

© Л. И. Хожай, В. А. Отеллин, 2012
УДК 611.018.86:612.64:599.323.4

Л. И. Хожай и В. А. Отеллин

СИНАПТОГЕНЕЗ В ДОРСАЛЬНОМ ЯДРЕ ШВА ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА СЕРОТОНИНА

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

Синаптогенез в *nucleus raphe dorsalis* (NRD) продолговатого мозга крыс Вистар изучен в конце пренатального (19-е и 20-е сутки) и раннего постнатального (5-е и 20-е сутки) периодов (по 8–10 животных на временную точку), а также исследована роль серотонина в формировании синаптических контактов в этот период развития. Показано, что у контрольных (интактных) животных на 19-е сутки пренатального развития в NRD-d, NRD-v и NRD-l начинает формироваться нейропиле, и на отростках появляются синаптические контакты, а на 20-е сутки они впервые обнаруживаются на поверхности тел нейронов. Плотность расположения синаптофизин-положительных гранул как на отростках в нейропиле, так и на телах нейронов, резко и значительно возрастает к 5-м суткам постнатального развития. В дальнейшем до 20-х суток ее увеличение незначительно. Дефицит серотонина во второй половине внутриутробного развития, вызванный введением пара-хлорфенилаланина самкам на 16-е сутки беременности, приводит к значительной задержке синаптогенеза в NRD у их потомства как в пре-, так и в ранний постнатальный периоды. С увеличением постнатального возраста плотность расположения синаптических контактов увеличивается не одинаково в разных частях NRD: в NRD-d она приближается к контрольной, а в NRD-v и NRD-l — остается сниженной. Полученные результаты свидетельствуют об участии серотонина в синаптогенезе в NRD.

Ключевые слова: *развивающийся мозг, синаптические контакты, синаптофизин, nucleus raphe dorsalis, серотонин*

Взаимоотношения между нейронами в ЦНС осуществляются в большей мере посредством специализированных синаптических контактов, которые формируются в раннем периоде онтогенеза с участием определенных зон одного или двух нейронов (компонентов пре- и постсинаптической мембраны) на уровне их тел и отростков. Способность к образованию синапсов максимально реализуется в развивающемся мозгу, при этом от своевременного установления высокоспецифических контактов между многообразными нейронами зависит функциональная активность структур мозга [8, 9, 11], а активность мозга, в свою очередь, сопровождается усложнением пространственной организации синапсов и увеличением их эффективности. Показано, что для периода развития различных отделов мозга характерным является как формирование синаптических контактов, так и элиминация последних — лишних, незрелых и неэффективных. При этом отдельные синапсы могут быть устойчивыми в течение продолжительных периодов времени, а другие — сохраняют поразительную способность к быстрой разборке и реорганизации [9–11], обеспечивая, тем самым, синаптическую пластичность. Особого внимания заслуживает исследование процессов синаптогенеза в стволовых ядрах, клетки которых содержат

моноамины, в частности, серотонин, поскольку эти клеточные группы представляют собой ключевые источники как эфферентных восходящих, так и нисходящих серотонинергических аксонных систем мозга у млекопитающих [12], оказывающие влияние на развитие и функции других отделов ЦНС [1, 4–7], так и афферентные волокна, обеспечивающих с ними обратную связь. Несмотря на важность проблемы, процесс формирования синапсов в моноаминергических структурах в настоящее время остается практически не изученным. В связи с этим проведено морфологическое исследование, цель которого — изучить динамику изменения синаптогенеза в дорсальном ядре шва (*nucleus raphe dorsalis* — NRD) в конце пренатального и раннего постнатального периодов развития, а также выявить роль серотонина в формировании синаптических контактов в этот период развития.

