

© Л.И.Хожай, 2015
УДК 611.018.8:612.015.348:599.323.4

Л.И.Хожай

ЭКСПРЕССИЯ СЕРОТОНИНОВОГО ТРАНСПОРТЕРА В ВЕНТРОЛАТЕРАЛЬНОЙ ЧАСТИ ЯДРА СОЛИТАРНОГО ТРАКТА У КРЫС В РАННИЕ СРОКИ ПОСТНАТАЛЬНОГО ПЕРИОДА В НОРМЕ И ПРИ НЕДОСТАТОЧНОСТИ СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ПРЕНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ

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

С использованием иммуоцитохимического метода исследована экспрессия серотонинового транспортера (5-НТТ) в вентролатеральной части ядра солитарного тракта у крыс линии Вистар в ранние сроки постнатального периода (5-е и 10-е сутки) в норме ($n=10$) и при пренатальном дефиците серотонина ($n=12$). Установлено, что в ранние постнатальные сроки в вентролатеральном отделе ядра солитарного тракта имеет место временная экспрессия 5-НТТ, наиболее выраженная в каудальной части вентрального субъядра. Показано, что в ростральной части вентрального и латерального субъядер число нейронов, синтезирующих 5-НТТ, невелико и с возрастом не изменяется. В каудальной области вентрального субъядра на 5-е сутки постнатального периода присутствует большое число нейронов, синтезирующих 5-НТТ, которое с возрастом значительно снижается. В каудальной области латерального субъядра выявляется небольшое количество нейронов, экспрессирующих 5-НТТ, которое с возрастом также снижается. Установлено, что в каудальной области как вентрального, так и латерального субъядер, уровень экспрессии 5-НТТ значительно выше, чем в ростральной области. Показано, что в исследованных субъядрах пренатальный дефицит серотонина вызывает уменьшение числа нейронов, синтезирующих 5-НТТ.

Ключевые слова: *ядро солитарного тракта, вентральное субъядро, латеральное субъядро, серотониновый транспортер*

Серотониновый транспортный трансмембранный белок (5-НТТ) является основным регулятором содержания внеклеточного серотонина, осуществляющим его обратный захват из межклеточного пространства и, таким образом, определяющим степень его трансмиссии. Показано, что 5-НТТ экспрессируется, главным образом, серотонинергическими нейронами [12, 14], при этом в нейропиле местами локализации 5-НТТ являются варикозные расширения терминальных отростков, где нейротрансмиттер может синтезироваться, сохраняться и высвобождаться [5, 15, 16], а также крупные и мелкие зерна, выявляющиеся при помощи иммуоцитохимической реакции на 5-НТТ, которые могут представлять собой пресинаптические места связывания 5-НТТ [1, 13, 14]. В поздние сроки пренатального периода развития и первые недели постнатального периода у мышевидных грызунов в некоторых формациях головного мозга (в ядрах таламуса, тригеминальном и кохлеарном ядрах, гиппокампе и неокортексе) были выявлены отдельные нейроны, экспрессирующие 5-НТТ, но не относящиеся к серотонинергической системе [6, 8, 12]. Полагают,

что в таких случаях имеет место «транзитная», или кратковременная, экспрессия 5-НТТ несеротониновыми нейронами [6, 12]. Ядро солитарного тракта обладает отчетливо выраженной висцеротопией, в него поступают многочисленные афферентные волокна от висцеральных систем, а также оно имеет зоны, проецирующиеся на различные внутренние органы [10, 11], в том числе, на обеспечивающие жизненно важные сердечно-сосудистые и дыхательные рефлексы [9, 10]. Вентролатеральная часть ядра солитарного тракта входит в состав дорсальной группы респираторных ядер, состоящих, преимущественно, из инспираторных бульбоспинальных нейронов, проецирующихся на спинальные диафрагмальные и межреберные инспираторные мотонейроны, осуществляющие процесс вдоха [7, 10]. Известно, что серотонин принимает непосредственное участие в регуляции респираторной функции [6], однако экспрессия 5-НТТ, как основного фактора, регулирующего его трансмиссию в области продолговатого мозга, а также зависимость экспрессии от содержания самого серотонина, практически не изучены. В связи с этим целью данной работы

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

явилось исследование экспрессии серотонинового транспортера в вентролатеральной части ядра солитарного тракта в ранние сроки постнатального периода в норме и при дефиците серотонина в пренатальный период развития.

