

В.В. Порсева¹, В.В. Шилкин¹, М.Б. Корзина², А.А. Коробкин² и П.М. Маслюков²

ВЕЩЕСТВО P-ИММУНОПОЗИТИВНЫЕ НЕЙРОНЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО УЗЛА СПИНОМОЗГОВОГО НЕРВА КРЫСЫ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

¹ Кафедра анатомии человека (зав. — проф. В.В. Шилкин), ² кафедра нормальной физиологии с биофизикой (зав. — проф. В.Н. Воловенко), Ярославская государственная медицинская академия Росздрава, e-mail: vvporseva@mail.ru; mpm@yuma.ac.ru

У крыс (n=30) в возрасте 10–90 сут иммуногистохимическим методом исследованы нейроны чувствительных узлов спинномозговых нервов, содержащие вещество P (BP). Результаты показали, что BP-иммунопозитивные нейроны в этих узлах присутствуют с момента рождения. С возрастом животного количество BP-содержащих нейронов уменьшается до 10-х суток жизни. BP-иммунопозитивные нейроны были представлены клетками очень малых и малых размеров.

Ключевые слова: нейроны, спинномозговые узлы, вещество P, иммуногистохимия, онтогенез

В нейрофизиологических механизмах боли участвуют периферические, сегментарные и надсегментарные структуры. С восприятием боли связаны ряд пептидов и их рецепторов, которые локализованы в различных структурах нервной системы [2, 4, 6]. Наряду с широко известными данными о нейрохимических механизмах активации ноцицепторов, до настоящего времени отсутствуют сведения об особенностях клеточного состава и морфологической характеристике популяции вещества P (BP)-содержащих чувствительных нейронов в постнатальном онтогенезе.

Целью исследования явилось изучение морфометрических характеристик BP-иммунопозитивных нейронов чувствительных узлов спинномозговых нервов в постнатальном онтогенезе крысы.

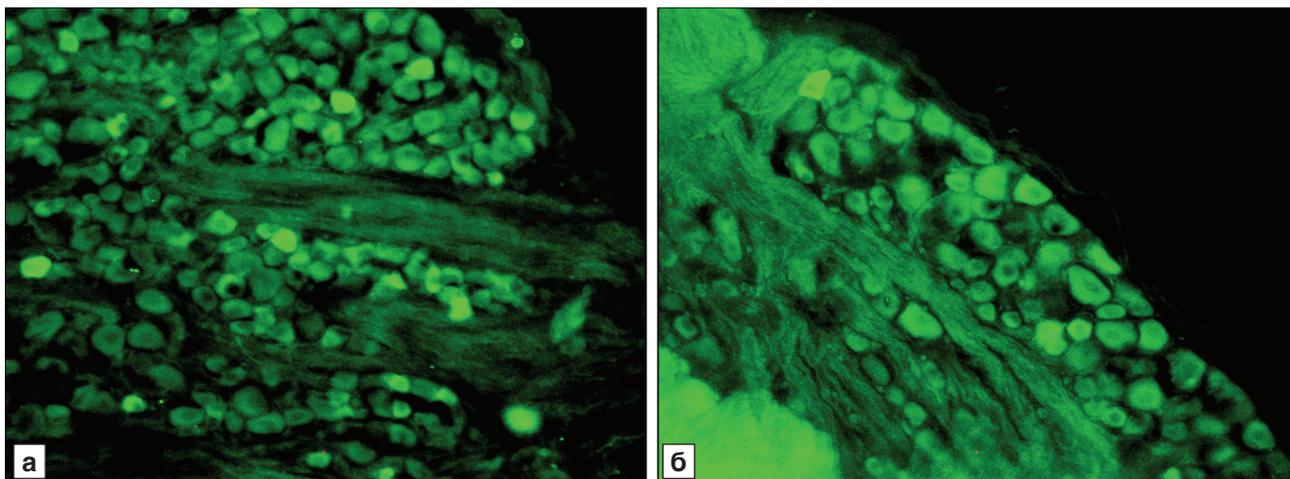
Материал и методы. Исследование проведено на 30 белых крысах-самках линии Вистар в возрасте 3, 10, 20, 30, 60 и 90 сут после рождения с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Эвтаназию животных осуществляли под уретановым наркозом (3 г/кг внутривенно). Изучали нейроны чувствительного узла второго грудного спинномозгового нерва. Выявление нейронов, содержащих BP, проводили при помощи меченых антител (Abscam, США, разведение 1:1000) по ранее описанной методике [1, 5]. Вторичные антитела были конъюгированы с флюорохромом — флюоресцеин-изотиоцианатом — FITS (Jackson, США), дающим зеленую флюоресценцию. Для расчета доли иммунопозитивных нейронов, кроме меток BP, использовали мечение всей нейронной популяции при помощи флюорохрома Neuro Trace (Molecular Probes, США) с красной флюоресценцией.

