

© А. И. Емануйлов, К. Ю. Моисеев, И. В. Филиппов, П. М. Маслюков
УДК 611.018.8:611.341:612.65:599.323.4

А. И. Емануйлов, К. Ю. Моисеев, И. В. Филиппов и П. М. Маслюков

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОНОВ ИНТРАМУРАЛЬНЫХ УЗЛОВ ТОНКОЙ КИШКИ, СОДЕРЖАЩИХ РАЗЛИЧНЫЕ ТИПЫ КАЛЬЦИЙ-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

Кафедра нормальной физиологии (зав. — проф. П. М. Маслюков), кафедра анатомии человека
(зав. — проф. Т. А. Румянцева), Ярославская государственная медицинская академия

Иммуногистохимическими и морфометрическими методами исследованы локализация, относительное содержание и площадь сечения кальбиндин (КБ)- и кальретинин (КР)-иммунопозитивных нейронов в интрамуральных узлах межмышечного сплетения двенадцатиперстной кишки крыс ($n=37$) в постнатальном онтогенезе (1-, 10-, 20-, 30-, 60-е сутки, 1 год, 2 года жизни). КБ- и КР-иммунопозитивные нейроны выявлялись у всех исследованных крыс от новорожденных до старых. Доля КР-иммунопозитивных нейронов увеличивалась в первые 10 сут жизни и далее значимо не изменялась, в том числе и у старых животных. Доля КБ-содержащих нейронов возрастала, достигая максимального значения к 20-м суткам жизни, незначительно снижалась к 30 сут и далее значимо не менялась. Средний размер КБ- и КР-иммунопозитивных нейронов был значимо больше средней площади сечения иммунонегативных нейронов во всех возрастных группах.

Ключевые слова: тонкая кишка, интрамуральные узлы, кальбиндин, кальретинин, онтогенез

Ca^{2+} является одним из универсальных регуляторов многочисленных процессов, происходящих в клетке. Внутри- и внеклеточные сигналы могут приводить к кратковременному увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в клетке [4, 8]. Связывание кальция сопровождается нарушением пространственной ориентации определенных групп белка и приводит к изменению его свойств.

В настоящее время описаны Са-связывающие белки, содержащие в своей структуре от 2 до 6 Са-связывающих центров [4, 8, 15]. Наиболее распространенными в нервной системе являются кальбиндин (КБ) массой 28 килодальтон, кальретинин (КР) и парвальбумин, относящиеся к EF-семейству Са-связывающих белков. В зависимости от концентрации Ca^{2+} последние по-разному взаимодействуют со своими белками-мишенями и регулируют их активность [8].

В автономной нервной системе сравнительно большая доля КБ-содержащих нейронов описана в симпатических узлах [2, 11] и метасимпатических интрамуральных узлах кишки [12, 13]. В подслизистом сплетении тонкой кишки у крысы около половины нейронов являются КР-позитивными [13]. Парвальбумин отсутствует в нейронах интрамуральных узлов пищеварительного тракта [7].

В нервной системе в онтогенезе относительное содержание различных типов Са-связывающих белков меняется. У крыс и кошек в ходе развития доля КБ-содержащих симпатических нейронов увеличивается с момента рождения до 10-х суток, затем снижается до конца 1-го месяца жизни [2, 11].

Однако в литературе практически отсутствуют данные о возрастной динамике содержания КБ и КР в нейронах интрамуральных узлов кишки. Поэтому целью настоящего исследования явилось выявление локализации, относительного содержания и морфометрическая характеристика КБ- и КР-иммунопозитивных нейронов в интрамуральных узлах межмышечного сплетения двенадцатиперстной кишки у крыс разного возраста от момента рождения до старости.

