

mediocortical amygdala in female rats. *Endokrinologie*, 1977, Bd. 69, № 2, S. 262–265.

11. Dominguez J.M., Riolo J.V., Xu Z. and Hull E.M. Regulation by the medial amygdala of copulation and medial preoptic dopamine release. *J. Neurosci.*, 2001, v. 21, № 1, p. 349–355.
12. Gulino M. and Etgen A.M. Sexually dimorphic hormonal regulation of the gap junction protein, CX43, in rats and altered female reproductive function in CX43<sup>+/–</sup> mice. *Brain Res.*, 2005, v. 1045, № 1–2, p. 107–115.
13. Hosokawa N. and Chiba A. Effects of sexual experience on conspecific odor preference and male odor-induced activation of the vomeronasal projection pathway and the nucleus accumbens in female rats. *Brain Res.*, 2007, v. 1066, № 1–2, p. 101–108.
14. Rakic S. and Zecevic N. Programmed cell death in developing human telencephalon. *Eur. J. Neurosci.*, 2000, v. 12, p. 2721–2734.
15. Salazar I., Sanchez-Quintero P., Cifuentes J.M. and Fernandez de Troconiz P. General organization of the perinatal and adult accessory olfactory bulb in mice. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.*, 2006, v. 288, № 9, p. 1009–1025.

Поступила в редакцию 09.02.08

## RAT PALEOAMYGDALA MORPHOGENESIS IN THE EARLY JUVENILE PERIOD

*A.V. Akhmedeyev and L.B. Kalimullina*

To characterize the structural remodeling of paleoamygdala during the early juvenile period, the studies were performed in 40 male and female Wistar rats on 21, 24, 28 and 31 postnatal days. Serial frontal brain sections stained with Nissl's cresyl violet were used to study the cytoarchitectonics of paleoamygdala (dorsomedial – Med, posterior medial – Mep and posterior cortical nuclei – Cop), as well as the dynamics of the formation of these structures, by means of the registration of planimetry characteristics, counting the number of neurons and glial cells, calculation of glial and apoptotic indexes. The results obtained suggest the heterochronism of the morphogenesis and gender-dependent differences in the differentiation of paleoamygdala structures. By day 21 (the beginning of early juvenile period), only Med appeared to be differentiated, while Mep became recognizable by day 24, and Cop acquired the characteristic cytoarchitectonics only by day 31 (the beginning of late juvenile period). Significant gender-associated structural differences were found in Med since day 28, and in Cop and Mep – on day 31.

**Keywords:** *paleoamygdala, morphogenesis, sexual dimorphism, rat.*

Department of Human and Animal Morphology and Physiology, Bashkir State University, Ufa.

© Коллектив авторов, 2008  
УДК 611.018.8-053:599.323.4

*М.Б. Корзина, А.И. Емануилов, С.А. Новаковская, Л.И. Арчакова и П.М. Маслюков*

## РАЗВИТИЕ НЕЙРОНОВ ЗВЕЗДЧАТОГО УЗЛА КРЫС, СОДЕРЖАЩИХ МЕМБРАННЫЕ МУСКАРИНОВЫЕ И ПУРИНОРЕЦЕПТОРЫ

Кафедра нормальной физиологии с курсом биофизики (зав. — проф. В.Н. Воловенко) и кафедра анатомии человека (зав. — проф. В.В. Шилкин) Ярославской государственной медицинской академии, Центр электронной и световой микроскопии (зав. — С.А. Новаковская) Института физиологии НАН Беларуси, г. Минск

Цель работы — исследование локализации и морфометрических характеристик нейронов звездчатого узла (ЗУ), содержащих мускариновые холино- и пуринорецепторы у крыс разного возраста (новорожденных, 10-, 20-, 30-, 60-, 180-суточных) с использованием иммуногистохимических методов. Результаты исследования показали, что у всех исследованных животных большинство нейронов являются иммунореактивными к M1-холинорецепторам, P2X2- и P2X6-пуринорецепторам с момента рождения. На срезах выявлены единичные нейроны, содержащие P2X3-пуринорецепторы, количество которых увеличивается с 10-х суток жизни к 20-суточному возрасту, а затем вновь уменьшается. В онтогенезе доля нейронов, экспрессирующих M1-холинорецепторы, P2X2- и P2X6-пуринорецепторы, значительно не меняется. Таким образом, к моменту рождения мускариновая синаптическая передача в ЗУ у крыс уже существует, а окончательный набор пуринорецепторов на нейронах симпатического узла формируется к 30-суточному возрасту.

