

НО-ЕРГИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ МЕТАСИМПАТИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

© Маслюков Петр Михайлович¹, Будник Антонина Францевна²

¹ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

²Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х. М. Бербекова, 360004, Нальчик, ул. Чернышевского, 173

Контактная информация: Маслюков Петр Михайлович — заведующий кафедрой нормальной физиологии с биофизикой. E-mail: mpm@ysmu.ru

РЕЗЮМЕ: Цель исследования — выявление локализации, процентного содержания и морфометрических характеристик NO-иммунореактивных (ИР) нейронов в интрамуральных ганглиях межмышечного (МС) и подслизистого сплетения (ПС) тонкой кишки крыс различных возрастных групп. Материал и методы. Работа выполнена на крысах линии Вистар в возрасте 1, 10, 20, 30, 60 суток и 2 года с использованием иммуногистохимических методов. Результаты. nNOS-ИР нейроны обнаруживаются в тонкой кишке уже с момента рождения и на протяжении остальных изучаемых возрастных периодов. В интрамуральных узлах МС процент изменялся от $43 \pm 4,3$ у новорожденного до $41 \pm 3,8$ у 60-суточного и достоверно снижался у старых крыс до $27 \pm 2,5$. В узлах ПС nNOS-ИР нейроны в наибольшем количестве выявлялись у новорожденных ($64 \pm 3,1\%$), в последующие 20 суток процент значительно уменьшался до нескольких процентов, но у старых крыс опять увеличивался до $27 \pm 1,9$. Заключение. Таким образом, в раннем постнатальном и в старческом периоде nNOS экспрессирует большее число энтеральных нейронов по сравнению с юными и взрослыми.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оксид азота, автономная нервная система, интрамуральные ганглии, тонкая кишка, онтогенез.

NO-ERGIC NEURONS OF THE METHASYMPATHETIC NERVOUS SYSTEM IN POSTNATAL DEVELOPMENT

© ¹Petr M. Masliukov, ²Antonina F. Budnik

¹Yaroslavl State Medical University, 5 Revolutionsnaya St, Yaroslavl, 150000;

²Kabardino-Balkarian State University named after H.M. Berbekov, ul. Chernyshevskogo 173, Nalchik, 360004.

Contact information: Petr M. Masliukov — head of Department of Normal Physiology. E-mail: mpm@ysmu.ru

ABSTRACT: The aim of the study was to identify the localization, percentage and morphometric characteristics of NPY-immunoreactive (IR) neurons in the intramural ganglia of the myenteric (MP) and submucous plexus (SP) of the small intestine of rats of different age groups. Material and methods. The work was performed on Wistar rats aged 1, 10, 20, 30, 60 days and 2 years using immunohistochemical methods. Results. nNOS-IR neurons are detected in the small intestine from the moment of birth and throughout the remaining studied age periods. In the intramural ganglia of the MP, the percentage varied from 43 ± 4.3 in the newborns to 41 ± 3.8 in the 60-day-old rats and significantly decreased to 27 ± 2.5 in aged rats. In the SP ganglia, nNOS-IR neurons were detected in most number in newborns ($64 \pm 3.1\%$). In the next 20 days, the percentage decreased significantly to several percent, but in old rats it increased again to 27 ± 1.9 . Conclusions. Thus, in the early postnatal and senile period, nNOS expresses a greater number of enteric neurons in comparison with young and adult.

KEY WORDS: nitric oxide, autonomic nervous system, intramural ganglia, small intestine, ontogenesis.

В нервной системе оксид азота (NO), синтезируемый при помощи NO-синтазы (nNOS), участвует в регуляции кровообращения, высвобождении нейромедиаторов и нейромодуляторов, процессах нейрогенеза и синаптической пластичности [3, 4, 7, 10, 12]. Значительная часть нейронов автономной нервной системы, в том числе энтеральных метасимпатических узлов содержит NO-синтазу. Холинергические энтеральные нейроны являются возбуждающими нейронами, тогда как NO-ергические нейроны могут быть тормозящими двигательными нейронами или интернейронами [6, 11].

