

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 НО-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 Р или родственному пептиду, связанному с кальцитониновым геном.

Малые не содержащие пептидов нейроны способны связывать изолектин Б4 *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

на лабораторных животных широко используется капсаицин [3, 4, 10]. Нейрофизиологические и нейрохимические исследования конца 80–90-х годов показали, что капсаицин, взаимодействуя со специфическими рецепторами плазмолеммы, вызывает возбуждение, последующую десенситизацию и морфологическую деструкцию в большой группе первичных афферентных С-и отчасти А-гамма-волокон. Нейротоксическое действие капсаицина объясняется избыточным внутриклеточным накоплением Ca^{2+} и Na^+ , что ведет к гидратации, активации протеаз, накоплению токсинов, дегенерации и гибели клеток [9].

Установлено, что введение новорожденным крысам капсаицина вызывает гибель 20% клеток грудного узла спинномозгового нерва на 10-е сутки жизни. При этом гибнет популяция нейронов малых размеров, которые являются капсаицин-чувствительными, содержащими TRPV1-рецепторы. У более взрослых животных доля TRPV1-иммунопозитивных нейронов в узле также была меньше на 12–20% [3, 4, 6, 8].

К числу нейротрансмиттеров относятся также мелкие молекулы, в частности, оксид азота (NO). Нейроны, содержащие NO-синтазу (NOC), выявляются в чувствительных узлах у крысы, в частности в каудальном узле блуждающего нерва (КУБН), чувствительных узлах спинномозговых нервов (ЧУСН). В постнатальном онтогенезе доля NOC-позитивных нейронов изменяется. В первые 10 сут жизни в ЧУСН происходит увеличение доли NOC-позитивных нейронов с последующим ее снижением между 30-ми и 60-ми сутками. В КУБН в онтогенезе доля NOC-иммунопозитивных нейронов существенно не меняется [9].

Сведения о влиянии химической деафферентации на нейроны, содержащие NOC, в литературе отсутствуют. Поэтому целью настоящего исследования явилось определение локализации, относительного содержания и морфометрическая характеристика NOC-иммунопозитивных нейронов в ЧУСН и КУБН при химической деафферентации, вызванной капсаицином, в постнатальном онтогенезе.

Материал и методы. Исследование проведено на 50 белых крысах-самках линии Вистар в возрасте 3, 10, 20, 30 и 60 сут после рождения с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ №775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Животные были разделены на 2 группы: контрольную ($n=25$), подопытную ($n=25$). Крысам подопытной группы на 2-е сутки жизни проводили деафферентацию путем однократного подкожного введения капсаицина (N-vanillylonanamide, Sigma, США) в дозе 100 мг/кг в растворе, состоящем из 1 части 96% этилового спирта, 1 части Твин-80, 8 частей изотонического раствора NaCl. Эвтаназию животных осуществляли под уретановым наркозом (3 г/кг, внутривенно) путем транскардиальной

перфузии фосфатно-солевого буфера (PBS) с гепарином (5 ЕД/л), затем 4% раствора параформальдегида на 0,1M PBS. Для исследования брали чувствительные узлы второго грудного (ЧУСН T_{II}) и четвертого поясничного (ЧУСН L_{IV}) спинномозгового нерва, а также КУБН. Выделенные узлы помещали на 2 ч в указанный фиксатор, после чего промывали 3-кратно в PBS в течение 30 мин и оставляли в 30% растворе сахарозы на 24 ч. Из фиксированного материала на криостате готовили серии срезов толщиной 14 мкм.

