

- 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

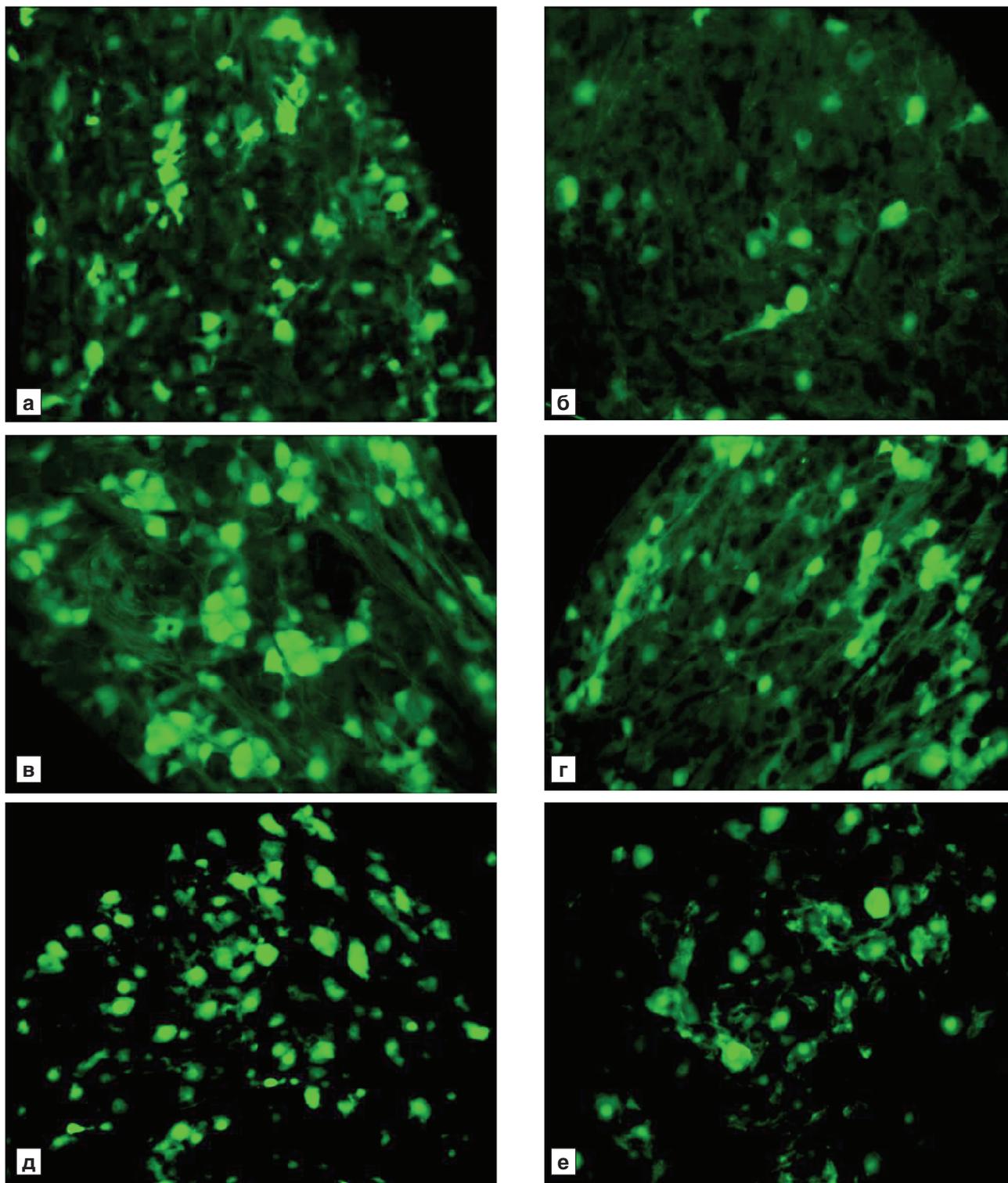
¹ Кафедра нормальной физиологии с биофизикой (зав. — проф. В.Н. Воловенко), ² кафедра анатомии человека (зав. — проф. В.В. Шилкин), Ярославская государственная медицинская академия, e-mail: mpm@uma.ac.ru

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.



Кальбиндин-иммунопозитивные нейроны в симпатических узлах крыс в возрасте 10 (а, в, д) и 30 сут (б, г, е).

а, б — краниальный шейный узел; в, г — звездчатый узел; д, е — чревный узел. Иммуногистохимическая реакция. Об. 20, ок. 7.

Материал и методы. Исследование проведено на 60 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). Исследованию подвергали КШУ, ЗУ и ЧУ.

Выявление нейронов, содержащих КБ, проводили при помощи меченых антител (Abcam, США, разведение 1:500) по ранее описанной методике [2, 5]. Вторичные антитела были конъюгированы с флюорохромом — флюоресцеин-изотиоцианатом (FITS) (Jackson, США), дающим зеленую флюоресценцию. Для определения доли иммунопозитивных нейронов, кроме использования меток отдельного нейропеп-

Таблица 1

Доля кальбиндин-иммунопозитивных нейронов в симпатических узлах у крыс разного возраста ($\bar{x} \pm s_x$)

| Возраст | Краниальный шейный узел | Звездчатый узел | Чревный узел |
|---------------|-------------------------|-----------------|--------------|
| Новорожденные | 28±4 | 36±4 | 21,1±1,4* |
| 10 сут | 24,6±2,6 | 42±3 | 33,6±2,2 |
| 20 сут | 17,1±2,2* | 33,3±2,9* | 15,6±2,5* |
| 1 мес | 11,8±1,8* | 30±3* | 13,5±2,3* |
| 2 мес | 9,9±2,4* | 27±3* | 11,4±2,3* |
| 6 мес | 10,5±1,8* | 27,1±2,6* | 11,7±2,6* |

* Различия значимы по сравнению с показателями у 10-суточных крыс при $P < 0,05$.