Материал и методы. Работа выполнена на крысах-самках линии Вистар в возрасте 1, 10, 20, 30, 60 сут, 1 года и 2 лет (по 5 животных в каждой возрастной группе). После введения летальной дозы уретана (3 г/кг, внутривенно) животных перфузировали транскардиально фосфатно-солевым буфером (PBS) с гепарином, а затем 4% параформальдегидом на 0,1 М PBS pH 7,4. Исследовали двенадцатиперстную кишку. Выделенные участки кишки помещали на 2 ч в указанный выше фиксатор, далее 3-кратно промывали в PBS в течение 30 мин и оставляли в 30% растворе сахарозы на 24 ч, после чего на криостате готовили серии срезов толщиной 14 мкм.

Сведения об авторах:

Емануйлов Андрей Игоревич, кафедра анатомии человека; *Моисеев Константин Юрьевич*, *Филиппов Игорь Владимирович*, *Маслюков Петр Михайлович* (e-mail: trm@yuma.ac.ru), кафедра нормальной физиологии, Ярославская государственная медицинская академия, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

Нейроны, содержащие КБ и КР, выявляли при помощи меченых антител по ранее описанной методике [2, 11]. При этом использовали первичные антитела овцы (Abscam, США, разведение 1:500 и 1:100 соответственно), вторичные антитела были конъюгированы с флюорохромом — флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC, разведение 1:100, Jackson Immunoresearch, США), дающим зеленую флюоресценцию. Для расчета относительного содержания иммунопозитивных нейронов, кроме мечения КБ и КР, проводили иммуномечение всей нейронной популяции при помощи моноклональных мышинных антител к протеиновому генному продукту 9,5 (Abscam, США, разведение 1:20), вторичные антитела были конъюгированы с флюорохромом индокарбоцианином (Cy3, Jackson, США, разведение 1:100), дающим красную флюоресценцию.

Срезы преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% сыворотки, 1% тритон X-100, 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% тимерозола. Затем срезы инкубировали с первичными антителами в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировали со вторичными антителами в течение 2 ч, отмывали в PBS и включали в среду для иммунофлюоресценции (VectaShield, Vector Laboratories, США).

Анализ препаратов проводили под флюоресцентным микроскопом Olympus BX43 (Olympus, Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD-камерой Tucsen TCC 6.1ICE с программным обеспечением ISCapture 3.6 (Китай). Для анализа размеров и относительного содержания иммунопозитивных нейронов на цифровых изображениях гистологических препаратов использовали программу Image J (NIH, США, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Долю иммунопозитивных нейронов определяли как их отношение к общему числу нейронов, которое принимали за 100%. Анализу подлежали нейроны, срез которых прошел через ядро с ядрышком. Для определения площади сечения нейронов в случайном порядке брали 100 нейронов, иммунопозитивных к каждому из исследованных маркеров в каждой возрастной группе.

Статистический анализ включал определение среднего арифметического значения и его стандартной ошибки. О значимости различий судили по величине t-критерия Стьюдента и считали их значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. КБ- и КР-иммунопозитивные нейроны выявлялись в межмышечном сплетении двенадцатиперстной кишки у всех исследованных крыс от новорожденных до старых. Интенсивная флюоресценция отмечалась как в ядре, так и в цитоплазме нейронов (рисунк).

У новорожденных крысят доля КБ- и КР-иммунопозитивных нейронов была небольшой и не превышала 24 и 20,3% соответственно. Доля КР-иммунопозитивных нейронов увеличивалась в первые 10 сут жизни и далее значимо не изменялась, в том числе и у старых животных. Доля КБ-содержащих нейронов возрастала, достигая максимального значения к 20-м суткам жизни, незначительно снижаясь к 30-м суткам и далее значимо не менялась (табл. 1).

Таблица 1

Доля кальбиндин (КБ)- и кальретинин (КР)-иммунопозитивных нейронов в интрамуральных узлах межмышечного сплетения двенадцатиперстной кишки у крыс разного возраста ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

Возраст	КБ	КР
Новорожденные	24±4	20±5
10 сут	53±4*	43,0±2,1*
20 сут	64,3±2,5*	46±12*
30 сут	56,3±2,3*	48±4*
2 мес	55±4*	46±4*
1 год	49±7*	45±7*
2 года	51±6*	48±5*

* Различия значимы по сравнению с новорожденными животными при $P < 0,05$.

