

Л.И. Хожай

ЭКСПРЕССИЯ СЕРТОНИНОВОГО ТРАНСПОРТНОГО БЕЛКА В ДОРСАЛЬНОМ ЯДРЕ ШВА В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ У КРЫС

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

В работе изучена экспрессия серотонинового транспортного белка (5-НТТ) в дорсальном, вентральном и латеральном субъядрах дорсального ядра шва (DRN) крыс линии Вистар (n=15) в ранний постнатальный период. В исследовании использованы гистологические методы и иммуноцитохимическая реакция на 5-НТТ. Обнаружено, что на 5-е сутки постнатального периода основная часть нейронов исследованных субъядер интенсивно экспрессирует 5-НТТ. Однако к 10-м суткам уровень его экспрессии резко снижается, но с возрастом (к 20-м суткам) вновь происходит подъем экспрессии, который выражается в увеличении численности популяции 5-НТТ-позитивных нейронов, повышении плотности сплетения сети их отростков. Выявленные изменения экспрессии 5-НТТ свидетельствуют о разной степени функциональной активности серотонина в DRN в ранний постнатальный период.

Ключевые слова: дорсальное ядро шва, нейроны, отростки нейронов, серотониновый транспортный белок

Серотониновый транспортер (5-НТТ) является основным фактором, регулирующим внеклеточный уровень серотонина. Исследование особенностей изменения его синтеза в разные периоды онтогенеза и тесное взаимодействие с различными типами нейронов являются важными для понимания регуляции активности самого серотонина как в развитии ЦНС, так и в реализации различных физиологических функций.

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что у эмбрионов и взрослых животных существуют значительные различия в распределении 5-НТТ на плазмолемме тел серотонинергических нейронов [2]. Иммуноцитохимическая реакция на 5-НТТ показала, что у взрослых животных на плазмолемме тел нейронов и дендритов выявляется незначительное количество мест локализации 5-НТТ. У эмбрионов и плодов на периферии тел нейронов и мембранах крупных дендритов в ядрах шва присутствует значительное количество гранул, содержащих 5-НТТ. Последний на телах, дендритах и терминальных отростках нейронов ядер шва обеспечивает обратный захват серотонина, что одновременно способствует запуску его активного высвобождения в развивающемся мозгу [2, 3]. Однако сведения о распределении мест связывания 5-НТТ в ядрах шва в период раннего постнатального развития практически отсутствуют. В связи с этим целью данной работы

было изучение экспрессии 5-НТТ в дорсальном (d), вентральном (v) и латеральном (lat) субъядрах дорсального ядра шва (DRN) у крыс в ранний постнатальный период.

Материал и методы. Работа выполнена на лабораторных крысах линии Вистар. Содержание животных и все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Головной мозг крысят исследовали на 5-, 10-е и 20-е сутки постнатального развития (по 5 животных в каждой возрастной группе) и фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде (pH 7,4), заливали в парафин по общепринятой методике и готовили серийные поперечные срезы толщиной 5 мкм на уровне Брегмы –7,92–8,04 мм.

Иммуноцитохимическую реакцию на 5-НТТ проводили с использованием первичных антител (anti-Serotonin transporter antibody, AbCam, Великобритания) и вторичных реагентов из набора LSAB2 System-HRP (Dako, Дания). 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 Permaunt (Termo, США). Все процедуры проведения иммуноцитохимической реакции на гистологических срезах мозга, полученных от животных в разные сроки развития, были стандартизированы и осуществлялись одновременно. При анализе результатов реакции учитывали иммуноцитохимическое окрашивание цитоплазмы нейронов, наличие варикозных расширений терминалей и распределение иммунопозитивных гранул — как предполагаемых мест связывания 5-НТТ [3].

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

Нейроны подсчитывали на гистологических срезах, проходящих через центральную часть ядра. Морфологический анализ и количественный подсчет проводили на цифровых изображениях серийных срезов, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия). Подсчитывали число иммунопозитивных нейронов на стандартной единице площади к общему их числу, принятому за 100%.

