

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ, ЦИТОЛОГИЯ, ГИСТОЛОГИЯ. ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ



УДК 612.826: 616-092.9

ДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ И КОМПЕНСАТОРНО-ПРИСПОСОБИТЕЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОНОВ БОЛЬШОГО СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКОГО ЯДРА ШВА ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕССА В НОВОРОЖДЕННОМ ПЕРИОДЕ И ТЕРАПИИ БУСПИРОНОМ

А.В.Дробленков, И.П.Буткевич*, В.А.Михайленко*, Т.Н.Шимараева**

DEGENERATIVE AND COMPENSATORY-ADAPTIVE CHANGES IN THE RAPHE NUCLEUS SEROTONERGIC NEURONS AFTER EXPERIMENTAL STRESS IN THE NEWBORN PERIOD AND BUSPIRONE THERAPY

A.V.Droblenkov, I.P.Butkevich*, V.A.Mikhailenko*, T.N.Shimaraeva**

*Институт медицинского образования НовГУ, Droblenkov_a@mail.ru***Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург****Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет*

Работа посвящена выявлению реактивных изменений нейронов большого ядра шва после экспериментального стресса в новорожденном периоде, знание которых необходимо для более глубокого понимания механизмов повреждения и адаптации серотонинергической системы головного мозга в процессе постнатального развития. У 37-дневных крыс после инъекции буспилона (подопытные животные) и у контрольных (с инъекцией физиологического раствора) исследовали болевой ответ в формалиновом тесте (инъекция 2,5% раствора формалина 1,0 мкл в подошву задней конечности). В срезах крупноклеточного ядра шва, окрашенных методом Ниссля, подсчитывали количество неизмененных, гипохромных, сморщенных гиперхромных и тенеvidных клеток, устанавливали площадь малоизмененных нейронов. Определяли также расстояние между телами нейронов, а также между телами глиоцитов и телами нейронов. Установлено, что после моделирования стресса в большом ядре шва развиваются дегенеративные и компенсаторно-приспособительные изменения. Первые выражаются сокращением доли и уменьшением площади малоизмененных нейронов, сморщиванием и гиперхромией, гипохромией, ростом удельного количества тенеvidных форм. Вторые выражаются признаками активации глио-нейрональных и межнейрональных взаимоотношений. Многие реактивные изменения клеток подвержены компенсационной коррекции препаратом, блокирующим рецепторы к серотонину.

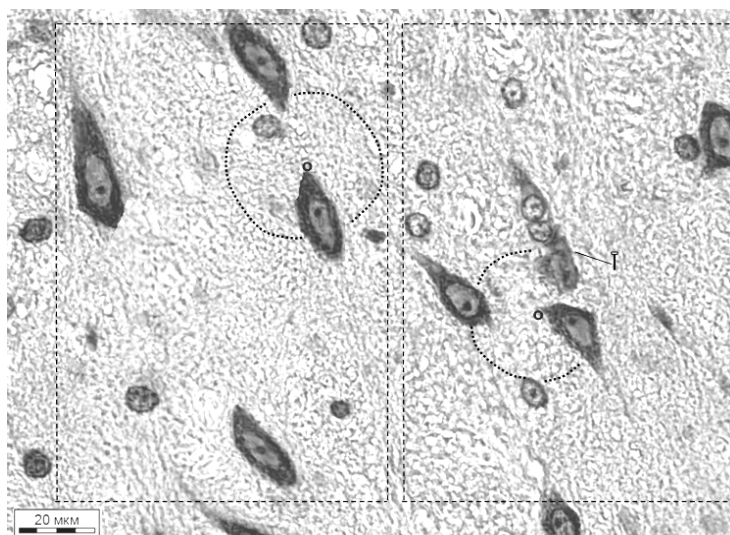
Ключевые слова: изменения нейронов, нейроноглиальные взаимоотношения, стресс, ядро шва

This paper describes the research on identification of reactive changes in the raphe nucleus neurons after experimental stress in the newborn period which is necessary for a better understanding of the mechanisms of damage and adaptation of the serotonergic system in the brain during postnatal development. We studied pain response in the formalin test (1.0 µl injection of formalin solution of 2.5% in the sole of hindlimb) in 37 day old rats after injection of buspirone (experimental animals) and control rats (injected with physiological solution). In the Nissl-stained sections of macrocellular raphe nucleus we counted the number of unmodified, hypochromic, shrunken and hyperchromatic, and shaded neurons and also determined the area of little changed neurons. The distances between the bodies of neurons and between the glial cells' bodies and the bodies of neurons were measured. It was found that after stress simulation there developed degenerative and compensatory-adaptive changes in the magnus raphe nucleus. Degenerative changes are manifested in reducing the number and size of bodies of the little changed neurons, wrinkling, hyperchromia, hypochromia, and increase in quantity of shaded neurons. Compensatory-adaptive changes are manifested in activation of glioneuronal and interneuronal relationships. Reactive changes in the cells exposed to compensatory correction with drugs that block the receptors for serotonin.

