

© А. И. Емануйлов, 2019
УДК 611.899.018:612.648:636.8

А. И. Емануйлов

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ МЕДИАТОРНОГО СОСТАВА НЕЙРОНОВ СИМПАТИЧЕСКИХ ГАНГЛИЕВ У КОШКИ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ

Кафедра анатомии человека (зав. — проф. Т. А. Румянцева), ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России

Цель исследования — выявление локализации и иммуногистохимических характеристик нейронов верхнего шейного (ВШГ) и звездчатого (ЗГ) ганглиев симпатической части периферической нервной системы у кошки.

Материал и методы. Работа выполнена на кошках в возрасте 1, 10, 20, 30 сут с использованием маркера ретроградного аксонального транспорта прочного синего Fast Blue (FB), вводимого в мышцы шеи, и иммуногистохимических методов.

Результаты. Меченые посредством FB нейроны выявляются в обоих исследованных симпатических ганглиях у котят с момента рождения. Во всех возрастных группах наибольшее количество таких нейронов оказалось иммунореактивными (ИР) к тирозингидроксилазе (ТГ). Доля меченых нейронов, одновременно реагирующих на антитела к ТГ и нейропептиду Y, в обоих узлах значительно увеличивается за первые 10 сут жизни. Процентное содержание кальбиндин-ИР-нейронов в ВШГ уменьшается с момента рождения до 30-х суток жизни, а в ЗГ — возрастает за первые 10 сут, затем уменьшается к 30-м суткам. Реакция на антитела к холинацетилтрансферазе, вазоинтестинальному полипептиду и нейрональной синтазе оксида азота обнаруживается менее чем в 1% меченых нейронов у котят всех возрастных групп. Соматостатин-ИР-меченые нейроны в ВШГ и ЗГ не обнаруживаются.

Выводы. В онтогенезе происходит перестройка медиаторного состава нейронов симпатических узлов, завершающаяся у кошек к 20-м суткам жизни.

Ключевые слова: автономная нервная система, симпатические узлы, онтогенез

Введение. В симпатических узлах в подавляющем большинстве нейронов выявляется фермент синтеза катехоламинов — тирозингидроксилаза (ТГ). Помимо этого, примерно $\frac{2}{3}$ нейронов содержат также нейропептид Y (НПУ) [14]. Небольшая часть нейронов симпатических ганглиев не содержат катехоламины и являются холинергическими [12, 14]. В отличие от грызунов симпатические узлы хищных млекопитающих и человека содержат нейроны, более разнообразные по медиаторному составу. Например, у крыс некатехолинергические нейроны содержат фермент синтеза ацетилхолина холинацетилтрансферазу (ХАТ) и вазоинтестинальный полипептид (ВИП) [3, 14]. У кошек в ТГ-негативных нейронах, кроме ацетилхолина и ВИП, также выявляются нейрональная синтаза оксида азота (nNOS) и кальцитонин-ген-родственный пептид (КГРП) [6, 12].

В онтогенезе параллельно с функциональным созреванием в нейронах симпатических узлов идет перестройка медиаторного состава, которая может происходить под влиянием целого ряда различных трофических факторов [7, 8]. У новорожденных и 10-суточных крысят и котят в симпатических узлах выявляется достаточно боль-

шой процент кальбиндин (КБ)-иммунореактивных (ИР) нейронов, доля которых значительно уменьшается после первых 10 сут жизни [2, 3]. Также в симпатических узлах крыс после рождения уменьшается процентное содержание соматостатин (СОМ)-ИР-клеток [3, 14].

Целью настоящего исследования явилось выявление локализации и иммуногистохимических характеристик нейронов верхнего шейного (КШГ) и звездчатого (ЗГ) ганглиев симпатической части периферической нервной системы кошки.

Материал и методы. Работа выполнена на 20 котят в возрасте 1, 10, 20, 30 сут (по 5 животных в каждой возрастной группе). Исследование проводили с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). На проведение исследования получено разрешение этического комитета Ярославского государственного медицинского университета (протокол № 29 от 21.02.2019 г.).

