

КЛЕТочНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ

УДК 577.175.823;591.392;599.323.45;611.818

РАЗВИТИЕ СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ЗАДНЕЙ ГРУППЫ ЯДЕР ШВА У МЫШЕЙ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ ВЫКЛЮЧЕНИЕМ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ А И АУТОРЕЦЕПТОРОВ 5-НТ1А И 5-НТ1В

© 2009 г. Н. А. Уртикова***, А. Я. Сапронова*, М.-Ж. Бризоргей**,
Д. Верже**, М. В. Угрюмов*

*Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН
119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26

**Лаборатория нейробиологии межклеточных сигналов (UMR 7101 IFR 83CNRS UPMC),
Национальный центр научных исследований, Университет П. и М. Кюри

75252 Париж, наб. Сен-Бернара, д. 7

E-mail: nataliya.urtikova@gmail.com

Поступила в редакцию 12.08.08 г.
Окончательный вариант получен 05.12.08 г.

Иммуноцитохимически исследованы морфологические изменения в развитии серотонинергических нейронов задней группы ядер шва, расположенной в продолговатом мозгу, у мышей в условиях генетического выключения ауторецепторов серотонина подтипа 1А и 1В, а также моноаминоксидазы типа А. Ауторецепторы к серотонину регулируют электрическую активность серотонинергического нейрона, а также синтез и выделение нейротрансмиттера, а фермент моноаминоксидаза типа А осуществляет его энзиматическую деградацию. Показано, что эти генетические модификации не влияют на количество серотонинергических нейронов продолговатого мозга, однако вызывают морфофункциональные изменения. Снижение размеров клеток и увеличение в них содержания серотонина было отмечено при функциональной недостаточности моноаминоксидазы А, в то время как умеренное увеличение размеров клеток и снижение внутриклеточного серотонина – при функциональной недостаточности ауторецепторов. Полученные данные подтверждают гипотезу об ауторегуляции серотонинергических нейронов в процессе развития.

Ключевые слова: серотонин, нокаут гена, продолговатый мозг, иммуноцитохимия, анализ изображения.

Серотонин – один из важнейших моноаминов в мозгу млекопитающих. Во взрослом организме серотонин играет роль нейротрансмиттера, контролируя терморегуляцию, регуляцию полового и пищевого поведения, цикла сон-бодрствование, двигательной функции, болевой чувствительности. Сбой в работе серотонинергической системы ведут к развитию таких психопатологических состояний, как тревожность, агрессия, нарушение пищевых мотиваций, шизофрения, депрессии (Blier, de Montigny, 1999; Vickers, Dourish, 2004; Lowry et al., 2005; Hough, Ursano, 2006; Schmitt et al., 2006).

Тела серотонинергических нейронов образуют небольшую группу в области ствола мозга, а отростки иннервируют большинство структур центральной нервной системы (ЦНС), что и обеспечивает широкий спектр его функций. В онтогенезе серотонинергические нейроны развиваются как два небольших скопления в стволе мозга. Передняя группа, содержащая самые многочисленные ядра, располагается каудальнее среднемозгового изгиба, в то время как задняя группа локали-

зована в продолговатом мозгу (Aitken, Tork, 1988). Передняя группа ядер дает начало восходящим путям, иннервируя весь передний мозг, в то время как задняя группа – нисходящим проводящим путям, оканчивающимся преимущественно в спинном мозгу (Lidov, Molliver, 1982; Wallace, Lauder, 1983; Aitken, Tork, 1988).

Ключевыми компонентами серотонинергического нейрона являются: триптофангидроксилаза (ТПГ), транспортер обратного захвата (5-НТТ), ауторецепторы 5-НТ1А (соматические) и 5-НТ1В (аксональные), а также везикулярный транспортер моноаминов (VMAT2). ТПГ второго типа ответственна за синтез серотонина, являясь скоростьюлимитирующим ферментом (Тусе, 1990; Walther et al., 2003), в то время как VMAT2 отвечает за его накопление в везикулах с последующим выделением во внеклеточную среду (Howell et al., 1994; Peter et al., 1995).

Ауторецепторы 5-НТ1А имеют в основном соматодендритическую локализацию, располагаясь

как на самих серотонинергических нейронах, так и на постсинаптических нейронах-мишенях (Jacobs, Azmitia, 1992), а для рецепторов 5-HT_{1B} в основном характерно пресинаптическое расположение: терминальных ауторецепторов на отростках серотонинергических нейронов, а гетерорецепторов – на отростках других нейронов (Gothert et al., 1996). Ауторецепторы играют важную роль в функционировании серотонинергической системы, регулируя активность серотонинергического нейрона, а также синтез и выделение серотонина на уровне тела нейрона и на уровне его отростков (Blair, de Montigny, 1987; Sprouse, Aghajanian, 1987; Hutson et al., 1989; Invernizzi et al., 1991; Galzin et al., 1992; Adell et al., 1993).

5-НТТ отвечает за инактивацию серотонина, контролируя его внеклеточный уровень и тем самым регулируя его влияние на пре- и постсинаптические рецепторы (Blakely et al., 1994; Zhou et al., 1996). Связанный с мембраной митохондриальный фермент моноаминоксидаза типа А (МАО-А) отвечает за деградацию серотонина. Этот фермент по большей части располагается в глиальных клетках, а также в несеротонинергических нейронах и лишь слабо экспрессируется в телах серотонинергических нейронов ядер шва (Arai et al., 1997; Jahng et al., 1997).

У грызунов в процессе развития серотонинергические нейроны появляются очень рано (Taber Pierce, 1973; Goridis, Rohrer, 2002; Cordes, 2005) и вскоре после образования способны синтезировать серотонин, более того, многие из ключевых элементов серотонинергического нейрона появляются в это же время (Bruning et al., 1997; Hery et al., 1999; Rumajogee et al., 2004). Тем не менее, несмотря на раннее появление в ЦНС, полное созревание серотонинергической системы наступает лишь в постнатальном периоде развития. В перинатальном онтогенезе серотонин регулирует развитие различных популяций нейронов в ЦНС, оказывая влияние на клеточное деление, их миграцию, дифференцировку и синаптогенез (Мирочник и др., 2002; Угрюмов, 2002; Пронина и др., 2007; Lipton, Kater, 1989; Lauder, 1993; Azmitia, 2001; Vitalis, Parnavelas, 2003), в том числе регулируя развитие и самих серотонинергических нейронов (Whitaker-Azmitia et al., 1996; Galter, Unsicker, 1999; Rumajogee et al., 2004) и выступая в качестве ауторегулятора развития серотонинергической системы. Подобное влияние по-разному реализуется в передней и задней группах серотонинергических нейронов (Jonakait et al., 1988; Galter, Unsicker, 1999; Cordes, 2005).

Благодаря достижениям современной молекулярной биологии и генетики в экспериментах последних десятилетий используются трансгенные животные, в частности нокаутные. Такие линии животных являются удобными объектами для изучения влияния тех или иных сигнальных моле-

кул на процесс развития. Так, с помощью линий мышей, имеющих нокаут гена ключевых элементов серотонинергического нейрона, была подтверждена ранее выдвинутая гипотеза о серотонине как о ауторегуляторе развития (Rumajogee et al., 2004).

Цель работы – изучение роли ауторецепторов серотонина 5-HT_{1A} и 5-HT_{1B}, а также МАО-А на развитие серотонинергических нейронов задней группы ядер шва мыши, а именно: изучение влияния нокаута генов *htr1a*, *htr1b* и *Maoa* на количество и размер серотонинергических нейронов, а также внутриклеточное и общее содержание серотонина в нейронах задней группы ядер шва в перинатальном онтогенезе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. Работа проведена на 12 мышах, нокаутных по гену моноаминоксидазы типа А (*Maoa*, линия Tg8) (Cases et al., 1995), на генетическом фоне СЗН/HeJ и 12 контрольных к ним (СЗН) – плодах на 18-е эмбриональные сут развития (Э18) и животных на 1-е (П1) и 10-е (П10) сут постнатального развития. Использовали также 12 мышей, имеющих нокаут гена 5-HT_{1A}-рецептора к серотонину (*htr1a*, линия 5-HT_{1A}-/-) (Ramboz et al., 1998); 12 мышей, имеющих нокаут гена 5-HT_{1B}-рецептора к серотонину (*htr1b*, линия 5-HT_{1B}-/-) (Saudou et al., 1994), на генетическом фоне 129/Sv и 12 контрольных к ним (129Sv) – плоды на Э18 и животных на П1 и П10. Для получения самок с датированным сроком беременности использовали 3–4-месячных мышей, к которым вечером подсаживали самцов, а утром брали влагалищные мазки. День обнаружения копулятивной пробки считали 1-ми сут беременности. У всех животных день рождения считали 0-ми сут постнатального развития (П0). Животных содержали в нормальных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде при температуре 22–24°C.

