

© Л. И. Хожай, 2013
УДК 611.81:612.64:599.323.4

Л. И. Хожай

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СУБЪЯДРАХ ПАРАБРАХИАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА У КРЫС ПРИ НЕДОСТАТОЧНОСТИ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ПРЕНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД ИХ РАЗВИТИЯ

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

Исследование проведено на потомстве, полученном от крыс-самок линии Вистар ($n=8$), которым на 16-е сутки беременности вводили параклорфенилаланин для снижения содержания эндогенного серотонина у их потомства. Гистологическими, иммуноцитохимическим и морфометрическим методами у крысят на 10-е и 14-е сутки постнатального развития (по 5–6 особей на каждую временную точку) изучали дорсальное и вентральное субъядра латеральной части парабрахиального комплекса. Показано, что дефицит серотонина приводит к изменению структуры субъядер. В вентральном субъядре более чувствительной к пониженному уровню серотонина оказалась популяция крупных мультиполярных нейронов. У подопытных животных имело место уменьшение размера тел этих нейронов в 1,6 раза по сравнению с контролем, при этом численность популяции практически не менялась. Морфологические характеристики нейронов меньшего размера соответствовали таковым в контроле, однако их численность была снижена, что, видимо, может объяснить некоторую нейронную разреженность в ядре. В дорсальном субъядре у подопытных животных нейроны обеих популяций, входящих в его состав, имели более выраженные изменения. Размеры клеточных тел как крупных, так и более мелких нейронов существенно уменьшались в 2,0 и 1,8 раза соответственно, значительно сокращался объем их цитоплазмы по сравнению с контролем, при этом число клеток в обеих популяциях практически не менялось. Реакция выявления глиального кислого фибриллярного белка показала, что у подопытных животных в ранний постнатальный период в обоих субъядрах повышается численность популяции астроцитарной глии.

Ключевые слова: нейроны, парабрахиальные субъядра, серотонин, пренатальный период

Парабрахиальное ядро представляет собой комплекс гетерогенных нейронных образований, функции которых связаны в основном с регуляцией активности висцеральной, респираторной и вегетативной систем.

Группы нейронов, входящие в его состав, располагаются вокруг верхней мозжечковой ножки, которая делит парабрахиальное ядро на две основные части: латеральную и медиальную, каждая из которых включает несколько субъядер, обладающих разнонаправленными связями и различающимися функционально. Известно, что парабрахиальное ядро образуют 10 субъядер (из них 7 — определены в латеральной части, 3 — в медиальной) и ядро Кёлликера—Фюзе [4]. Установлены обширные связи нейронов этой области со многими формациями мозга, а сопоставление данных по афферентной и эфферентной иннервации парабрахиального ядра выявило реципрокность его взаимоотношений со всеми связанными с ним структурами [4, 5, 7, 9–11]. Парабрахиальные субъядра, участвующие в том числе в регуляции жизненно важных кардиореспираторных функций (вентральное и дорсальное латеральные субъ-

ядра), иннервируются нейронами каудальных ядер серотонинергической системы (*raphe pallidus*, *raphe magnus* and *raphe obscurus*) [6]. Имеются ряд наблюдений, свидетельствующих о том, что моноамины, в том числе серотонин, принимают участие в модуляции кардиоваскулярных и респираторных функций [9, 10]. Существуют данные, что в вентральном и дорсальном субъядрах латеральной части парабрахиального комплекса присутствуют серотонинергические нейроны [10]. В настоящее время структурная организация субъядер парабрахиальной области малоизвестна, кроме того, нерешенным остается вопрос о роли серотонина в процессах формирования субъядер парабрахиального ядра в пренатальный период развития. Цель настоящего исследования — изучение численности нейронов в вентральном и дорсальном субъядрах латеральной части парабрахиального ядра в ранние сроки постнатального периода у животных в контроле и испытывших дефицит серотонина во время развития.