Анализ препаратов проводили с помощью флюоресцентного микроскопа Микмед 2, вариант 12 (ЛОМО, Россия) с

соответствующим набором светофильтров и CCD-камеры MDC320 (ScoreTec, Китай). На оцифрованных изображениях гистологических препаратов узлов при увеличении 200 с использованием программы Image J (NIH, США, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) оценивали площадь сечения тел нервных клеток и подсчитывали клетки на площади квадрата 100 мкм² с помощью квадратно-сетчатой вставки. Долю иммунопозитивных нейронов определяли как их отношение к общему числу нейронов, которое принимали за 100%. Для характеристики нейронов узлов по площади сечения использовали 5 размерных классов: до 300 мкм² (очень малые), 301–600 мкм² (малые), 601–900 мкм² (средние), 901–1200 мкм² (крупные), 1201–1500 мкм² (очень крупные). Анализу подлежали нейроны, срез которых прошел через ядро с ядрышком. Статистический анализ включал определение средней арифметической и ее стандартной ошибки. О значимости различий судили по величине t-критерия Стьюдента и считали их значимыми при P<0,05.

Результаты исследования. В чувствительных узлах BP-иммунопозитивные нейроны выявлялись у крыс всех исследуемых групп (рисунок). С возрастом животного количество BP-содержащих нейронов уменьшалось: к 10-м суткам оно снизилось в 1,5 раза и не менялось до конца наблюдения (таблица). Площадь сечения нейронов, содержащих BP, за весь период наблюдения увеличилась в 1,3 раза и достигла максимальных значений в 60-суточном возрасте крысы, в последующем незначительно снижаясь в 90-суточном возрасте (см. таблицу).

Анализ клеточного состава иммунопозитивных нейронов показал, что во всех исследованных возрастных группах крыс эти нейроны принадлежали только к двум размерным классам: очень малым и малым (см. таблицу). При этом в 3- и 10-суточном, в 20- и 30-суточном возрасте в попу-



Вещество Р-иммунопозитивные нейроны чувствительного узла второго грудного спинномозгового нерва крысы в возрасте 3 сут (а) и 10 сут (б).

Иммуногистохимическая реакция. Об. 20, ок. 7.

Морфометрические характеристики вещества Р-иммунопозитивных нейронов ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Возраст крыс (сутки)	Доля нейронов в узле (%)	Площадь сечения (мкм ²)	Доля нейронов разных размерных классов (%)	
			до 300 мкм ²	301–600 мкм ²
3-и	9,5±0,8	217±7	88,4±0,6	12,6±0,6
10-е	6,4±0,4*	218±9	82±4	18±4
20-е	6,1±0,4*	225±9	77,5±0,4	22,5±0,4
30-е	5,11±0,24*	256±9*	73,3±0,6	26,7±0,6
60-е	6,7±0,4*	304±9*	52,4±0,7	47,6±0,7
90-е	6,5±0,4*	281±8*	64,2±0,5	35,8±0,5

* Различия значимы по сравнению с показателями у 3-суточных крыс при $P < 0,05$.

ляции иммунопозитивных нейронов преобладали клетки очень малых размеров — более 80 и 70% соответственно. В 60-суточном возрасте количество клеток очень малых размеров снизилось и в 90-суточном возрасте вновь повысилось и стало более 60% (см. таблицу).

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенного исследования показали, что лишь небольшая часть (менее 10%) нейронов чувствительного узла грудного спинномозгового нерва у крыс разного возраста содержит ВР, что соответствует данным других исследований, полученных на взрослых животных [3]. ВР-иммунопозитивные нейроны в чувствительных узлах отличались по своим морфологическим характеристикам и были представлены нейронами очень малых и малых размеров. С возрастом у крыс площадь сечения ВР-иммунопозитивных нейронов увеличивалась, однако количество нейронов малых размеров оставалось высоким (более 50%) в течение всего наблюдения.

Таким образом, популяция нейронов в чувствительных узлах спинномозговых нервов уже к моменту рождения являлась неоднородной по размерам и иммуногистохимическим характеристикам. Очевидно, часть ноцицептивной системы, включающая ВР-иммунореактивные структуры, у крыс к моменту рождения функционирует. Окончательное становление этой системы приходится на 10-е сутки жизни.