Материал и методы. Работа выполнена на лабораторных крысах линии Вистар. Были использованы 10 беременных самок, из них: 6 экспериментальных и 4 контрольных (интактных). Все экспериментальные процедуры осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Для снижения содержания серотонина в мозгу плодов использовали метод ингибирования ключевого фермента его синтеза —

Сведения об авторах:

Хожай Людмила Ивановна, Отеллин Владимир Александрович (astarta0505@mail.ru), лаборатория онтогенеза нервной системы, Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, 199034 Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

триптофангидроксилазы пара-хлорфенилаланином (пХФА) (Sigma, США). пХФА крысам вводили однократно, внутрибрюшинно в дозе 400 мг/кг на 16-е сутки беременности в период формирования у плодов NRD, вызывая дефицит серотонина и, как следствие, нарушая его развитие [1]. Доза была выбрана с учетом данных литературы, свидетельствующих о снижении содержания серотонина до 50–80% у взрослых животных и плодов [2, 10, 12]. Исследование головного мозга у плодов проводили в конце пренатального (на 19-е и 20-е сутки) и у животных раннего постнатального (на 5-е и 20-е сутки) периодов развития. В качестве контроля использовали головной мозг крысят соответствующих сроков развития, полученных от интактных самок. Гистологическому анализу подвергали мозг, взятый от 8–10 плодов и крысят каждого срока развития. Детально исследовали состояние разных частей NRD: дорсальной (NRD-d), вентральной (NRD-v) и латеральных (NRD-l). У контрольных животных и у развивавшихся при дефиците серотонина идентификацию структур мозга проводили по атласу [13]. Мозг крысят фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде на фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) в течение 24 ч, обезвоживали и заливали в парафин по общепринятой методике, готовили серийные фронтальные срезы толщиной 5–7 мкм.

Для обнаружения синаптофизин-позитивных структур использовали кроличьи поликлональные антитела к синаптофизину (интегральному мембранному гликопротеину) — маркеру пресинаптических пузырьков (DakoCytomation, Дания) в разведении 1:1. Для выявления комплекса антиген—антитело применяли набор реагентов LSAB+2 (Dako, Дания). Визуализацию продукта реакции проводили при помощи хромогена DAB+ (Dako, Дания). Для оценки плотности продукта реакции использовали полуколичественный метод, выражая самую высокую плотность расположения синаптофизин-иммунопозитивных гранул как 5+. Принято считать, что выявляемые синаптофизин-позитивные гранулы идентифицируют пресинаптическую часть синапса и, таким образом, определяют места контактов между нейронами [9, 11]. Условия процедуры иммуноцитохимической реакции (длительность инкубации, температура, концентрация и количество реагентов) стандартизировали, одновременно окрашивали препараты, полученные как от контрольных животных, так и подопытных. После проведения иммуноцитохимической реакции часть срезов докрашивали гематоксилином Джалла (Био Витрум, Россия) и заключали в синтетическую среду Permount (Dako, Дания). Исследования проводили, используя световой микроскоп DME (Leica, Германия), изображения были получены при помощи цифровой видеокамеры (Leica, Германия). Для компьютерной морфометрии использовали поперечные срезы стволовой части мозга. С помощью цифровой камеры, встроенной в микроскоп, получали изображения, на которых при помощи программы ImageJ (США) определяли площади тел нейронов. Измерения проводили на 10 гистологических срезах (каждом 3-м серийном срезе) у всех животных экспериментальной и контрольной групп. Статистическую обработку полученных морфометрических показателей осуществляли при помощи компьютерных программ ImageScore Color и ORIGIN50. Определяли среднее арифметическое значение и его стандартную ошибку. Для оценки значимости цифровых данных применяли t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