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). В работе использовали метод ингибирования триптофангидроксилазы (фермента синтеза серотонина) параклорфенилаланином (пХФА) (Sigma, США). пХФА в дозе 400 мг/кг самкам крыс ($n=5$) вводили внутривентрально на 16-е сутки беременности, при этом происходило снижение содержания эндогенного серотонина до 50–80% в период формирования у плодов собственной серотонинергической системы [1, 3]. Головной мозг у крысят исследовали на 5-е и 10-е сутки после рождения. В качестве контроля использовали животных соответствующих сроков развития, полученных от интактных самок ($n=3$). В каждый срок исследования было использовано по 5–6 как подопытных, так и контрольных крысят. Материал фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (рН 7,4), заливали в парафин по общепринятой методике и готовили серийные поперечные срезы продолговатого мозга толщиной 4–5 мкм. Исследовали ростральную и каудальную области вентрального и латерального субъядер ядра солитарного тракта. Ростральную область вентрального и латерального субъядер исследовали на уровне *nucl. facialis* (Bregma — 11,64 мм), а каудальную область на уровне *nucl. ambiguus* (Bregma — 12,00–12,84 мм).

Выявление 5-НТТ проводили с использованием первичных 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). Условия проведения иммуноцитохимической реакции были стандартизированы, все процедуры при иммуноокрашивании гистологических срезов продолговатого мозга, полученных от интактных и подопытных животных в разные сроки развития, осуществляли одновременно. При анализе результатов реакции учитывали окрашивание цитоплазмы нейронов, наличие терминальных варикозных расширений и распределение иммунопозитивных гранул — как предполагаемых мест связывания 5-НТТ [12].

Морфологический анализ и подсчет нейронов проводили на цифровых изображениях серийных срезов разных областей изучаемых субъядер, полученных при помощи светового микроскопа Leica DME (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica EC3 (Leica, Германия). Подсчитывали число иммунопозитивных нейронов на стандартной площади 0,1 мм². Статистическую обработку полученных показателей осуществляли при помощи пакета прикладных компьютерных программ Statistica 6.0., ImageScope Color и ORIGIN50. Значимость различий определяли по величине *t*-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $P<0,05$.

