

ПАРВАЛЬБУМИН-СОДЕРЖАЩИЕ ЭНТЕРАЛЬНЫЕ
МЕТАСИМПАТИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

© 2020 г. А. Д. Ноздрачев¹, А. Ф. Будник², П. М. Маслюков^{3, 4, *}

¹Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

²Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова,
Нальчик, Россия

³Ярославский государственный медицинский университет,
Ярославль, Россия

⁴Петрозаводский государственный университет,
Петрозаводск, Россия

*E-mail: mpm@ysmu.ru

Поступила в редакцию 16.08.2019 г.

После доработки 14.11.2019 г.

Принята к публикации 22.11.2019 г.

Кальций-связывающий белок парвальбумин селективно экспрессируется в различных популяциях нейронов центральной и периферической нервной системы. Локализация и процентный состав парвальбумин-иммунореактивных нейронов определялся в нейронах метасимпатических энтеральных узлов тонкой и толстой кишки у крыс разного возраста (1, 10, 20, 30, 60 сут и 2 года). В межмышечном сплетении парвальбумин-иммунореактивные нейроны выявляются в онтогенезе с момента рождения и до старости, при этом их процент в межмышечном сплетении тонкой кишки возрастает с 10 по 20 сутки жизни, в межмышечном сплетении толстой кишки – в первые 10 суток жизни. В подслизистом сплетении тонкой и толстой кишки у новорожденных крыс парвальбумин отсутствует и определяется с 10-х суток жизни. Процент парвальбумин-иммунореактивных нейронов в подслизистом сплетении увеличивается между 10-ми и 20-ми сутками жизни. При старении доля парвальбумин-иммунореактивных нейронов в межмышечном и подслизистом сплетениях достоверно не меняется. Таким образом, в раннем постнатальном онтогенезе происходит увеличение доли парвальбумин-иммунореактивных нейронов в интрамуральных метасимпатических узлах кишки. Вероятно, данное увеличение связано с буферной ролью парвальбумина в отношении ионов Ca^{2+} .

Ключевые слова: метасимпатическая нервная система, интрамуральные ганглии кишки, парвальбумин, кальций-связывающие белки, иммуногистохимия, онтогенез

DOI: 10.31857/S0869813920020065

Ионы кальция в нервной системе играют важнейшую роль в осуществлении различных физиологических процессов, в т.ч. в возрастных и стресс-индуцированных изменениях нейронов, секреции медиатора, в поддержании оптимального уровня нейропластичности [1, 2]. Ионы Ca^{2+} могут связываться кальций-связывающими белками. При этом эти белки изменяют свою структуру и могут оказывать влияние на разнообразные процессы внутри клетки. Часть из них широко распространена,

например, кальмодулин, обнаруженный почти во всех клетках животных и растений [3]. К наиболее распространенным в нервной системе относятся кальбиндин массой 28 кДа, кальретинин и парвальбумин [1, 4]. Кальбиндин и кальретинин обнаруживаются в большом числе нейронов энтеральных интрамуральных метасимпатических узлов [5, 6]. Однако в отличие от кальбиндина данные по локализации парвальбумина в узлах автономной нервной системы в литературе немногочисленны [7–9].

Известно, что нейронная организация периферических узлов автономной нервной системы сопровождается возрастной перестройкой, сопровождающейся изменением морфологических и функциональных характеристик нейронов [10–12]. Установлено, что в энтеральных узлах в онтогенезе процентное содержание различных типов кальций-связывающих белков меняется. У крыс и кошек в ходе возрастного развития процент кальбиндин-иммунореактивных симпатических нейронов увеличивается с момента рождения до 10-х суток, а затем снижается до конца первого месяца жизни [4]. В тонкой кишке процент кальбиндин-иммунореактивных нейронов возрастал в первые 20 суток жизни, процент кальретинин-иммунореактивных нейронов увеличивался в течение 2 месяцев жизни [13, 14].