Содержание животных и все манипуляции с ними осуществляли согласно установленным правилам и национальным и международным этическим законам.

Фиксация и обработка ткани. Находящихся под пентобарбиталовым наркозом (100 мг/кг, в/б) новорожденных и постнатальных животных, а также плоды (Э18), быстро извлеченные из наркотизированной беременной самки (100 мг/кг, в/б), перфузировали через сердце сначала 0.9%-ным NaCl на 0.02 М фосфатном буфере (ФСБ) до вымывания крови из сосудов, а затем 4%-ным параформальдегидом на 0.1 М ФСБ (pH 7.3) в течение 15 и 10 мин соответственно. Животных декапитировали, у постнатальных выделяли мозг и дофиксировали его у особей П1 и П10, а также фиксировали голову у Э18 в 4%-ном параформальдегиде на 0.1 М ФСБ в течение ночи, затем отмывали 30 мин в ФСБ и по-

мещали на 24 ч в 20%-ный раствор сахарозы на 0.02 М ФСБ при 4°C с последующей заморозкой в изопентане, охлажденном до -37°C жидким азотом.

Серийные фронтальные срезы мозга толщиной 16 мкм, приготовленные на криостате ("Leica", Германия), монтировали на покрытые желатином предметные стекла.

Одинарное иммуногистохимическое мечение. Для иммуногистохимического выявления серотонина срезы последовательно инкубировали в ФСБ, содержащем следующие компоненты: 1) 0.3%-ную нормальную бычью сыворотку и 0.1%-ный Тритон X-100 ("Sigma", США); 2) первичные антитела кролика против серотонина (1 : 500), 0.3%-ную нормальную бычью сыворотку и 0.1%-ный Тритон X-100 18 ч при комнатной температуре; 3) вторичные биотинилированные антитела козы против иммуноглобулинов кролика (1 : 250) ("Vector Laboratories", США) 2 ч при комнатной температуре и 4) авидин-пероксидазный комплекс Elite (1 : 100) ("Vector Laboratories", США) 1 ч при комнатной температуре. Срезы промывали в ФСБ после каждой инкубации, за исключением первой. На последнем этапе срезы промывали в 0.05 М *tris*-HCl-буфере (pH 7.6), пероксидазную реакцию выявляли в том же буфере, содержащем 0.05% 3,3'-диаминобензидина тетрагидрохлорида ("Sigma", США) и 0.01% перекиси, под визуальным контролем. Затем срезы обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в толуоле и заключали в среду Permount DPX ("Fluka", Германия).

Двойное иммуногистохимическое мечение. Для одновременного выявления двух антигенов (ТПГ/серотонин) использовали непрямо двойное иммунофлуоресцентное мечение. Срезы последовательно инкубировали в ФСБ, содержащем следующие компоненты: 1) 0.3%-ную нормальную бычью сыворотку, 0.1%-ый Тритон X-100 и 36 мкл/мл реагента М.О.М. (Mouse Ig-Blocking Reagent(c), "Vector Laboratories", США) в течение 20 мин при комнатной температуре; 2) 0.3%-ную нормальную бычью сыворотку, 0.1%-ный Тритон X-100 и 80 мкл/мл белкового концентрата Diluent (М.О.М. Protein Concentrate(c), "Vector Laboratories", США) в течение 1ч при комнатной температуре; 3) смесь моноклональных антител крысы против серотонина (1/250) ("Chemicon", США) и моноклональных антител мыши против ТПГ (1/1000) ("Sigma", США), 0.3%-ную нормальную бычью сыворотку, 0.1%-ный Тритон X-100 и 80 мкл/мл Diluent в течение ночи при комнатной температуре; 4) вторичные биотинилированные антитела против иммуноглобулинов мыши (1/250) (М.О.М. Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent(c), "Vector Laboratories", США) 2 ч при комнатной температуре; 5) стрептавидин-биотинный комплекс, меченный цианином (Cy3) (1/100) ("Sigma", США) 1 ч при комнатной температуре; 6) вторичные биотинилированные антитела

козы против иммуноглобулинов крысы (1 : 250) ("Vector Laboratories", США) 2 ч при комнатной температуре и 7) авидин-биотинный комплекс, меченный флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (1/100) ("Sigma", США). Срезы промывали в ФСБ после каждой инкубации, за исключением второй, затем заключали в среду Mowiol и просматривали во флуоресцентном микроскопе Leitz DIAPLAN ("Leitz", Германия), соединенном с камерой и компьютером.

Количественный и полуколичественный анализ результатов иммуноцитохимии. Серий срезов от Тg8 и СЗН (на каждом стекле содержались срезы нокаутных контрольных животных в возрасте Э18, П1 и П10) и от 5-НТ1А-/-, 5-НТ1В-/- и 129Sv (на каждом стекле содержались срезы животных двух нокаутных линий и контрольной к ним в возрасте Э18, П1 и П10) просматривали в rostrocaudальном направлении. Для количественного и полуколичественного анализа серотониниммунореактивных нейронов использовали исследовательский микроскоп Olympus VX5.1 ("Olympus", Япония) и программное обеспечение Analysis Five(c). Подсчет серотонинергических нейронов проводили на каждом срезе с задней группы ядер шва, включающей в себя бледное ядро шва (В1), темное ядро шва (В2) и большое ядро шва (В3) (Dahlstrom, Fuxe, 1964; Taber Pierce, 1973). Поправки двойного подсчета нейронов не вводили, так как основной задачей нашей работы являлось сравнение полученного количества нейронов различных групп, а не точное определение общего количества иммунореактивных нейронов. Для полуколичественного анализа нейроны каждого пятого среза обводили "световым пером" для получения "морфометрической" маски. Оптическую плотность (ОП) нейрона, соответствующую концентрации серотонина в нейроне, измеряли как "уровень серого" по следующей формуле (Smolen, 1990):

$$ОП = \log (УС_{\text{фона}} / УС_{\text{нейрона}}).$$

В качестве фона использовали область, свободную от специфического иммуноцитохимического мечения в непосредственной близости от иммунореактивных нейронов.

Площадь серотониниммуноположительных нейронов (С-ИП) тоже измеряли. Общее содержание серотонина (ОС) в исследуемой области было посчитано следующим образом:

$$ОС = ОП \times S \times N,$$

где *S* – площадь нейрона С-ИП, а *N* – их количество.

