

УДК 612.8

А.Ф. Будник

кандидат медицинских наук, доцент кафедры нормальной и патологической анатомии человека медицинского факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова»

A.F. Budnik

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Normal and Pathological Human Anatomy of the Medical Faculty at Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Kabardino-Balkarian State University named after H.M. Berbekov»

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ КАЛЬБИДИНА И КАЛЬРЕТИНИНА В НЕЙРОНАХ КИШКИ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

DYNAMICS OF EXPRESSION OF CALBINDIN AND CALRETININ IN THE NEURONS OF THE INTESTINE IN POSTNATAL ONTOGENESIS

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Будник Антонина Францевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры нормальной и патологической анатомии человека медицинского факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова»
Адрес: 360 000, Кабардино-Балкарская Республика, Нальчик, ул. И. Арманд, д. 1
Тел.: +7 (906) 485-86-22; e-mail: budnik74@mail.ru
Статья поступила: 19.11.2017
Статья принята: 01.12.2017

CONTACT INFORMATION

Budnik Antonina, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Normal and Pathological Human Anatomy of the Medical Faculty at Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Kabardino-Balkarian State University named after H.M. Berbekov»
Address: p. 1, I. Armand str., Nalchik, Kabardino-Balkar Republic, Russia, 360 000
Tel.: +7 (906) 485-86-22; e-mail: budnik74@mail.ru
Article received: 19.11.2017
Article approved: 01.12.2017

Аннотация

Работа выполнена на крысах-самках линии Вистар в возрасте 1, 10, 20, 30, 60 суток, 1 и 2 лет после рождения (5 животных в каждой возрастной группе). Выявление нейронов, содержащих кальбиндин и кальретинин, проводили при помощи меченых антител. Вторичные антитела были конъюгированы с флюорохромами FITC и CY3. Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD-камерой Tucsen TCC 6.1ICE. Для анализа размеров и процентного соотношения иммунопозитивных нейронов на цифровых изображениях гистологических препаратов использовали программу Image J. В раннем постнатальном онтогенезе происходит увеличение доли кальбиндин- и кальретинин-содержащих нейронов в интрамуральных узлах кишки, что противоположно возрастным изменениям содержания кальций-связывающих белков в спинномозговых и симпатических узлах.

Ключевые слова: автономная нервная система, интрамуральные узлы, кальций-связывающие белки, онтогенез.

Abstract

The work was done on female Wistar rats aged 1, 10, 20, 30, 60 days, 1 and 2 years after birth (5 animals in each age group). Identification of neurons containing calbindin and calretinin, was performed using labeled antibodies. Secondary antibodies were conjugated with FITC and CY3 fluorochrome. Analysis of drugs was carried out on a fluorescent microscope with the appropriate filter set and a cooled digital CCD camera Tucsen TCC 6.1ICE. To study the size and percentage of neurons in digital images of histological preparations the program Image J was used. In the early postnatal ontogenesis there is an increase in the share of calbindin- and calretinin — containing neurons in the intramural nodes of the intestine, which is the opposite of age-related changes in the content of calcium-binding proteins in the cerebrospinal and the sympathetic nodes.

Keywords: autonomic nervous system, intramural nodes, calcium-binding proteins, ontogenesis.

Ионы кальция регулируют многочисленные биохимические процессы, происходящие в клетке. В современной литературе описаны разнообразные кальций-связывающие белки [1–3]. В структуре клеток вегетативной нервной системы самые распространенные это кальбиндин (КБ), кальретинин (КР) и парвальбумин, они относятся к EF-семейству кальций-связывающих белков [4]. В зависимости от концентрации ионов кальция эти белки по-разному взаимодействуют со своими белками-мишенями и регулируют активность последних [2]. В метасимпатической нервной системе относительно много кальбиндин-содержащих нейронов отмечено в симпатических сплетениях [5, 6] и интрамуральных узлах кишки [7].

В процессе развития после рождения в нейронах автономной нервной системы происходит ряд изменений нейрохимического состава [8, 9]. В том числе в клетках меняется процентная доля содержания различных типов кальций-связывающих белков. У крыс и кошек от момента рождения до десяти суток количество КБ-содержащих симпатических нейронов увеличивается, затем постепенно снижается до конца первого месяца жизни [3, 6]. В современной литературе мало данных о возрастных колебаниях содержания в клетках интрамуральных сплетений кишки КБ и КР. Целью этого исследования явилось выявление количественного содержания, морфометрических характеристик и определение топика КБ- и КР-иммунопозитивных нейронов в узлах межмышечного и подслизистого сплетений двенадцатиперстной кишки крыс в динамике от момента рождения до старости.