Материал и методы. Исследование проведено на лабораторных крысах линии Вистар в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных

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

животных». Для снижения эндогенного уровня серотонина использовали метод ингибирования триптофангидроксилазы параклорфенилаланином (пХФА) (Sigma, США). Самкам крыс ($n=8$) пХФА вводили внутривентриально на 16-е сутки беременности в дозе 400 мг/кг (для длительного снижения эндогенного уровня серотонина до 50–80% у плодов в период формирования их собственной серотонинергической системы). Головной мозг исследовали на 10-е и 14-е постнатальные сутки. В качестве контроля использовали животных соответствующих сроков развития, полученных от интактных самок ($n=4$) и после введения изотонического раствора натрия хлорида ($n=4$) в те же сутки беременности. На каждый срок исследования было использовано по 5–6 крысят. Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), заливали в парафин по общепринятой методике и готовили серийные поперечные срезы продолговатого мозга на уровне Bregma от $-8,88$ до $-9,24$ мм толщиной 4–5 мкм, которые окрашивали метиленовым синим (Sigma, США) по методу Ниссля.

Иммуноцитохимическую реакцию для выявления глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) проводили с использованием кроличьих поликлональных антител к GFAP (Dako, Дания) и вторичных антител из набора EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DakoCytomation, США). Для визуализации продукта реакции использовали хромоген DAB+ (Dako, Дания). После проведения иммуноцитохимической реакции часть срезов докрашивали гематоксилином Майера (Bio-Optica, Италия) или тионином (Serva, США, Германия) 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).

Для компьютерной морфометрии использовали изображения, полученные с гистологических поперечных срезов продолговатого мозга, окрашенных по методу Ниссля метиленовым синим (Sigma, США). На 10 серийных срезах мозга, взятого у 3–4 животных каждого срока исследования в экспериментальной и контрольных группах, на стандартной площади при об. 100 и ок. 10 определяли среднее арифметическое значение площади тел нейронов и ошибку среднего значения. На этих же срезах подсчитывали среднее количество разных типов нейронов. Статистическую обработку полученных морфометрических показателей осуществляли при помощи пакета прикладных компьютерных программ Statistica 6.0., ImageScope Color и ORIGIN50.

Результаты исследования. *Дорсальное субъядро латеральной части парабрахиального комплекса.* На 10-е и 14-е сутки постнатального развития у контрольных животных в субъядре присутствуют 2 популяции нейронов, которые имеют сходные морфологические признаки соответственно. Довольно крупные (74 ± 5 мкм²) полигональной формы нейроны со светлым овальным ядром, расположенным эксцентрично, и интенсивно окрашенной (по Ниссля) цитоплазмой присутствуют на срезе в количестве примерно 8–10 клеток и более мелкие нейроны $24,2 \pm 1,3$ мкм² в основном веретеновидной формы, с небольшим объемом цитоплазмы и численностью 19–20 клеток на срезе.

У животных, развивавшихся при недостаточности серотонинергической системы, на 10-е постнатальные сутки в субъядре обнаруживаются структурные изменения: разреженность и хаотичность расположения нейронов. Однако, также как и в контроле, присутствуют 2 популяции нейронов, различающиеся только по размеру клеточных тел: более крупные $44,9 \pm 2,3$ мкм², их число на срезе около 10, и более мелкие $24,5 \pm 2,0$ мкм², их число — 14. Форма клеточных тел нейронов обеих популяций может быть округлая, полигональная или веретеновидная, объем цитоплазмы очень мал (рис. 1, а–в).

На 14-е сутки постнатального развития у подопытных животных размеры двух популяций нейронов — $44,4 \pm 1,5$ и $23,7 \pm 1,3$ мкм² соответственно, численность и форма практически соответствуют таковым в предыдущий срок исследования.

Иммуноцитохимическая реакция на глиальный кислый фибриллярный белок показала, что у подопытных животных на 10-е сутки развития в дорсальном субъядре имеет место увеличение популяции глиоцитов и сети их отростков по сравнению с контролем (рис. 2, а, б).

Вентральное субъядро латеральной части парабрахиального комплекса. У животных в контроле на 10-е и 14-е сутки постнатального развития субъядро образуют 2 популяции нейронов, которые в оба срока исследования имеют сходное строение. Популяция крупных (88 ± 8 мкм²) нейронов, веретеновидной или полигональной формы, со светлым овальным ядром, расположенным в центральной части клетки, небольшим объемом интенсивно окрашенной (по Ниссля) цитоплазмы; и популяция нейронов меньшего размера (49 ± 4 мкм²) полигональной формы, с центрально расположенным ядром и узким ободком цитоплазмы вокруг него. Численность нейронов в обеих популяциях одинакова и составляет примерно по 10 клеток на срезе.