Статистическая обработка. Количество нейронов представлено в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего от четырех мышей в каждой линии каждого возраста. Данные полуколичественного анализа представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки сред-

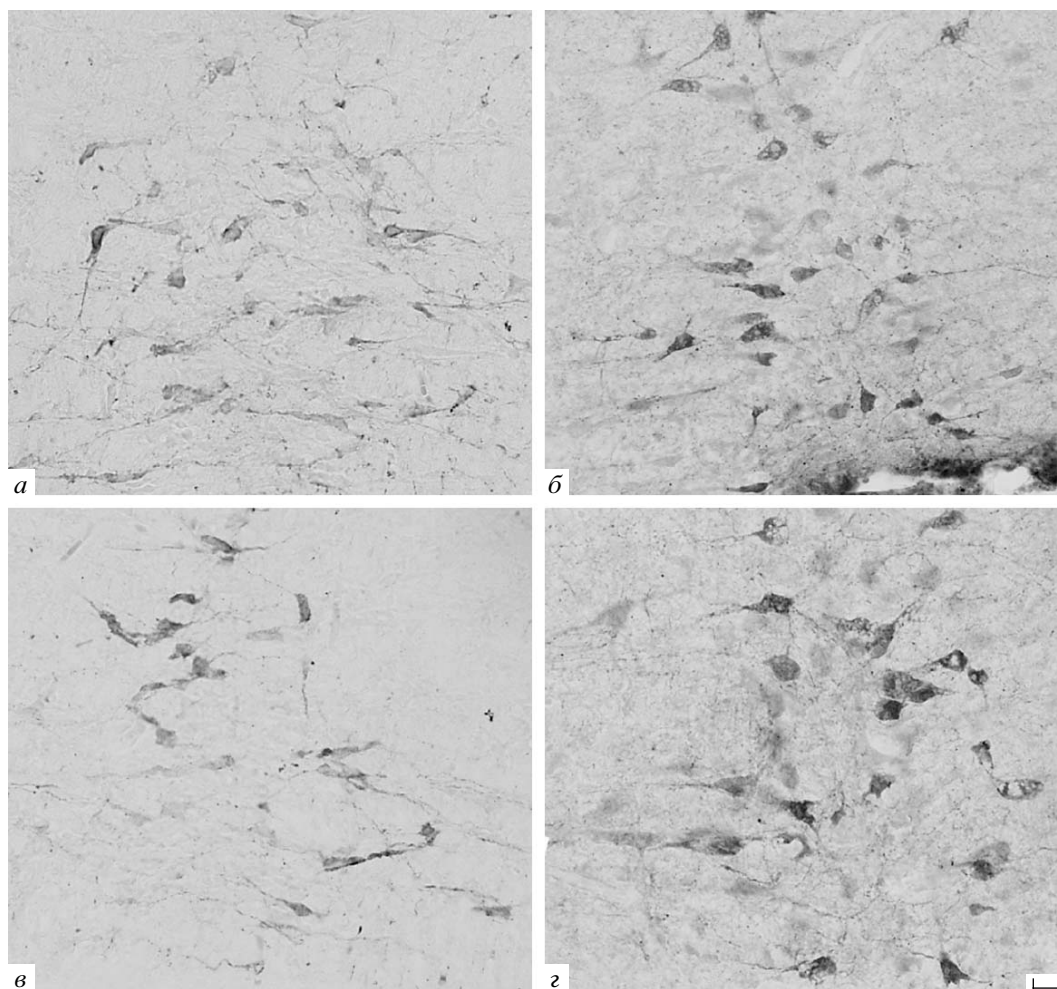


Рис. 1. Серотониниммуопозитивные нейроны в задней группе ядер шва у мышей, имеющих нокаут гена МАО-А (а, в), и у контрольных (б, г) на 18-е сут эмбрионального (а, б) и 10-е сут постнатального развития (в, г).

него от 423 до 644 независимых определений от животного. Для определения достоверности различия между линиями животных использовали пакет программ статистической обработки данных GraphPad Prism ("GraphPad Software", США). Использовали *t*-тест Стьюдента, одно- и двухфакторную программу ANOVA с последующим тестом Бонферрони, когда ANOVA показывала достоверные различия. Значение доверительного интервала, $p < 0.05$, считалось статистически достоверным.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На предварительном этапе было проведено двойное иммуногистохимическое мечение на серотонин/ТТГ на срезах задних ядер шва у мышей нокаутных линий и контрольных всех исследуемых возрастов. Аналогично полученным ранее данным о полной совместной локализации этих маркеров в области ядер шва у мышей, имеющих нокаут гена

5htt (5-НТТ^{-/-}), и у контрольных животных линии С57В1/6J (5-НТТ^{-/-}) (Urtikova et al., 2009) подобную совместную локализацию мы обнаружили в задних ядрах шва у мышей всех исследованных нокаутных линий, а также у контрольных.

Количественный анализ нейронов С-ИП в задней группе ядер шва. Общее количество С-ИП-нейронов достоверно не отличалось между Э18 и П10 у мышей линии Tg8 и контрольной С3Н (рис. 1), отсутствуют также различия в количестве нейронов между мышами линии Tg8 и С3Н (рис. 1; 2, а). Общее количество С-ИП-нейронов достоверно не различалось между Э18 и П10 у нокаутных линий мышей 5-НТ1А^{-/-} и 5-НТ1В^{-/-}, а также у контрольной линии 129/Sv. Достоверных отличий в количестве нейронов между нокаутными линиями мышей 5-НТ1А^{-/-} и 5-НТ1В^{-/-} и линией 129/Sv также не обнаружено (рис. 2, б; 3).

Морфометрический и полуколичественный анализ нейронов С-ИП задней группы ядер шва. В исследовании были обнаружены морфологиче-

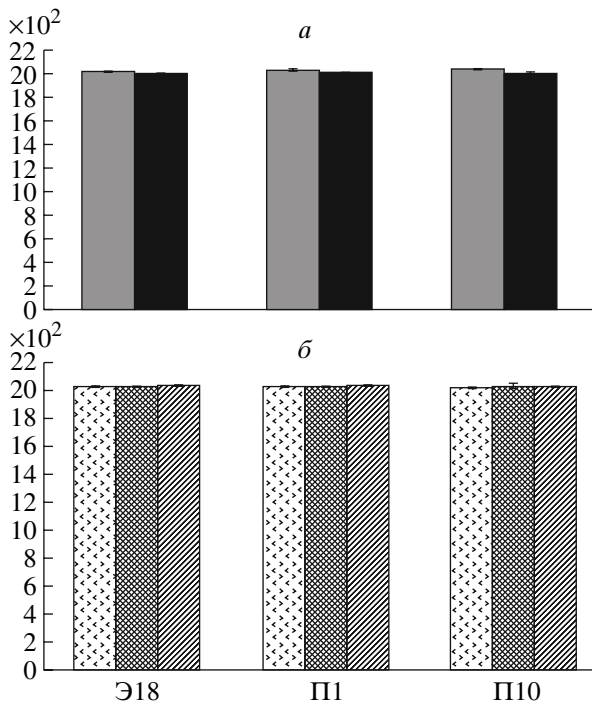


Рис. 2. Общее количество серотониниммуореактивных нейронов в задних ядрах шва в перинатальном периоде развития мышей нокаутных и контрольных линий.

По оси абсцисс – время развития, сут; по оси ординат – количество нейронов.

Мыши: *a* – имеющие нокаут гена *MOA-A* (*Tg8*) (■) и контрольные (*C3H*) (■); *b* – имеющие нокаут генов рецепторов *5-HT1A* (*5-HT1A-/-*) и *5-HT1B* (*5-HT1B-/-*) соответственно (□, ▨), и контрольные (*129/Sv*) (▩). Число животных в каждой группе $n = 4$, $M \pm SEM$.

ские различия С-ИП-нейронов. Размеры клеток у мышей всех исследуемых линий с возрастом достоверно увеличиваются (рис. 1, 3, 4), также наблюдаются достоверные различия площади нейронов между нокаутными и контрольными линиями. У мышей линии *Tg8* размер С-ИП-нейронов был достоверно ниже, чем у мышей линии *C3H* всех исследуемых возрастов (рис. 4, *a*). Площадь С-ИП-нейронов у особей линий *5-HT1A-/-* и *5-HT1B-/-* достоверно выше, чем у контрольных мышей линии *129/Sv* всех исследуемых возрастов. Достоверных различий в размере С-ИП-нейронов между нокаутными линиями *5-HT1A-/-* и *5-HT1B-/-* не обнаружено (рис. 4, *b*).

