

© К. Ю. Моисеев, П. М. Маслюков, 2018
УДК 611.899:612.65:599.323.4

К. Ю. Моисеев, П. М. Маслюков

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ NO-СОДЕРЖАЩИХ СИМПАТИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ В СПИННОМ МОЗГУ У КРЫС

Кафедра нормальной физиологии с биофизикой (зав. — проф. П. М. Маслюков), ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

Цель — установить локализацию, процентный состав и морфометрические характеристики симпатических преганглионарных нейронов, содержащих NO-синтазу (NOS) в спинном мозгу у крыс.

Материал и методы. Исследование проведено на 35 белых крысах-самках линии Вистар в возрасте 3, 10, 20, 30, 60 сут, 6 мес и 3 лет. На срезах спинного мозга, сделанных на уровне его T_{II}-сегмента, проводили иммуногистохимическое выявление NOS и фермента синтеза ацетилхолина холинацетилтрансферазу (ХАТ).

Оценивали площадь нервных клеток и процент иммунореактивных нейронов.

Результаты. В спинном мозгу у новорожденных и 10-суточных крыс большинство симпатических преганглионарных нейронов содержали NOS и одновременно — ХАТ. В этих возрастных группах крыс обнаруживали также популяцию NOS-позитивных/ХАТ-негативных нейронов (26% у новорожденных и 8% у 10-суточных), которые не наблюдались у более взрослых животных. В течение первых 20 сут доля NOS-иммунопозитивных нейронов существенно уменьшалась, а ХАТ-положительных — увеличивалась.

Вывод. В раннем постнатальном онтогенезе наблюдается снижение числа симпатических преганглионарных нейронов, экспрессирующих NOS, что, возможно, оказывает влияние на механизмы NO-ергической симпатической передачи.

Ключевые слова: симпатические преганглионарные нейроны, NO-синтаза, спинной мозг, иммуногистохимия, крыса

Симпатические преганглионарные нейроны располагаются в спинном мозгу не только в боковом роге, где располагается главная часть промежуточно-латерального ядра (nucleus intermediolateralis, pars principalis — nucl. ILp) и канатиковая часть этого ядра (nucleus intermediolateralis, pars funicularis — nucl. ILf), но и в дорсально расположенном межкостистом спинномозговом ядре (nucleus intercalatus spinalis — nucl. IC), включая его параэпендимальную часть (nucleus intercalatus spinalis, pars paraependymalis — nucl. ICpe) [5]. Нейроны этих ядер являются холинергическими и содержат ацетилхолин, который синтезируется под влиянием холинацетилтрансферазы (ХАТ) — фермента синтеза ацетилхолина. В холинергических нейронах, наряду с ХАТ, выявляется NO-синтаза (NOS) — фермент синтеза оксида азота [14].

Оксид азота (NO) играет роль универсального модулятора разнообразных функций организма, включая регуляцию дыхания, кровообращения, поддержание иммунного статуса организма, пластичности нервной ткани, памяти, высвобождения нейротрансмиттеров [3, 4, 12]. NO является внутри- и межклеточным посредником, выполняющим различные сигнальные функции. В синапсах NO может действовать на пре-

и постсинаптическом уровне [3, 8, 12]. В ходе постнатального онтогенеза происходит изменение нейротрансмиттерного состава нейронов автономной нервной системы, в частности симпатических узлов [2]. Современные литературные данные свидетельствуют о возможности локализации NOS и ХАТ в отдельных нейронах спинного мозга с момента рождения [1]. Однако имеется мало данных относительно возрастных изменений нейрохимического состава преганглионарных симпатических нейронов. Поэтому целью настоящей работы было определение локализации, процентного состава и морфологических характеристик преганглионарных симпатических NOS-иммунореактивных нейронов спинного мозга в постнатальном онтогенезе.