У подопытных животных на 10-е сутки постнатального развития в состав субъядра также входят 2 популяции нейронов, однако размеры их клеточных тел значительно меньше, чем в контроле — 56 ± 3 и $32,8 \pm 2,5$ мкм² соответственно (см. рис. 1, г, д). Тела нейронов обеих популяций имеют как веретеновидную, так и полигональную форму, цитоплазма часто вакуолизирована, при этом численность крупных и мелких нейронов соответствует таковой в контроле.

На 14-е сутки постнатального развития у животных, развивавшихся при дефиците серотонина, нейроны обеих популяций вентрального субъядра имеют уменьшенные размеры клеточных тел (46 ± 3 мкм² и $27,3 \pm 0,8$ мкм² соответствен-

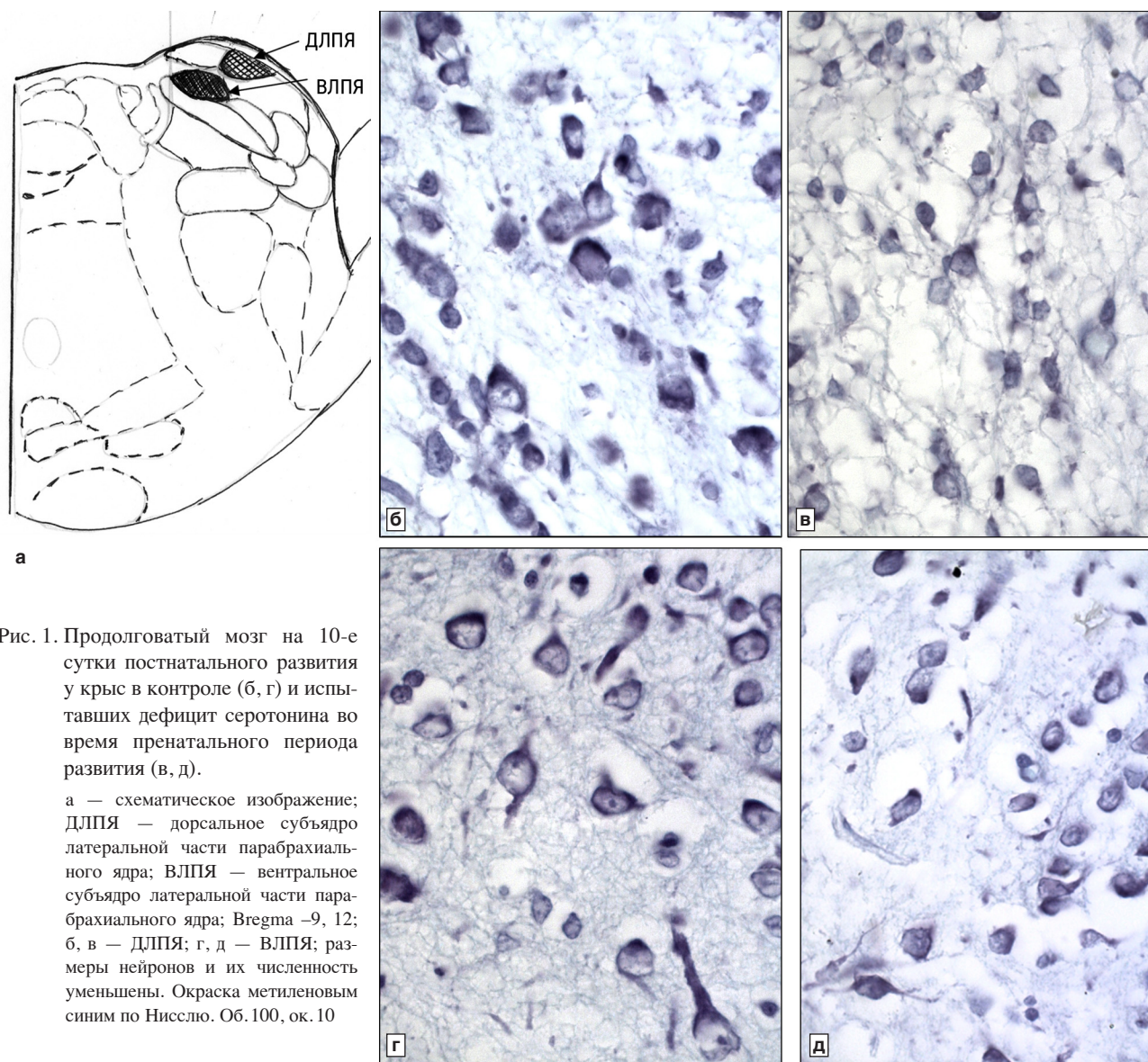


Рис. 1. Продолговатый мозг на 10-е сутки постнатального развития у крыс в контроле (б, г) и испытывавших дефицит серотонина во время пренатального периода развития (в, д).

а — схематическое изображение; ДЛПЯ — дорсальное субъядро латеральной части парабрахияльного ядра; ВЛПЯ — вентральное субъядро латеральной части парабрахияльного ядра; Bregma -9, 12; б, в — ДЛПЯ; г, д — ВЛПЯ; размеры нейронов и их численность уменьшены. Окраска метиленовым синим по Нисслю. Об. 100, ок. 10

но), а также меньший объем цитоплазмы, которая в основном сосредоточена в основаниях крупных отростков, большинство тел нейронов сохраняют полигональную форму. Число как крупных, так и мелких нейронов составляет от 8 до 10 клеток на срезе.

