

## 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.

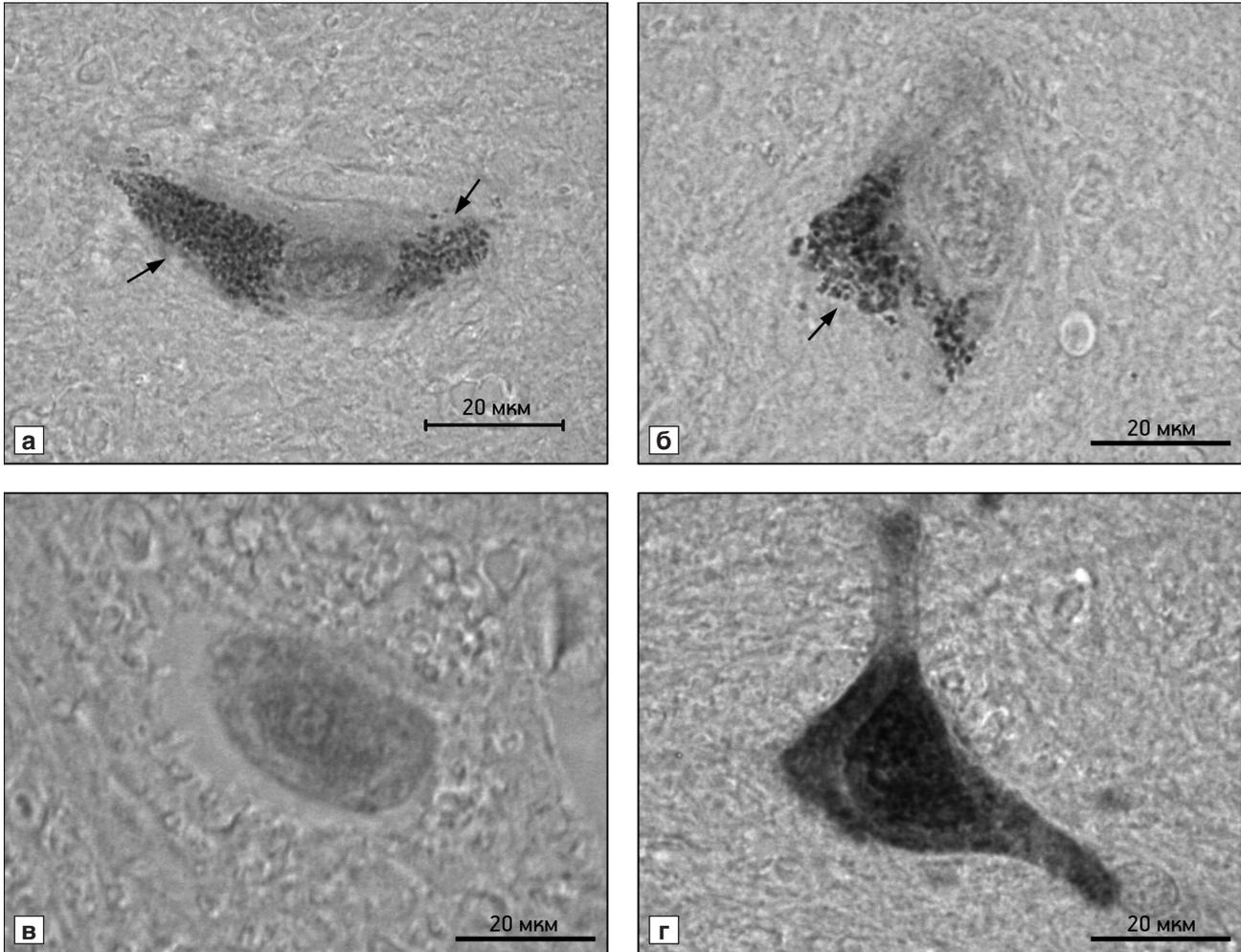
**Ключевые слова:** *головной мозг, черное вещество, ядерный белок NeuN, человек*

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 Кахалы—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



Нейроны черного вещества (а–в) и красного ядра (г) головного мозга человека.

а — нейромеланин-содержащий нейрон со слабой положительной реакцией на белок NeuN; б — нейромеланин-содержащий нейрон с отсутствием положительной реакции на белок NeuN; в — нейрон, не содержащий нейромеланина, со слабой положительной реакцией на белок NeuN; г — нейрон с интенсивной положительной реакцией на белок NeuN. Стрелки — скопления гранул нейромеланина в цитоплазме нейронов. Иммуноцитохимическая реакция на белок NeuN без докраски

патологических состояниях белок NeuN в нейронах перестает синтезироваться [2], сведения о его экспрессии в клетках ЧВ могут быть существенны для оценки функционального статуса этого важнейшего дофаминергического центра [3].

Цель данного исследования состояла в иммуногистохимическом выявлении белка NeuN в нейронах ЧВ головного мозга человека.