Средняя площадь сечения КБ- и КР-иммунопозитивных нейронов увеличивалась в онтогенезе с момента рождения в течение 1-го месяца жизни (табл. 2). При этом средний размер КБ-содержащих нейронов возрастал в 1,5 раза, а КР-позитивных — в 1,35 раза. Средний размер КБ- и КР-иммунопозитивных нейронов значимо превышал среднюю площадь сечения иммунонегативных во всех возрастных группах ($P < 0,05$). Значимых различий между средней площадью сечения КБ- и КР-иммунопозитивных нейронов во всех возрастных группах не наблюдалось ($P > 0,05$).

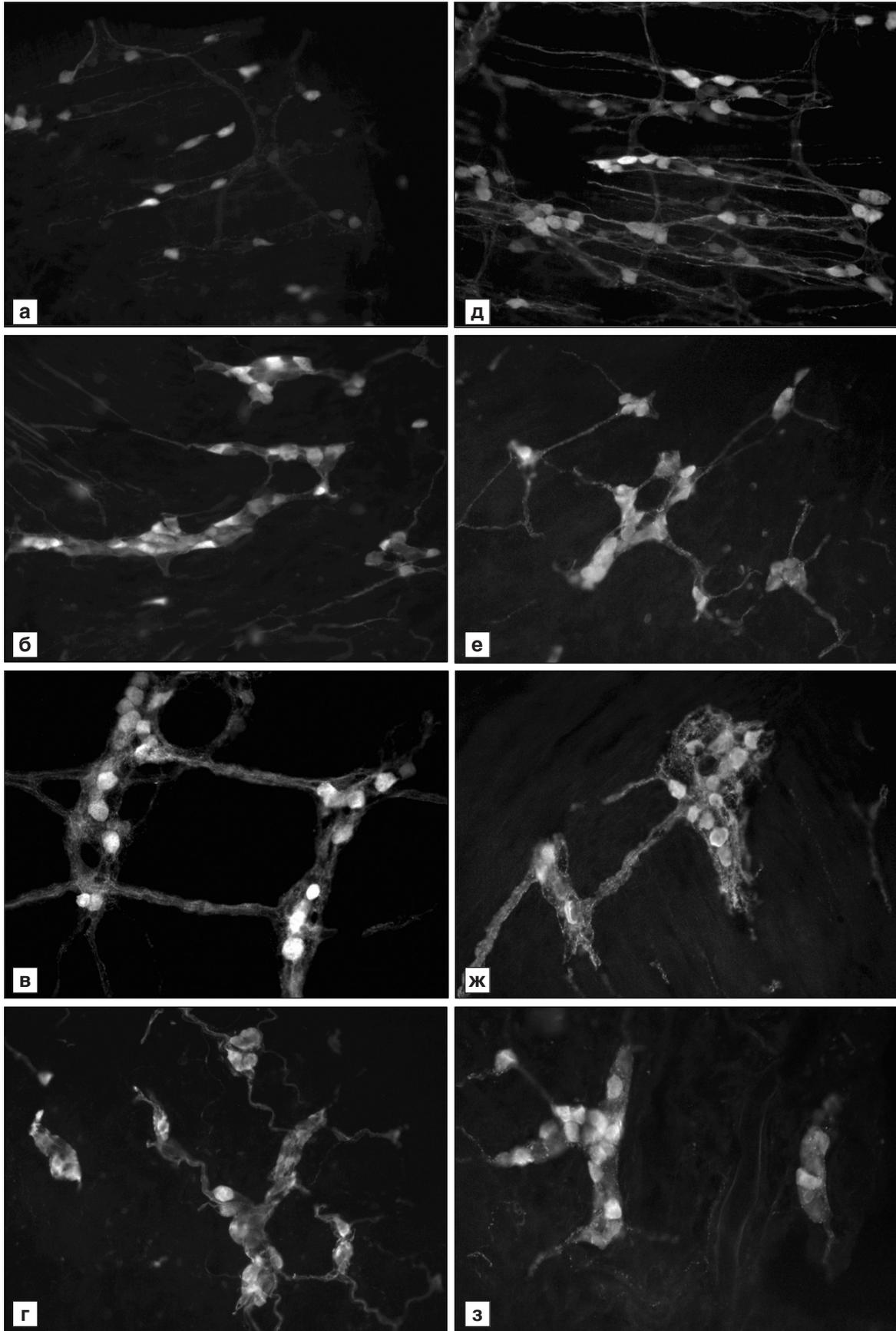
Обсуждение полученных данных. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что в первые 10 сут доля КБ- и КР-иммунопозитивных нейронов в интрамуральных узлах кишки увеличивается. Вероятно, это связано с важной ролью кальция в возраст-