Материал и методы. Исследование проведено на 35 белых крысах-самках линии Вистар в возрасте 3, 10, 20, 30, 60 сут, 6 мес и 3 лет после рождения. Содержание, эксперименты и выведение животных из них проводили с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На данное исследование получено разрешение этического комитета (№ 11 от 29.09.2016 г.). Эвтаназию животных осуществляли под уретановым наркозом (3 г/кг, внутривенно), далее проводили транскраниальную перфузию изотоническим раствором хлорида натрия с гепарином (5 ЕД/л), затем 4% раствором параформальдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4). Для исследования производился забор T_{II}-сегментов грудного

Сведения об авторах:

Моисеев Константин Юрьевич, Маслюков Петр Михайлович (e-mail: mpm@ysmu.ru), кафедра нормальной физиологии с биофизикой, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

отдела спинного мозга. Выделенный материал фиксировали в течение 2 ч в предыдущей смеси, после чего промывали трехкратно в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7,4 (ООО «Биолот», Санкт-Петербург, Россия) в течение 30 мин и оставляли в 30% растворе сахарозы на 24 ч. Из фиксированного материала на криостате готовили серии срезов толщиной 14 мкм.

С целью выявления нейронов, иммунореактивных к NOS, применяли мечение поликлональными антителами кролика к нейрональной изоформе NOS фирмы LifeSpan Biosciences (США), марка антитела LS-B8696, при разведении 1:300 и к ХАТ — антителами козы фирмы Millipore (США) в разведении 1:50. Срезы преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% ослиной сыворотки (Jackson ImmunoResearch, США), 1% тритон X-100 (Sigma-Aldrich, США), 0,1% бычьего сывороточного альбумина (ООО «Биолот», Санкт-Петербург, Россия), 0,05% тимерозола. Затем срезы инкубировали с первичными антителами в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировали с вторичными ослиными антикроличьими и антикозьими антителами, конъюгированными с флюорохромом FITC или Cy3 (Jackson ImmunoResearch, США) в течение 2 ч (разведение 1:150), дающими зеленую или красную флюоресценцию. После этого срезы отмывали в PBS и заключали в среду для иммунофлюоресценции (VectaShield, Vector Laboratories, США).

Анализ препаратов, подвергнутых процедуре иммуногистохимической обработки, проводился с использованием программно-аппаратного комплекса, включающего флюоресцентный микроскоп Olympus BX45 (Япония) с набором фильтров (модуль зеркал U-FBWA — синее возбуждение, фильтр возбуждения BP460-495, барьерный фильтр BA510-550; модуль зеркал U-FGWA — зеленое возбуждение, фильтр возбуждения BP530-550, барьерный фильтр BA575-625), охлаждаемую CCD камеру Tусen TCH-5.0ICE (Xintu Photonics, Китай) и компьютер на базе процессора Intel Core i7. Получение и последующая обработка изображений проводились с использованием программы IScapture, версия 3.6 (Xintu Photonics, Китай). Морфологические свойства нейронов (коэффициент округлости, площадь сечения, максимальный диаметр) определялись при помощи программы ImageJ (NIH, США). Оценивали площадь нервных клеток и процент

иммунореактивных нейронов. Анализу подлежали нервные клетки, срез которых прошел через ядро.

Определяли процент NOS-иммунопозитивных/ХАТ-иммунонегативных, NOS-иммунопозитивных/ХАТ-иммунопозитивных, NOS-иммунонегативных /ХАТ-иммунопозитивных нейронов. Для этого определяли отношение каждой из вышеперечисленных групп клеток к общему числу (NOS и ХАТ) иммунопозитивных нейронов, которое принимали за 100%. Для определения площади сечения нейронов в случайном порядке брали 100 нейронов, иммунопозитивных к NOS в каждой возрастной группе.

Статистический анализ включал определение средней арифметической и ее стандартной ошибки. Значения сравнивали при помощи t-критерия Стьюдента, ANOVA, Манна—Уитни U-теста. Значения считались достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования. В спинном мозгу NOS выявлялась в автономных симпатических ядрах: nucl. ILp, nucl. ILf, nucl. IC и nucl. ICре с момента рождения у всех животных (рис. 1). Обнаруживали отдельные NOS-позитивные клетки также в области дорсального рога, промежуточного серого вещества и вентральной части области вокруг центрального канала, которые, по литературным данным, не относятся к автономной нервной системе [11]. Большинство NOS-содержащих нейронов на срезах имели круглую или веретенную форму. Также отмечались отдельные клетки треугольной формы.