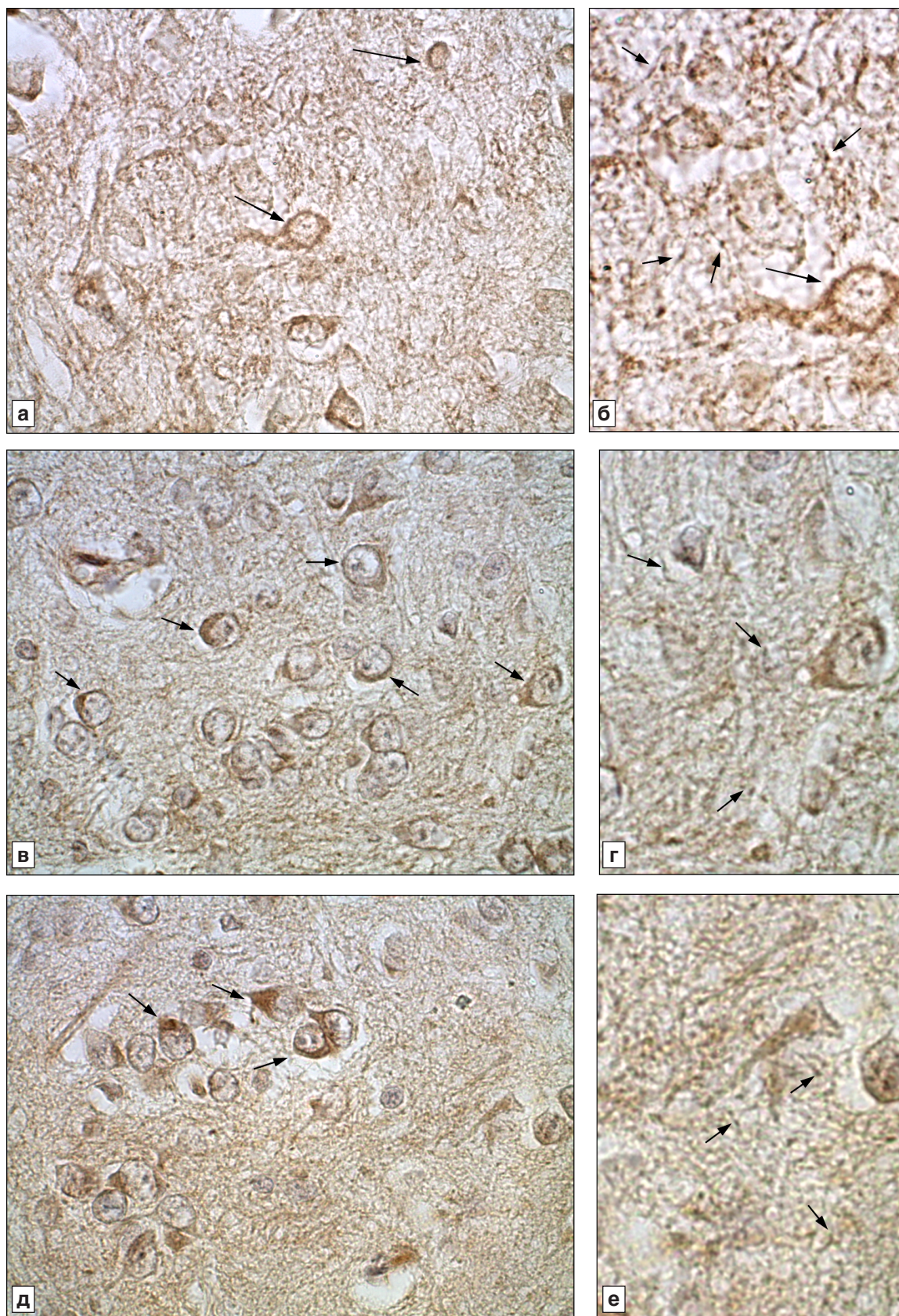
Результаты исследования. *Ростральная часть вентрального и латерального субъядер ядра солитарного тракта.* На 5-е и 10-е сутки у контрольных животных в ростральной части вентрального субъядра присутствует по $2,4\pm0,8$ и $2,0\pm0,7$ иммунопозитивных нейронов на стандартной площади среза соответственно. На 5-е сутки в нейропиле визуально определяется довольно высокая плотность сплетения отростков и мелких варикозных расширений (рисунков, а, б). К 10-м суткам происходит снижение интенсивности окрашивания цитоплазмы нейронов, сокращение количества терминальных варикозных расширений и появление иммунопозитивных пылевидных зерен.

На 5-е и 10-е сутки в ростральной части вентрального субъядра при пренатальной недостаточности серотонинергической системы динамика изменений соответствует таковой в контроле. В субъядре обнаруживается по $2,0\pm0,4$ и $1,1\pm0,9$ иммунопозитивных нейронов соответственно. К 10-м суткам, также как в контроле, происходит некоторое снижение интенсивности иммунной реакции цитоплазмы нейронов, сокращение количества терминальных варикозных расширений и появление иммунопозитивных пылевидных зерен.