Таблица 2

Площади сечения кальбиндин (КБ)- и кальретинин (КР)-иммунопозитивных (+) и негативных (-) нейронов в интрамуральных узлах межмышечного сплетения двенадцатиперстной кишки у крыс разного возраста ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, мкм²)

Возраст	КБ		КР	
	КБ ⁺	КБ ⁻	КР ⁺	КР ⁻
Новорожденные	150±8*	121±3	168±9*	128±4
10 сут	147±6*	121±5	174±6*	132±4
20 сут	170±6*	145±8	169±9*	137±6
30 сут	206±10*	158±6	202±11*	144±10
2 мес	225±19*	159±12	227±14*	158±15
1 год	195±8	179±11	222±10*	151±6
2 года	184±9*	153±12	218±12*	156±9

* Различия значимы по сравнению с показателем у иммунонегативных нейронов при $P < 0,05$.



Нейроны, содержащие кальбиндин (а—г) и кальретинин (д—з) в интрамуральных узлах межмышечного сплетения двенадцатиперстной кишки у новорожденных (а, д), 10-суточных (б, е), 30-суточных (в, ж) и 2-летних (г, з) крыс. Иммуногистохимическая реакция. Об. 10, ок. 10

ных и стресс-индуцированных изменениях нервной системы [6, 8]. В интрамуральных узлах кишки у взрослой крысы почти половина нейронов содержат КБ и КР [12, 13], что согласуется с нашими данными. Однако у крыс в симпатических узлах и чувствительных узлах спинномозговых нервов содержание кальций-связывающих белков максимально у новорожденных и 10-суточных животных и снижается в раннем постнатальном онтогенезе. Значение такой гетерохронии остается пока неясным.

Так же, как и в симпатических узлах, размеры нейронов в интрамуральных узлах возрастают в постнатальном онтогенезе. Однако средняя площадь сечения нейронов, в том числе КБ- и КР-содержащих, в интрамуральных узлах увеличивается в меньшей степени, чем в симпатических узлах [1, 3, 10]. Так же, как и в превертебральных симпатических узлах, КБ-иммунопозитивные нейроны крупнее иммунонегативных [11].

Среди факторов, регулирующих развитие синапсов и их пластичность, важную роль играет поддержание определенной концентрации ионов кальция, которая может изменяться в пространстве и во времени, в частности, благодаря КБ и КР [8, 14]. При участии ионов кальция происходит регуляция роста развивающихся нейронов и морфологической пластичности конуса роста и развития дендритов, что совпадает по времени с увеличением содержания Са-связывающих белков [15]. На более поздних этапах постнатального развития нейронов интрамуральных узлов Са-связывающие белки играют роль кальциевых сенсоров и участвуют в поддержании концентрации кальция в клетках.

КБ, связывая кальций, может регулировать внутриклеточные ответы на физиологические стимулы и защищать клетки от опосредованной кальцием нейротоксичности [9]. КБ играет также важную роль в защите клеток от апоптоза [5].

В литературе имеются данные о возрастном снижении экспрессии КБ, что делает клетки более чувствительными к изменениям концентрации ионов кальция [6]. Однако результаты нашего исследования не подтверждают снижение содержания Са-связывающих белков в нейронах интрамуральных узлов метасимпатической нервной системы у старых животных.