Под уретановой анестезией (1 г/кг внутривенно) животным под фасцию грудиноключично-сосцевидной мышцы с помощью микрошприца вводили 10 мкл маркера ретроградного аксонального транспорта прочный синий [Fast Blue (FB), «Polysciences», США] [2% раствор на фосфатно-солевом буфере (PBS, 0,01M, pH 7,4)]. Послеоперационный период составлял 24 ч.

После введения летальной дозы уретана (3 г/кг внутривенно) животных перфузировали транскардиально изотони-

Сведения об авторах:

Емануйлов Андрей Игоревич (e-mail: post_doc@mail.ru), кафедра анатомии человека, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

Таблица 1

Использованные первичные антитела к тирозингидроксилазе (ТГ), вазоинтестинальному полипептиду (ВИП), соматостатину (СОМ), нейрональной синтазе оксида азота (nNOS), нейропептиду Y (НПУ) и холинацетилтрансферазе (ХАТ)

Тип антител	Животное-донор	Разведение	Источник
ТГ	Овца	1:1000	Abcam (Великобритания)
ВИП	Кролик	1:300	Abcam (Великобритания)
СОМ	Коза	1:200	Santa-Cruz (США)
nNOS	Коза	1:300	Abcam (Великобритания)
НПУ	Кролик	1:500	Abcam (Великобритания)
ХАТ	Коза	1:100	Millipore (США)

Таблица 2

Число нейронов, меченных маркёром ретроградного аксонального транспорта Fast Blue, в верхнем шейном (ВШГ) и звёздчатом (ЗГ) ганглиях (n=5 для каждого возраста)

Ганглий	Возраст животного			
	Новорожденные	10 сут	20 сут	30 сут
Верхний шейный	542±63	783±104	631±89	525±75
Звёздчатый	473±70	687±85	424±56	701±109

ческим раствором NaCl с гепарином, а затем фиксирующей смесью 4 % параформальдегида на PBS. Извлекали верхний шейный (ВШГ) и звездчатый (ЗГ) ганглии, которые фиксировали в течение 2 ч в указанной смеси, после чего промывали трехкратно в PBS в течение 30 мин и оставляли в 20 % растворе сахарозы (рН 7,4) на ночь. Из фиксированного материала на криостате готовили серии срезов толщиной 14 мкм.

С целью выявления нейронов, содержащих ТГ, ХАТ, ВИП, НПУ, nNOS, КБ и СОМ, применяли двойное иммуногистохимическое мечение по ранее описанной нами методике [2, 12]. С этой целью срезы преинкубировали 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10 % сыворотки, 1 % тритона X-100, 0,1 % бычьего сывороточного альбумина, 0,05 % тимерозола. Затем инкубировали 24 ч при комнатной температуре с первичными антителами (табл. 1). После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировали 2 ч с вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромами: флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC), дающим зеленую флюоресценцию, и индокарбоданином (Cy3), дающим красную флюоресценцию (разведение 1:150, Jackson Immunoresearch, США). Затем срезы снова отмывали в PBS и заключали в среду для иммунофлюоресценции (VectaShield, Vector Laboratories, США).

Анализ гистологических препаратов проводили на флюоресцентном микроскопе Olympus BX43 (Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD-камерой Tucsen TCC 6.1ICE с программным обеспечением ISCapture 3.6 (Китай). Нейроны, меченные маркёром FB, выявляли по синей флюоресценции, иммунопозитивные — по зеленой и красной. Для анализа процентного соотношения иммунопозитивных нейронов на цифровых изображениях гистологических препаратов использовали программу Image J (НИН, США, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Математическую обработку данных проводили с использованием пакетов прикладных программ Sigma Plot (StatSoft, США). Все величины представлены в виде $(\bar{x} \pm s_{\bar{x}})$, где \bar{x} — среднее арифметическое, а $s_{\bar{x}}$ — стандартная ошибка среднего.