Целью настоящего исследования явилось определение локализации и процентного соотношения парвальбумин-иммунореактивных нейронов подслизистого и межмышечного сплетения тонкой и толстой кишки в постнатальном онтогенезе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на новорожденных, 10-, 20-, 30-, 60-суточных, 2-х-летних крысах (по 5 в каждой возрастной группе). На проведение исследования получено разрешение Этического комитета Ярославского государственного медицинского университета. После введения летальной дозы уретана (3 г/кг, внутривенно), животных перфузировали транскардиально физиологическим раствором с гепарином, а затем фиксирующей смесью 4%-ного параформальдегида на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4). После перфузии участки двенадцатиперстной и поперечно-ободочной толстой кишки длиной 0.5 см извлекались и помещались в ту же фиксирующую смесь, в которой производили перфузию, на 1–2 ч. Продольные серии срезов кишки толщиной 12 мкм изготавливали на криостате.

С целью выявления парвальбумина применялось двойное мечение соответствующими первичными кроличьими антителами фирмы Abscam (США, ab11427), разведение 1 : 500. Срезы преинкубировались в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% сыворотки, 1% тритона X-100, 0.1% бычьего сывороточного альбумина. Затем срезы инкубировались с первичными антителами в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировались с ослиными вторичными антителами против кролика, конъюгированными с индокарбоцианином (Cy3, Jackson Immunoresearch, США, 711-165-152, разведение 1 : 150), дающим красную флуоресценцию. Для расчета процента иммунопозитивных нейронов, кроме меток к парвальбумину, производилось иммуномечение всей нейронной популяции при помощи антител морской свинки к протеиновому генному продукту 9.5 (Abscam, США, ab10410, разведение 1 : 300), вторичные ослиные антитела против морской свинки были конъюгированы с флуорохромом флуоресцином изотиоционатом (FITC, Jackson Immunoresearch, США, 706-095-148, разведение 1 : 150), дающим зеленую флуоресценцию.

Негативный контроль проводили путем преабсорбции первичного антитела с рекомбинантным парвальбумином (Abscam, ab69002) или отсутствием первичного антитела.

Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus BX43 (Токио, Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD камерой Tucsen TCC 6.11CE с программным обеспечением ISCapture 3.6 (Китай). Для анализа размеров и процентного соотношения иммунопозитивных нейронов на цифровых изображениях гистологических препаратов использовали программу Image J (НИН, США, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Долю иммунопозитивных нейронов определяли как их отношение к общему числу нейронов, меченных протеиновым генным продуктом 9.5, которое принимали за 100%. Анализу подлежали нервные клетки, срез которых прошел через ядро. Подсчет производили в 10 случайно выбранных измеренных областях (1 микроскопическое поле составляло 0.12 мм^2) при 200-кратном увеличении у каждого животного в каждой возрастной группе. Среднее определяли путем усреднения пропорций, полученных от пяти животных.

Математическая обработка данных проведена с использованием пакетов прикладных программ Sigma Plot (StatSoft, США). Все величины представлены как средняя арифметическая \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Достоверность различий средних величин определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с коррекцией Бонферрони. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты показали, что парвальбумин-иммунореактивные нейроны обнаруживались в тонкой и толстой кишке у крыс всех исследованных возрастов, начиная с момента рождения до старости. Иммунофлуоресценция наблюдалась главным образом в телах нейронов (рис. 1). Преабсорбция первичных антител с рекомбинантным парвальбумином (Abcam, ab69002), а также отсутствие первичных антител приводили к исчезновению парвальбумин-иммунореактивной флуоресценции.

В межмышечном сплетении тонкой кишки у новорожденных и 10-суточных крысят процент парвальбумин-иммунореактивных нейронов был небольшим. Доля парвальбумин-иммунореактивных нейронов достоверно увеличивалась между 10-ми и 20-ми сутками жизни ($p < 0.001$, табл. 1). В межмышечном сплетении толстой кишки процент парвальбумин-иммунореактивных нейронов был низким, но значительно возрастал в первые 10 суток жизни ($p < 0.001$). Начиная с 10 суток жизни, процент таких нейронов в интрамуральных ганглиях межмышечного сплетения был достоверно больше в толстой кишке по сравнению с тонкой ($p < 0.05$).