Таким образом, в раннем постнатальном онтогенезе происходит увеличение доли КБ- и КР-иммунопозитивных нейронов в интрамуральных узлах кишки, что противоположно возрастным изменениям содержания Са-связывающих белков в чувствительных узлах спинномозговых нервов и симпатических узлах. Окончательное созрева-

ние нейронов интрамуральных узлов, содержащих различные типы Са-связывающих белков, завершается к концу 1-го месяца жизни. Возрастной инволюции КБ- и КР-иммунопозитивных нейронов межмышечного сплетения двенадцатиперстной кишки у старых крыс не отмечается.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант 14-15-00040.

ЛИТЕРАТУРА

1. Корзина М.Б., Коробкин А.А., Васильева О.А. и Маслюков П.М. Морфологические особенности звездчатого узла белой крысы. *Морфология*, 2010, т. 137, вып. 2, с. 23–26.
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.
3. Маслюков П.М., Ноздрачев А.Д. и Timmermans J.P. Возрастные особенности нейротрансмиттерного состава нейронов звездчатого узла. *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, 2006, т. 92, № 2, с. 214–221.
4. Andressen C., Blumcke I. and Celio M.R. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res.*, 1993, v. 271, p. 181–208.
5. Bellido T., Huening M., Raval-Pandya M. et al. Calbindin-D28k is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity. *J. Biol. Chem.*, 2000, v. 275, p. 26328–26332.
6. Chard P. S., Bleakman D., Christakos S. et al. Calcium buffering properties of calbindin-D28k and parvalbumin in rat sensory neurons. *J. Physiol.*, 1993, v. 472, p. 341–357.
7. Endo T. and Onaya T. Immunohistochemical localization of parvalbumin in rat and monkey autonomic ganglia. *J. Neurocytol.* 1988, v. 17, p. 73–77.
8. Franconville R., Revet G., Astorga G. et al. Somatic calcium level reports integrated spiking activity of cerebellar interneurons in vitro and in vivo. *J. Neurophysiol.*, 2011, v. 106, p. 1793–1805.
9. Lee D., Obukhov A.G., Shen Q. et al. Calbindin-D28k decreases L-type calcium channel activity and modulates intracellular calcium homeostasis in response to K⁺ depolarization in a rat beta cell line RINr1046–38. *Cell Calcium*, 2006, v. 39, p. 475–485.
10. Masliukov P.M. Sympathetic neurons of the cat stellate ganglion in postnatal ontogenesis: morphometric analysis. *Auton. Neurosci.*, 2001, v. 89, № 1–2, p. 48–53.
11. Masliukov P.M., Korobkin A.A., Nozdrachev A.D. and Timmermans J.P. Calbindin-D28k immunoreactivity in sympathetic ganglionic neurons during development. *Auton. Neurosci.*, 2012, v. 167, № 1–2, p. 27–33.
12. Mitsui R. Immunohistochemical analysis of substance P-containing neurons in rat small intestine. *Cell Tissue Res.*, 2011, v. 343, p. 331–341.
13. Sayegh A.I. and Ritter R.C. Morphology and distribution of nitric oxide synthase-, neurokinin-1 receptor-, calretinin-, calbindin-, and neurofilament-M-immunoreactive neurons in the myenteric and submucosal plexuses of the rat small intestine. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.*, 2003, v. 271, № 1, p. 209–216.

14. Schwaller B. The regulation of a cell's Ca(2+) signaling toolkit: the Ca (2+) homeostasome. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012, v. 740, p. 1–25.
15. Yano S., Tokumitsu H. and Soderling T.R. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature*, 1998, v. 396, p. 584–587.