У крыс всех возрастов наибольшее количество NOS-позитивных симпатических преганглионарных нейронов выявлялось в nucl. ILp (табл. 1, см. рис. 1). В первые 2 мес жизни относительное содержание NOS-позитивных нейронов в nucl. ILf, nucl. IC и nucl. ICре достоверно увеличивалось, а в nucl. ILp — снижалось.

Средняя площадь профильного поля NOS-иммунореактивных преганглионарных нейронов увеличивалась в онтогенезе с момента рождения до 10-х суток жизни с 176 ± 8 до 208 ± 14 мкм² и далее достоверно не изменялась. У новорожденных и 10-суточных крыс большинство нейронов в nucl. ILp были NOS-позитивными и одновременно содержали фермент холинацетилтрансферазу (рис. 2, табл. 2). Однако в этих возрастных группах обнаруживалась также популяция NOS-позитивных/ХАТ-негативных нейронов (26% — у новорож-

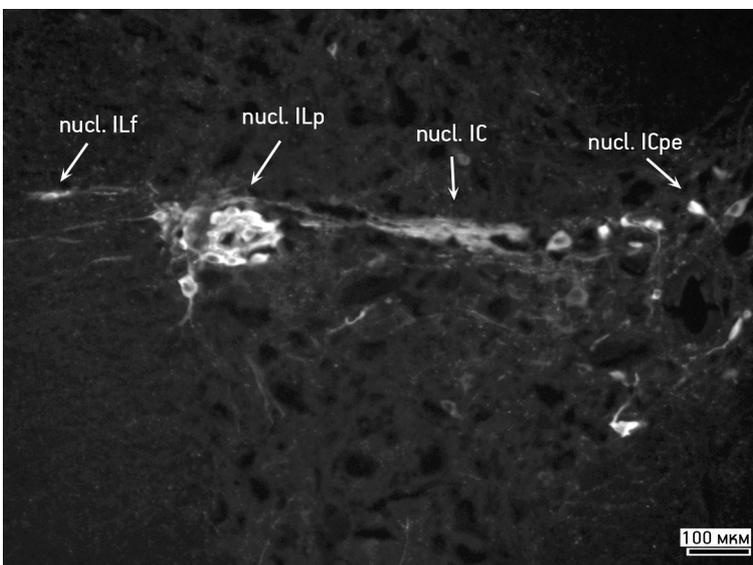


Рис. 1. NOS-иммунореактивные нейроны 20-суточной крысы в автономных ядрах спинного мозга крыс. Флюоресценция Cy3

Таблица 1

Относительное содержание NOS-позитивных нейронов в ядрах спинного мозга крысы ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

Возраст	nucl. ILf	nucl. ILp	nucl. IC	nucl. ICре
Новорожденный	9±0,4	56±3,4	14±1,9	19±2,1
10 сут	11±0,6	54±2,7	15±1,5	18±1,8
20 сут	12±0,8	60±4,3	12±1,8	15±1,6
30 сут	10±0,5	59±3,5	13±1,1	16±1,7
2 мес	14±1,1*	57±3,9	15±1,9	12±1,8*
6 мес	14±0,6*	56±3,8	16±1,2**	13±1,4*
3 года	14±0,5*	56±4,1	17±1,1**	12±1,6*

* Различия значимы по сравнению с новорожденными при $p < 0,05$;
** различия значимы по сравнению с 20-суточными крысами при $p < 0,05$.

Таблица 2

Относительное содержание ХАТ- и NOS-иммунореактивных нейронов nucl. ILp в онтогенезе ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

Возраст	NOS(+)/ХАТ(-)	NOS(+)/ХАТ(+)	NOS(-)/ХАТ(+)
Новорожденный	26±4,5**	66±5,8	8±2,3**
10 сут	8±3,2*	75±4,6	17±3,3*
20 сут	<1* **	76±3,8	23±2,1*
30 сут	<1* **	55±3,3**	45±3,6* **
2 мес	<1* **	59±4,2**	41±2,2* **
6 мес	<1* **	62±5,1**	38±4,5* **
3 года	<1* **	56±4,6**	44±3,7* **

* Различия значимы по сравнению с новорожденными при $p < 0,01$;
** различия значимы по сравнению с 10-суточными крысами при $p < 0,05$. За 100% принято общее количество ХАТ- и NOS-иммунореактивных нейронов.