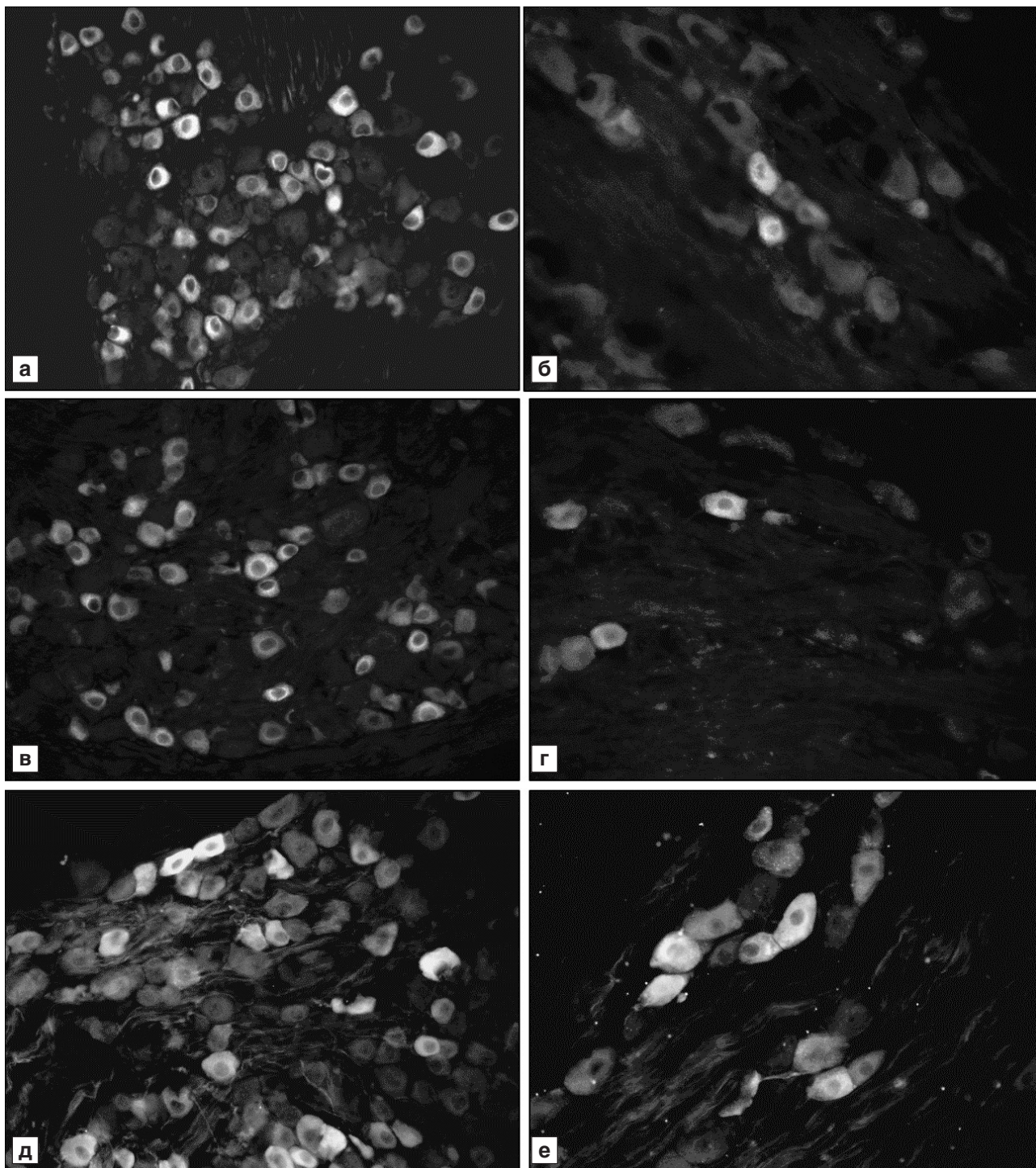
С целью выявления нейронов, содержащих NOC, применяли мечение антителами козы (Abscam, США) при разведении 1:300. Срезы преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% сыворотки, 1% тритон X-100, 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% тимерозола. Затем срезы инкубировали с первичными антителами в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременного промывания в PBS срезы инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флюоресцин-изотиоцианатом (FITS) дающим зеленую флюоресценцию (Jackson, США, разведение 1:100) в течение 2 ч.

Для расчета доли иммунопозитивных нейронов производили мечение всей нейронной популяции флюорохромом Neuro Trace Red (Molecular Probes, США) с красной флюоресценцией. После промывки в PBS срезы инкубировали в этом растворе в течение 20 мин (разведение 1:200). После этого срезы отмывали в PBS и заключали в среду для иммунофлюоресценции (VectaShield, Vector Laboratories, США).