**Материал и методы.** В работе использованы фрагменты стволового отдела головного мозга людей обоего пола (n=14, возраст 27–78 лет), полученные при аутопсии. Программа исследования имеет положительное заключение этического комитета Научно-исследовательского института экспериментальной медицины СЗО РАМН. Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде, обезвоживали и заливали в парафин по общепринятой методике. Готовили срезы толщиной 5 мкм. Белок NeuN выявляли с помощью моноклональных (клон А60) мышиных антител (Chemicon, США) и набора EnVision+® System Labelled Polymer-HRP Anti-Mouse (Dako, Дания). Для визуализации продукта иммуноцитохими-

ческой реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). Часть срезов докрашивали астровым синим. В качестве внутреннего положительного контроля выступали нейроны красного ядра, расположенного на тех же срезах. Анализ и фотосъемку препаратов выполняли, используя микроскоп Leica DM750 и фотокамеру ICC50 (Leica, Германия).

**Результаты исследования.** Обнаружено, что в изученных препаратах реакцию на белок NeuN давали только нейроны. В нейропиле положительная реакция на этот белок отсутствовала. Большинство нейронов ЧВ отчетливо определялись на не докрашенных срезах благодаря наличию в их цитоплазме нейромеланина. Кроме того, на докрашенных срезах среди нейронов ЧВ выявлялись и те, которые не содержали нейромеланина. Во всех исследованных случаях в ЧВ встречались несколько вариантов нейронов, различающихся по содержанию нейромеланина и способности окрашиваться при проведении реак-

ции на белок NeuN: нейроны, содержащие нейромеланин и белок NeuN, нейроны, содержащие нейромеланин, но не дающие реакции на белок NeuN, и нейроны, не содержащие нейромеланина, но дающие реакцию на белок NeuN (рисунки, а–в).

Общим признаком иммунопозитивных ядер нейронов ЧВ была слабая реакция на белок NeuN. В отличие от нейронов ЧВ, в нейронах красного ядра реакция на белок NeuN была интенсивная, причем в большинстве случаев наблюдалось окрашивание не только ядер клеток, но и перинуклеарной цитоплазмы (см. рисунок, г).

**Обсуждение полученных данных.** Как было установлено ранее [1], в ЧВ головного мозга человека присутствуют нейроны как содержащие нейромеланин, так и лишенные его. Настоящее исследование показало, что белок NeuN выявляется и в тех, и в других подтипах нейронов ЧВ, однако его концентрация в них значительно ниже, чем в нейронах анатомически близко расположенного к ЧВ красного ядра и других областей головного мозга [6]. Этот факт может быть обусловлен специфическими функциональными характеристиками дофаминергических нейронов головного мозга, связанными с биосинтезом нейромеланина и метаболизмом катехоламинов [3]. Ранее, при исследовании распределения белка NeuN в клетках ЧВ головного мозга крысы было обнаружено, что в части нейронов он слабо экспрессируется, а в части — отсутствует [4]. В то же время, у песчанок NeuN-иммунопозитивные нейроны были выявлены только в компактной части ЧВ [5]. Результаты этого исследования сопоставимы с данными, полученными при изучении экспрессии белка NeuN в нейронах ЧВ крысы: популяция нейронов ЧВ у человека также неоднородна, поскольку в ней имеются клетки, в которых белок NeuN выявляется и в которых он отсутствует. Негативный результат иммуноцитохимической реакции в части нейронов ЧВ может объясняться тем, что белок NeuN в них либо не экспрессируется совсем, либо он экспрессируется в таком малом количестве, что методами иммуноцитохимии не определяется.

Таким образом, нейроны ЧВ головного мозга человека по выявляемости белка NeuN подразделяются на 2 группы: слабо иммунопозитивные и иммунонегативные к этому белку. Установленный факт следует учитывать при изучении патогенеза болезни Паркинсона и создании ее адекватных экспериментальных моделей.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 12-04-31857).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьев И. П., Сухорукова Е. Г., Колос Е. А. и Коржевский Д. Э. Нейромеланин в нейронах черного вещества, не содержащих тирозингидроксилазу. *Морфология*, 2012, т. 141, вып. 2, с. 65–67.
2. Коржевский Д. Э., Петрова Е. С., Кирик О. В. и др. Нейральные маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, 2010, т. 5, № 3, с. 57–63.
3. Отеллин В. А. и Арушанян Э. Б. *Нигрострионигральная система*. М., Медицина, 1989.
4. Cannon J. R. and Greenamyre J. T. NeuN is not a reliable marker of dopamine neurons in rat substantia nigra. *Neurosci. Lett.*, 2009, v. 464, № 1, p. 14–17.
5. Kumar S. S. and Buckmaster P. S. Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra pars reticulata. *Brain Res.*, 2007, v. 1142, p. 54–60.
6. Mullen R. J., Buck C. R. and Smith A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 1992, v. 116, № 1, p. 201–11.

Поступила в редакцию 13.02.2013

#### NeuN NUCLEAR PROTEIN IN NEURONS OF HUMAN BRAIN SUBSTANTIA NIGRA

*Ye. G. Sukhorukova*

The expression of NeuN protein was examined immunocytochemically in the neurons of human substantia nigra (n=14, age: 27–78 years). Some of substantia nigra neurons demonstrated weak NeuN immunopositive reaction, while the others were NeuN-immunonegative. In general, NeuN immunocytochemical reaction in neurons of human substantia nigra was expressed much weaker than in the nucleus rubrum neurons located in the same sections.

**Key words:** *brain, substantia nigra, NeuN nuclear protein, man*

Laboratory of the Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Special Morphology, RAMS North-Western Branch Institute of Experimental Medicine