Значимость различий средних величин определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (Anova) с коррекцией Бонферрони. Значимыми считали различия сравниваемых показателей при $p < 0,05$.

Результаты исследования. С момента рождения нейроны, меченные посредством FB, выявляются и в ВШГ, и в ЗГ. В ВШГ такие нейроны располагаются в каудальной области, а в ЗГ — преимущественно в медиальной части. Значимых различий по числу нейронов между ганглиями, а также между различными возрастными группами не выявлено (табл. 2, $p > 0,05$). Также не обнаружено значимых различий по числу меченных нейронов в правом и левом узлах ($p > 0,05$).

Большинство меченых нейронов у котят всех возрастных групп являются норадренергическими и содержат фермент синтеза норадреналина ТГ (рис. 1). Доля таких нейронов в раннем постнатальном онтогенезе в обоих узлах значительно не меняется и варьирует от 89 до 94 %.

У новорожденного котенка лишь небольшая часть нейронов, наряду с ТГ, содержат НПУ.

Доля таких нейронов значительно увеличивается за первые 10 сут жизни в ЗГ и в течение 20 сут в ВШГ (см. рис. 1, 2), а далее значительно не меняется.

Большая часть нейронов, меченных FB, у новорожденных котят в ВШГ и ЗГ являются КБ-ИР (см. рис. 1, 2). Процентное содержание меченых КБ-ИР-нейронов в ВШГ значительно уменьшается с момента рождения до 30-х суток жизни, а в ЗГ — возрастает за первые 10 сут, а затем уменьшается к 30-м суткам ($p < 0,05$).

Реакция на антитела к ХАТ, ВИП и nNOS выявляется менее чем у 1 % от общей популяции меченых нейронов в обоих исследованных ганглиях во всех возрастных группах. СОМ-ИР-меченные нейроны в симпатических узлах кошек не обнаружены.

Размеры нейронов, меченных FB, увеличиваются в процессе онтогенеза (табл. 3). Значимых различий по средней площади сечения между мечеными нейронами и нейронами, не содержащими метку, не выявлено ($p > 0,05$).