**Ключевые слова:** *звездчатый узел, нейроны, рецепторы, иммуногистохимия, постнатальное развитие.*

При исследовании синаптической передачи в симпатических узлах взрослых млекопитающих было установлено, что ацетилхолин активирует никотиновые и мускариновые мембранные рецепторы, тем самым, вызывая быстрый и медленный возбуждающий постсинаптический потенциал [7, 8]. Среди мускариновых рецепторов, экспрессирующихся на симпатических нейронах, выде-

лены типы M1 и M2 [17]. Также была доказана роль пуринорецепторов в синаптической передаче в симпатических узлах, где в качестве медиатора выступает аденозинтрифосфорная кислота (АТФ). АТФ при этом воздействует на P2X- и P2Y-рецепторы, которые, в свою очередь, подразделяются на ряд подтипов [5, 6].

В симпатических узлах взрослой крысы большинство нейронов содержат рецепторы P2X2- и P2X6- типа. Рецепторы P2X3 обнаружены в большом числе нейронов чувствительных ганглиев и единичных клетках верхнего шейного и чревного узла [9, 15].

В то же время данные о развитии синаптической передачи в симпатических узлах являются противоречивыми. Есть сведения, что холинорецепторы на симпатических ганглионарных нейронах существуют к моменту рождения [2], однако состав их субъединиц в этом возрасте остается неясным. Доля чувствительных нейронов, содержащих P2X3-рецепторы, меняется в пре- и постнатальном онтогенезе [15].

В наших предыдущих работах, выполненных на звездчатом узле (ЗУ) грызунов, установлено, что в постнатальном онтогенезе происходит перестройка медиаторного состава его нейронов [3, 13].

В связи с этим, целью данной работы являлось исследование локализации и морфометрических характеристик нейронов ЗУ, содержащих M1-холино- и пуринорецепторы типа P2X2, P2X3 и P2X6 у крыс в процессе постнатального развития.

**Материал и методы.** Работа выполнена на новорожденных, 10-, 20-, 30-, 60-, 180-суточных крысах (по 5 в каждой возрастной группе). После введения летальной дозы пентобарбитала натрия (Nembutal®, 300 мг/кг, внутривенно) животных перфузировали транскардиально изотоническим раствором хлорида натрия с гепарином, а затем фиксирующей смесью 4% параформальдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4). После перфузии ЗУ извлекали с каждой стороны и помещали в ту же фиксирующую смесь, которой производили перфузию, на 1–2 ч. Серии срезов толщиной 12 мкм изготавливали с помощью криостата.

Рецепторный состав клеток ЗУ исследовали иммуногистохимическим методом с использованием двойного мечения. При этом применяли первичные антитела к M1-холинорецепторам и пуринорецепторам типов P2X2, P2X3 и P2X6 фирмы Chemicon (США, табл. 1).

Определение общего количества нейронов в узле проводили с использованием антител к ядрам нейронов (АЯН) (Chemicon, США). Срезы преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в фосфатно-солевом буфере (PBS) с добавлением 10% сыворотки, 1% тритона X-100, 0,1% бычьего сывороточного альбумина. Затем срезы инкубировали с первичными антителами в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом — флюоросцеин-изотиоцианатом (FITC) или CY3 (Jackson Immuno Research Lab., США) в течение 2 ч. С целью контроля, для исключения неспецифической реакции, часть срезов инкубировали без первичных антител.