В подслизистом сплетении у новорожденных крысят парвальбумин не выявлялся, а определялся с 10-х суток жизни (табл. 2). В тонкой кишке процент парвальбумин-иммунореактивных нейронов достоверно увеличивался между 10-ми и 20-ми сутками жизни ($p = 0.03$) и далее не изменялся ($p > 0.05$). При этом в тонкой кишке процент этих нейронов был достоверно большим по сравнению с толстой ($p < 0.05$) кишкой крыс разного возраста ($n = 5$ в каждой возрастной группе).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе проведенного исследования нами впервые доказана локализация парвальбумина не только в нейронах центральной, но и автономной нервной системы, в том числе в нейронах интрамуральных узлов тонкой и толстой кишки. Предыдущие исследования не выявили парвальбумин в метасимпатических интрамуральных ганглиях органов пищеварения у разных животных: крысы, морской свинки и макаки-резус [7–9]. Вероятно, данные различия связаны с особенностями применяемых антител, различными видами животных и различными исследован-

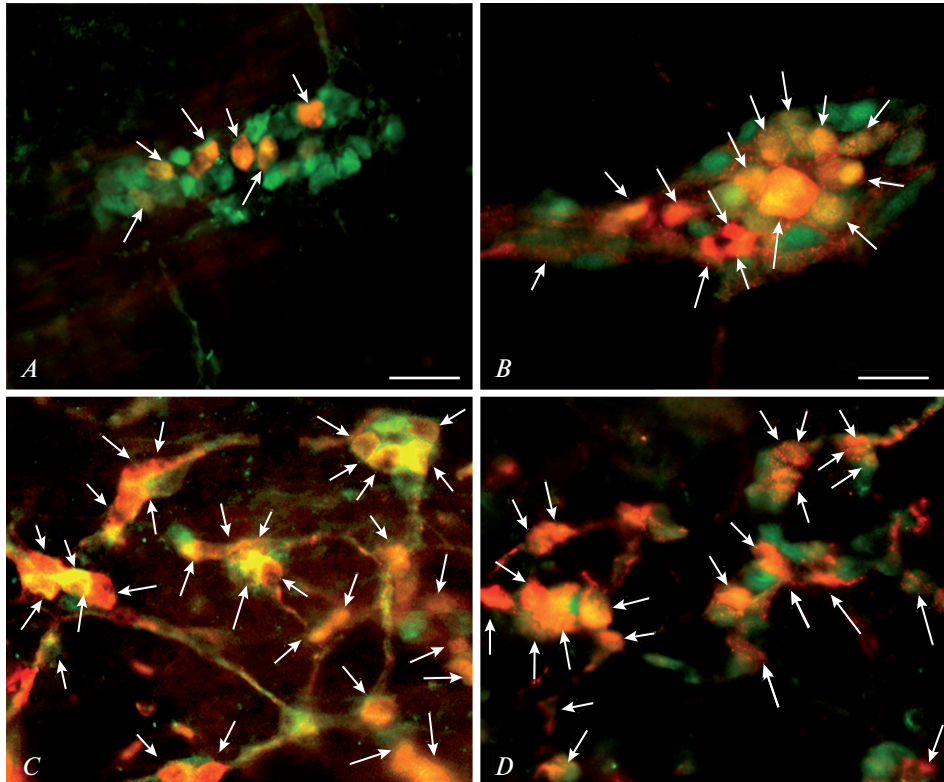


Рис. 1. Микрофотографии парвальбумин (ПБ)-ИР нейронов (указаны стрелками) тонкой кишки в межмышечном сплетении (A) новорожденных, (B) 2-летних, и подслизистом сплетении (C) 10-суточных и (D) 30-суточных крыс. Флюоресценция Cy3 (красный, ПБ), FITC (зеленый, PGP9.5). Масштаб: 50 мкм.
Fig. 1. Micrographs of parvalbumin IR neurons (indicated by arrows) of the small intestine in the myenteric plexus of (A) newborns, (B) 2-year-old, and submucous plexus of (C) 10-day-old and (D) 30-day-old rats. Fluorescence of Cy3 (red, PB), FITC (green, PGP9.5). Scale: 50 mkm.

ными отделами пищеварительного тракта. Например, работа М. Schemann с соавт. [9] выполнена на желудке морской свинки, а структурно-функциональная организация метасимпатической энтеральной системы у разных животных, в т.ч. морской свинки с одной стороны, мыши и крысы с другой – существенно отличаются [15]. Исследование Т. Endo и Т. Опауа [7] проведено на крысе, но на тощей кишке, наша работа выполнена на двенадцатиперстной и поперечно-ободочной толстой кишке.