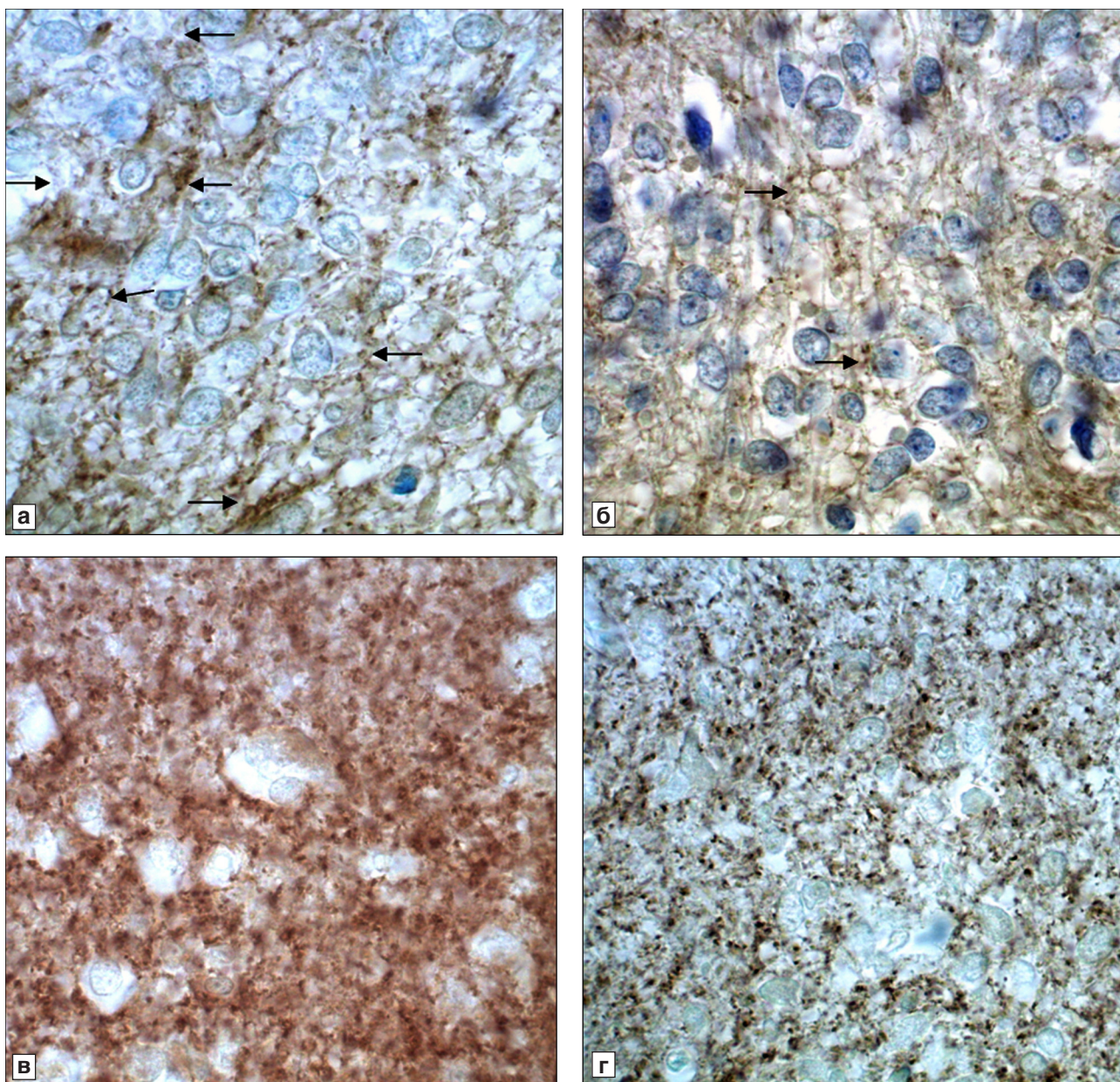
Результаты исследования. У плодов контрольной группы на 19-е и 20-е сутки развития

в NRD-d, NRD-v и NRD-l начинает развиваться нейропилль, отдельные нейроны располагаются на расстоянии друг от друга. Наличие на срезах оснований отростков тел клеток дает возможность предположить, что некоторые молодые нейроны уже имеют по 2–3 отростка. Встречаются нейроны, попарно прилежащие друг к другу. В нейропилле отдельные терминальные отростки имеют иммунопозитивную реакцию цитоплазмы на синаптофизин. По ходу отростков на поверхности некоторых из них присутствуют синаптофизин-позитивные гранулы, как мелкие одиночные, так и собранные (по 8–10) в группы, плотность их расположения можно оценить как 1+. В этот срок развития на теле некоторых клеток уже встречаются мелкие одиночные, а иногда довольно крупные синаптофизин-позитивные гранулы.