Работа поддержана грантами Президента РФ для поддержки молодых ученых; ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маслюков П.М., Корзина М.Б., Емануйлов А.И. и Шилкин В.В. Нейромедиаторный состав нейронов краниального шейного и чревного симпатических узлов в постнатальном онтогенезе. Морфология, 2009, т. 135, вып. 1, с. 30–34.
2. Elfvin L.-G. and Dalsgaard C.-J. Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in afferent fibers of the inferior mesen-

- teric ganglion of the guinea-pig. Identification of the cells of origin in dorsal root ganglia. *Brain Res.*, 1977, v. 126, № 1, p. 149–153.
3. Helke C.J. and Niederer A.J. Studies on the coexistence of substance P with other putative transmitters in the nodose and petrosal ganglia. *Synapse*, 1990, v. 5, № 2, p. 144–151.
4. Ivanusic J.J. Size, neurochemistry, and segmental distribution of sensory neurons innervating the rat tibia. *J. Comp. Neurol.*, 2009, v. 517, p. 276–283.
5. Korzina M.B., Emanuilov A.I., Novakovskaya S.A. et al. Development of rat stellate ganglion neurons containing membrane-bound muscarinic receptors and purinoreceptors. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2010, v. 40, p. 91–95.
6. Snider W.D. and McMahon S.B. Tackling pain at the source: new insights into nociceptors. *Neuron*, 1998, v. 20, p. 629–632.

Поступила в редакцию 27.05.2011

SUBSTANCE P-IMMUNOPosITIVE NEURONS IN RAT SENSORY GANGLION OF THE SPINAL NERVE IN POSTNATAL DEVELOPMENT

V.V. Porseva, V.V. Shilkin, M.B. Korzina, A.A. Korobkin and P.M. Masliukov

Afferent neurons containing substance P (SP) were studied immunohistochemically in the sensory ganglion of the spinal nerve in 30 rats aged 10–90 days. The results obtained indicated that SP-immunoreactive neurons are present in these ganglia from the moment of birth. During the development, the percentage of SP-containing neurons decreased till day 10. SP-immunoreactive neurons were represented by the cells of very small or small size.

Key words: *neurons, sensory ganglion of the spinal nerve, immunohistochemistry, substance P, ontogenesis*

Department of Human Anatomy, Yaroslavl State Medical Academy

© Коллектив авторов, 2011
УДК 611.899.018.8-053:599.323.4

П.М. Маслюков¹, А.А. Коробкин¹, В.В. Коновалов¹, В.В. Порсева² и А.И. Емануйлов²

ВОЗРАСТНОЕ РАЗВИТИЕ КАЛЬБИДИН-ИММУНОПОЗИТИВНЫХ НЕЙРОНОВ СИМПАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ КРЫСЫ

¹ Кафедра нормальной физиологии с биофизикой (зав. — проф. В.Н. Воловенко), ² кафедра анатомии человека (зав. — проф. В.В. Шилкин), Ярославская государственная медицинская академия, e-mail: mpm@yma.ac.ru

Нейроны краниального шейного, звездчатого и чревного симпатических узлов крыс (n=60) в возрасте 3–90 сут, содержащие кальбиндин (КБ), исследовали иммуногистохимическим методом. Результаты показали, что наибольшая доля КБ-иммунопозитивных нейронов содержится в звездчатом узле. Доля КБ-содержащих нейронов в пара- и превертебральных симпатических узлах с возрастом снижается. Окончательное формирование группы КБ-иммунопозитивных нейронов симпатических узлов происходит к концу 1-го месяца жизни.

Ключевые слова: *нейроны, симпатические узлы, кальбиндин, иммуногистохимия, онтогенез*

Ионы кальция являются одними из универсальных регуляторов многочисленных процессов, происходящих в клетке. Существуют специальные системы, обеспечивающие поддержание низкой концентрации кальция в цитоплазме, в том числе кальций-связывающие белки: кальбиндин (КБ) массой 28 килодальтон и кальретицин, обнаруженные в нейронах [1]. В симпатических узлах у взрослых крыс наибольшая доля КБ-иммунопозитивных нейронов отмечена в краниальном шейном (КШУ) и звездчатом узлах (ЗУ). В чревных узлах (ЧУ) доля КБ-иммунопозитивных нейронов значительно ниже [4].

В нервной системе в онтогенезе относительное содержание различных типов кальций-связывающих белков меняется. По последним данным, в частности, уменьшается доля нейронов, содержащих КБ. Доля кальретицин-иммунореактивных нейронов остается неизменной [3]. Однако особенности возрастного развития кальций-регулирующих систем в нейронах автономной нервной системы, особенно нейронов симпатических узлов, малоизучены. Поэтому целью настоящего исследования явилось определение локализации и морфометрических характеристик КБ-иммунопозитивных нейронов в постнатальном онтогенезе крысы.