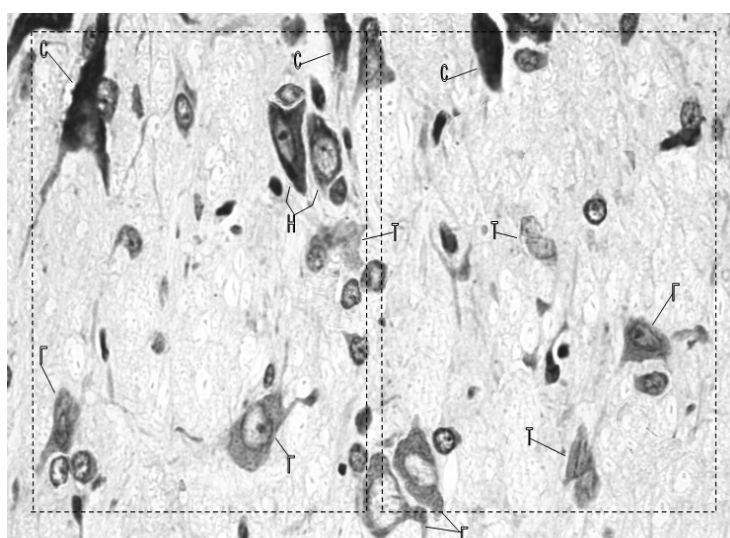
Keywords: neuron changes, neuroglial relationships, stress, raphe nuclei

Известно, что большое ядро шва является наиболее крупным источником серотонинергических нервных волокон, благодаря которым устанавливается связь с гипоталамусом и другими проекционными центрами системы «положительного подкрепления». Изучение реактивных изменений нейронов большого ядра шва после экспериментального стресса в новорожденном периоде необходимо для более глубокого понимания механизмов повреждения и адаптации серотонинергической системы головного мозга в процессе постнатального развития, а также для возможной коррекции поведенческих нарушений. Серотонинергиче-

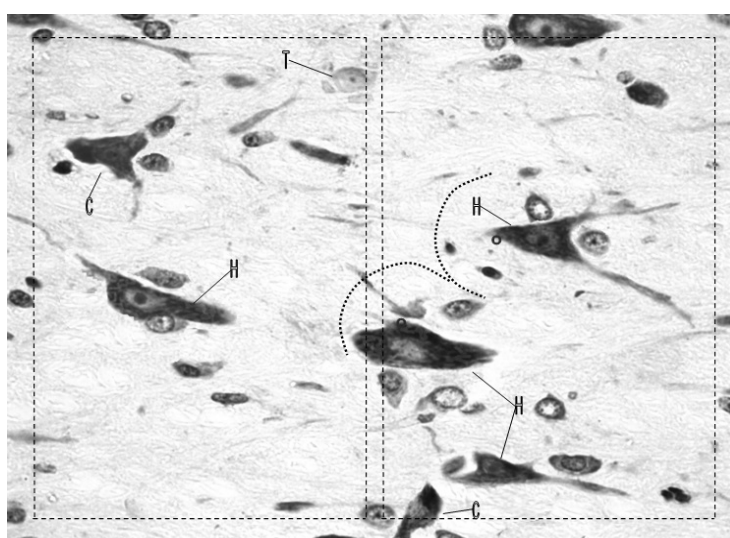
ские рецепторы типа 1A (5-HT_{1A}), интенсивно представленные в ядрах шва и префронтальной коре, участвуют в обработке ноцицептивных сигналов и в психоэмоциональном поведении [1,2]. Агонист 5-HT_{1A}, буспирон, использован в настоящей работе в препубертатный период развития для возможной коррекции последствий болевого стресса новорожденных. Ранее нами впервые было обнаружено, что хроническая инъекция буспилона самкам до стресса в период беременности нормализовала у потомства болевой ответ при воспалении и психоэмоциональное поведение, нарушение которых вызывает пренатальный стресс [3].