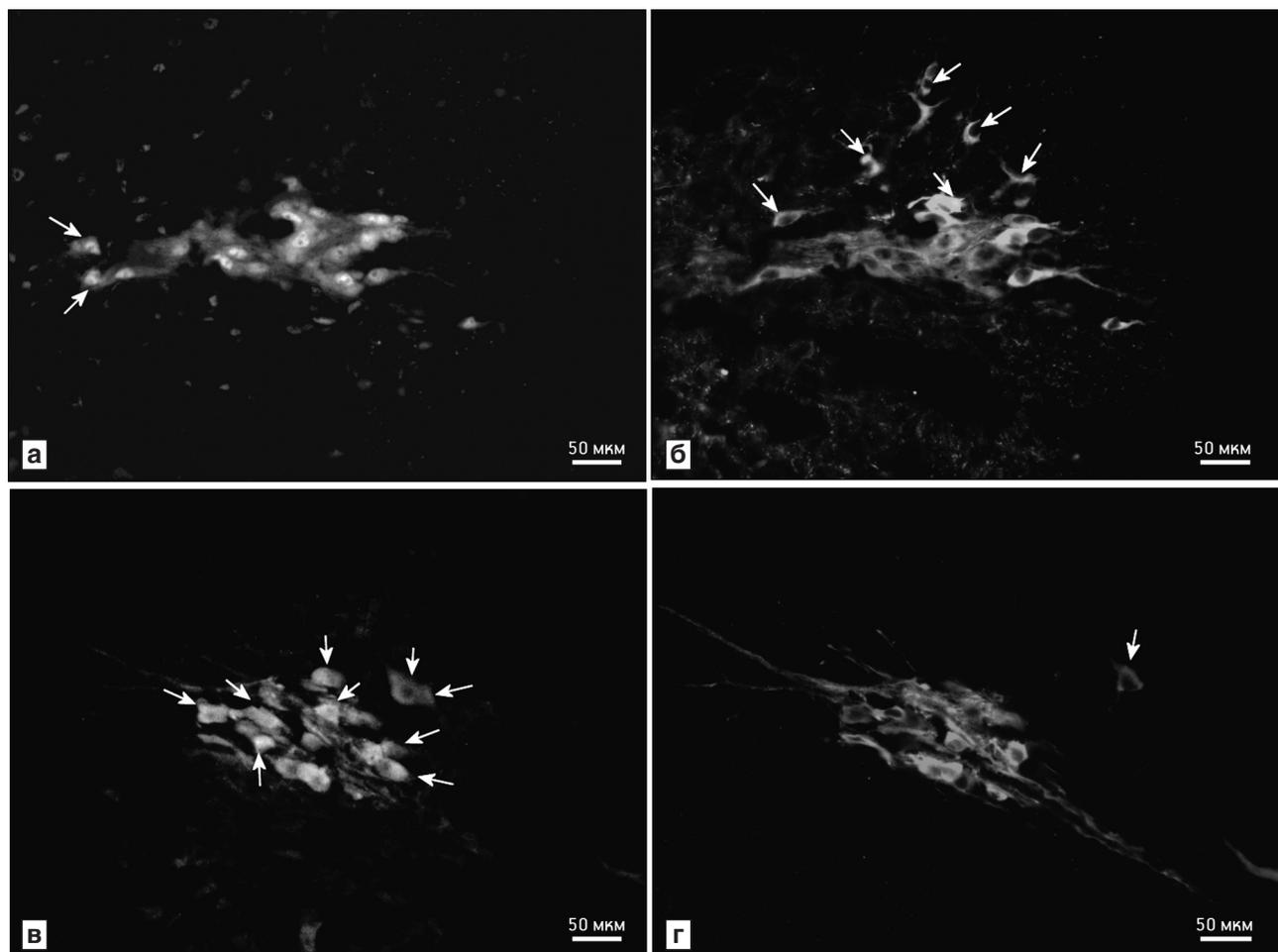


Рис. 2. Параллельная реакция на ХАТ (а, в) и NOS (б, г) нейронов nucl. ILp T_{II}-сегмента спинного мозга крысы: новорожденной (а, б), 30-суточной (в, г).

Стрелками указаны нейроны, иммунопозитивные только к одному маркеру (только ХАТ или только NOS).