Результаты исследования. На 5-е сутки постнатального развития в DRN-d, DRN-v, DRN-lat практически все нейроны крупного размера были 5-НТТ-иммунопозитивными, цитоплазма нейронов имела интенсивное окрашивание (рисунк). При реакции на 5-НТТ на плазмолемме тел нейронов в DRN-d в небольшом количестве присутствовали иммунопозитивные гранулы, однако они отсутствовали на телах нейронов в DRN-v и DRN-lat. В нейропиле DRN-d и DRN-v присутствовала довольно плотная сеть иммунопозитивных тонких терминальных отростков, которые имели множество варикозных расширений. В нейропиле DRN-lat, напротив, сеть иммунопозитивных тонких отростков была рыхлой, при этом отростки также имели много варикозных расширений. На поверхности мембран как дендри-

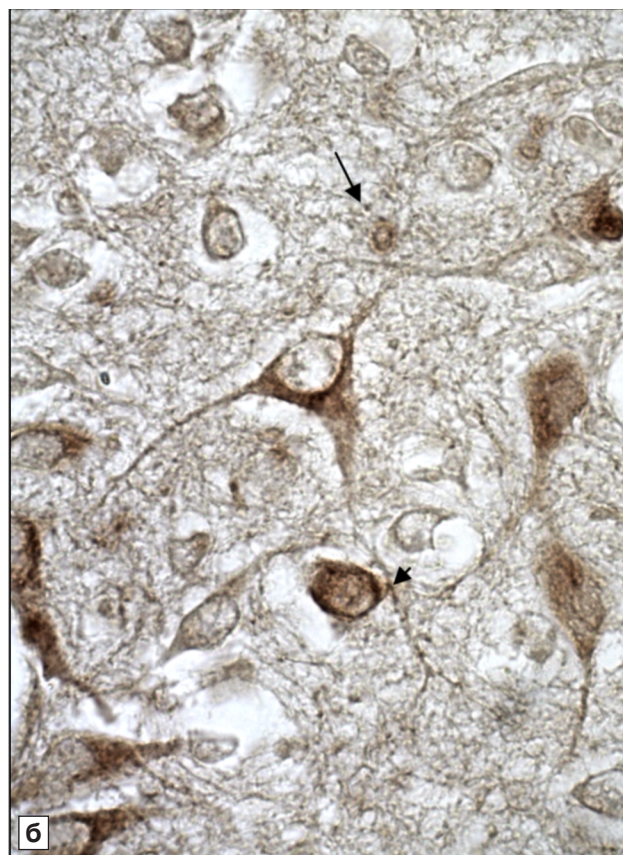
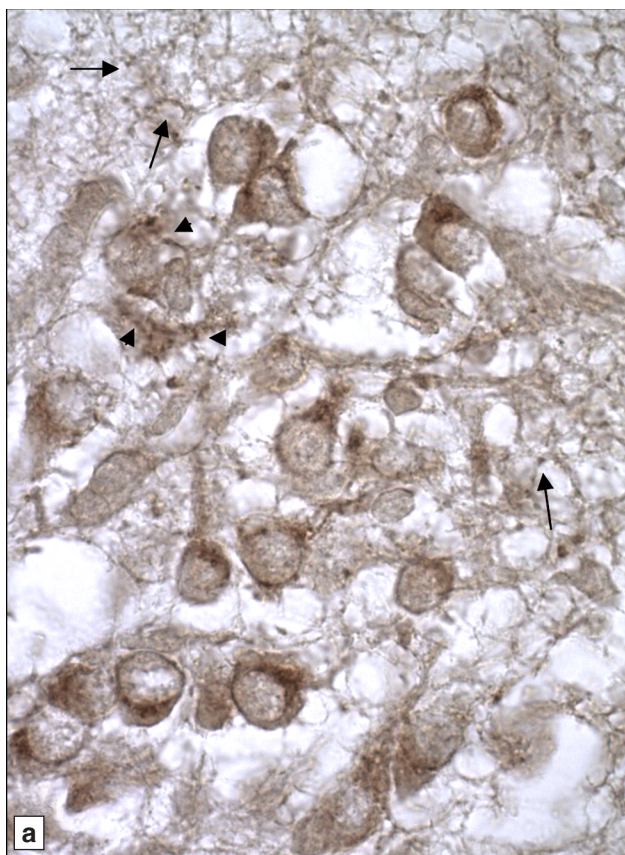
тов, так и аксонов (по их длине), присутствовали иммунопозитивные гранулы.

На 10-е сутки в DRN-d, DRN-v, DRN-lat иммунопозитивными были примерно 50% нейронов, преимущественно крупного размера. Объем окрашенной цитоплазмы клеток был значительно больше, чем в предыдущий срок исследования, при этом интенсивность окрашивания — одинаковая. Цитоплазма дендритов была окрашена, а аксонов — нет. Иммунопозитивные гранулы на мембране тел нейронов отсутствовали, однако они наблюдались на протяжении отростков, но в меньшем количестве, чем в предыдущий срок исследования.