На 5-е и 10-е сутки у животных в контроле в ростральной части латерального субъядра присутствует незначительное число иммунопозитивных нейронов $1,3\pm0,5$ и $1,0\pm0,7$ соответственно. В нейропиле на 5-е сутки плотность сплетения отростков и расположения терминальных варикозных расширений выше, чем на 10-е сутки. При пренатальной недостаточности серотонинергической системы на 5-е и 10-е сутки в латеральном субъядре число иммунопозитивных нейронов составляет $0,8\pm0,3$ и $0,60\pm0,10$ соответственно. В нейропиле динамика изменений соответствует таковой в контроле.

Таким образом, у животных в контроле в ростральной области вентрального и латерального субъядер ядра солитарного тракта нейронов, экспрессирующих 5-НТТ, очень мало, их численность на протяжении исследованного периода развития не изменяется. У подопытных крыс, также как в контроле, интенсивность экспрессии 5-НТТ незначительная, и численность иммунопозитивных нейронов соответствует контрольным значениям.

Каудальная часть вентрального и латерального субъядер ядра солитарного тракта. На 5-е сутки у животных в контроле в каудальной части вентрального субъядра присутствует $8,3\pm1,4$ иммунопозитивных нейронов. В нейропиле обнаруживается плотное сплетение иммунопозитив-



Ростральная (а, б) и каудальная (в–е) части вентрального субъядра солитарного тракта у крысят на 5-е (а–г) и 10-е (д, е) сутки после рождения.

а, б — иммунопозитивные нейроны (длинные стрелки); б — увеличенный фрагмент рис. а; терминальные варикозные расширения (короткие стрелки); в — иммунопозитивные нейроны (стрелки); г — увеличенный фрагмент рис. в. Нейропиль, терминальные варикозные расширения (стрелки); д — иммунопозитивные нейроны (стрелки); е — увеличенный фрагмент рис. д — терминальные варикозные расширения (стрелки). Иммуногистохимическая реакция на 5-НТТ. Об. 100, ок. 10

ных тонких терминальных отростков, имеющих множество варикозных расширений и гранул на их поверхности (см. рисунок, в, г). К 10-м суткам (см. рисунок, д, е) число иммунопозитивных нейронов значимо снижается до $5,1 \pm 1,5$, однако, в нейропиле плотность сети отростков примерно соответствует таковой на 5-е сутки.

На 5-е сутки у подопытных животных в каудальной части вентрального субъядра присутствует $4,7 \pm 1,4$ иммунопозитивных нейронов (на центральных срезах). В нейропиле выявляется довольно плотное сплетение отростков с множеством варикозных расширений и гранул. На 10-е сутки число иммунопозитивных нейронов соответствует таковому на 5-е сутки и составляет $4,5 \pm 0,8$. В нейропиле морфологическая картина схожа с таковой на 5-е сутки.

На 5-е сутки у животных в контроле в каудальной части латерального субъядра на стандартной площади среза присутствует $3,1 \pm 1,1$ иммунопозитивных нейронов. В нейропиле обнаруживается плотное сплетение терминальных отростков и множество варикозных расширений и гранул. К 10-м суткам число иммунопозитивных нейронов соответствует таковому на 5-е сутки и составляет $2,8 \pm 0,9$, но в нейропиле плотность сплетения отростков и варикозных расширений снижается.

На 5-е и 10-е сутки у подопытных крыс в каудальной части латерального субъядра значимо сокращается число иммунопозитивных нейронов до $1,3 \pm 0,6$ и $1,0 \pm 0,7$ соответственно. В нейропиле плотность сплетения отростков и варикозных расширений также снижается по сравнению с контролем.

Обсуждение полученных данных. Проведенное исследование показало, что в ранний постнатальный период в ростральной и каудальной частях вентролатерального отдела ядра солитарного тракта наблюдается разная динамика экспрессии 5-НТТ.

У контрольных и подопытных животных в ростральной части вентрального и латерального субъядер ядра солитарного тракта число нейронов, синтезирующих 5-НТТ, невелико и с возрастом не изменяется. Вероятно, уровень экспрессии 5-НТТ здесь низкий, и пренатальный дефицит серотонина не оказывает заметного влияния.