Обсуждение полученных данных. Результаты исследования подтверждают ранее

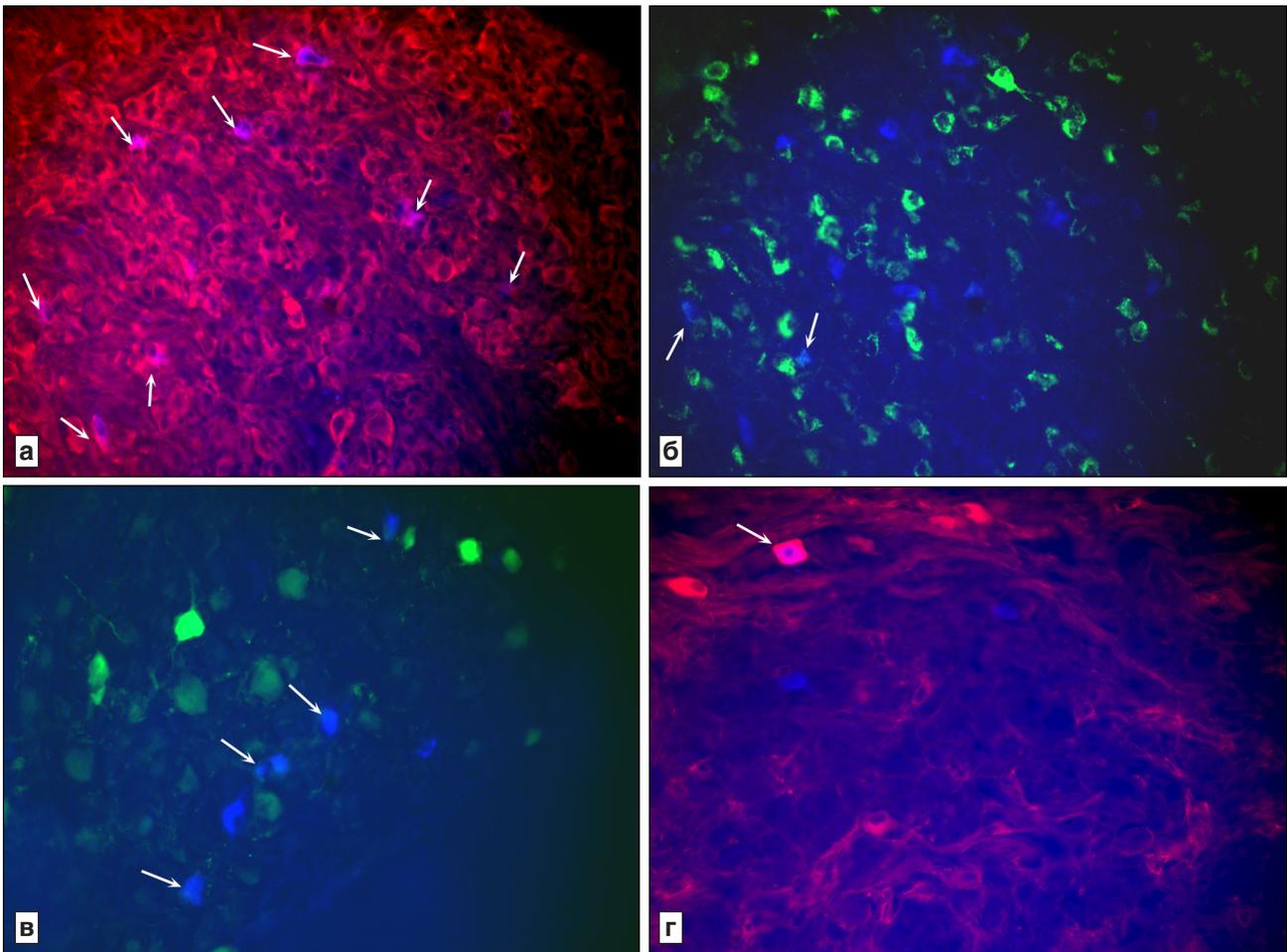


Рис. 1. Нейроны (стрелки), меченные маркёром ретроградного аксонального транспорта Fast Blue (FB), содержащие тирозингидроксилазу (а), нейропептид Y (б), кальбиндин (в) и нейрональную синтазу оксида азота (г) в верхнем шейном ганглии новорожденных (а, б) и звёздчатом ганглии 20-суточных котят (в, г).

Флюоресценция FB (синий), FITC (зеленый, нейропептид Y, кальбиндин) и Су3 (красный, тирозингидроксилаза и нейрональная синтаза оксида азота). Ув. 200

полученные методом ретроградного аксонного транспорта сведения о наличии связей нейронов симпатических узлов с органами-мишенями, в частности сосудами скелетных мышц, уже к моменту рождения [1]. В онтогенезе размеры

нейронов симпатических узлов увеличиваются. У кошки площадь сечения нейронов ЗГ приобретает размеры, свойственные взрослому животному, к 6-месячному возрасту [3, 11].

В симпатических узлах млекопитающих большая часть нейронов содержат одновременно ТГ и НПУ [5, 13]. НПУ является не только нейротрансмиттером, способствующим вазоконстрикции сосудов скелетных мышц, но и трофическим фактором, способствующим ангиогенезу [15]. При этом у новорожденных котят, согласно полученным результатам, лишь небольшая часть меченых нейронов симпатических узлов являются НПУ-ИР, доля которых в онтогенезе возрастает за первые 20 сут жизни, достигая примерно $\frac{2}{3}$ всех нейронов. В литературе есть данные, что в симпатических ганглиях крыс доля НПУ-ИР-нейронов, посылающих свои аксоны к сердцу и сосудам скелетных мышц, составляет половину от общего количества меченых нейро-

Таблица 3

Средняя площадь сечения нейронов (n=100 в каждой возрастной группе), меченных маркёром ретроградного аксонального транспорта Fast Blue (FB+) и не содержащих метку (FB-), в верхнем шейном (ВШГ) и звёздчатом (ЗГ) ганглиях у крыс разных возрастных групп