Поступила в редакцию 21.05.2014
Получена после доработки 22.07.2014

AGE-RELATED PECULIARITIES OF THE NEURONS CONTAINING DIFFERENT TYPES OF CALCIUM-BINDING PROTEINS IN THE INTRAMURAL GANGLIA OF SMALL INTESTINE

*A.I. Yemanuilov, K. Yu. Moiseyev, I. V. Filippov
and P.M. Masliukov*

Immunohistochemical and morphometric methods were used to study the localization, relative content and the cross-sectional

area of calbindin (CB)- and calretinin (CR)-immunopositive neurons in the intramural ganglia of the myenteric plexus of duodenum in rats (n=37) in postnatal ontogenesis (Days 1, 10, 20, 30, 60, 1 and 2 years). CB - and CR-immunopositive neurons were detected in all the rats studied, from newborn to aged ones. The proportion of CR-immunopositive neurons was increased during the first 10 days of life, and then was not changed significantly, including the older animals. The proportion of CB-containing neurons increased, reaching a maximum value by Day 20, then declined insignificantly by Day 30 and was not significantly changing thereafter. The average size of CB- and CR-immunopositive neurons was significantly greater than the average cross-sectional area of immunoreactive neurons in all age groups.

Key words: *small intestine, intramural ganglia, calbindin, calretinin, ontogenesis*

Department of Normal Physiology with Biophysics, Department of Human Anatomy, Yaroslavl' State Medical Academy

© Коллектив авторов, 2014
УДК 612.014.46:611.018.8:612.65:599.323.4

К. Ю. Моисеев, В. В. Порсева, В. П. Смирнова, М. Б. Корзина и П. М. Маслюков

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ NO-СИНТАЗУ, ПРИ ХИМИЧЕСКОЙ ДЕАФФЕРЕНТАЦИИ КАПСАИЦИНОМ

Кафедра нормальной физиологии (зав. — проф. П. М. Маслюков), Ярославская государственная медицинская академия

У самок крыс линии Вистар (n=25) в возрасте 3, 10, 20, 30 и 60 сут, подвергнутых на 2-е сутки жизни химической деафферентации однократным введением капсаицина с использованием иммуногистохимических и морфометрических методов в каудальном узле блуждающего нерва (КУБН), чувствительных узлах спинномозговых нервов (ЧУСН) определяли локализацию, относительное содержание и морфометрические характеристики нейронов, экспрессирующих NO-синтазу (NOS). Контрольную группу составили крысы (n=25) соответствующего возраста. Результаты свидетельствуют, что в контрольной группе в ЧУСН доля NOS-иммунопозитивных нейронов увеличивалась в первые 10 сут жизни и уменьшалась между 30-ми и 60-ми сутками. В КУБН доля NOS-иммунопозитивных нейронов в онтогенезе значимо не менялась. У животных подопытной группы в ЧУСН и КУБН доля NOS-позитивных нейронов резко снижалась в первые 20 сут жизни. Более выраженное снижение числа NOS-содержащих нейронов отмечалось в ЧУСН по сравнению с таковым в КУБН. Полученные данные свидетельствуют о повреждающем действии капсаицина на NOS-позитивные нейроны, что подтверждает роль NO в механизмах ноцицепции.

Ключевые слова: *чувствительные узлы, оксид азота, онтогенез, иммуногистохимия*

Чувствительные ганглии содержат гетерогенную популяцию нейронов [2–5, 9], включающую 3 их группы: большие нейроны, малые, содержащие нейропептиды и малые, не содержащие нейропептидов. Пептид-содержащие нейроны иммунопозитивны к веществу P или родственному пептиду, связанному с кальцитониновым геном.

Малые не содержащие пептидов нейроны способны связывать изолектин B4 *Griffonia simplicifolia* (ИБ4) и могут участвовать в различных болевых синдромах, в том числе — посттравматическом [2, 9].

При изучении механизмов боли как в клинических, так и в экспериментальных исследованиях

Сведения об авторах:

Моисеев Константин Юрьевич, Смирнова Виктория Павловна, Корзина Марина Борисовна, Маслюков Петр Михайлович (e-mail: mpm@yma.ac.ru), кафедра нормальной физиологии; *Порсева Валентина Вячеславовна*, кафедра анатомии человека, Ярославская государственная медицинская академия, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5