а)



б)



в)

Строение большого серотонинергического ядра продолговатого мозга на площади $0,01 \text{ мм}^2$ (пунктир) у intactных крыс (а), после воздействия стресса (б), после воздействия стресса и терапии буспионом (в). Нейроны: Н — неизменные, Г — гипохромные, С — сморщенные гиперхромные, Т — тенивидные. Центр окружности (о), где $R = 20 \text{ мкм}$, совмещен с поверхностью нейрона. Окраска методом Ниссля. Ок. $\times 10$, об. $\times 63$

Цель работы состояла в установлении влияния хронического введения буспирона в препубертатный период развития (24-36 дни) у самцов крыс, подвергнутых в новорожденном состоянии болевому воздействию при воспалении, на функциональную активность тонической ноцицептивной системы в условиях формалинового теста и на реактивные изменения нейрон большого серотонинергического ядра шва.

Материал и методы

Новорожденные самцы-крысята были подвергнуты болевому воздействию (0,5 мкл 2,5%-го раствора формалина в подошву задней конечности) последовательно в первый и второй дни жизни, контроль — крысята без воздействий. Предварительные данные при исследовании крыс с инъекцией физиологического раствора в новорожденном периоде показали отсутствие изменений в болевой чувствительности при достижении животными препубертатного периода развития (при сравнении с контрольными крысами без инъекций), поэтому в качестве контроля использованы крысы без воздействий. Внутривбрюшинные инъекции буспирона (3,0 мг/кг, 100 мкл) осуществляли с 24-го по 36-й постнатальные дни. У 37-дневных крыс после инъекции буспирона (подопытные животные) и у контрольных (с инъекцией физиологического раствора) исследовали болевой ответ в формалиновом тесте (инъекция 2,5% раствора формалина 1,0 мкл в подош-

ву задней конечности). Регистрировали продолжительность вылизывания инъекционной конечности (с) у контрольных и подопытных крыс. Каждая группа животных состояла из 8 особей. После завершения экспериментов у подопытных и контрольных крыс декапитацией вынимали мозг и погружали в формалин. Статистический анализ проводили с применением критерия Стьюдента и критерия Манна-Уитни. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка. Принятый уровень значимости составил 5%.

После окрашивания фронтальных срезов крупноклеточного ядра шва по Нисслю на площади 0,01 мм² у каждой особи (m , общее количество подсчетов = 12) определяли фенотип нейронов согласно классификации Ю.М.Жаботинского. Раздельно подсчитывали количество неизмененных, гипохромных, сморщенных гиперхромных и тeneвидных клеток, устанавливали площадь малоизмененных нейронов. Определяли также расстояние между телами нейронов, а также между телами глиоцитов и телами нейронов. Морфометрию проводили с помощью программы Imagescope (Электронный анализ, Россия). Различия средней величины и ее ошибки ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$) считали значимыми при $p < 0,05$.

Полученные результаты

В поведенческих экспериментах у подопытных самцов препубертатного периода, которых подвергали

Таблица 1
Количество и долевое соотношение субпопуляций нейронов в большом серотонинергическом ядре продолговатого мозга на площади 0,01 мм² ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Воздействие	Количество и доля нейронов в популяции (количество исследованных площадей, $m = 14$)				Суммарное количество нейронов
	малоизмененных	гипохромных	сморщенных	тенеvidных	
Нет (контроль)	3,9 $\pm$ 0,4 82,9$\pm$3,5%	0,2 $\pm$ 0,2 4,2$\pm$1,1%	0,2 $\pm$ 0,2 4,2$\pm$1,7%	0,4 $\pm$ 0,3 8,7$\pm$3,3%	100%
Воздействие стресса	0,7 $\pm$ 1,1 14,3$\pm$5,2%*	1,1 $\pm$ 0,6 22,4$\pm$3,6%*	2,1 $\pm$ 0,7 42,9$\pm$4,8%*	1,0 $\pm$ 0,7 20,4$\pm$4,9%	100%
Воздействие стресса и терапия буспином	3,2 $\pm$ 1,4 62,7$\pm$4,3%**	0,3 $\pm$ 0,7 5,9$\pm$2,7%**	0,9 $\pm$ 0,3 4,2$\pm$1,5%**	0,7 $\pm$ 1,3 17,6$\pm$4,2%	100%

*различия с параметрами клеток в контроле значимы ($p < 0,05$);