Возраст	Средняя площадь сечения (мкм ²)			
	ВШГ		ЗГ	
	FB+	FB-	FB+	FB-
Новорожденные	201±11	181±8	215±23	207±14
10 сут	254±26	239±11	247±22	256±16
20 сут	288±17	301±22	291±22	316±24
30 сут	345±27	361±19	338±21	345±15

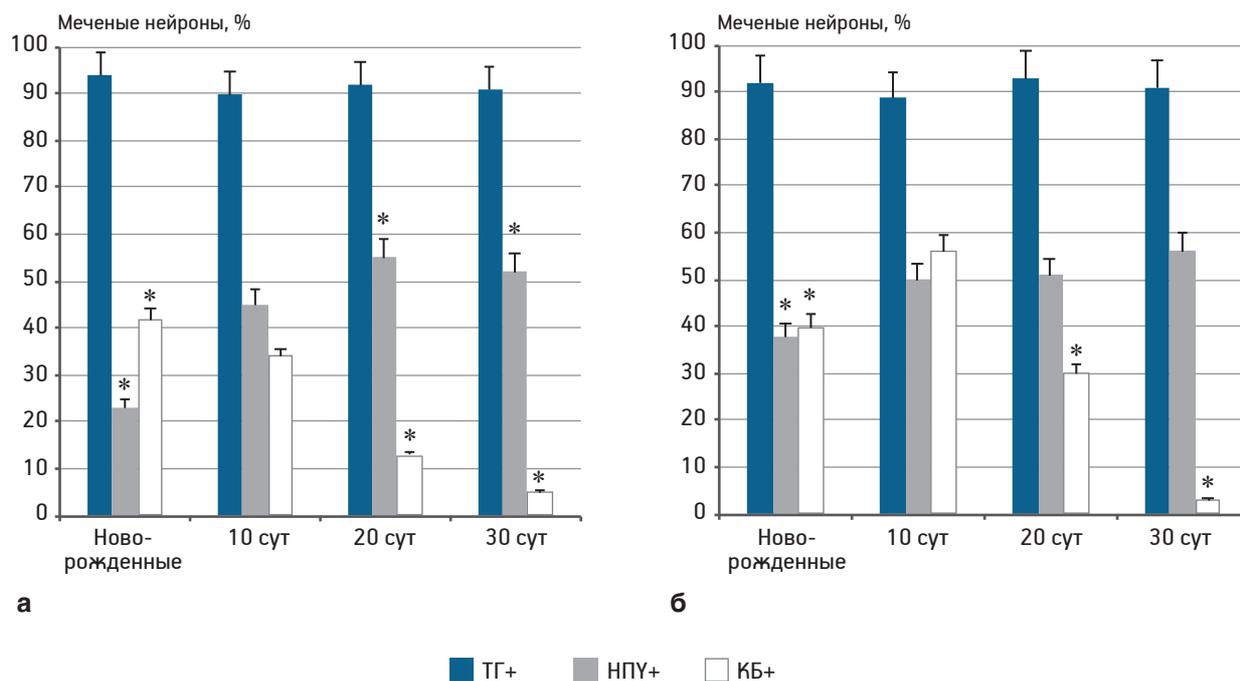


Рис. 2. Доля нейронов, содержащих тирозингидроксилазу (ТГ+), нейропептид Y (НПУ+) и кальбиндин (КБ+) в верхнем шейном ганглии (а) и звёздчатом ганглии (б) котят разных возрастов (* различия значимы по сравнению с 10-суточными животными при $p < 0,05$)

нов и в онтогенезе не изменяется с момента рождения [13].