Внутриклеточное содержание серотонина достоверно снижается с возрастом, достигая минимального значения на стадии П1 у всех линий мышей, за исключением линии *5-HT1A-/-*, у которой оно достоверно увеличивается между эмбриональным и постнатальным развитием (рис. 5). Внутриклеточное содержание серотонина в нейронах линии *Tg8* достоверно выше на стадиях Э18, П1 и П10

по сравнению с нейронами мышей *C3H* тех же возрастов (рис. 5, *a*). Содержание серотонина в нейронах мышей линии *5-HT1A-/-* наиболее низкое на Э18, а у мышей линии *5-HT1B-/-* также и на П1. Достоверное различие во внутриклеточном содержании серотонина между мышами нокаутных линий *5-HT1A-/-* и *5-HT1B-/-* обнаружено лишь на П1 (рис. 5, *b*).

Общее содержание серотонина в телах С-ИП-нейронов в области задних ядер шва достоверно снижается в перинатальном периоде развития, достигая минимального значения к стадии П1, а затем увеличивается к П10 у всех контрольных линий мышей (*C3H* и *129/Sv*), а также у мышей линии *5-HT1B-/-* (рис. 6). У мышей линии *Tg8* общее содержание серотонина снижается между Э18 и П1, а к стадии П10 вновь поднимается до уровня, сравнимого с обнаруженным у животных на стадии Э18 (рис. 6, *a*). У мышей линии *5-HT1A-/-* общее содержание серотонина в области задних ядер шва достоверно увеличивается между эмбриональным и постнатальным сроками развития (рис. 6, *b*). Общее содержание серотонина у мышей линии *Tg8* достоверно выше, чем у контрольной линии на всех исследуемых стадиях развития (рис. 6, *a*). Общее содержание серотонина было достоверно ниже у мышей линии *5-HT1B-/-* на Э18 и П1, и у мышей линии *5-HT1A-/-* лишь на Э18, в то время как оно было достоверно выше на П1 по сравнению с контрольной линией *129/Sv*. Достоверных различий в содержании серотонина в области задних ядер шва между линиями *5-HT1A-/-* и *5-HT1B-/-* и контрольной *129/Sv* обнаружено не было (рис. 6, *b*).

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе впервые предпринята попытка оценить количественные изменения в задней группе ядер шва в перинатальном онтогенезе у мышей в условиях нокаута ключевых элементов серотонинергического нейрона.

Для достижения этой цели использовали три линии нокаутных мышей и две контрольные (Saudou et al., 1994; Cases et al., 1995; Ramboz et al., 1998). Линия мышей, имеющих нокаут гена фермента *MAO-A*, была создана благодаря вживлению мини-гена *IFN-β* между экзонами 1 и 4 гена *Maoa* мышам линии *C3H/HeJ* (Cases et al., 1995). В результате этого синтезируется функционально-неактивный белок *MAO-A*, лишенный части субъединицы, отвечающей за связь фермента с кофактором (Grimsby et al., 1991). Мыши этой линии характеризуются увеличенным содержанием серотонина, норадреналина и дофамина в мозгу на фоне значительного снижения содержания метаболита серотонина, 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК). У этих животных были обнаружены некоторые компенсаторные изменения серотонинергической системы, например, увеличение

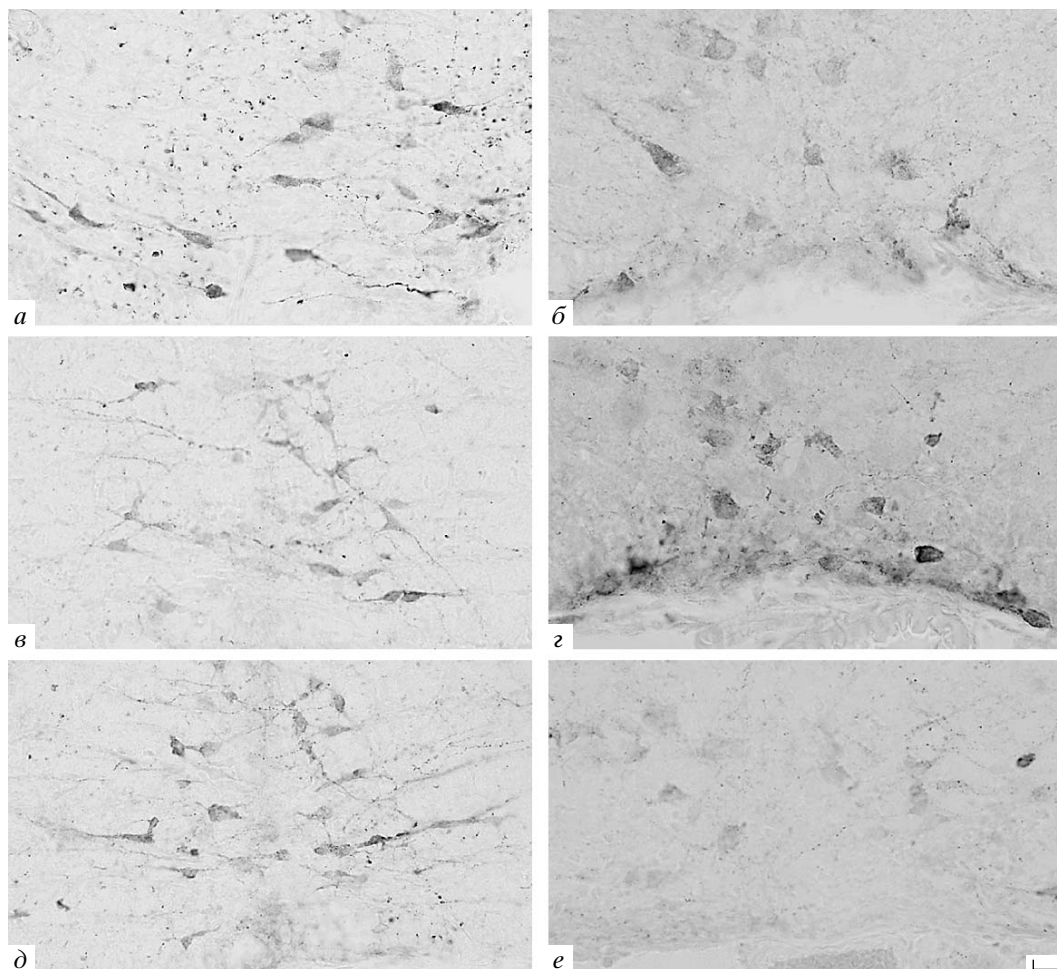


Рис. 3. Серотониниммунопозитивные нейроны в задней группе ядер шва у мышей, имеющих нокаут генов 5-НТ1А- (а, з) и 5НТ1В-рецепторов (б, д), и у контрольных (в, е) на стадиях развития Э18 (а-в) и П10 (з-е).

внеклеточного содержания серотонина, десенситизация ауторецепторов серотонина и ингибиторная регуляция VMAT2 (Shih et al., 1999; Bou-Flores, Hilaire, 2000; Evrard et al., 2002).

Линии мышей, имеющих нокаут генов ауторецепторов к сертонину, были созданы на генетическом фоне 129/Sv благодаря вживлению неомициновой кассеты в область *Asc1* гена *htr1a* (линия 5-НТ1А^{-/-}), а также с помощью методики гомологичной рекомбинации вируса-вектора, содержащего мутацию, с геном *htr1b* (5-НТ1В^{-/-}) (Saudou et al., 1994; Ramboz et al., 1998). Эти линии нокаутных мышей характеризуются широким спектром изменений поведенческих реакций, физиологические же реакции у них выражены более умеренно (Bonasera, Tecott, 1988). Снижение уровня серотонина и его метаболита 5-ГИУК отмечено в некоторых областях мозга у взрослых представителей нокаутных линий 5-НТ1А^{-/-} и 5-НТ1В^{-/-}, также зафиксировано транзитное снижение уровня серотонина и 5-ГИУК в мозгу животных 1-х сут постнатального

развития, однако только у мышей линии 5-НТ1В^{-/-} (Ase et al., 2000; Janusonis et al., 2006). Компенсаторных изменений со стороны 5-НТ1В-рецепторов у мышей линии 5-НТ1А^{-/-}, так же как и со стороны 5-НТ1А-рецепторов у мышей линии 5-НТ1В^{-/-}, отмечено не было (Ramboz et al., 1998; Mayorga et al., 2001; Ase et al., 2001, 2002).