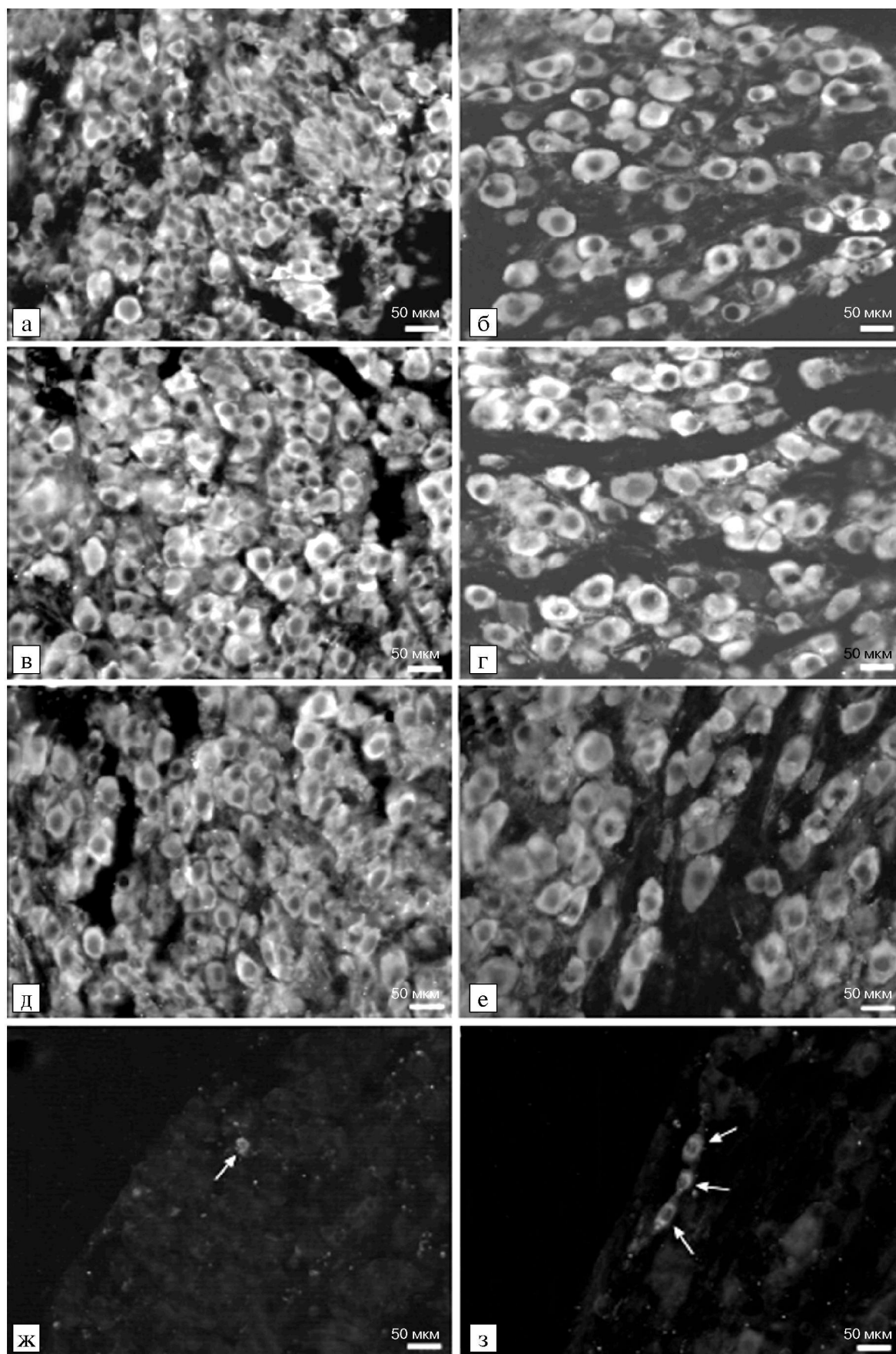
Дальнейший анализ препаратов проводили при помощи флюоресцентного микроскопа ЛОМО Микмед 2, вариант 12, снабженного соответствующим набором светофильтров, и цифровой фотокамеры. Для анализа размеров и процентного соотношения иммунопозитивных нейронов брали три центральных среза в каждом узле с интервалом приблизительно 0,05 мм. При подсчете оценивали только нейроны с четко идентифицированным ядром. Долю иммунореактивных нейронов рассчитывали как отношение нейронов, иммунореактивных к данному маркеру, к общему числу нейронов на срезе (иммунопозитивных к АЯН). Площадь сечения нейронов определяли с использованием некоммерческой программы ImageJ. Для определения этого параметра в случайном порядке по методике, описанной Г.Г. Автандиловым [1], брали 100 нейронов, иммунопозитивных к каждому из исследованных маркеров в каждой возрастной группе. Статистическая обработка включала определение для каждого показателя среднего значения и его стандартной ошибки. Для оценки значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считали значимыми при  $P < 0,05$ .