Флуоресценция FITC (а, в), Cy3 (б, г)

денных и 8% — у 10-суточных), которые не наблюдались у более взрослых животных. В течение первых 20 сут доля NOS-иммунопозитивных нейронов в nucl. IPr существенно уменьшалась, а ХАТ-положительных, наоборот, увеличивалась. У 30-суточных крысят около 45% преганглионарных симпатических спинномозговых нейронов были NOS-иммунонегативными. Эта доля оставалась впоследствии почти неизменной.

В nucl. IPr у всех животных NOS-позитивные нейроны были ХАТ-позитивными. В nucl. IC и nucl. ICре содержание NOS-позитивных/ХАТ-негативных, NOS-позитивных/ХАТ-позитивных, NOS-негативных /ХАТ-позитивных достоверно не отличалось между собой у животных всех возрастных групп. Таким образом, в раннем постнатальном онтогенезе наблюдается возрастное изменение NO-ергической симпатической передачи, проявляющееся в снижении числа симпатических преганглионарных нейронов, экспрессирующих NOS.

Обсуждение полученных данных. В результате проведенного исследования установлено, что подавляющее большинство симпатических преганглионарных нейронов у крыс от момента рождения до старости содержат NOS, которая при этом солокализована с ферментом синтеза ацетилхолина — холинацетилтрансферазой, что подтверждается литературными данными [14]. Однако у крыс до 10-х суток жизни в nucl. IPr обнаруживалась группа NOS-позитивных/ХАТ-негативных нейронов, которые не наблюдались у более взрослых животных. В течение первых 20 сут доля NOS-иммунопозитивных нейронов вышеупомянутой области существенно уменьшается, а ХАТ-положительных, наоборот, увеличивается. Преганглионарные симпатические волокна образуют синапсы с нейронами пара- и превертебральных узлов, которые у грызунов являются NOS-негативными [6, 9].

Ранее было показано, что в метасимпатических интрамуральных узлах кишки у мыши и человека NOS-иммунореактивные нейроны в эмбриогенезе созревают раньше, чем холинергические [7, 13]. В позднем эмбриональном и раннем постнатальном периоде NOS экспрессируется большим числом нейронов по сравнению с более взрослыми особями [7].

Установлено, что NO может модулировать синаптическую функцию в различных регионах мозга. Так, в базальных ганглиях NO почти в 2 раза увеличивает секрецию ацетилхолина [12]. NO также играет важную роль в нейропластич-

ности, способствуя развитию дендритов и формированию синапсов [4, 8]. Известно, что синаптическая передача в симпатических узлах у крыс окончательно формируется к 20-м суткам жизни [10], поэтому, вероятно, NO может служить трофическим фактором, способствующим созреванию синапсов в раннем постнатальном онтогенезе.

Заключение. В раннем постнатальном онтогенезе в преганглионарных симпатических нейронах происходит снижение экспрессии нейрональной NOS и увеличение числа нейронов, содержащих ХАТ. Таким образом, можно предположить, что NO способствует улучшению синаптической передачи в автономных узлах в пренатальном и раннем постнатальном периоде, которая еще на этот момент остается незрелой.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 16-04-00538).

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: П. М. М.

Сбор и обработка материала: К. Ю. М.

Статистическая обработка данных: К. Ю. М.

Анализ и интерпретация данных: П. М. М.

Написание текста: П. М. М.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колос Е.А., Коржевский Д.Э. Распределение холинергических и нитроксидаергических нейронов в спинном мозгу у новорожденных и взрослых крыс // *Морфология*. 2015. Т. 147, вып. 2. С. 32–37 [Kolos E.A., Korzhevskii D.E. The distribution of cholinergic and nitroxidergic neurons in the spinal cord of newborn and adult rats // *Morfologija*. 2015. Vol. 147, № 2. P. 32–37. In Russ.].
2. Маслюков П.М., Емануйлов А.И., Ноздрачёв 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.].
3. Ситдикова Г.Ф., Яковлев А.В., Зефирова А.Л. Газомедиаторы: от токсических эффектов к регуляции клеточных функций и использованию в клинике // *Бюллетень сибирской медицины*. 2014. Т. 13, № 6. С. 185–200 [Sitdikova G.F., Yakovlev A.V., Zefirova A.L. Gasotransmitters: from the toxic effects to the regulation of cellular function and clinical application // *Byulleten' sibirskoi meditsiny*. 2014. Vol. 13, № 6. P. 185–200. In Russ.].
4. Cossenza M., Socodato R., Portugal C.C. et al. Nitric oxide in the nervous system: biochemical, developmental, and neurobiological aspects // *Vitam. Horm.* 2014. Vol. 96. P. 79–125.
5. Deuchars S.A., Lall V.K. Sympathetic preganglionic neurons: properties and inputs // *Compr. Physiol.* 2015. Vol. 5, № 2. P. 829–869.