Анализ препаратов проводили с помощью флюоресцентного микроскопа Olympus BX43 (Olympus, Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD-камерой Tucsен TCH 5.0 (Tucsен, Китай) с программным обеспечением ISCapture 3.6 (Tucsен, Китай). Для анализа размеров и относительного содержания иммунопозитивных нейронов брали 3 центральных среза каждого узла, сделанных с интервалом приблизительно 0,05 мм. При подсчете учитывали только нейроны с четко идентифицируемым ядром. Долю иммунопозитивных нейронов определяли как их отношение к общему числу нейронов на срезе, принятому за 100%. Площадь сечения нейронов определяли с использованием программы Image J (НИН, США). Для определения этого параметра в случайном порядке по методике, описанной Г.Г. Автандиловым [1], оценивали 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. В контрольной и подопытной группах у крыс всех исследованных возрастов NOC-позитивные нейроны выявлялись и в ЧУСН, и в КУБН (рисунк). У животных контрольной группы в ЧУСН доля NOC-иммунопозитивных нейронов увеличивалась в первые 10 сут жизни и уменьшалась между 30-ми и 60-ми сутками. В КУБН доля NOC-иммунопозитивных нейронов в онтогенезе значимо не менялась ($P>0,05$, табл. 1). В каждой возрастной группе доля NOC-иммунопозитивных нейронов в КУБН была значимо меньше,



Нейроны, содержащие NO-синтазу во втором грудном (T_{II}) чувствительном узле спинномозгового нерва (ЧУСН) (а, б), четвертом поясничном (L_{IV}) ЧУСН (в, г), каудальном узле блуждающего нерва (д, е) у 10-суточных (а, в, д) и 60-суточных (б, г, е) крыс при химической деафферентации капсаицином.

Иммуногистохимическая реакция с флюоресцен-изотиоцианатом. Об. 10, ок. 10

чем в ЧУСН. Значимые различия доли NOC-иммунопозитивных нейронов между ЧУСН T_{II} и L_{IV} в контрольной группе отсутствовали ($P > 0,05$).

У животных подопытной группы в ЧУСН и КУБН доля NOC-позитивных нейронов резко снижалась в первые 20 сут жизни (см. табл. 1). Значимых различий доли NOC-иммунопозитив-

ных нейронов в ЧУСН T_{II} и L_{IV} не отмечалось, за исключением 10-суточного возраста, когда доля иммунопозитивных нейронов была значимо больше в ЧУСН T_{II} ($P < 0,05$). Наиболее выраженное снижение числа NOC-содержащих нейронов отмечалось в ЧУСН по сравнению с КУБН. В КУБН к концу 2-го месяца жизни доля NOC-

Таблица 1

Относительное содержание NOC-иммунопозитивных нейронов в чувствительных узлах спинномозговых нервов (ЧУСН) и каудальных узлах блуждающего нерва (КУБН) у контрольных крыс и после введения капсаицина ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

Группа животных	Возраст (сут)	ЧУСН T _{II}	ЧУСН L _{IV}	КУБН
Контрольная	3	41,7±2,8	41±3	35,1±2,2**
	10	55,4±2,5*	54,6±2,1*	37,1±1,8**
	20	63±3*	60±3*	41,3±2,2**
	30	63±3*	60,6±2,1*	40,5±2,4**
	60	52,9±2,4*	50,9±2,4*	39,2±2,5**
Подопытная	3	42±3	40±4	32,7±1,8
	10	36,9±2,5*	26±3*	15,0±2,7*, **
	20	9,9±1,7*	10,1±2,5*	11,8±2,9*
	30	5,3±0,9*	9,8±1,6*	18±3*, **
	60	7,8±1,4*	11,9±1,6*	24±3*, **

* Различия значимы по сравнению с показателями у 3-суточных крысят при P<0,05; ** различия значимы по сравнению с ЧУСН T_{II} и L_{IV} при P<0,05.