В ЦНС мышей серотонинергические нейроны появляются очень рано во время двух “волн” нейрогенеза: первые выявляются иммуноцитохимически на Э10.5–11.5 в передней группе, а через несколько суток – в задней (Goridis, Rohrer, 2002; Cordes, 2005). Несмотря на общее происхождение, серотонинергические нейроны передней и задней групп ядер шва сильно различаются (Levitt et al., 1982; Wallace, Lauder, 1983), например в образовании нейронов-предшественников и становлении синтеза серотонина (Lauder et al., 1982), а также в процессе первичной и вторичной миграции серотонинергических нейронов в места окончательного расположения (Lidov, Molliver, 1982; Wallace, Lauder, 1983). Молекулярно-генетические работы

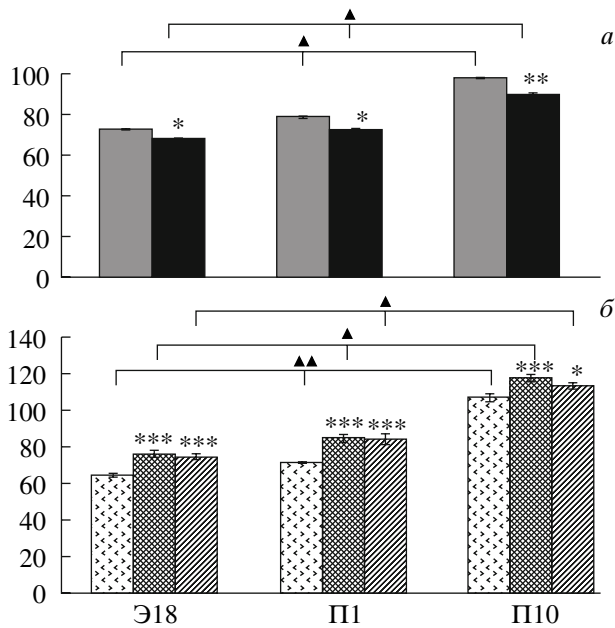


Рис. 4. Площадь серотониниммунопозитивных нейронов в задней группе ядер шва в перинатальном онтогенезе у мышей нокаутных и контрольных линий.

По оси абсцисс – время развития, сут; по оси ординат – площадь нейрона, $\mu\text{м}^2$. Данные представлены: $M \pm \text{SEM}$. Достоверность различия между контрольными и нокаутными животными: * $p < 0.01$, ** $p < 0.005$; между возрастами: $\blacktriangle p < 0.01$, $\blacktriangle\blacktriangle p < 0.005$; между линиями 5-HT1A $^{-/-}$ и 5-HT1B $^{-/-}$: *** $p < 0.01$, остальные обозначения см. на рис. 2.

также подтверждают этот факт, уточняя индивидуальные особенности транскрипционного профиля, характерного для каждого из ядер (Cordes, 2005).

Морфогенетическое влияние серотонина на развитие было ранее показано у беспозвоночных и позвоночных животных. Так, у позвоночных серотонин способен оказывать влияние на клеточное деление, пролиферацию и дифференцировку, а также на миграцию некоторых популяций нейронов, астроцитов и мезенхимных клеток (Мирочник и др., 2002; Пронина и др., 2007; Ugrumov et al., 1994; Lavdas et al., 1997; Moiseiwitsch, 2000; Azmitia, 2001; Pronina et al., 2003; Menegola et al., 2004; Mirochnik et al., 2005). Серотонин оказывает ауторегуляторное влияние на развитие серотонинергической системы (De Vitry et al., 1986; Whitaker-Azmitia, Azmitia, 1989; Galter, Unsicker, 1999), причем это влияние по-разному выражено в передней и задней группах ядер шва (Urtikova et al., 2009).

Мы впервые провели количественный и полуколичественный анализ серотонинергических нейронов задней группы ядер шва в постнатальном периоде развития мышей и показали отсутствие различий в количестве нейронов между нокаутными (Tg8, 5-HT1A $^{-/-}$, 5-HT1B $^{-/-}$) и кон-

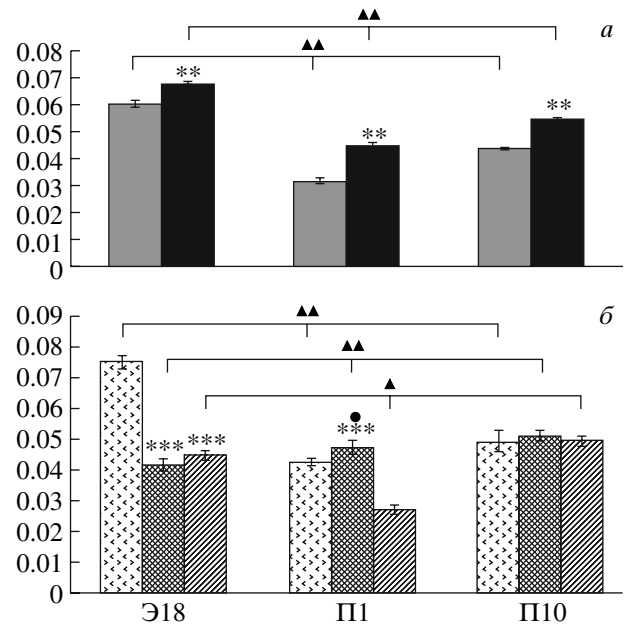


Рис. 5. Полуколичественный анализ серотониниммунопозитивных нейронов в задней группе ядер шва в перинатальном онтогенезе развития у мышей нокаутных и контрольных линий.

По оси абсцисс – время развития, сут; по оси ординат – оптическая плотность. Достоверность различия между контрольными и нокаутными животными: $\bullet p < 0.01$. Остальные обозначения см. на рис. 4.

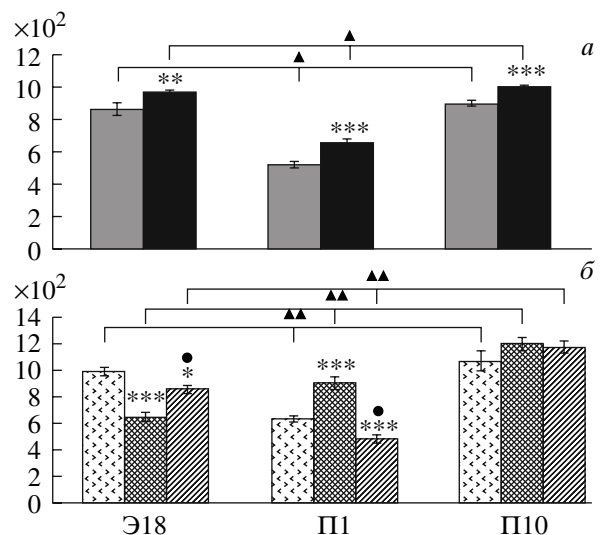


Рис. 6. Полуколичественный анализ области задней группы ядер шва в перинатальном онтогенезе мышей нокаутных и контрольных линий.

По оси абсцисс – время развития, сут; по оси ординат – содержание серотонина. Остальные обозначения см. на рис. 5.

трольным линиями мышей (СЗН и 129/Sv) в задней группе ядер шва. Тем не менее наличие количественных различий было показано ранее в культуре клеток эмбриональных ядер шва некоторых из указанных нокаутных линий (5-HT1A-/- и 5-HT1B-/-) (Rumajoo et al., 2004). Расхождение с литературными данными может быть обусловлено различием используемых моделей, а также особенностью развития этого кластера серотонинергических нейронов. Так, предшественники нейронов задней группы ядер шва обретают способность синтезировать серотонин лишь после того, как процесс клеточного деления и дифференцировки будет окончен (Lauder et al., 1982). Также это может быть обусловлено короткой протяженностью критического периода для воздействия на развитие серотонинергических нейронов задней группы (Wallace, Lauder, 1983; Whitaker-Azmitia, Azmitia, 1986; Liu, Lauder, 1991). Более того, было показано, что нейроны задней группы ядер шва часто содержат более чем один нейротрансмиттер, а значит, возможно, что подобные нейроны менее чувствительны к сигналам, исходящим из их локального окружения или извне (Wallace, Lauder, 1983; Jonakait et al., 1988; Ni, Jonakait, 1989; Cordes, 2005).