**Результаты исследования.** При исследовании нейронов, иммунореактивных к различным маркерам, установлено, что значимых различий их распределения и морфометрических характеристик с правой и левой стороны в ЗУ нет ( $P > 0,05$ ). У всех исследованных животных подавляющее большинство нейронов (свыше 98%) являются иммунореактивными к M1-холинорецепторам, P2X2- и P2X6-пуринорецепторам

Таблица 1

Первичные и вторичные антитела

| Антитела                             | Животное | Разведение | Фирма-производитель               |
|--------------------------------------|----------|------------|-----------------------------------|
| <b>Первичные:</b>                    |          |            |                                   |
| NeuN                                 | Мышь     | 1:200      | Chemicon, США                     |
| P2X2                                 | Кролик   | 1:100      | Chemicon, США                     |
| P2X3                                 | Кролик   | 1:100      | Chemicon, США                     |
| P2X6                                 | Кролик   | 1:100      | Chemicon, США                     |
| M1                                   | Кролик   | 1:100      | Chemicon, США                     |
| <b>Вторичные:</b>                    |          |            |                                   |
| Анти-мышь IgG CY3-конъюгированные    | Осел     | 1:200      | Jackson Immuno Research Lab., США |
| Анти-кролик IgG FITC-конъюгированные | Осел     | 1:150      | Jackson Immuno Research Lab., США |



P2X2- (а, б), P2X6- (в, г), M1- (д, е), P2X3- (ж, з) иммунопозитивные нейроны в звездчатом узле новорожденных (а), 10- (в, д, ж) и 30-суточных (б, г, е, з) крысят.

Стрелки — нейроны, содержащие P2X3-рецепторы.

Таблица 2

**Площадь сечения иммунореактивных нейронов в звездчатом узле у крыс разного возраста ( $\bar{x} \pm s_x$ , мкм<sup>2</sup>)**

| Возраст крыс  | Иммунореактивные нейроны |         |        |        |
|---------------|--------------------------|---------|--------|--------|
|               | P2X2                     | P2X3    | P2X6   | M1     |
| Новорожденные | 212±14                   | 90±25*  | 207±8  | 195±12 |
| 10 сут        | 341±16                   | 149±33* | 316±14 | 324±9  |
| 20 сут        | 364±20                   | 196±37* | 367±12 | 364±14 |
| 30 сут        | 386±18                   | 245±26* | 406±17 | 398±18 |
| 60 сут        | 530±19                   | 298±44* | 518±10 | 541±17 |
| 180 сут       | 678±20                   | 367±38* | 628±18 | 617±22 |

Примечание. n=200 для каждой возрастной группы.

\* Различия значимы по сравнению со значениями площади сечения P2X2-, P2X6-, M1-иммунореактивных нейронов в данной возрастной группе при  $P < 0,05$ .

с момента рождения (рисунок). Статистически значимых различий относительного содержания нейронов, имеющих указанные рецепторы в каждой возрастной группе, обнаружено не было ( $P > 0,05$ ).

Были выявлены единичные нейроны, содержащие P2X3-рецепторы, количество которых очень мало у новорожденных и у 10-суточных крысят ( $3 \pm 1$ ). Затем доля P2X3-иммунореактивных нейронов увеличивалась и достигала максимума к 20-суточному возрасту ( $12 \pm 5$ ), после чего снижалась до  $4 \pm 1$  у 30-суточных животных и далее не менялась. Число P2X3-иммунореактивных клеток в ЗУ 2-хмесячных крысят равнялось  $4 \pm 2$ , у 6-месячных —  $3 \pm 1$ . Различия этого показателя у 20-суточных животных и остальных возрастных групп статистически значимы ( $P < 0,05$ ).