В каудальной части вентрального субъядра на 5-е сутки после рождения у контрольных животных имеется довольно большое число нейронов, синтезирующих 5-НТТ, что свидетельствует об интенсивной его экспрессии, однако с возрастом (на 10-е сутки) количество таких нейронов резко снижается (почти в 2 раза). Результаты исследования показали, что в ранний постнатальный

период в этой области субъядра при пренатальном дефиците серотонина численность нейронов, экспрессирующих 5-НТТ, сокращается примерно в 2 раза, она сохраняется таковой до 10-х суток. Вероятно, эти изменения имеют вторичный характер и являются результатом либо нарушения синтетических процессов, вследствие задержки дифференцировки нейронов, либо сокращения афферентных и эфферентных связей в результате недоразвития мишеней.

В каудальной части латерального субъядра у контрольных животных на 5-е сутки после рождения число нейронов, экспрессирующих 5-НТТ, небольшое, но немного, однако, значимо снижающееся к 10-м суткам; у подопытных крыс такие нейроны единичны и с возрастом их количество не изменяется.

В каудальной части как вентрального, так и латерального субъядер количество нейронов, экспрессирующих 5-НТТ, почти в 3–3,5 раза больше и, вероятно, уровень экспрессии 5-НТТ здесь значительно выше, чем в ростральной.

Представленные наблюдения, по-видимому, могут отражать разную функциональную активность нейронов ростральных и каудальных частей субъядер, однако, следует принимать во внимание особенности строения и организации межнейронных связей в этой области продолговатого мозга.

Установлено, что вентролатеральный отдел ядра солитарного тракта отличается разнообразием поступающих сюда висцеральных афферентных проекций и нисходящих проекций из вышележащих отделов головного мозга. Важная информация для регуляции дыхания поступает в каудальные области респираторных субъядер ядра солитарного тракта как по афферентным волокнам от различных структур, участвующих в процессе дыхания, так и блуждающего нерва [11]. Более того, были установлены обширные эфферентные связи нейронов каудальной части вентролатеральной области с амбигуальным и ретроамбигуальным ядрами (иннервирующими мускулатуру бронхов, сердца, легких, участвующих в регуляции фаз дыхательного цикла), входящими в состав вентральной респираторной группы ядер, а также и с ядрами спинного мозга [2, 9].

В ростральной части, напротив, выявлено небольшое число нейронов, дающих проекции на межреберные респираторные мышцы [4].

Таким образом, результаты исследования показали, что в ранние сроки постнатального развития в вентролатеральной части ядра солитарного тракта имеет место временная экспрессия серотонинового транспортера, наиболее выраженная в каудальной части вентрального субъядра.

Присутствие транспортера предполагает трансмиссию серотонина, который, учитывая множественные афферентные и эфферентные связи с нейронами ядер вентральной респираторной группы и ядрами спинного мозга, может участвовать в регуляции механизмов фаз респираторного цикла. Нарушение экспрессии серотонинового транспортера в вентральном и латеральном субъядрах в ранний постнатальный период, вероятно, может вызывать снижение уровня трансмиссии серотонина, контролирующего деятельность инспираторных нейронов этих субъядер, что, в свою очередь, может быть причиной респираторных нарушений у новорожденных и приводить к апноэ и синдрому внезапной детской смерти.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-02167.