Мы показали прогрессивное увеличение размеров С-ИП-клеток в перинатальном периоде развития у всех исследуемых линий мышей. Схожий морфометрический анализ был проведен на культуре нейронов человека (Levallois et al., 1997), а также в проведенном нами ранее исследовании *in vivo* С-ИП-нейронов задней группы ядер шва линии мышей, имеющих нокаут гена транспортера серотонина (Urtikova et al., 2009). Есть основания предполагать, что в случае популяции серотонинергических нейронов увеличение размеров клеток в процессе развития отражает степень их дифференцировки (Zhou et al., 2001) или же компенсационное изменение серотонинергического фенотипа в ответ на недостаточность и/или избыточность серотонинергической передачи. Обнаруженные нами изменения в площади С-ИП-нейронов (уменьшение у мышей, имеющих нокаут гена МОА-А, и транзиторное увеличение у мышей, имеющих нокаут генов ауторецепторов) могут быть связаны с общим содержанием серотонина в этой области и в мозгу в целом, обнаруженном у этих мышей в процессе развития. Так, мыши линии Tg8 характеризуются увеличенным содержанием серотонина как в области ядер шва, так и в других областях мозга; как в перинатальном периоде развития, так и у взрослых животных, причем пик такого увеличения приходится на ранний постнатальный период (Lajard et al., 1999). В отличие от этого, у мышей линии 5-HT1A-/- отмечено лишь небольшое

снижение содержания серотонина в раннем постнатальном периоде по сравнению с контрольной линией; затем подобные изменения исчезают, таким образом, изменение уровня серотонина отмечено лишь в перинатальном периоде онтогенеза (Janusonis et al., 2006). Исходя из этого мы предполагаем, что изменение размеров клеток у разных линий нокаутных мышей может быть связано с изменением тканевого уровня серотонина в определенные периоды онтогенеза.

С помощью полуколичественного анализа мы обнаружили разнонаправленное изменение внутриклеточного содержания серотонина в задней группе ядер шва у мышей различных нокаутных линий по сравнению с контрольными. Так, у мышей линии Tg8 внутриклеточное содержание серотонина было выше во всех исследуемых возрастах по сравнению с контрольной линией СЗН. Подобное увеличение может быть связано как с увеличением активности ТПП в перинатальном онтогенезе (Попова и др., 1999), так и с ингибированием выделения серотонина за счет деактивации VMAT2 (Shih et al., 1999), обнаруженным у подобных мышей. Увеличение внеклеточного уровня серотонина совместно с десенситизацией соматодендритических (5-HT1A) и терминальных (5-HT1B) ауторецепторов также может быть вовлечено в процесс регуляции уровня внутриклеточного серотонина у мышей линии Tg8 (Bou-Flores, Hilaire, 2000; Evrard et al., 2002).

Снижение внутриклеточного содержания серотонина в С-ИП-нейронах задней группы ядер шва у нокаутной линии мышей 5-HT1A-/- может быть связано с тоническим дезингибированием центральной серотониновой нервной передачи, выражающейся в нарушении выделения серотонина, которое обнаружено у этой линии мышей (Parsons et al., 2001). Мы предполагаем, что подобная дисрегуляция имеет более выраженную степень на ранних стадиях развития (перинатальный период), нежели на более поздних стадиях (поздний постнатальный период и взрослые животные), что подтверждается увеличением как общего тканевого, так и внутриклеточного уровня серотонина в перинатальном периоде, а также его последующим увеличением до искомого уровня контрольных животных ко второй неделе постнатального развития (Janusonis et al., 2006). Ранее было показано, что важное место в ауторегуляции серотонинергической системы и, в частности, синтеза занимает так называемое “коллатеральное ингибирование”, причем этот механизм регуляции проявляется очень рано (Jonakait et al., 1988). Подобная регуляция, возможно, опосредована 5-HT1A-рецепторами (Li, Bayliss, 1998), более того, уровень их экспрессии сопоставим с из-

менением уровня экспрессии ТПП, наблюдаемой в перинатальном периоде развития (Daval et al., 1987; Hillion et al., 1993; Rind et al., 2000). Другой механизм ауторегуляции, происходящий в задних ядрах шва, включает в себя посредничество 5-HT_{1B}-рецепторов, расположенных на глутаматергических нейронах, и являет собой совершенно новую ауторегуляцию задних ядер шва (Li, Bayliss, 1998). Выключение того или иного механизма развития у соответствующих линий нокаутных мышей и объясняет разнообразие изменений внутриклеточного содержания серотонина в задней группе ядер шва.

Общее содержание серотонина в области задних ядер шва было подсчитано с учетом значения оптической плотности, площади нейронов и их количества, и это значение достоверно выше у мышей линии Tg8 по сравнению с особями линии СЗН всех исследуемых возрастов. Изменение этого показателя сопоставимо с изменением общей концентрации серотонина в мозгу в целом и в области ядер шва у мышей нокаутной линии Tg8, измеренной с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В перинатальном периоде развития мыши Tg8 имеют большую концентрацию серотонина в этой области мозга, нежели таковые линии СЗН (Lajard et al., 1999), подобные различия мы обнаружили при проведении полуколичественного иммуноцитохимического анализа содержания серотонина в области задней группы ядер шва. Схожая корреляция между данными ВЭЖХ и полуколичественным анализом наблюдается и у мышей нокаутной линии 5-HT_{1A}^{-/-}: было показано, что концентрация серотонина увеличивается в постнатальном периоде развития, достигая уровня контрольной линии в конце второй постнатальной недели (Janusonis et al., 2006), что мы и продемонстрировали в нашем исследовании.

Таким образом, показанное в настоящей работе аутоингибиторное влияние выключение гена MAO-A и ауторецепторов серотонина 5-HT_{1A} и 5-HT_{1B} на морфологию медуллярных серотонинергических нейронов является удобной моделью для определения механизмов, лежащих в основе ауторегуляторного контроля развития серотонинергической системы мозга.

Авторы выражают глубокую признательность И. Сейф (I. Seif, Serotonine et Neuropharmacologie, Universite Paris-Sud), Ж. Адриен и М. Амон (J. Adrien, M. Hamon, Unite UMR INSERM 677, IFR 70, Universite Pierre et Marie Curie-Paris 6) за предоставление мышей нокаутных и контрольных линий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мирочник В.В., Угрюмов М.В., Бослер О. и др. Влияние серотонина на дифференцировку нейронов, продуцирующих вазоактивный интестинальный пептид в супрахиазматическом ядре у крыс // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2002. Т. 88. № 4. С. 417–423.
- Попова Н.К., Амстиславская Т.Г., Морозова Е.А. и др. Эффект генетического нокаута MOA-A на активность триптофангидроксилазы, скоростью лимитирующего фермента синтеза серотонина // Нейрохимия. 1999. Т. 16. С. 265–268.
- Пронина Т.С., Угрюмов М.В., Калас А. и др. Миграция и дифференцировка нейронов, продуцирующих гонадотропин-рилизинг-гормон, в условиях избытка серотонина с мозгу у плодов мышей // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 2007. Т. 43. № 3. С. 299–305.
- Угрюмов М.В. Дифференцировка магноцеллюлярных вазопрессинергических нейронов и их регуляция сигнальными молекулами в онтогенезе // Там же. 2002. Т. 38. № 5. С. 452–459.
- Adell A., Carceller A., Artigas F. In vivo brain dialysis study of the somatodendritic release of serotonin in the Raphe nuclei of the rat: effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin // J. Neurochem. 1993. V. 60. № 5. P. 1673–1681.
- Aitken A.R., Tork I. Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in wholmount preparations of the fetal rat brain // J. Comp. Neurol. 1988. V. 274. № 1. P. 32–47.
- Arai R., Kimura H., Nagatsu I. et al. Preferential localization of monoamine oxidase type A activity in neurons of the locus coeruleus and type B activity in neurons of the dorsal raphe nucleus of the rat: a detailed enzyme histochemical study // Brain Res. 1997. V. 745. № 1–2. P. 352–356.
- Ase A.R., Reader T.A., Hen R. et al. Altered serotonin and dopamine metabolism in the CNS of serotonin 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptor knockout mice // J. Neurochem. 2000. V. 75. № 6. P. 2415–2426.
- Ase A.R., Reader T.A., Hen R. et al. Regional changes in density of serotonin transporter in the brain of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} knockout mice, and of serotonin innervation in the 5-HT_{1B} knockout // Ibid. 2001. V. 78. № 3. P. 619–630.
- Ase A.R., Senecal J., Reader T.A. et al. Decreased G-protein coupling of serotonin 5-HT_{1A} receptors in the brain of 5-HT_{1B} knockout mouse // Neuropharmacology. 2002. V. 42. № 7. P. 941–949.
- Azmitia E.C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis // Brain Res. Bull. 2001. V. 56. № 5. P. 413–424.
- Blakely R.D., De Felice L.J., Hartzell H.C. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters // J. Exp. Biol. 1994. V. 196. P. 263–281.
- Blier P., de Montigny C. Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT_{1A} agonist gepirone: electrophysiological studies in the rat brain // Synapse. 1987. V. 1. № 5. P. 470–480.
- Blier P., de Montigny C. Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessive-compulsive and panic disorders // Neuropsychopharmacology. 1999. V. 21. № 2 (Suppl.). P. 91S–98S.
- Bonasera S.J., Tecott L.H. Mouse models of serotonin receptor function: toward a genetic dissection of serotonin systems // Pharmacol. Ther. 1988. V. 2. P. 133–142.