Таблица 2

Площадь сечения тел кальбиндин-иммунопозитивных (КБ+) и КБ-иммунонегативных (КБ-) нейронов в симпатических узлах у крыс в онтогенезе ($\bar{x} \pm s_x$, мкм)

| Возраст | Краниальный шейный узел | | Звездчатый узел | | Чревный узел | |
|---------------|-------------------------|--------|-----------------|--------|--------------|--------|
| | КБ+ | КБ- | КБ+ | КБ- | КБ+ | КБ- |
| Новорожденные | 78±3* | 170±6 | 201±7 | 225±7 | 160±7 | 186±7 |
| 10 сут | 157±6* | 272±10 | 327±13* | 279±9 | 399±12* | 287±8 |
| 20 сут | 311±14 | 324±14 | 385±11* | 329±8 | 421±24 | 341±11 |
| 1 мес | 375±13 | 365±15 | 422±14* | 368±10 | 506±9* | 401±11 |
| 2 мес | 472±19 | 488±26 | 483±12 | 441±12 | 522±19* | 475±10 |
| 6 мес | 495±23 | 518±26 | 526±28 | 488±16 | 598±16* | 537±12 |

* Различия значимы по сравнению с КБ-нейронами при $P < 0,05$.

тида, производили 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 ССD-камеры MDC320 (ScoreТес, Китай). На оцифрованных изображениях гистологических препаратов узлов при увеличении 200 с использованием программы Image J (НИН, США, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) оценивали площадь сечения тел нейронов и производили их подсчет на площади квадрата 100 мкм² с помощью квадратно-сетчатой вставки. Долю иммунопозитивных нейронов определяли как отношение их количества к общему числу нейронов, которое принимали за 100%. 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 КШУ наибольшая доля КБ-иммунопозитивных нейронов — в первые 10 сут жизни, затем она снижается до конца 2-го месяца жизни (рисунок; табл. 1). В дальнейшем доля КБ-содержащих нейронов значимо не меняется. В ЗУ и ЧУ доля КБ-иммунореактивных нейронов увеличивается с момента рождения до 10-х суток жизни, затем уменьшается к концу 1-го месяца и далее остается постоянной.

Площадь сечения КБ-иммунореактивных нейронов у новорожденных в КШУ значимо

ниже, а у 10-суточных крысят во всех исследованных симпатических узлах значимо выше, чем КБ-иммунонегативных нейронов (табл. 2, $P < 0,05$). В КШУ и ЗУ площадь сечения тел КБ-иммунореактивных нейронов во всех возрастных группах, за исключением 20-суточных животных, значимо ниже, чем в ЧУ ($P < 0,05$).

Обсуждение полученных данных. Таким образом, во всех симпатических узлах крыс с возрастом доля КБ-иммунореактивных нейронов снижается. Вероятно, это связано с важной ролью кальция при возрастных и стресс-индуцированных изменениях нервной системы. В ходе развития при участии ионов кальция происходит регуляция роста нейронов и морфологической пластичности, в частности, конуса роста и развития дендритов [6, 7]. Очевидно, КБ особенно важен на ранних этапах постнатального развития нервной системы, и впоследствии его роль, по-видимому, уменьшается.

Работа поддержана РФФИ (грант 10-04-00509), грантами Президента РФ для поддержки молодых ученых; ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев Н.Б. Внутриклеточные Са-связывающие белки. Ч 1. Классификация и структура. Соревский образовательный журн., 1998, № 5, с. 2–9.

2. 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.
3. Choi J.H., Lee C.H., Yoo K.Y. et al. Age-related changes in calbindin-D28k, parvalbumin, and calretinin immunoreactivity in the dog main olfactory bulb. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2010, v. 30, p. 1–12.
4. Grkovic I. and Anderson C.R. Calbindin D28K-immunoreactivity identifies distinct subpopulations of sympathetic pre- and post-ganglionic neurons in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 1997, v. 386, p. 245–259.
5. Maslyukov P.M., Korzina M.B., Emanuilov A.I. and Shilkin V.V. Neurotransmitter composition of neurons in the cranial cervical and celiac sympathetic ganglia in postnatal ontogenesis. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 2010, v. 40, p. 143–147.
6. Simons M.J. and Pellionisz A.J. Genomics, morphogenesis and biophysics: triangulation of Purkinje cell development. *Cerebellum*, 2006, v. 5, p. 27–35.
7. 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 27.05.2011

AGE-RELATED DEVELOPMENT OF CALBINDIN-IMMUNOPosITIVE NEURONS OF RAT SYMPATHETIC GANGLIA

*P.M. Maslyukov, A.A. Korobkin, V.V. Konovalov,
V.V. Porseva and A.I. Yemanuilov*

Neurons of cranial cervical, stellate and celiac sympathetic ganglia containing calbindin (CALB) were studied in rats (n=60) aged 3–90 days using immunohistochemical method. The results obtained indicate that the largest population of CALB-immunopositive neurons was located in the stellate ganglion. The proportion of CALB-containing neurons in sympathetic para- and prevertebral ganglia decreased during the development. Final formation of CALB-immunopositive group of neurons was observed by the end of the first month of life.

Key words: *neurons, sympathetic ganglia, calbindin, immunohistochemistry, ontogenesis*

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