**различия с параметрами клеток после воздействия стресса значимы ($p < 0,05$); m — количество наблюдений

Таблица 2
Морфометрические параметры нейронов и глиоцитов в большом серотонинергическом ядре продолговатого мозга на площади 0,01 мм² ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Параметры Группа животных	S неизмененных нейронов, мкм ²	Глиальное расстояние, мкм	Межнейронное расстояние, мкм
Интakтные	245,8$\pm$12,9 ($m = 60$)	11,6$\pm$0,9 ($m = 38$)	12,8$\pm$0,8 ($m = 22$)
Воздействие стресса	126,4$\pm$28,3* ($m = 60$)	3,1$\pm$1,0* ($m = 58$)	5,6$\pm$2,1* ($m = 35$)
Воздействие стресса и терапия буспином	188,7$\pm$22,4* ($m = 60$)	3,3$\pm$0,9 ($m = 64$)	11,7$\pm$1,8** ($m = 38$)

*различия с параметрами клеток в контроле значимы ($p < 0,05$);

**различия с параметрами клеток после воздействия стресса значимы ($p < 0,05$); m — количество наблюдений

болевого стрессу, вызванному очагом воспаления в первые два дня жизни, обнаружено увеличение продолжительности вылизывания в формалиновом тесте по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Хроническая инъекция буспилона нормализовала продолжительность вылизывания, поведенческую реакцию, организованную на супраспинальном уровне ($p < 0,05$).

В морфологическом исследовании установлено (см. рис.), что после моделирования болевого стресса в большом ядре шва развиваются дегенеративные и компенсаторно-приспособительные изменения. Первые выражаются сокращением доли и уменьшением площади малоизмененных нейронов, сморщиванием и гиперхромией, гипохромией, ростом удельного количества тeneвидных форм (табл.1). Вторые выражаются признаками активации глио-нейрональных и межнейрональных взаимоотношений (табл.2). Многие реактивные изменения клеток подвержены компенсационной коррекции препаратом буспилоном, который является агонистом 5-HT_{1A} рецепторов.

Таким образом, болевой стресс, вызванный воспалительным агентом в период новорожденности, проявился при достижении животными препубертатного периода развития в гипералгезии в условиях повторно вызванного очага воспаления в формалиновом тесте. Хроническая инъекция буспилона в течение двух недель до формалинового теста нормализовала болевую чувствительность тонической ноцицептивной системы. Установлено, что поведенческие изменения сочетаются с полученными результатами морфофункционального исследования большого ядра шва, вовлеченного в нисходящую серотонинергическую систему, осуществляющую модуляцию ноцицептивных сигналов на уровне задних рогов спинного мозга и имеющего нейроанатомические связи с пре-

фронтальной корой [2], вовлеченной в психоэмоциональное поведение.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-00106-а.

1. Huo F.Q., Huang F.S., Ly B.C., et al. Activation of serotonin 1A receptors in ventrolateral orbital cortex depresses persistent nociception: a presynaptic inhibition mechanism // *Neurochem. Int.* 2010. Vol.57. №7. P.749-55. doi: 10.1016/j.neuint.2010.08.011.
2. Bernasconi F., Komater M., Pokornya T., Seifritz E., Vollenweider F.X. The electrophysiological effects of the serotonin 1A receptor agonist bupirone in emotional face processing // *Europ. Neuropsychopharmacology*. Available online 17 January 2015. In press. Corrected Proof.
3. Буткевич И.П., Шимараева Т.Н., Михайленко В.А. Пренатальные влияния буспилона и стресса на поведенческие реакции у разнополых крысят в период онтогенеза с пониженным уровнем мозгового серотонина // *Педиатр.* 2014. Т.5. №1. С.90-96.

References

1. Huo F.Q., Huang F.S., Ly B.C., Chen T., Feng J., Qu C.L., Tang J.S., Li Y.Q. Activation of serotonin 1A receptors in ventrolateral orbital cortex depresses persistent nociception: a presynaptic inhibition mechanism. *Neurochemistry International*, 2010, vol. 57, no. 7, pp. 749-755. doi: 10.1016/j.neuint.2010.08.011.
2. Bernasconi F., Komater M., Pokornya T., Seifritz E., Vollenweider F.X. The electrophysiological effects of the serotonin 1A receptor agonist bupirone in emotional face processing. *European Neuropsychopharmacology*, vol. 25, no. 4, pp. 474-482. doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.01.009
3. Butkevich I.P., Shimaraeva T.N., Mikhailenko V.A. Prenatal'nye vliianiia buspirona i stressa na povedencheskie reaktsii u raznopolykh krysiat v period ontogeneza s ponizhennym urovnem mozgovogo serotoninina [Prenatal effects of bupirone and stress on behavioral reactions in rat pups of different sexes during period of ontogeny with low level of brain serotonin]. *Pediatr.* 2014, vol. 5, no. 1, pp. 90-96.