У плодов крыс, развивавшихся при дефиците серотонина, во всех частях NRD на 19-е и 20-е сутки нейропилль менее развит, тела нейронных клеток имеют значимо меньшие размеры, чем в контроле (84 ± 6 и 98 ± 4 мкм² соответственно) и располагаются близко друг к другу, более того, присутствуют прилежащие друг к другу клетки как парно, так и составляющие группы по 3–5 клеток. В нейропилле цитоплазма многих отростков дает положительную реакцию на синаптофизин. На поверхности отростков определяются одиночные синаптофизин-позитивные гранулы, на поверхности тел нейронов их практически нет (рисунки, а, б).

Исследование мозга контрольных животных на 5-е сутки постнатального развития показало, что нейропилль уже хорошо развит, и в NRD-d, NRD-v и NRD-l одинаково высокая плотность синаптофизин-позитивных гранул, которые как мелкие, так и крупные, часто образуют интенсивно окрашенные скопления и в большом количестве встречаются не только в нейропилле, но и на поверхности тел нейронов (плотность расположения гранул можно оценить как 4+) (см. рисунок, в). Во всех частях NRD встречаются единичные пары прилежащих друг к другу тел нейронов.

При дефиците серотонина в последнюю неделю внутриутробного развития у животных на 5-е сутки постнатального развития в NRD-d, NRD-v и NRD-l нейроны имеют значимо меньший размер тел, чем в контроле (103 ± 9 и 164 ± 5 мкм² соответственно), и располагаются ближе друг к другу, что свидетельствует о задержке общего развития NRD и меньшей степени развития нейропиля, где цитоплазма некоторых отростков сохраняет иммунопозитивную реакцию на синаптофизин. Плотность расположения синаптофизин-позитивных гранул в NRD-d значительно ниже



Nucleus raphe dorsalis (pars dorsalis) мозга крысы на 20-е сутки пре- (а, б) и 5-е сутки постнатального (в, г) развития.

а, в — контроль; б, г — при дефиците серотонина во второй половине внутриутробного развития. Иммуноцитохимическая реакция на синаптофизин (стрелки — иммунопозитивные гранулы), докраска гематоксилином Джалла. Об. 100, ок. 10

(2+), чем в контроле (см. рисунок, г), однако выше, чем в NRD-v и NRD-l (1+), как правило, гранулы одиночные, мелкие или крупные, их скоплений практически нет. На поверхности тел нейронов присутствуют немногочисленные одиночные гранулы.

К 20-м суткам у животных в контроле в NRD-d, NRD-v и NRD-l тела нейронов располагаются на значительном расстоянии друг от друга, что свидетельствует о высокой степени развития нейропиля, однако, наряду с этим, в ядре сохраняются единичные пары прилежащих друг к другу тел нейронов. В нейропиле в NRD-d, NRD-v и NRD-l плотность синаптофизин-позитивных гра-

нул одинаково высокая (5+) и выше, чем в предыдущий срок исследования. На поверхности тела отдельных нейронов много иммунопозитивных гранул (как одиночных крупных, так и собранных в группы).

У животных, испытывавших дефицит серотонина в последнюю неделю внутриутробного развития, в NRD-d, NRD-v и NRD-l размеры тел нейронов значимо меньше, чем в контроле (156 ± 18 и 251 ± 13 μm^2 соответственно). Сохраняются попарно лежащие тела нейронов. В нейропиле NRD-d плотность расположения синаптофизин-позитивных гранул практически не отличается от таковой в контроле (5+). На поверхности

тел нейронов располагаются в основном крупные одиночные гранулы. Как в NRD-v, так и в NRD-l общая плотность расположения синаптофизин-позитивных гранул (мест контактов) на поверхности отростков и тел нейронов оказалась примерно одинаковой (3+), однако ниже, чем в NRD-d, и гораздо ниже, чем в контроле.

