нейроны нижних олив, митральные клетки обонятельных луковиц, гамма-мотонейроны в спинном мозге [2]. Данные об особенностях экспрессии NeuN в нейронах черного вещества (ЧВ) у лабораторных млекопитающих противоречивы [4, 5], а в отношении человека — отсутствуют. Учитывая то, что при различных

Сведения об авторе:

Сухорукова Елена Геннадьевна (e-mail: len48@inbox.ru), лаборатория функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы, отдел общей и частной морфологии, Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12