Реакция на выявление глиального кислого фибриллярного белка показала, что у подопытных животных на 10-е сутки в вентральном субъядре популяция астроцитов значительно увеличивается по сравнению с контролем (см. рис. 2, в, г).

Обсуждение полученных данных. Исследование показало, что в норме как вентральное, так и дорсальное субъядра латеральной части парабрахияльного комплекса образованы разными популяциями нейронов, различающимися по размеру клеточных тел и их форме, которые к исследуемой стадии (на 10-е сутки жизни) достигают довольно высокой степени

дифференцировки, соответствующей таковой в более поздний срок развития. Недостаточность серотонинергической системы в пренатальный период вызывает структурные изменения в обоих субъядрах. В вентральном субъядре более чувствительной к снижению содержания серотонина оказалась популяция крупных мультиполярных нейронов, у которых уменьшался размер клеточных тел (в 1,6 раза) по сравнению с таковым в контроле, при этом их число практически не менялось. Морфологические характеристики нейронов меньшего размера соответствовали таковым в контроле, однако численность их популяции была сниженной, что, видимо, может объяснить некоторую разреженность нейронов в ядре. В дорсальном субъядре дефицит серотонина в пренатальный период развития приводил к более выраженному изменению нейронов в обеих популяциях. У подопытных животных по сравнению с контролем значительно уменьшались размеры тел