В процессе развития после рождения в нейронах автономной нервной системы происходит ряд изменений нейрохимического состава [1, 2, 9]. Тем не менее современной литературе мало данных о возрастных изменениях содержания в энтеральных метасимпатических нейронах nNOS. Поэтому целью настоящего исследования явилось выявление морфо-функциональных особенностей NO-ергических нейронов тонкой и толстой кишки в постнатальном онтогенезе у крысы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на новорожденных, 10-, 20-, 30-, 60-суточных, 2-х-летних крысах (по 5 в каждой возрастной группе). Исследование проводилось с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). На проведение исследования получено разрешение Этического комитета Ярославского государственного медицинского университета (№ 29 от 21.02.2019 г.). После введения летальной дозы уретана (3 г/кг, внутривенно), животных перфузировали транскардиально раствором стандартного фосфатно-солевого буфера (PBS; 0.01 M, pH 7.4) (БиолоТ, Россия), затем 4% раствором параформальдегида (Sigma, США) на PBS. После перфузии участок двенадцатиперстной кишки длиной 0,5 см извлекался и помещался в ту же фиксирующую смесь, в которой производили перфузию, на 1–2 часа. Серии срезов толщиной 12 мкм изготавливали на криостате.

Для выявления нейронов, содержащих nNOS, использовались первичные антитела кролика (Abcam, США, разведение 1:500), вторичные антитела были конъюгированы с флюорохромом — индокарбоцианином (Cy3, Jackson, США, разведение 1:100), дающим красную флюоресценцию. Для расчета процента иммунопозитивных нейронов кроме метки к nNOS

производилось иммуномечение всей нейронной популяции при помощи антител от морской свинки к протеиновому генному продукту 9,5 (PGP9.5, Abcam, США, разведение 1:200), вторичные антитела были конъюгированы с флюорохромом флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC, разведение 1:100, Jackson Immunoresearch, США), дающим зеленую флюоресценцию.

Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus BX43 (Токио, 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 процентного соотношения 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 нервные клетки, срез которых прошел через ядро с ядрышком. Для определения площади сечения нейронов в случайном порядке брались 100 нейронов, иммунопозитивных к каждому из исследованных маркеров в каждой возрастной группе.

Математическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Sigma Plot (StatSoft, USA). Все величины представлены как средняя арифметическая $\pm$ ошибка среднего ($M \pm m$). Достоверность различий средних величин определяли по методикам ANOVA, критериям Вилкоксона и Манна — Уитни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования свидетельствуют, что nNOS-иммунореактивные (nNOS-ИР) нейроны обнаруживались в тонкой кишке в интрамуральных ганглиях межмышечного (МС) и подслизистого (ПС) сплетения уже с момента рождения. В интрамуральных узлах МС процент изменялся от $43 \pm 4,3$ у новорожденного до $41 \pm 3,8$ у 60-суточного и достоверно снижался у старых крыс до $27 \pm 2,5$. В узлах ПС nNOS-ИР нейроны в наибольшем количестве выявлялись у новорожденных ($64 \pm 3,1\%$), в последующие 20 суток процент значительно уменьшался до нескольких процентов, но у старых крыс опять увеличивался до $27 \pm 1,9$. Средняя площадь сечения nNOS-ИР клеток в МС являлась достоверно большей по сравнению с иммунонегативными нейронами у крыс во всех возрастных группах.