Средние значения площади сечения нейронов увеличивались с возрастом животных (табл. 2).

Нейроны, содержащие M1-холинорецепторы, P2X2- и P2X6-пуринорецепторы, по данному параметру не различались. Площадь сечения P2X3-иммунореактивных нейронов была значимо меньше, чем у нейронов, содержащих M1-, P2X2- и P2X6-рецепторы ( $P < 0,01$ ).

В контрольных срезах не наблюдалось иммунореактивных нейронов. Это свидетельствует о специфичности реакции с использованными антителами.

**Обсуждение полученных данных.** Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что большинство нейронов ЗУ к моменту рождения содержат M1-холинорецепторы, P2X2- и P2X6-пуринорецепторы. Это согласуется с данными, полученными на взрослых животных [16]. В дальнейшем с возрастом относительное содержание таких нейронов не изменяется.

Доля P2X3-иммунореактивных нейронов очень мала у животных всех возрастных групп. Этот тип рецепторов характерен для нейронов чувствительных узлов [15]. По нашим наблюдениям, наибольшее число нейронов, содержащих P2X3-рецепторы, наблюдается в 20-суточном возрасте. Сходный паттерн (увеличение относительного содержания меченых клеток между 10 и 20-ми сутками жизни) был продемонстрирован ранее при исследовании связей нейронов ЗУ с органами-мишенями [12]. Можно предположить, что в этом периоде орган-мишень может влиять на нейротрансмиттерные свойства нейрона.

Размеры клеток увеличиваются с возрастом животных. Это согласуется с предыдущими работами по изучению морфометрических характеристик нейронов ЗУ [11]. Средняя площадь сечения нейронов, экспрессирующих мембранные мускариновые и пуринорецепторы, совпадает с аналогичным параметром катехоламинергических нейронов, содержащих тирозингидроксилазу в соответствующих возрастных группах [13].

Принимая во внимание доли нейронов, содержащих M1-холинорецепторы, P2X2- и P2X6-пуринорецепторы и значения средней площади сечения этих нейронов, можно предположить, что эти рецепторы локализованы в нейронах ЗУ на всех этапах постнатального развития.

Функциональная роль мускариновые и пуринорецепторов нейронов симпатических узлов заключается в модуляции синаптической передачи, осуществляемой при участии никотиновых рецепторов [4, 8, 14]. Быстрая синаптическая пуринергическая передача, опосредуемая при участии P2X-рецепторов, присутствует в верхнем шейном ганглии новорожденных и более взрослых животных [6]. В периферических же синапсах с органами-мишенями в первые 2 нед жизни функционирует только норадренергическая передача. Пуринергическая передача в онтогенезе возникает

позднее, что может свидетельствовать о недостаточном количестве АТФ в синаптических пузырьках, а также о низкой плотности расположения рецепторов [10]. Вероятно, имеются различия в процессе возрастного развития в узлах и органах-мишенях.

Таким образом, мускариновая и пуринореактивная синаптическая передача в ЗУ у крыс уже существует к моменту рождения. В процессе онтогенеза изменяется число нейронов, содержащих P2X3-пуринорецепторы. Окончательный набор пуринорецепторов на нейронах симпатического узла формируется к 30-суточному возрасту.

*Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-00470 и грантом Президента РФ для поддержания молодых ученых докторов наук: МД-175. 2008.4*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М., Медицина, 1990.
2. Иванов А.Я., Скок В.И. и Мельниченко Л.В. Проведение возбуждения через верхний шейный ганглий на раннем этапе постнатального развития. Нейрофизиология, 1987, т. 15, № 5, с. 539–546.
3. Маслюков П.М., Шилкин В.В. и Тиммерманс Ж.-П. Иммуноцитохимическая характеристика нейронов звездчатого узла симпатического ствола мыши в постнатальном онтогенезе. Морфология, 2005, т. 128, вып. 5, с. 41–44.
4. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. Physiol. Rev., 2007, v. 87, p. 659–797.
5. Burnstock G. and Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoreceptor? Gen. Pharmacol., 1985, v. 16, p. 433–440.
6. Dunn P.M., Zhong Y. and Burnstock G. P2X receptors in peripheral neurons. Prog. Neurobiol., 2001, v. 65, p. 107–134.
7. Eccles R.M. and Libet B. Origin and blockade of the synaptic responses of curarized sympathetic ganglia. J. Physiol., 1961, v. 157, p. 484–503.
8. Kullmann P.H. and Horn J.P. Excitatory muscarinic modulation strengthens virtual nicotinic synapses on sympathetic neurons and thereby enhances synaptic gain. J. Neurophysiol., 2006, v. 96, p. 3104–3113.
9. Li G.H., Lee E.M., Blair D. et al. The distribution of P2X receptor clusters on individual neurons in sympathetic ganglia and their redistribution on agonist activation. J. Biol. Chem., 2000, v. 275, p. 29107–29112.
10. Liang S.X., Arbe M.D., Phillips W.D. and Lavidis N.A. Development of fast purinergic transmission in the mouse vas deferens. Synapse, 2000, v. 37, p. 283–291.
11. Masliukov P.M. Sympathetic neurons of the cat stellate ganglion in postnatal ontogenesis: morphometric analysis. Auton. Neurosci., 2001, v. 89, p. 48–53.
12. Masliukov P.M., Pankov V.A., Strelkov A.A. et al. Morphological features of neurons innervating different viscera in the cat stellate ganglion in postnatal ontogenesis. Auton. Neurosci., 2000, v. 84, p. 169–175.
13. Masliukov P.M. and Timmermans J.-P. Immunocytochemical properties of stellate ganglion neurons during early postnatal development. Histochem. Cell Biol., 2004, v. 122, p. 201–209.
14. Pankratov Y.V., Lalo U.V. and Krishtal O.A. Role for P2X receptors in long-term potentiation. J. Neurosci., 2002, v. 22, p. 8363–8369.
15. Ruan H.Z., Moules E. and Burnstock G. Changes in P2X3 purinoreceptors in sensory ganglia of the mouse during embryonic and postnatal development. Histochem. Cell Biol., 2004, v. 122, p. 539–551.
16. Xiang Z., Bo X. and Burnstock G. Localization of ATP-gated P2X receptor immunoreactivity in rat sensory and sympathetic ganglia. Neurosci. Lett., 1998, v. 256, p. 105–108.
17. Yang Q., Sumner A.D., Puhl H.L. and Ruiz-Velasco V. M(1) and M(2) muscarinic acetylcholine receptor subtypes mediate Ca(2+) channel current inhibition in rat sympathetic stellate ganglion neurons. J. Neurophysiol., 2006, v. 96, p. 2479–2487.

Поступила в редакцию 23.02.08

#### DEVELOPMENT OF RAT STELLATE GANGLION NEURONS, CONTAINING MEMBRANE MUSCARINIC AND PURINORECEPTORS

*M.B. Korzina, A.I. Yemanuilov, L.I. Archakova, S.A. Novakovskaya and P.M. Masliukov*

The aim of this study was to determine the localization and morphometric characteristics of the stellate ganglion (SG) neurons containing muscarinic and purinoreceptors in rats of different ages (newborn, 10-, 20-, 30-, 60-, and 180-day-old) using the immunocytochemical methods. The results obtained indicated that in all the animals studied, the major part of neurons contained immunopositive P2X2, P2X6 purinoreceptors and M1 cholinoreceptors since birth onwards. A few of the neurons containing P2X3 purinoreceptors were detected in all the stages of postnatal development; these neurons were scarce in rats up to 10 days of life, after which their number increased to reach a maximal value in 20-day-old animals and then declined again. No significant changes were found in the proportion of neurons expressing M1 cholinoreceptors and P2X2, P2X6 purinoreceptors during the ontogenesis. Thus, the muscarinic synaptic transmission was already present in SG of rats by the time of their birth, while the final set of purinoreceptors on the neurons of sympathetic ganglion was formed by the age of 30 days.

**Key words:** stellate ganglion, neurons, receptors, immunohistochemistry, postnatal ontogenesis.

Department of Physiology with the Course of Biophysics, Department of Human Anatomy, Yaroslavl State Medical Academy; Center of Electron and Light Microscopy, National Academy of Sciences Institute of Physiology, Minsk, Belarus.