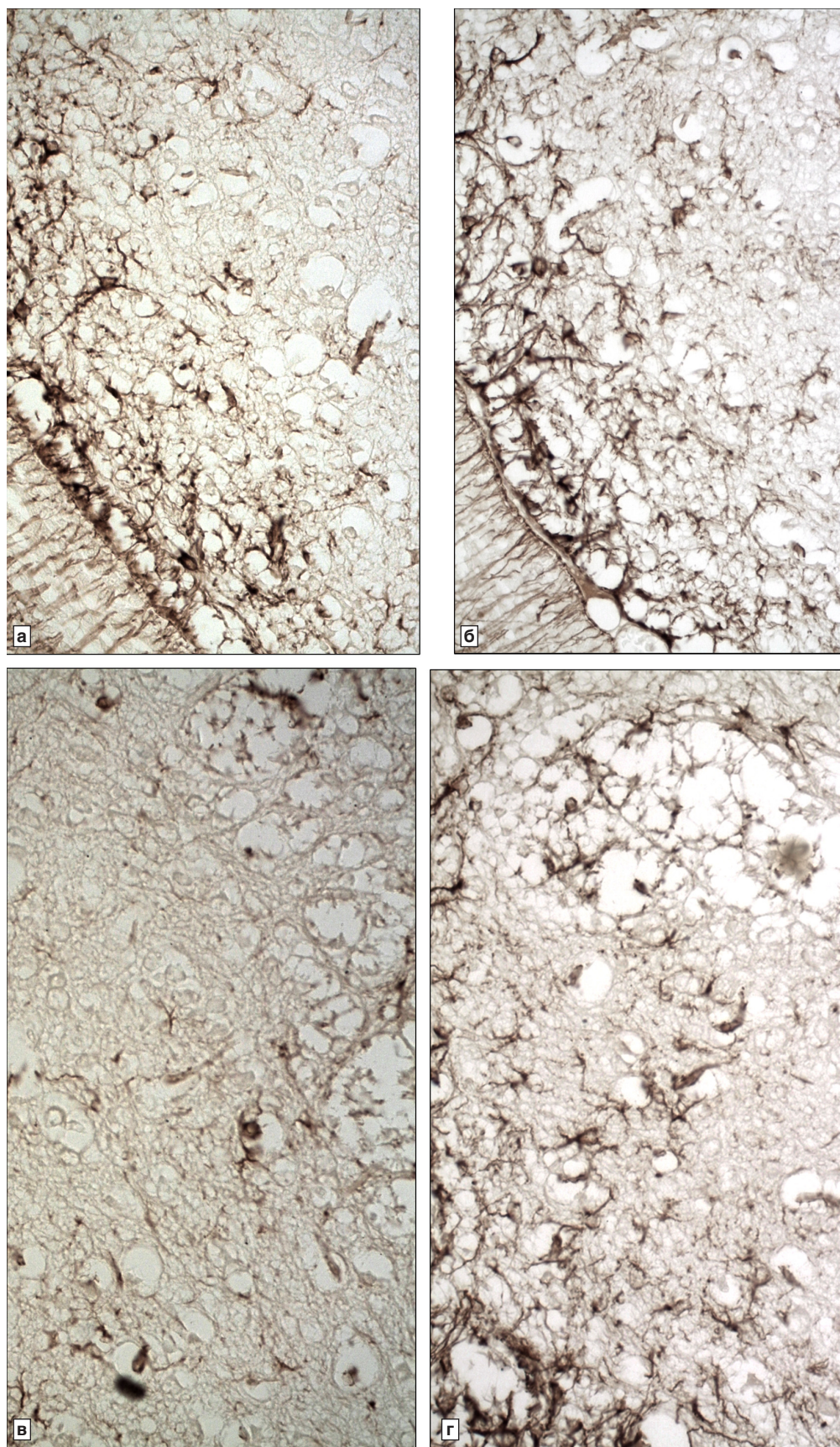


Рис. 2. Продолговатый мозг контрольных крыс (а, б) и развивавшихся при дефиците серотонина (в, г) на 10-е сутки постнатального развития.

а, б — дорсальное и в, г — вентральное субъядра латеральной части парабрахияльного ядра, плотность популяции астроцитов увеличена. Иммуноцитохимическая реакция на глиальный фибриллярный кислый белок. Об.40, ок. 10

как крупных (почти в 2,0 раза), так и мелких нейронов (почти в 1,8 раза), существенно сократился объем их цитоплазмы, при этом численность нейронов обеих популяций сохранилась. Наряду с этим, в обоих субъядрах значительно увеличилась плотность популяции астроглии.