Известно, что у кошек связи с сосудами скелетных мышц образуют и холинергические нейроны симпатических узлов, содержащие pNOS и ВИП [6]. В нашем исследовании мы выявили лишь небольшую долю холинергических меченых нейронов в симпатических ганглиях, что свидетельствует о малом их количестве среди подавляющего большинства катехоламинергических нейронов. В отличие от ЗГ грызунов, где в раннем постнатальном онтогенезе доля СОМ-ИР-нейронов уменьшается [3, 14], у кошек в ВШГ и ЗГ выявить СОМ-ИР-нейроны нам не удалось.

У новорожденного котенка большая часть меченых нейронов являются КБ-ИР. В отличие от кошек у крыс симпатические нейроны, образующие связи с сосудами, не содержат КБ в постнатальном онтогенезе [4]. В развивающихся нейронах при участии ионов кальция происходит регуляция роста нейронов и морфологической пластичности, в частности образования и функционирования конуса роста и развития дендритов [9, 10]. Вероятно, КБ особенно важен на ранних этапах постнатального развития нервной системы, а впоследствии его роль снижается.

Заключение. Таким образом, у кошек нейрохимический состав симпатических узлов в первые недели жизни изменяется. Происходит пере-

стройка медиаторного состава нейронов, завершающаяся к 20-м суткам жизни.

Автор сообщает об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маслюков П.М. Связи нейронов звездчатого ганглия кошки с органами-мишенями в постнатальном онтогенезе // Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова. 2000. Т. 86, № 6. С. 703–710 [Masliukov P.M. Connections of the cat stellate ganglion with target organs during postnatal ontogenesis // Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I.M.Sechenova. 2000. Vol. 86, № 6. P. 703–710. In Russ.].
2. Маслюков П.М., Коробкин А.А., Коновалов В.В. и др. Возрастное развитие кальбиндин-иммунопозитивных нейронов симпатических узлов крысы // Морфология. 2012. Т. 141, вып. 1. С. 77–80 [Masliukov P.M., Korobkin A.A., Kononov V.V. et al. Age-related development of calbindin-immunopositive neurons of rat sympathetic ganglia // Morfologiya. 2012. Vol. 141, № 1. P. 77–80. In Russ.].
3. Маслюков П.М., Емануйлов А.И., Ноздрачев А.Д. Возрастные изменения нейротрансмиттерного состава нейронов симпатических узлов // Успехи геронтологии. 2016. Т. 29, № 3. С. 442–453 [Masliukov P.M., Emanuilov A.I., Nozdrachev A.D. Developmental changes of neurotransmitter properties in sympathetic neurons // Uspekhi gerontologii. 2016. Vol. 29, № 3. P. 442–453. In Russ.].
4. Маслюков П.М., Ноздрачев А.Д., Емануйлов А.И. Возрастные особенности экспрессии кальций-связывающих белков в нейронах ганглиев автономной нервной системы // Успехи геронтологии. 2016. Т. 29, № 2. С. 247–253 [Masliukov P.M., Nozdrachev A.D., Emanuilov A.I. Age-related expression of calcium-binding proteins in autonomic ganglionic