Результаты настоящей работы также свидетельствуют, что в раннем онтогенезе доля нейронов, экспрессирующих парвальбумин, увеличивается в подслизистом и межмышечном сплетениях тонкой и толстой кишки. Учитывая, что сходные процессы были ранее нами описаны в отношении других кальций-связывающих белков – кальбиндина и кальретинина [13, 14], можно предположить, что возрастное увеличение экспрессии нейрональных кальций-связывающих белков в раннем постнатальном онтогенезе носит более общий характер.

В отличие от кальбиндина и кальретинина, парвальбумин относится к медленным буферам [1, 16]. Одна из функций парвальбумина – участие в механизмах генерации ритма в нейронах с высокой частотой импульсации [17]. Нейроны с повы-

Таблица 1. Процент парвальбумин-иммунореактивных нейронов в интрамуральных ганглиях межмышечного сплетения тонкой и толстой кишки крыс разного возраста ($n = 5$ в каждой возрастной группе)

Table 1. The percentage of PB-IR neurons in the intramural ganglia of myenteric plexus in the small and large intestines of rats of different ages ($n = 5$ in each age group)

Возраст Age	Тонкая кишка Small intestine	Толстая кишка Large intestine
Новорожденный Newborn	28 ± 3.2	24 ± 3.2
10 суток 10-day-old	30 ± 4.2	$71 \pm 2.1^{***}$
20 суток 20-day-old	$57 \pm 2.3^*$	$70 \pm 4.2^{***}$
30 суток 30-day-old	$54 \pm 4.6^*$	$68 \pm 3.2^{***}$
2 месяца 2-month-old	$58 \pm 4.1^*$	$69 \pm 3.4^{***}$
2 года 2-year-old	$59 \pm 3.3^*$	$69 \pm 3.1^{***}$

* $p < 0.01$, различия достоверны по сравнению с новорожденными животными

* $p < 0.01$, the differences are significant compared with newborn animals;

** $p < 0.05$, различия достоверны по сравнению с тонкой кишкой

** $p < 0.05$, differences are significant compared with the small intestine.

Таблица 2. Процент парвальбумин-иммунореактивных нейронов в интрамуральных ганглиях подслизистого сплетения тонкой и толстой кишки крыс разного возраста ($n = 5$ в каждой возрастной группе)

Table 2. The percentage of parvalbumin-IR neurons in the intramural ganglia of submucous plexus of the small and large intestines of rats of different ages ($n = 5$ in each age group)

Возраст Age	Тонкая кишка Small intestine	Толстая кишка Large intestine
10 суток 10-day-old	72 ± 1.3	$51 \pm 2.3^{**}$
20 суток 20-day-old	$82 \pm 2.6^*$	$62 \pm 3.4^{**}$
30 суток 30-day-old	$82 \pm 2.3^*$	$63 \pm 3.5^{**}$
2 месяца 2-month-old	$84 \pm 2.3^*$	$61 \pm 3.6^{**}$
2 года 2-year-old	$87 \pm 5.3^*$	$65 \pm 5.3^{**}$

* $p < 0.05$, различия достоверны по сравнению с новорожденными животными

* $p < 0.05$, the differences are significant compared with newborn animals;

** $p < 0.05$, различия достоверны по сравнению с тонкой кишкой

** $p < 0.05$, differences are significant compared with the small intestine.

шенным уровнем экспрессии парвальбумина обнаруживали большую устойчивость к гибели после неонатального повреждения аксонов [1].

В ряде работ установлена связь уровня кальбиндина и парвальбумина в нейронах и экспрессии кальциевых каналов. В нейронах гиппокампа мышей каналы Cav1.2 на ранних этапах развития экспрессируются в теле клетки, дендритах и аксоне. По

мере взросления экспрессия в аксоне уменьшается и определяется только в теле клетки и дендритах [18]. В развивающихся нейронах при участии ионов кальция происходит регуляция роста нейронов и морфологической пластичности, в частности, конуса роста и развитие дендритов, что совпадает по времени с увеличением содержания кальций-связывающих белков [19]. На более поздних этапах постнатального развития нейронов интрамуральных узлов кальций-связывающие белки играют роль кальциевых сенсоров и участвуют в поддержании уровня кальция в клетках.