Известно, что механизмы регуляции таких жизненно важных систем, как кардиоваскулярная и респираторная, начинают формироваться в раннем периоде онтогенеза [3, 9]. Полученные результаты позволяют предполагать, что в процессах формирования парабрахияльных субъядер (в дальнейшем контролирующих кардиореспираторные функции) принимает участие серотонин, который, вероятно, модулирует процессы созревания нейронов, а впоследствии способен к организации и регуляции различных параметров респираторной активности [2, 6]. При недостаточности серотонинергической системы в пренатальный период нарушение процессов созревания нейронов (уменьшение размеров тел клеток, сокращение объема цитоплазмы) сопровождается активацией астроглии, что, вероятно, свидетельствует о тенденции к нейродегенеративным процессам. Существует мнение, что многие респираторные нарушения являются приобретенными во время пренатального развития и могут быть связаны с дисбалансом серотонина [6]. Недостаточная пластичность модуляции респираторной активности у новорожденных млекопитающих и человека может быть обусловлена незрелостью нейронных популяций парабрахияльных субъядер [1] и приводить к нарушению респираторной функции, синдрому внезапной детской смерти, апноэ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 12-04-00658.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carpentier V., Vaudry H., Mallet E. et al. Increased density of somatostatin binding sites in respiratory nuclei of the brainstem in sudden infant death syndrome. *J. Neurosci.*, 1998, v. 86, № 1, p. 159–166.
2. Dong X.-W. and Feldman J.S. Modulation of inspiratory drive to phrenic motoneurons by presynaptic adenosine A1 receptors. *J. Neurosci.*, 1996, v. 15, p. 3458–3467.
3. Dutschmann M., Morschel M., Kron M. and Herbert H. Development adaptive of the respiratory network: implications for the pontine Kolliker-Fuse nucleus. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2004, v. 143, № 2–3, p. 155–165.
4. Fulwiler C.E. and Saper C.B. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res. Rev.*, 1984, v. 7, p. 229–259.
5. Hayakawa T., Zheng J.Q. and Seki M. Direct parabrachial nuclear projections to the pharyngeal motoneurons in the rat: an anterograde and retrograde double-labeling study. *Brain Res.*, 1999, v. 816, № 2, p. 364–374.
6. Ptak K., Yamanishi T., Aungst J. et al. Raphé neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance. *P. J. Neurosci.*, 2009, v. 29, № 12, p. 3720–3737.
7. Saper C.B. and Loewy A.D. Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res.*, 1980, v. 197, p. 291–317.
8. Takeuchi Y., Kimura H. and Sano Y. Immunohistochemical demonstration of the distribution of serotonin neurons in the brainstem of the rat and cat. *Cell Tissue Res.*, 1982, v. 224, № 2, p. 247–267.
9. Ter Horst C.J., Hautvast R.W.H., De Jongste J. and Korf J. Neuroanatomy of cardiac activity-regulating circuitry: a transneuronal retrograde viral labeling study in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 1996, v. 8, p. 2029–2041.
10. Tokita K., Inoue T. and Boughter J.D. Jr. Subnuclear organization of parabrachial efferents to the thalamus, amygdala and lateral hypothalamus in C57BL/6J mice: a quantitative retrograde double labeling study. *Neuroscience*, 2010, v. 171, № 1, p. 351–365.
11. Yamamoto T., Takemura M., Inui T. et al. Functional organization of the rodent parabrachial nucleus. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 2009, v. 1170, p. 378–382.

Поступила в редакцию 23.09.2013

STRUCTURAL CHANGES IN THE SUBNUCLEI OF PARABRACHIAL COMPLEX IN THE DEFICIENCY OF SEROTONINERGIC SYSTEM IN THE PRENATAL PERIOD OF RAT DEVELOPMENT

L.I. Khozhai

The study was performed on the offspring, obtained from 8 female Wistar rats, which were administered parachlorophenylalanine on day 16 of gestation, to deplete the endogenous serotonin in their offspring. Dorsal and ventral subnuclei of the parabrachial complex lateral part were studied in rats on postnatal days 10 and 14 days (5–6 animals for each time point) using histological, immunocytochemical and morphometric methods. It was shown that serotonin deficiency changed the structure of the subnuclei. In the ventral subnucleus, the population of large multipolar neurons was more sensitive to low levels of serotonin. In experimental animals, the size of neuron cell bodies was reduced 1.6 times in comparison with the control, while cell numbers in the population remained practically unchanged. Morphological characteristics of smaller neurons corresponded to those in the control group, but their numbers were reduced, which probably can explain some rarefaction of neurons in the nucleus. In dorsal subnucleus of the experimental animals, the neurons of both populations had more pronounced changes. Sizes of the cell bodies in both large and small neurons was significantly decreased 2.0 and 1.8 times, respectively; the volume of their cytoplasm was significantly reduced, compared to that in control animals, while the number of cells in both populations remained practically unchanged. The reaction demonstrating glial fibrillary acidic protein has shown that the astrocytic glial population was increased in both subnuclei in the experimental animals in the early postnatal period.

Key words: *neurons, parabrachial subnuclei, serotonin, prenatal period*

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