Обсуждение полученных данных. Исследование показало, что у плодов крыс контрольной группы в NRD-d, NRD-v и NRD-l на 19-е сутки начинает развиваться нейропиле, и на поверхности отростков появляются синаптические контакты, а на 20-е сутки они впервые обнаруживаются на поверхности тел нейронов. На 19–20-е сутки в нейропиле всех частей NRD цитоплазма многих отростков нейронов дает иммунорезистивную реакцию на синаптофизин, что, видимо, свидетельствует о незрелости нейронов. Подобный факт был отмечен при исследовании синаптогенеза в мозгу мыши, где в цитоплазме отростков незрелых нейронов — как аксонов, так и дендритов — выявлялся синаптофизин. В зрелых нейронах синаптофизин определялся только в аксональных пресинаптических терминалах [9, 11]. Результаты нашего исследования показали, что уже на ранних стадиях развития синаптофизин-позитивные гранулы имеют разные размеры. Вероятно, синапсы в этот период отличаются по степени сложности своей организации, они могут быть простыми (т. е. иметь одну пре- и постсинаптическую активные зоны) и сложными (образованными большим числом пре- и постсинаптических зон, объединенных в единый структурно-функциональный комплекс), при этом диаметр синаптических контактов может составлять от 0,126 до 0,270 мкм [3]. Плотность расположения синаптофизин-позитивных гранул как на отростках в нейропиле, так и на поверхности тел нейронов резко и значительно увеличивается к 5-м суткам постнатального развития. В дальнейшем — к 20-м суткам она возрастает незначительно.

Полученные результаты свидетельствуют о влиянии серотонина на синаптогенез в NRD. Дефицит серотонина во второй половине внутриутробного развития приводит к значительной задержке синаптогенеза в NRD как в пре-, так и в ранний постнатальный периоды. К концу пренатального развития, в отличие от контроля, в нейропиле выявляются редкие синаптические контакты, а на телах нейронов контакты вообще отсутствуют. В ранний постнатальный период плотность расположения контактов увеличивается, однако на отростках как в нейропиле, так и на телах нейронов при дефиците серотонина

она значительно ниже, чем в контроле. К 20-м суткам постнатального развития плотность расположения синаптических контактов возрастает не одинаково в разных частях NRD: в NRD-d она приближается к таковой в контроле, а в NRD-v и NRD-l остается сниженной. Возможно, разница в плотности расположения синапсов в разных частях NRD отражает как региональные различия в постсинаптических структурах клеток-мишеней, так и их способность формировать постсинаптические структуры в зависимости от содержания серотонина.

Увеличение количества синаптических контактов в NRD во время развития особи является отражением как повышения числа мест контактов между нейронами внутри ядра, так и увеличения числа установленных контактов с нейронами и их отростками приходящих в NRD пресинаптических терминалей афферентных волокон. Существует мнение, что при этом формируются определенные моноаминергические нейрональные цепи, звеньями которых являются серотонинергические нейроны [12]. Возникающие посредством установления синаптических контактов нейрональные цепи, несомненно, оказываются функциональными еще до рождения. Задержка или нарушение синаптогенеза может приводить к изменению взаимодействия серотонинергических нейронов с нейронами других формаций мозга. Как в пре-, так и в постнатальный период в NRD обнаруживаются прилежащие друг к другу (расположенные парно или группами до 5) тела нейронов, образующие между собой сомато-соматические контакты [12]. При дефиците серотонина такие группы встречаются значительно чаще, чем в контроле. Их существование между нейронами NRD было ранее отмечено в развивающемся мозгу у мышей [12], однако функции этих контактов до сих пор неизвестны. В настоящее время роль и значение сомато-соматических контактов, имеющих место до и во время синаптогенеза, могут быть только гипотетическими. Вероятно, эти контакты служат для удерживания нейрональных клеток вместе во время, когда формируются функционально однотипные клеточные группы. Возможно, контакты образуются непосредственно после миграции этих клеток к их дефинитивному месту расположения и представляют собой способ «узнавания местоположения», позволяющий формировать такие однотипные нейрональные группы [12].

Работа поддержана грантом РФФИ № 12-04-00658.