- Bou-Flores C., Hilaire G.* 5-Hydroxytryptamine(2A) and 5-the monoamine oxidase A-deficiency in the Tg8 transgenic mouse // *Neurosci. Lett.* 2000. V. 296. № 2–3. P. 141–144.
- Bruning G., Liangos O., Baumgarten H.G.* Prenatal development of the serotonin transporter in mouse brain // *Cell Tiss. Res.* 1997. V. 289. № 2. P. 211–221.
- Cases O., Seif I., Grimsby J. et al.* Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA // *Science.* 1995. V. 268. № 5218. P. 1763–1766.
- Cordes S.P.* Molecular genetics of the early development of hindbrain serotonergic neurons // *Clin. Genet.* 2005. V. 68. № 6. P. 487–494.
- Dahlstrom A., Fuxe K.* Localization of monoamines in the lower brain stem // *Experientia.* 1964. V. 20. № 7. P. 398–399.
- Daval G., Verge D., Becerril A. et al.* Transient expression of 5-HT_{1A} receptor binding sites in some areas of the rat CNS during postnatal development // *Int. J. Devel. Neurosci.* 1987. V. 5. № 3. P. 171–180.
- De Vitry F., Hamon M., Catelon J. et al.* Serotonin initiates and autoamplifies its own synthesis during mouse central nervous system development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. № 22. P. 8629–8633.
- Evrard A., Malagie I., Laporte A.M. et al.* Altered regulation of the 5-HT system in the brain of MAO-A knock-out mice // *Eur. J. Neurosci.* 2002. V. 15. № 5. P. 841–851.
- Galter D., Unsicker K.* Regulation of the transmitter phenotype of rostral and caudal groups of cultured serotonergic raphe neurons // *Neuroscience.* 1999. V. 88. № 2. P. 549–559.
- Galzin A.M., Poirier M.F., Lista A. et al.* Characterization of the 5-hydroxytryptamine receptor modulating the release of 5-[³H]hydroxytryptamine in slices of the human neocortex // *J. Neurochem.* 1992. V. 59. № 4. P. 1293–1301.
- Goridis C., Rohrer H.* Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons // *Nat. Rev. Neurosci.* 2002. V. 3. № 7. P. 531–541.
- Gothert M., Fink K., Frolich D. et al.* Presynaptic 5-HT auto- and heteroreceptors in the human central and peripheral nervous system // *Behav. Brain Res.* 1996. V. 73. № 1–2. P. 89–92.
- Grimsby J., Chen K., Wang L.J. et al.* Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. № 9. P. 3637–3641.
- Hery F., Boulenguez P., Semont A. et al.* Identification and role of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in primary cultures of rat embryonic rostral raphe nucleus neurons // *J. Neurochem.* 1999. V. 72. № 5. P. 1791–1801.
- Hillion J., Milne-Edwards J.B., Catelon J. et al.* Prenatal developmental expression of rat brain 5-HT_{1A} receptor gene followed by PCR // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1993. V. 191. № 3. P. 991–997.
- Hough C.J., Ursano R.J.* A guide to the genetics of psychiatric disease // *Psychiatry.* 2006. V. 69. № 1. P. 1–20.
- Howell M., Shirvan A., Stern-Bach Y. et al.* Cloning and functional expression of a tetrabenazine sensitive vesicular monoamine transporter from bovine chromaffin granules // *FEBS Lett.* 1994. V. 338. № 1. P. 16–22.
- Hutson P.H., Sarna G.S., O'Connell M.T. et al.* Hippocampal 5-HT synthesis and release *in vivo* is decreased by infusion of 8-OHDPAT into the nucleus raphe dorsalis // *Neurosci. Lett.* 1989. V. 100. № 1–3. P. 276–280.
- Invernizzi R., Carli M., Di Clemente A. et al.* Administration of 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)tetralin in raphe nuclei dorsalis and medianus reduces serotonin synthesis in the rat brain: differences in potency and regional sensitivity // *J. Neurochem.* 1991. V. 56. № 1. P. 243–247.
- Jacobs B.L., Azmitia E.C.* Structure and function of the brain serotonin system // *Physiol. Rev.* 1992. V. 72. № 1. P. 165–229.
- Jahng J.W., Houpt T.A., Wessel T.C. et al.* Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by *in situ* hybridization // *Synapse.* 1997. V. 25. № 1. P. 30–36.
- Janusonis S., Anderson G.M., Shifrovich I. et al.* Ontogeny of brain and blood serotonin levels in 5-HT receptor knockout mice: potential relevance to the neurobiology of autism // *J. Neurochem.* 2006. V. 99. № 3. P. 1019–1031.
- Jonakait G.M., Schotland S., Ni L.* Development of serotonin, substance P and thyrotrophin-releasing hormone in mouse medullary raphe grown in organotypic tissue culture: developmental regulation by serotonin // *Brain Res.* 1988. V. 473. № 2. P. 336–343.
- Lajard A.M., Bou C., Monteau R. et al.* Serotonin levels are abnormally elevated in the fetus of the monoamine oxidase-A-deficient transgenic mouse // *Neurosci. Lett.* 1999. V. 261. № 1–2. P. 41–44.
- Lauder J.M.* Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers // *Trends Neurosci.* 1993. V. 16. № 6. P. 233–240.
- Lauder J.M., Wallace J.A., Krebs H. et al.* *In vivo* and *in vitro* development of serotonergic neurons // *Brain Res. Bull.* 1982. V. 9. № 1–6. P. 605–625.
- Lavdas A.A., Blue M.E., Lincoln J. et al.* Serotonin promotes the differentiation of glutamate neurons in organotypic slice cultures of the developing cerebral cortex // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. № 20. P. 7872–7880.
- Levallois C., Valence C., Baldet P. et al.* Morphological and morphometric analysis of serotonin-containing neurons in primary dissociated cultures of human rhombencephalon: a study of development // *Brain Res. Devel. Brain Res.* 1997. V. 99. № 2. P. 243–252.
- Levitt P., Pintar J.E., Breakefield X.O.* Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. № 20. P. 6385–6389.
- Li Y.W., Bayliss D.A.* Presynaptic inhibition by 5-HT_{1B} receptors of glutamatergic synaptic inputs onto serotonergic caudal raphe neurones in rat // *J. Physiol.* 1998. V. 510. № 1. P. 121–134.
- Lidov H.G., Molliver M.E.* An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields // *Brain Res. Bull.* 1982. V. 8. № 4. P. 389–430.
- Lipton S.A., Kater S.B.* Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival // *Trends Neurosci.* 1989. V. 12. № 7. P. 265–270.