Согласно литературным сведениям процент кальбиндин-позитивных энтеральных нейронов был меньше у мышей, содержащихся в стерильных условиях [20, 21]. Т.к. заселение кишечника микрофлорой происходит после рождения, можно предположить, что микрофлора кишки оказывает влияние и на нейрохимический состав, в т.ч. на экспрессию кальций-связывающих белков, и изменения их экспрессии в онтогенезе могут быть связаны и с влиянием микробиоты.

Данные литературы свидетельствуют, что при старении процент парвальбумин-иммунореактивных нейронов в коре больших полушарий увеличивается [22]. Тем не менее, мы не обнаружили повышения доли парвальбумин-иммунореактивных нейронов у старых крыс.

Таким образом, в раннем постнатальном онтогенезе происходит увеличение доли парвальбумин-иммунореактивных нейронов в интрамуральных узлах кишки, что соответствует возрастным изменениям содержания других кальций-связывающих белков, в т.ч. кальбиндина и кальретицина в энтеральных узлах. Вероятно, данное увеличение связано с буферной ролью парвальбумина в отношении ионов Ca^{2+} . Возрастной инволюции парвальбумин-иммунореактивных нейронов кишки у старых крыс не отмечается.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schwaller B. The regulation of a cell's Ca^{2+} signaling toolkit: the Ca (2+) homeostosome. *Adv. Exp. Med. Biol.* 740: 1–25. 2012.
2. Simons M.J., Pellionisz A.J. Genomics, morphogenesis and biophysics: triangulation of Purkinje cell development. *Cerebellum*. 5: 27–35. 2006.
3. Пермяков Е.А. Кальцийсвязывающие белки. М. Наука. 1993 [Permyakov E.A. Kaltsiysvyazyvayushchiye belki. [Calcium-Binding Proteins]. Moscow. Nauka. 1993 (In Russ)].
4. Маслюков П.М., Ноздрачев А.Д., Емануилов А.И. Возрастные особенности экспрессии кальций-связывающих белков в нейронах ганглиев автономной нервной системы. *Успехи геронтологии*. 29(2): 247–253. 2016. [Masliukov P.M., Nozdrachev A.D., Emanuilov A.I. Age-related expression of calcium-binding proteins in autonomic ganglionic neurons. *Adv. Gerontol.* 29(2): 247–253. 2016. (In Russ)].
5. Mitsui R. Immunohistochemical analysis of substance P-containing neurons in rat small intestine. *Cell Tissue Res.* 343(2): 331–341. 2011.
6. Qu Z.D., Thacker M., Castelucci P., Bagyánszki M., Epstein M.L., Furness J.B. Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. *Cell Tissue Res.* 334(2): 147–161. 2008.
7. Endo T., Onaya T. Immunohistochemical localization of parvalbumin in rat and monkey autonomic ganglia. *J. Neurocytol.* 17(1): 73–77. 1988.
8. Celio M.R. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*. 35(2): 375–475. 1990.
9. Schemann M., Schaaf C., Mäder M. Neurochemical coding of enteric neurons in the guinea pig stomach. *J. Comp. Neurol.* 353(2): 161–178. 1995.
10. Ноздрачев А.Д., Маслюков П.М. Возрастное развитие нейронов автономных ганглиев. СПб. Информ-Навигатор. 2014. [Nozdrachev A.D., Maslyukov P.M. Vozrastnoye razvitiye neyronov avtonomnykh gangliyev [Age development of autonomic ganglionic neurons]. SPb. Inform-Navigator. 2014 (In Russ)].
11. Masliukov P.M. Sympathetic neurons of the cat stellate ganglion in postnatal ontogenesis: morphometric analysis. *Auton. Neurosci.* 89(1–2): 48–53. 2001.
12. Маслюков П.М., Ноздрачев А.Д., Тиммерманс Ж.П. Возрастные особенности нейротрансмиттерного состава нейронов звездчатого узла. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 92(2): 214–221. 2006. [Masliukov P.M., Nozdrachev A.D., Timmermans J.P. The age specifics of the neurotransmitter composition of the stellate ganglion neurons. *Russ J. Physiol.* 92(2): 214–221. 2006. (In Russ)].