ЛИТЕРАТУРА

1. Отеллин В. А., Хожай Л. И. и Ордян Н. Э. Пренатальное стрессирование и развивающийся мозг. Адаптивные меха-

- низмы, непосредственные и отсроченные эффекты. СПб., Деятка, 2007.
2. Попова Н. К., Никулина Э. М., Арав В. Н. и Кудрявцева Н. Н. О роли серотонина в одном из видов агрессивного поведения. Физиол. журн. им. И. М. Сеченова, 1975, т. 61, № 2, с. 183–186.
 3. Семченко В. В., Боголепов Н. Н. и Степанов С. С. Синапто-архитектоника коры большого мозга. Омск, Омич, 1995.
 4. Хожай Л. И. Формирование астроглии в неокортексе мыши после пренатального временного блокирования синтеза серотонина. Морфология, 2005, т. 127, вып. 1, с. 17–21.
 5. Хожай Л. И. и Отеллин В. А. Формирование неокортекса у мышей, развивающихся в условиях пренатального дефицита серотонина. Морфология, 2005, т. 127, вып. 3, с. 17–21.
 6. Хожай Л. И., Отеллин В. А. и Неокесарийский А. А. Постнатальные изменения морфологии нейрональных и глиальных клеток в неокортексе мышей, развивавшихся на фоне дефицита серотонина. Журн. эволюц. биохим., 2007, т. 43, № 3, с. 293–298.
 7. 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.
 8. Brewer G. J., Boehler M. D., Pearson R. A. et al. Neuron network activity scales exponentially with synapse density. J. Neural. Eng., 2009, v. 6, № 1, p. 140–145.
 9. Crins T. T., Rusu S. I., Rodriguez-Contreras A. and Borst Y. G. Developmental changes in short-term plasticity at the rat calyx of Held synapse. J. Neurosci., 2011, v. 31, № 32, p. 11706–11717.
 10. Keller H. H. Depletion of cerebral monoamines by p-chlorophenylalanine in the cat. Experientia, 1972, v. 28, № 2, p. 177–178.
 11. Kim J. E., O'Sullivan M. L., Sanchez C. A. et al. Investigating synapse formation and function using human pluripotent stem cell-derived neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, v. 108, № 7, p. 3005–3010.
 12. 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. Dev. Brain Res., 1985, v. 20, № 1, p. 107–114.
 13. Paxinos G. and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Washington, Acad. Press, 2005.
- Поступила в редакцию 15.05.2012
Получена после доработки 27.08.2012

SYNAPTogenesis IN THE DORSAL RAPHE NUCLEUS OF RAT MEDULLA OBLONGATA IN SEROTONIN DEFICIENCY

L. I. Khozhai and V. A. Otellin

The purpose of the present study was to examine the synaptogenesis in the dorsal raphe nucleus (DRN) in Wistar rats (n=8–10 for each time point) in the end of prenatal (days 19 and 20) and early postnatal (days 5 and 20) periods, and to determine the role of serotonin in the formation of synaptic contacts during this period of development. It is shown that at prenatal day 19 neuropil started to develop in DRN -d, DRN -v and DRN -l in control (intact) animals, while the synaptic contacts appeared on cell processes. At prenatal day 20 synaptic contacts were detected for the first time on neuronal cell body surface. The density of synaptophysin-positive granules on both the cell processes in the neuropil, and neuronal cell bodies was sharply and considerably increased by postnatal day 5. Subsequently, until postnatal day 20, the augmentation of their density was insignificant. Serotonin deficiency in a second half of prenatal development, induced by a single injection of parachlorophenylalanine to female rats at gestational day 16 resulted in a significant delay of synaptogenesis in DRN of their offspring in both prenatal and early postnatal periods. With the increase of postnatal age the density synaptic contacts was unequally augmented in various parts of DRN: in DRN-d it approached the control level, while in DRN-v and DRN-l it remained significantly reduced. The results received suggest serotonin participation in synaptogenesis in DRN.

Key words: brain development, synaptic contacts, synaptophysin, dorsal raphe nucleus, serotonin

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