Таблица 2

Площадь сечения NOC-иммунопозитивных (NOC⁺) и NOC-иммунонегативных (NOC⁻) нейронов в чувствительных узлах спинномозговых нервов (ЧУСН) и каудальных узлах блуждающего нерва (КУБН) у контрольных крыс и при химической деафферентации капсаицином ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, мкм²)

Группа животных	Возраст (сут)	ЧУСН T _{II}		ЧУСН L _{IV}		КУБН	
		NOC ⁺	NOC ⁻	NOC ⁺	NOC ⁻	NOC ⁺	NOC ⁻
Контрольная	3	239±13	261±11	245±16	238±12	227±6	222±6
	10	365±10*	448±15	329±6*	448±12	357±14	328±12
	20	381±14*	504±14	337±13*	564±34	421±24	381±11
	30	405±13*	520±21	382±12*	557±20	468±19	452±10
	60	469±10*	576±34	483±12*	541±12	502±19	485±10
Подопытная	3	239±13	261±11	245±16	238±12	227±6	222±6
	10	360±7*	450±16	354±12*	432±12	381±14*	324±6
	20	378±4*	523±14	442±34*	598±26	584±39	560±14
	30	561±16*	618±22	526±22*	743±27	550±33	533±18
	60	508±14*	553±20	489±31*	627±40	542±24*	531±16

* Различия достоверны по сравнению с NOC⁻ при P<0,05.

иммунопозитивных нейронов возрастала, тем не менее оставаясь значимо ниже, чем в группе контрольных животных (P<0,01) (см. табл. 1).

Средняя площадь сечения NOC-иммунопозитивных и негативных нейронов в онтогенезе возрастала во всех исследованных узлах с момента рождения до 2-го месяца жизни в контрольной группе и до 1-го месяца жизни в подопытной группе (табл. 2). При этом в обеих группах, начиная с 10-х суток жизни, средняя площадь сечения NOC-иммунопозитивных нейронов в ЧУСН становилась значимо меньше, чем NOC-иммунонегативных нейронов (P<0,05). Средняя площадь сечения NOC-позитивных и негативных нейронов в ЧУСН и КУБН у подопытных 30-суточных крыс была значимо выше, чем у контрольных крыс (P<0,05).

Обсуждение полученных данных. В результате проведенного исследования установлено, что в раннем постнатальном онтогенезе у контрольных крыс доля NOC-иммунопозитивных нейронов в ЧУСН изменяется и достигает максимума на 30-е сутки жизни, что согласуется с ранее проведенными исследованиями [9].

При химической деафферентации под влиянием капсаицина происходит значительное снижение доли NOC-позитивных нейронов в первые 20 сут жизни. Однако в КУБН после 20-х суток доля NOC-иммунопозитивных нейронов вновь возрастает, хотя и остается ниже, чем у животных контрольной группы. Возможно, что висцеральные афферентные нейроны КУБН более устойчивы к химической деафферентации, чем ЧУСН,

где имеется много соматических афферентных нейронов.

При химической деафферентации капсаицином на 30-е сутки жизни средняя площадь сечения NOC-позитивных и негативных нейронов у подопытных крыс становится значимо выше, чем у контрольных крыс. Это можно объяснить гибелью самых мелких нейронов, наиболее чувствительных к капсаицину [3, 4, 8], а также увеличением размеров нейронов при отеке вследствие токсического действия нейротоксина. К концу 2-го месяца жизни происходит восстановление размеров нейронов, и они вновь соответствуют морфометрическим показателям у контрольных крыс.