13. Маслюков П.М., Будник А.Ф., Ноздрачев А.Д. Нейрохимические особенности узлов метасимпатической системы в онтогенезе. Успехи геронтологии. 30(3): 347–355 2017. [Masliukov P.M., Budnik A.F., Nozdrachev A.D. Developmental changes of neurotransmitter properties in sympathetic neurons. Adv. Gerontol. 30(3): 347–355. 2017. (In Russ)].
14. Masliukov P.M., Moiseev K., Budnik A.F., Nozdrachev A.D., Timmermans J.-P. Development of calbindin- and calretinin-immunopositive neurons in the enteric ganglia of rats. Cell Mol. Neurobiol. 37(7): 1257–1267. 2017.
15. Furness J.B. The enteric nervous system. Oxford. Blackwell Publishing, 2006.
16. Permyakov E.A., Uversky V.N., Permyakov S.E. Parvalbumin as a Pleomorphic Protein. Curr. Protein Pept. Sci. 18(8): 780–794. 2017.
17. Orduz D., Bishop D.P., Schwaller B., Schiffmann S.N., Gall D. Parvalbumin tunes spike-timing and efferent short-term plasticity in striatal fast spiking interneurons. J. Physiol. 591(Pt 13): 3215–3232. 2013.
18. Obermair G.J., Szabo Z., Bourinet E., Flucher B.E. Differential targeting of the L-type Ca²⁺ channel alpha 1C (CaV1.2) to synaptic and extrasynaptic compartments in hippocampal neurons. Eur. J. Neurosci. 8: 2109–2122. 2004.
19. Gasperini R.J., Pavez M., Thompson A.C., Mitchell C.B., Hardy H., Young K.M., Chilton J.K., Foa L. How does calcium interact with the cytoskeleton to regulate growth cone motility during axon pathfinding? Mol. Cell Neurosci. 84: 29–35. 2017.

Parvalbumin-Containing Enteric Metasympathic Neurons in Postnatal Ontogenesis

A. D. Nozdrachev^a, A. F. Budnik^b, and P. M. Masliukov^{c, d, *}

^aSt. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

^bBerbekov Kabardino-Balkarian State University, Nalchik, Russia

^cYaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

^dPetrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

*e-mail: mpm@ysmu.ru

Calcium-binding protein parvalbumin (PB) is selectively expressed in various populations of neurons in the central and peripheral nervous system. The localization and percentage of PB-immunoreactive (IR) neurons was determined in the neurons of metasympathetic enteric ganglia of the small and large intestine in rats of different ages (1, 10, 20, 30, 60 days and 2 years). In the myenteric plexus (MP) PB-IR neurons are detected in ontogenesis from birth to old age, while their percentage in the MP of small intestine increases from 10 to 20 days of life, in the MP of the colon - in the first 10 days of life. In the submucosal plexus (SP) of the small and large intestine in newborn pups, PB is absent and it is determined from 10 days of life. The percentage of PB-IR neurons in the SP increases between 10 and 20 days of life. With aging, the proportion of PB-IR neurons in the MP and SP does not significantly change. Thus, in the early postnatal ontogenesis, there is an increase in the proportion of PB-IR neurons in the gut methasympathetic intramural ganglia. This increase is likely due to the buffer role of PB in relation to Ca²⁺ ions.

Keywords: Methasympathetic nervous system, intramural enteric ganglia, parvalbumin, calcium-binding proteins, immunohistochemistry, ontogenesis

ЦИТИРОВАТЬ:

Ноздрачев А.Д., Будник А.Ф., Маслюков П.М. Парвальбумин-содержащие энтеральные метасимпатические нейроны в постнатальном онтогенезе. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 106(2): 224–230.

DOI: 10.31857/S0869813920020065

TO CITE THIS ARTICLE:

Nozdrachev A.D., Budnik A.F., Masliukov P.M. Parvalbumin-Containing Enteric Metasympathic Neurons in Postnatal Ontogenesis. Russian Journal of Physiology. 106(2): 224–230.

DOI: 10.31857/S0869813920020065