ЛИТЕРАТУРА

1. Науменко Е.В. Центральная регуляция гипоталамо-надпочечникового комплекса. Л.: Наука, 1917.
2. Оленев С.Н., Оленев А.С. Нейробиология-95. СПб.: Изд-во СПбГПМА, 1995.
3. Попова Н.К., Никулина Э.М., Арав В.Н., Кудрявцева Н.Н. О роли серотонина в одном из видов агрессивного поведения // Физиол. журн. 1975. Т. 61, № 2. С. 183–186.
4. Сергиевский М.В., Киреева Н.Я., Гордиевская Н.А. О возможных взаимодействиях инспираторной и экспираторной нейрональных систем // Физиол. журн. им. И.М.Сеченова. 1983. Т. 69, № 4. С. 439–444.
5. Agnati L.F., Guidolin D., Guescini M. et al. Understanding wiring and volume transmission // Brain Res. Rev. 2010. Vol. 64, № 1. P. 137–159.
6. Brünig G.L., Liangos O. Transient expression of the serotonin transporter in the developing mouse thalamocortical system // Acta Histochem. 1997. Vol. 99, № 1. P. 117–121.
7. Fedorco L., Merrill E.G., Lipski J. Two descending medullary inspiratory pathways in phrenic motoneurons // Neurosci. Lett. 1984. Vol. 43. P. 74–77.
8. Hanson S.R., Mezey E., Hoffman B.J. Serotonin transporter messenger RNA in the developing rat brain: early expression in serotonergic neurons and transient expression in non-serotonergic neurons // Neuroscience. 1998. Vol. 83, № 4. P. 1185–1201.
9. Merrill E. The lateral respiratory neurons of the medulla: their association with nucleus ambiguus, nucleus retroambiguus, the spinal accessory nucleus and the spinal cord // Brain Res. 1970. Vol. 24, № 1. P. 11–28.
10. Paton J.F. Pattern of cardiorespiratory afferent convergence to solitary tract neurons driven by pulmonary vagal C fiber stimulation in the mouse // Am. J. Neurophysiol. 1998. Vol. 79, № 5. P. 2365–2373.
11. Wilson C.G., Zhang Z., Bonham A.C. Non NMDA receptors transmit cardiopulmonary C fiber input in nucleus tractus solitarius in rats // J. Physiol. 1996. Vol. 496, № 3. P. 773–785.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Zoli M.L., Agnati L.F. Wiring and volume transmission in the central nervous system: the concept of closed and open synapses // Prog. Neurobiol. 1996. Vol. 49, № 4. P. 363–380.
16. Zoli M.L., Torri C., Ferrari R. et al. The emergence of the volume transmission concept // Brain Res. Brain Res. Rev. 1998. Vol. 26, № 2–3. P. 136–147.

Поступила в редакцию 24.06.2015

EXPRESSION OF SEROTONIN TRANSPORTER IN THE VENTROLATERAL PART OF THE NUCLEUS OF THE SOLITARY TRACT IN RATS IN THE EARLY POSTNATAL PERIOD IN NORM AND FOLLOWING SEROTONERGIC SYSTEM DEFICIENCY IN THE PRENATAL PERIOD OF DEVELOPMENT

L.I.Khozha

The expression of serotonin transporter (5-HTT) was examined using the immunocytochemical method in the ventrolateral part of the nucleus of the solitary tract in Wistar rats in the early postnatal period (Days 5 and 10) in norm (n=10) and after prenatal serotonin deficiency (n=12). Temporary expression of the 5-HTT was demonstrated during the early postnatal period in the ventrolateral division of the nucleus of the solitary tract, that was more pronounced in the most caudal part of the ventral subnucleus. It was shown that in the rostral part of ventral and lateral subnuclei, the number of neurons synthesizing 5-HTT was low and remained unchanged with age. In the caudal region of the ventral subnucleus, a large number of neurons synthesizing 5-HTT was found on Day 5 of postnatal period, that was significantly reduced with age. In the caudal region of the lateral subnucleus, a small number of neurons expressing 5-HTT was detected, that also decreased with age. It was found that in the caudal region of both ventral and lateral subnuclei, the level of 5-HTT expression was significantly higher than in the rostral region. Prenatal deficiency of serotonin resulted in a reduction of the number of neurons synthesizing 5-HTT in all the subnuclei investigated.

Key words: *nucleus of the solitary tract, ventral subnucleus, lateral subnucleus, serotonin transporter*

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