В нейропиле плотность сети тонких слабо иммунопозитивных терминалей была значительно меньше, чем на 5-е сутки развития, также меньше было и варикозных терминальных расширений (см. рисунок, б).

На 20-е сутки в DRN-d, DRN-v, DRN-lat большинство нейронов крупного размера (почти 80%) иммунопозитивны, преимущественно это нейроны крупного размера. На плазмолемме тел нейронов гранулы отсутствовали.

В нейропиле присутствовала довольно плотная сеть иммунопозитивных отростков. В DRN-d



Дорсальное ядро шва у крыс на 5-е (а) и 10-е (б) сутки постнатального периода развития.

Длинные стрелки — терминальные варикозные расширения; головки стрелок — иммунопозитивные гранулы. Иммуноцитохимическая реакция выявления серотонинового транспортного белка. Об. 100, ок. 10

и DRN-lat редко встречались терминальные варикозные расширения, но при этом в нейропиле присутствовали множество очень мелких иммунопозитивных зерен. В DRN-v в нейропиле наблюдались плотная сеть иммунопозитивных отростков, множество терминальных варикозных расширений и гранул, однако их было меньше, чем на 5-е сутки развития.

Обсуждение полученных данных. Результаты исследования показали, что на 5-е сутки постнатального периода основная часть нейронов субъядер (DRN-d, DRN-v, DRN-lat) DRN интенсивно экспрессируют 5-HTT. Однако к 10-м суткам уровень его экспрессии резко снижается, но с возрастом (к 20-м суткам) вновь происходит ее подъем, который выражается в увеличении численности популяции нейронов, экспрессирующих 5-HTT, повышении плотности сети иммунопозитивных отростков и появлении множества очень мелких (пылевидных) иммунопозитивных зерен, видимо, представляющих пресинаптические места связывания 5-HTT [3, 4].

Присутствие в области DRN большого количества 5-HTT на телах, дендритах и терминальных отростках нейронов [5], вероятно, свидетельствует о процессе эффективного обратного захвата как внеклеточного, так и синаптического серотонина.

Полагают, что обратный захват серотонина способствует запуску его активного высвобождения, что обеспечивает необходимые условия развития и созревания ЦНС и формирования функций, контролируемых серотонином [3]. Выявленные изменения экспрессии 5-HTT свидетельствуют о разной степени функциональной активности серотонина в DRN в раннем постнатальном периоде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bruning G., Liangos O., Baumgarten H.G. Prenatal development of the serotonin transporter in mouse brain // *Cell. Tiss. Res.* 1997. Vol. 289, № 2. P. 211–221.
2. Tao-Cheng J.H., Zhou F.C. Differential polarization of serotonin transporters in axons vs. soma-dendrites: an immunogold electron microscopy study // *Neuroscience*. 1999. Vol. 94. P. 821–830.
3. Zhou F.C., Sari Y., Zhang J.K. Expression of serotonin transporter protein in developing rat brain // *Dev. Brain Res.* 2000. Vol. 119. P. 33–45.
4. Zhou F.C., Tao-Cheng J.H., Segu L. et al. Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junction: anatomical and functional evidence // *Brain Res.* 1998. Vol. 805. P. 241–254.
5. Zhou F.C., Xu Y., Bledsoe S. et al. Serotonin transporter antibodies: production, characterization, and localization in the brain // *Mol. Brain Res.* 1996. Vol. 43. P. 267–278.

Поступила в редакцию 13.02.2015

EXPRESSION OF SEROTONIN TRANSPORT PROTEIN IN THE DORSAL RAPHE NUCLEUS IN THE EARLY POSTNATAL PERIOD IN RATS

L.I. Khozhai

In this work an expression of serotonin transport protein (5-HTT) was studied in the dorsal raphe nucleus (DRN) — in its dorsal, ventral and lateral subnuclei in Wistar rats (n=15) during the early postnatal period. Histological methods and immunocytochemical staining demonstrating 5-HTT were used in the investigation. It was shown that at postnatal Day 5 major part of neurons of the subnuclei studied intensively expressed 5-HTT. However, by Day 10, the level of its expression decreased dramatically, but with age (by Day 20) the expression was increased once again. This was manifested by the augmentation of size of 5-HTT-positive neuronal population, the increase in the density of plexus network of their processes. The detected changes of 5-HTT expression indicate the varying degrees of functional activity of serotonin in the DRN in the early postnatal period.

Key words: *dorsal raphe nucleus, neurons, neuronal processes, serotonin transport protein*

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