6. Emanuilov A. I., Korzina M. B., Archakova L. I. et al. Development of the NADPH-diaphorase-positive neurons in the sympathetic ganglia // *Ann. Anat.* 2008. Vol. 190, № 6. P. 516–524.
7. Foong J. P. Postnatal development of the mouse enteric nervous system // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. Vol. 891. P. 135–143.
8. Garthwaite J. From synaptically localized to volume transmission by nitric oxide // *J. Physiol.* 2016. Vol. 594. P. 9–18.
9. Masliukov P. M., Emanuilov A. I., Madalieva L. V. et al. Development of nNOS-positive neurons in the rat sensory and sympathetic ganglia // *Neuroscience*. 2014. Vol. 256. P. 271–281.
10. Masliukov P. M., Fateev M. M., Nozdrachev A. D. Age-dependent changes of electrophysiologic characteristics of the stellate ganglion conducting pathways in kittens // *Auton. Neurosci.* 2000. Vol. 83, № 1–2. P. 12–18.
11. Phelps P. E., Barber R. P., Vaughn J. E. Embryonic development of choline acetyltransferase in thoracic spinal motor neurons: somatic and autonomic neurons may be derived from a common cellular group // *J. Comp. Neurol.* 1991. Vol. 307, № 1. P. 77–86.
12. Philippu A. Nitric Oxide: A Universal Modulator of Brain Function // *Curr. Med. Chem.* 2016. Vol. 23. P. 2643–2652.
13. Timmermans J. P., Barbiers M., Scheuermann D. W. et al. Distribution pattern, neurochemical features and projections of nitric neurons in the pig small intestine // *Ann. Anat.* 1994. Vol. 176. P. 515–525.
14. Wetts R., Vaughn J. E. Choline acetyltransferase and NADPH diaphorase are co-expressed in rat spinal cord neurons // *Neuroscience*. 1994. Vol. 63, № 4. P. 1117–1124.

Поступила в редакцию 18.09.2017
Получена после доработки 28.10.2017

AGE-RELATED CHANGES OF NO-CONTAINING SYMPATHETIC NEURONS IN RAT SPINAL CORD

K. Yu. Moiseyev, P. M. Masliukov

Objective — to determine the localization, percentage and morphometric characteristics of sympathetic preganglionic neurons containing NO synthase (NOS) in rat spinal cord.

Material and methods. The study was conducted on 35 female albino Wistar rats aged 3, 10, 20, 30, 60 days, 6 months and 3 years. In spinal cord sections taken at the level of its T_{II}-segment, NOS and enzyme of acetylcholine synthesis cholineacetyltransferase (ChAT) were demonstrated using the immunohistochemical methods. Nerve cell area and the percentage of immunoreactive neurons were evaluated.

Results. In the spinal cord of newborn and 10-day-old rats, the majority of sympathetic preganglionic neurons contained NOS and ChAT. However, in these age groups a population of NOS-positive/ChAT-negative neurons was detected, which were not observed in older animals (26% in the newborns and 8% in 10-day-old rats). During the first 20 days, the proportion of NOS-immunopositive neurons decreased significantly, while that of ChAT-positive neurons increased.

Conclusions. In the early postnatal ontogenesis, there is an age-related decrease in the number of sympathetic preganglionic NOS-expressing neurons, that, probably, affects the mechanisms of NO-ergic sympathetic transmission.

Key words: *preganglionic sympathetic neurons, spinal cord, NO synthase, immunohistochemistry, rat*

Department of Normal Physiology with Biophysics, Yaroslavl State Medical University, 5, Revolutsionnaya St., Yaroslavl, 150000