Исследование проведено на крысах-самках линии Вистар в возрасте 1, 10, 20, 30, 60 суток, 1 и 2 лет после рождения (5 животных в каждой возрастной группе). При проведении экспериментов были соблюдены основные правила биоэтики [10]. КБ- и КР-содержащие нейроны выявляли с использованием меченых антител по методике, ранее описанной П.М. Маслюковым и соавт. [5, 6]. Вторичные антитела были конъюгированы с флуорохромами FITC и Cy3. Препараты анализированы на флуоресцентном микроскопе Olympus BX43 (Токио, Япония) с необходимым набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD-камерой Tucsen TCC 6.1PCE (программное обеспечение ISCapture 3.6, Китай). Измерение и определение процентного содержания иммунопозитивных нейронов на цифровых микрофотографиях гистологических срезов осуществляли с помощью программы Image J (НИН, США; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Статистический анализ основан на определении среднего арифметического значения и стандартной ошибки. Результаты различий считали статистически значимыми при $p < 0,05$, ориентировались по величине t-критерия Стьюдента.

Таблица 1
Площадь сечения клеток (в $\mu\text{м}^2$)

Возраст	Межмышечное нервное сплетение		Подслизистое нервное сплетение	
	КР(+)	КР(-)	КБ(+)	КБ(-)
Новорожденные	168 ± 8	128 ± 4	—	—
10 дней	131 ± 6**	112 ± 4	121 ± 6**	104 ± 5
20 дней	169 ± 9*	120 ± 6	170 ± 6*	125 ± 7
1 месяц	195 ± 11*	152 ± 7	206 ± 10*	157 ± 6
2 месяца	265 ± 18*	158 ± 14	282 ± 19*	159 ± 12
6 месяцев	257 ± 13**	161 ± 12	270 ± 17**	173 ± 12
1 год	271 ± 19*	171 ± 16	266 ± 15*	176 ± 16
2 года	268 ± 15*	169 ± 15	261 ± 13*	169 ± 15

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, в сравнении с иммунонегативными нейронами.

Исследование показало: у крыс всех исследованных возрастных групп в межмышечном сплетении двенадцатиперстной кишки выявлялись КБ- и КР-иммунопозитивные нейроны, появление этих нейронов в подслизистых узлах начинается с возраста десяти суток. Сразу после рождения процентная доля КБ- и КР-реактивных клеток не превышала 24 % и 20,3 % соответственно. В первые десять дней жизни крысят доля КР-иммунореактивных нейронов росла существенно — до 43 % и далее достоверно не колебалась до самой смерти. Количество КБ-содержащих нейронов заметно увеличивалось в первые 20 суток жизни, к концу обозначенного периода доходя до пика своего значения в 64,3 %, затем их процентная доля несущественно снижалась к концу 30-го дня (до 56,3 %) и далее достоверно не изменялась на протяжении всей жизни крыс.

Площадь сечения КБ- и КР-позитивных нейронов в подслизистом и межмышечном нервных сплетениях двенадцатиперстной кишки крыс также подвержена возрастным колебаниям, и значения этого параметра приведены в табл. 1.

Обращает внимание, что площадь сечения иммунопозитивных нейронов в нервных сплетениях двенадцатиперстной кишки крысы всех исследованных возрастных периодов превышает аналогичный показатель по иммунонегативным нейронам. Площадь сечения КР-позитивных нейронов снижается к возрасту 10 дней и возвращается почти к исходному показателю к 20-му дню жизни. В целом отмечается тенденция к увеличению этого параметра в течение жизни. Площадь сечения иммунопозитивных нейронов в стенке кишки старых крыс практически такая же, как и в возрасте 6 месяцев.