Имеются довольно противоречивые данные, свидетельствующие о проноцицептивном и антиноцицептивном действии NO в сенсорных нейронах [11]. Многочисленные данные свидетельствуют о роли NO в развитии сенситизации при воспалительной и нейропатической боли [7, 11]. NO может играть роль в процессах сенситизации за счет синтеза цГМФ и последующего фосфорилирования специфических мембранных белков, опосредованного через протеинкиназу C. NO также может активировать различные типы TRP-каналов, включая TRPC5, TRPV1, TRPV3, TRPV4 и TRPA1 [11, 12].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о повреждающем действии капсаицина на NOC-позитивные нейроны, что подтверждает роль NO в механизмах ноцицепции. В большей степени токсическому действию капсаицина подвержены NOC-иммунопозитивные нейроны ЧУСН, чем таковые КУБН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М., Медицина, 1990.
2. Маслюков П.М., Порсева В.В., Корзина М.Б. и Ноздрачев А.Д. Нейрохимические особенности сенсорных нейронов в онтогенезе. Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова, 2013, т. 99, № 7, с. 777–792.
3. Порсева В.В., Шилкин В.В., Корзина М.Б. и др. Изменение TRPV1-иммунореактивных нейронов чувствительных узлов спинномозговых нервов крысы под влиянием капсаицина. Морфология, 2011, т. 139, вып. 3, с. 41–45.
4. Порсева В.В., Стрелков А.А., Шилкин В.В. и Маслюков П.М. Возрастные изменения чувствительных нейронов, содержащих кальцитонин ген родственный пептид в условиях дефицита афферентации у крысы. Онтогенез, 2012, т. 43, № 6, с. 405–412.
5. Рагинов И.С. и Чельшев Ю.А. Посттравматическое выживание чувствительных нейронов различных субпопуляций. Морфология, 2003, т. 124, № 4, с. 47–50.
6. Gallaher Z.R., Larios R.M., Ryu V. et al. Recovery of viscerosensory innervation from the dorsal root ganglia of the adult rat following capsaicin-induced injury. J. Comp. Neurol., 2010, v. 518, № 17, p. 3529–3540.
7. Kallenborn-Gerhardt W., Schröder K., Geisslinger G. and Schmidtko A. NOXious signaling in pain processing. Pharmacol Ther. 2013, v. 137, p. 309–317.
8. Ma Q.P. Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats. J. Neurosci. Lett., 2002, v. 319, p. 87–90.
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, v. 256, p. 271–281.
10. Pecze L.1., Blum W. and Schwaller B. Mechanism of capsaicin receptor TRPV1-mediated toxicity in pain-sensing neurons focusing on the effects of Na(+)/Ca(2+) fluxes and the Ca(2+)-binding protein calretinin. Biochim Biophys Acta, 2013, v. 1833, № 7, p. 1680–1691.
11. Petho G. and Reeh P.W. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. Physiol. Rev., 2012, v. 92, p. 1699–1775.
12. Yoshida T., Inoue R., Morii T. et al. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. Nat. Chem. Biol., 2006, v. 2, p. 596–607.

Поступила в редакцию 21.05.2014

Получена после доработки 22.07.2014

AGE-RELATED CHANGES OF SENSORY NO SYNTHASE-CONTAINING NEURONS AFTER CHEMICAL DEAFFERENTATION BY CAPSAICIN

K. Yu. Moiseyev, V. V. Porseva, V. P. Smirnova,
M. B. Korzina and P. M. Masliukov

In male Wistar rats (n=25) aged 3, 10, 20, 30 and 60 days, subjected to chemical deafferentation by a single injection of capsaicin at postnatal Day 2, localization, relative content and morphometric characteristics of neurons expressing NO synthase (NOS) were studied in caudal ganglion of vagus nerve (CGVN) and sensory ganglia of spinal nerves (SGSN) using immunohistochemical and morphometric methods. The control group consisted of rats (n=25) of the appropriate age. The results suggest that in the control group the proportion of NOS-immunopositive neurons in SGSN increased during the first 10 days of life and decreased between Day 30 and Day 60. In CGVN, the proportion of NOS-immunopositive neurons did not change significantly during the ontogenesis. In animals of the experimental group, the proportion of NOS-positive neurons decreased rapidly during the first 20 days of life. More pronounced decrease in the number of NOS-containing neurons was observed in SGSN as compared to that one in CGVN. The data obtained indicate deleterious effects of capsaicin on NOS-positive neurons, which confirms the role of NO in the mechanisms of nociception.

Key words: sensory ganglia, nitric oxide, ontogenesis, immunohistochemistry

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