Ранее было показано, что метасимпатических интрамуральных узлах кишки у мыши и человека NOS-иммунореактивные нейроны в эмбриогенезе созревают раньше, чем холинергические [8]. В позднем эмбриональном и раннем постнатальном периоде NOS экспрессирует большее число нейронов по сравнению с более взрослыми [5]. Есть предположения, что запоры в раннем детском возрасте связаны с гиперактивацией NO-ергической энтеральной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в раннем постнатальном и в старческом периоде nNOS экспрессирует большее число энтеральных нейронов по сравнению с юными и взрослыми. Тем не менее, значение повышенной экспрессии нейрональной NOS у животных в раннем онтогенезе остается неясным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маслоков П.М., Будник А.Ф., Ноздрачев А.Д. Нейрохимические особенности узлов метасимпатической системы в онтогенезе // Успехи геронтологии. 2017. Т. 30. № 3. С. 347–355.
2. Маслоков П.М., Емануилов А.И., Ноздрачев А.Д. Возрастные изменения нейротрансмиттерного состава нейронов симпатических узлов // Успехи геронтол. 2016. Т. 29. № 3. С. 442–453.
3. Ситдикова Г.Ф., Зефирова А.Л. Газообразные посредники в нервной системе // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2006. Т. 92, № 7. С. 872–882.
4. Bahadoran Z., Carlström M., Mirmiran P., Ghasemi A. Nitric oxide: to be or not to be an endocrine hormone? // Acta Physiol. (Oxf). 2020. e13443.
5. Bergner A.J., Stamp L.A., Gonsalvez D.G., Allison M.B., Olson D.P., Myers M.G.Jr., Anderson C.R., Young H.M., Birthdating of myenteric neuron subtypes in the small intestine of the mouse // J. Comp. Neurol. 2014. Vol. 522. P. 514–527.
6. Foong J.P. Postnatal Development of the Mouse Enteric Nervous System // Adv. Exp. Med. Biol. 2016. Vol. 891. P. 135–43.
7. Gaynullina D.K., Schubert R., Tarasova O.S. Changes in endothelial nitric oxide production in systemic vessels during early ontogenesis-a key mechanism for the perinatal adaptation of the circulatory system // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20. N 6. E1421.
8. Hao M.M., Bornstein J.C., Young H.M. Development of myenteric cholinergic neurons in ChAT-Cre;R26R-YFP mice // J. Comp. Neurol. 2013. Vol. 521. P. 3358–3370.
9. Masliukov P.M., Moiseev K., Budnik A.F., Nozdachev A.D., Timmermans J.-P. Development of calbindin- and calretinin-immunopositive neurons in the enteric

ganglia of rats // Cell Mol. Neurobiol. 2017. Vol. 37. N 7. P. 1257–1267.

10. Prast H., Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function // Prog. Neurobiol. 2001. Vol. 64. P. 51–68.
11. Sang Q., Young H.M. Chemical coding of neurons in the myenteric plexus and external muscle of the small and large intestine of the mouse // Cell Tissue Res. 1996. Vol. 284. № 1. P. 39–53.
12. Snyder S.H. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters // Science 1992. Vol. 257. P. 494–496.

REFERENCES

1. Masliukov P.M., Emanuilov A.I., Nozdachev A.D. Developmental changes of neurotransmitter properties in sympathetic neurons // Adv. Gerontol. 2016. Vol. 29. N 3. P. 442–453.
2. Masliukov P.M., Budnik A.F., Nozdachev A.D. Developmental changes of neurotransmitter properties in sympathetic neurons // Adv. Gerontol. 2017. Vol. 30, N 3. P. 347–355.
3. Sitdikova G.F., Zefirov A.L. Gaseous messengers in the nervous system // Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova. 2006. Vol. 92. N 7. P. 872–882.
4. Bahadoran Z., Carlström M., Mirmiran P., Ghasemi A. Nitric oxide: to be or not to be an endocrine hormone? // Acta Physiol. (Oxf). 2020. e13443.
5. Bergner A.J., Stamp L.A., Gonsalvez D.G., Allison M.B., Olson D.P., Myers M.G.Jr., Anderson C.R., Young H.M., Birthdating of myenteric neuron subtypes in the small intestine of the mouse // J. Comp. Neurol. 2014. Vol. 522. P. 514–527.
6. Foong J.P. Postnatal Development of the Mouse Enteric Nervous System // Adv. Exp. Med. Biol. 2016. Vol. 891. P. 135–43.
7. Gaynullina D.K., Schubert R., Tarasova O.S. Changes in endothelial nitric oxide production in systemic vessels during early ontogenesis-a key mechanism for the perinatal adaptation of the circulatory system // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20. N 6. E1421.
8. Hao M.M., Bornstein J.C., Young H.M. Development of myenteric cholinergic neurons in ChAT-Cre;R26R-YFP mice // J. Comp. Neurol. 2013. Vol. 521. P. 3358–3370.
9. Masliukov P.M., Moiseev K., Budnik A.F., Nozdachev A.D., Timmermans J.-P. Development of calbindin- and calretinin-immunopositive neurons in the enteric ganglia of rats // Cell Mol. Neurobiol. 2017. Vol. 37. N 7. P. 1257–1267.
10. Prast H., Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function // Prog. Neurobiol. 2001. Vol. 64. P. 51–68.
11. Sang Q., Young H.M. Chemical coding of neurons in the myenteric plexus and external muscle of the small and large intestine of the mouse // Cell Tissue Res. 1996. Vol. 284. № 1. P. 39–53.
12. Snyder S.H. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters // Science 1992. Vol. 257. P. 494–496.