Поддержание определенной концентрации ионов кальция имеет важное значение как один из факторов, регулирующих пластичность синапсов и их фор-

мирование. Концентрация Ca^{2+} может изменяться в пространстве и во времени, и существенная роль в ее регуляции отводится КБ и КР [1, 2, 10]. В формирующихся нейронах ионы кальция участвуют в регуляции роста клеток и развитии их структурной пластичности. В частности, в формировании конуса роста и развитии дендритов, что по времени совпадает с ростом процентной доли нейронов, содержащих кальций-связывающие белки [11]. У взрослых животных кальций-связывающие белки играют роль кальциевых сенсоров и участвуют в поддержании уровня кальция в нейронах интрамуральных сплетений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доля кальбиндин- и кальретицин-иммунопозитивных нейронов в интрамуральных вегетативных сплетениях двенадцатиперстной кишки крыс в раннем постнатальном онтогенезе возрастает, тогда как с увеличением возраста животных количество кальций-связывающих белков в сенсорных спинномозговых и симпатических узлах наоборот — снижается. Полное формирование нейронов вегетативной нервной системы, содержащих различные виды кальций-связывающих белков, завершается к концу первого месяца жизни. У пожилых и старых крыс количество кальбиндин- и кальретицин-позитивных нейронов в межмышечном и подслизистом сплетениях кишки не изменяется.

Финансирование. Работа не имеет финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Kreutz M.R., Naranjo J.R., Koch K.W., Schwaller B. The neuronal functions of EF-hand Ca^{2+} -binding proteins. *Front. Mol. Neurosci.* 2012; 11(5): 92.
- Schwaller B. Calretinin: from a "simple" Ca^{2+} buffer to a multifunctional protein implicated in many biological processes. *Front. Neuroanat.* 2014; 5(8): 3.
- Викулов А.Д., Маргазин В.А., Бойков В.Л., Каунина Д.В. Кальций — важнейший регулирующий фактор жизнедеятельности организма спортсменов-пловцов. *Спортивная медицина: наука и практика.* 2016; 2: 10–15.
[Vikulov A.D., Marghazin V.A., Boykov V.L., Kaunina D.V. Calcium is the most important regulating factor in the vital activity of the body of swimmer athletes. *Sports medicine: science and practice.* 2016; 2: 10–15 (In Russian).]
- Andressen C., Blumcke I., Celio M.R. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res.* 1993; 271: 181–208.
- Маслюков П.М., Коробкин А.А., Коновалов В.В., Порсева В.В. и др. Возрастное развитие кальбиндин-иммунопозитивных нейронов симпатических узлов крысы. *Морфология.* 2012; 141(1): 77–80.
[Maslyukov P.M., Korobkin A.A., Konovalov V.V., Porseva V.V. et al. Age development of calbindin-immunopositive neurons of sympathetic nodes of the rat. *Morphology.* 2012; 141(1): 77–80 (In Russian).]
- Maslyukov P.M., Korobkin A.A., Nozdrachev A.D., Timmermans J.P. Calbindin-D28k immunoreactivity in sympathetic ganglionic neurons during development. *Auton. Neurosci.* 2012; 167(1–2): 27–33.
- Sayegh A.I., Ritter R.C. Morphology and distribution of nitric oxide synthase-, neurokinin-1 receptor-, calretinin-, calbindin-, and neurofilament-M-immunoreactive neurons in the myenteric and submucosal plexuses of the rat small intestine. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 2003; 271(1): 209–216.
- Maslyukov P.M., Nozdrachev A.D., Timmermans J.-P. Age-related characteristics of the neurotransmitter composition of neurons in the stellate ganglion. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2007; 37(4): 349–353.
- Чучков В.М., Николенко В.Н., Полякова О.Л., Кашин М.И. Гистоархитектоника и морфологические особенности адренергических нервных терминалей в тканях постоянного зуба у детей. *Здоровье, демография, экология финно-угорских народов.* 2015; 3: 68–69.
[Chuchkov V.M., Nikolenko V.N., Polyakova O.L., Kashin M.I. Histoarchitectonics and morphological features of adrenergic nerve terminals in the tissues of a permanent tooth in children. *Health, demography, ecology of Finno-Ugric peoples.* 2015; 3: 68–69 (In Russian).]
- Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н. Методы доклинических исследований в спортивной фармакологии. *Спортивная медицина: наука и практика.* 2013; 1: 7–17.
[Karkishchenko V.N., Karkishchenko N.N. Methods of preclinical research in sports pharmacology. *Sports medicine: science and practice.* 2013; 1: 7–17 (In Russian).]
- Yano S., Tokumitsu H., Soderling T.R. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature.* 1998; 396: 584–587.