- neurons // *Uspekhi gerontologii*. 2016. Vol. 29, № 2. P. 247–253. In Russ.].
5. Ноздрачев А. Д., Маслюков П. М. Нейропептид Y и автономная нервная система // *Журн. эволюцион. биохим. и физиол.* 2011. Т. 47, № 2. С. 105–112 [Nozdrachev A. D., Masliukov P. M. Neuropeptide Y and autonomic nervous system // *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii*. 2011. Vol. 47. P. 105–112. In Russ.].
 6. Anderson C. R., McAllen R. M., Edwards S. L. Nitric oxide synthase and chemical coding in cat sympathetic postganglionic neurons // *Neuroscience* 1995. Vol. 68, № 1. P. 255–264. doi: 10.1016/0306-4522(95)00143-7
 7. Chan W. H., Anderson C. R., Gonsalvez D. G. From proliferation to target innervation: signaling molecules that direct sympathetic nervous system development // *Cell Tissue Res*. 2018. Vol. 372, № 2. P. 171–193. doi: 10.1007/s00441-017-2693-x
 8. Ernsberger U., Rohrer H. Sympathetic tales: subdivisions of the autonomic nervous system and the impact of developmental studies // *Neural. Dev.* 2018. Vol. 13, № 1. P. 20. doi: 10.1186/s13064-018-0117-6
 9. Fliniaux I., Germain E., Farfariello V., Prevarskaya N. TRPs and Ca²⁺ in cell death and survival // *Cell Calcium*. 2018. Vol. 69. P. 4–18. doi: 10.1016/j.ceca.2017.07.002
 10. Gasperini R. J., Pavez M., Thompson A. C., Mitchell C. B., Hardy H., Young K. M., Chilton J. K., Foa L. How does calcium interact with the cytoskeleton to regulate growth cone motility during axon pathfinding? // *Mol. Cell Neurosci.* 2017. Vol. 84. P. 29–35. doi: 10.1016/j.mcn.2017.07.006
 11. Masliukov P. M. Sympathetic neurons of the cat stellate ganglion in postnatal ontogenesis: morphometric analysis // *Auton. Neurosci.* 2001. Vol. 89, № 1–2. P. 48–53.
 12. Masliukov P. M., Emanuilov A. I., Moiseev K., Nozdrachev A. D., Dobrotvorskaya S., Timmermans J. P. Development of non-catecholaminergic sympathetic neurons in para- and prevertebral ganglia of cats // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2015. Vol. 40. P. 76–84. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2014.12.004
 13. Masliukov P. M., Konovalov V. V., Emanuilov A. I., Nozdrachev A. D. Development of neuropeptide Y-containing neurons in sympathetic ganglia of rats // *Neuropeptides*. 2012. Vol. 46, № 6. P. 345–352. doi: 10.1016/j.npep.2012.08.003
 14. Maslyukov P. M., Korzina M. B., Emanuilov A. I., Shilkin V. V. Neurotransmitter composition of neurons in the cranial cervical and celiac sympathetic ganglia in postnatal ontogenesis // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2010. Vol. 40, № 2. P. 143–147. doi: 10.1007/s11055-009-9247-y
 15. Saraf R., Mahmood F., Amir R., Matyal R. Neuropeptide Y is an angiogenic factor in cardiovascular regeneration // *Europ. J. Pharmacol.* 2016. Vol. 776. P. 64–70. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.02.033
- Поступила в редакцию 11.04.2019
Получена после доработки 22.06.2019
- THE STUDY OF THE DYNAMICS OF THE MEDIATOR CONTENT OF SYMPATHETIC NEURONS IN EARLY ONTOGENESIS OF CAT**
- A. I. Emanuilov*
- Objective** — to demonstrate the localization and immunohistochemical characteristics of cat sympathetic neurons in the superior cervical (SCG) and stellate (SG) ganglia.
- Material and methods.** The work was performed on 1-, 10-, 20-, 30-day-old cats using retrograde axonal transport of Fast Blue (FB) which was injected in the neck muscle, and immunohistochemical methods.
- Results.** FB-labeled neurons were detected in both studied ganglia in cats from the moment of birth. The largest number of labeled neurons in kittens of all age groups were immunoreactive (IR) to tyrosine hydroxylase (TH). The percentage of labeled neurons reactive both to TH and neuropeptide Y significantly increased in both ganglia during the first 10 days of life. The percentage of calbindin-IR neurons in the SCG decreased from birth by the 30th day of life, in the SG — increased in the first 10 days and then decreased by the 30th day of life. Immunoreactivity to choline acetyltransferase, vasointestinal polypeptide, and neuronal nitric oxide synthase were found in less than 1 % of labeled neurons in kittens of all age groups. Somatostatin-IR labeled neurons were not detected in the SCG and SG.
- Conclusions.** In ontogenesis a reorganization of the mediator content of sympathetic neurons occurs, which in cats ends by the 20th day of life.
- Key words:** *autonomic nervous system, sympathetic ganglia, ontogenesis*
- Department of Human Anatomy, Yaroslavl' State Medical University, 5 Revolyutsionnaya St., Yaroslavl' 150000