- Liu J.P., Lauder J.M.* Serotonin and nialamide differentially regulate survival and growth of cultured serotonin and catecholamine neurons // *Brain Res. Devel. Brain Res.* 1991. V. 62. № 2. P. 297–305.
- Lowry C.A., Johnson P.L., Hay-Schmidt A. et al.* Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems // *Stress.* 2005. V. 8. № 4. P. 233–246.
- Mayorga A.J., Dalvi A., Page M.E. et al.* Antidepressant-like behavioral effects in 5-hydroxytryptamine(1A) and 5-hydroxytryptamine(1B) receptor mutant mice // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001. V. 298. № 3. P. 1101–1107.
- Menegola E., Broccia M.L., Di Renzo F. et al.* Effects of excess and deprivation of serotonin on in vitro neuronal differentiation // *In Vitro Cell Devel. Biol. Anim.* 2004. V. 40. № 1–2. P. 52–56.
- Mirochnik V., Bosler O., Tillet Y. et al.* Long-lasting effects of serotonin deficiency on differentiating peptidergic neurons in the rat suprachiasmatic nucleus // *Int. J. Devel. Neurosci.* 2005. V. 23. № 1. P. 85–91.
- Moiseiwitsch J.R.* The role of serotonin and neurotransmitters during craniofacial development // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2000. V. 11. № 2. P. 230–239.
- Ni L., Jonakait G.M.* Ontogeny of substance P-containing neurons in relation to serotonin-containing neurons in the central nervous system of the mouse // *Neuroscience.* 1989. V. 30. № 1. P. 257–269.
- Parsons L.H., Kerr T.M., Tecott L.H.* 5-HT(1A) receptor mutant mice exhibit enhanced tonic, stress-induced and fluoxetine-induced serotonergic neurotransmission // *J. Neurochem.* 2001. V. 77. № 2. P. 607–617.
- Peter D., Liu Y., Sternini C. et al.* Differential expression of two vesicular monoamine transporters // *J. Neurosci.* 1995. V. 15. № 9. P. 6179–6188.
- Pronina T., Ugrumov M., Calas A. et al.* Influence of monoamines on differentiating gonadotropin-releasing hormone neurons in foetal mice // *J. Neuroendocrinol.* 2003. V. 15. № 10. P. 925–932.
- Ramboz S., Oosting R., Amara D.A. et al.* Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 24. P. 14476–14481.
- Rind H.B., Russo A.F., Whittemore S.R.* Developmental regulation of tryptophan hydroxylase messenger RNA expression and enzyme activity in the raphe and its target fields // *Neuroscience.* 2000. V. 101. № 3. P. 665–677.
- Rumajogee P., Verge D., Hanoun N. et al.* Adaption of the serotonergic neuronal phenotype in the absence of 5-HT autoreceptors or the 5-HT transporter: involvement of BDNF and cAMP // *Eur. J. Neurosci.* 2004. V. 19. № 4. P. 937–944.
- Saudou F., Amara D.A., Dierich A. et al.* Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor // *Science.* 1994. V. 265. № 5180. P. 1875–1878.
- Schmitt J.A., Wingen M., Ramaekers J.G. et al.* Serotonin and human cognitive performance // *Curr. Pharm. Des.* 2006. V. 12. № 20. P. 2473–2486.
- Shih J.C., Ridd M.J., Chen K. et al.* Ketanserin and tetrabenzazine abolish aggression in mice lacking monoamine oxidase A // *Brain Res.* 1999. V. 835. № 2. P. 104–112.
- Smolen D.* Image analytic techniques for quantification of immunohistochemical staining in the nervous system // *Quantitative and qualitative microscopy methods in neuroscience.* San Diego: Acad. Press, 1990. P. 208–229.
- Sprouse J.S., Aghajanian G.K.* Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT1A and 5-HT1B agonists // *Synapse.* 1987. V. 1. № 1. P. 3–9.
- Taber Pierce E.* Time of origin of neurons in the brain stem of the mouse // *Prog. Brain Res.* 1973. V. 40. № 10. P. 53–65.
- Tyce G.M.* Origin and metabolism of serotonin // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1990. V. 16. № 3 (Suppl.). P. 1–7.
- Ugrumov M.V., Trembleau A., Calas A.* Altered vasoactive intestinal polypeptide gene expression in the fetal rat suprachiasmatic nucleus following prenatal serotonin deficiency // *Int. J. Devel. Neurosci.* 1994. V. 12. № 2. P. 143–149.
- Urtikova N.A., Brisorgueil M.J., Lanfumey L. et al.* Differential consequences of 5-HT transporter deficiency on autocrine regulation of 5-HT neuron phenotype in anterior versus posterior raphe nuclei during development // *J. Chem. Neuroanat.* 2009. In press.
- Vickers S.P., Dourish C.T.* Serotonin receptor ligands and the treatment of obesity // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2004. V. 5. № 4. P. 377–388.
- Vitalis T., Parnavelas J.G.* The role of serotonin in early cortical development // *Devel. Neurosci.* 2003. V. 25. № 2–4. P. 245–256.
- Wallace J.A., Lauder J.M.* Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study // *Brain Res. Bull.* 1983. V. 10. № 4. P. 459–479.
- Walther D.J., Peter J.U., Bashammakh S. et al.* Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform // *Science.* 2003. V. 299. № 5603. P. 76.
- Whitaker-Azmitia P.M., Azmitia E.C.* Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: role of high affinity serotonin receptors // *Neurosci. Lett.* 1986. V. 67. № 3. P. 307–312.
- Whitaker-Azmitia P.M., Azmitia E.C.* Stimulation of astroglial serotonin receptors produces culture media which regulates growth of serotonergic neurons // *Brain Res.* 1989. V. 497. № 1. P. 80–85.
- Whitaker-Azmitia P.M., Druse M., Walker P. et al.* Serotonin as a developmental signal // *Behav. Brain Res.* 1996. V. 73. № 1–2. P. 19–29.
- Zhou F.C., Xu Y., Bledsoe S. et al.* Serotonin transporter antibodies: production, characterization, and localization in the brain // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1996. V. 43. № 1–2. P. 267–278.
- Zhou F.C., Sari Y., Zhang J.K. et al.* Prenatal alcohol exposure retards the migration and development of serotonin neurons in fetal C57BL mice // *Brain Res. Devel. Brain Res.* 2001. V. 126. № 2. P. 147–155.

Development of Serotonergic Neurons of Dorsal Raphe Nuclei in Mice with Knockout of Monoamine Oxidase A and 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} Autoreceptor

N. A. Urtikova^{a,b}, A. Ya. Sapronova^a, M. J. Brisorgueil^b, D. Verge^b, and M. V. Ugryumov^a

^a *Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119991 Russia*

^b *Neurobiologie des Signaux Intercellulaires (UMR 7101 IFR 83 CNRS UPMC), Universite Pierre et Marie Curie, 7 Quai Saint Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France*

e-mail: nataliya.urtikova@gmail.com

Abstract—The morphological changes in the development of serotonergic neurons of the dorsal raphe nuclei in the medulla oblongata was studied by immunocytochemistry in mice with knockout of 1A and 1B serotonin autoreceptors as well as monoamine oxidase A. Serotonin autoreceptors regulate electric activity of serotonergic neurons as well as the synthesis and release of the neurotransmitter, while monoamine oxidase A catalyzes its degradation. These genetic modifications proved to have no effect on the number of serotonergic neurons in the medulla oblongata but induced morphofunctional changes. Decreased cell size and increased intracellular serotonin level were observed in the case of monoamine oxidase A deficiency, while excessive cell size and decreased intracellular serotonin level were observed in the case of autoreceptor deficiency. The data obtained confirm the hypothesis of autoregulation of serotonergic neurons in development.

Key words: serotonin, knockout, medulla oblongata, immunocytochemistry, image analysis.