

12. Moore K. J., Freeman M. W. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006; 26(8):1702–1711.
13. Song L., Lee C., Schindler C. Deletion of the murine scavenger receptor CD68. *Journal of lipid research*. 2011;52(8):1542–1550.
14. Ashley J. W., Shi Z., Zhao H., Li X., Kesterson R. A., Feng X. Genetic ablation of CD68 results in mice with increased bone and dysfunctional osteoclasts. *PLoS One*. 2011; 6(10):e25838. DOI: 10.1371/journal.pone.0025838
15. Стручко Г. Ю., Меркулова Л. М., Москвичев Е. В. и др. Морфологическая картина и иммуногистохимический фенотип тимуса при вторичной иммунной недостаточности // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2015. Т. 159. № 6. С. 784–788.
16. Gheorghe R. O., Deftu A., Filippi A., Grosu A., Bica-Popi M., Chiritoiu M., Chiritoiu G., Munteanu C., Silvestro L., Ristoiu V. Silencing the Cytoskeleton Protein Iba1 (Ionized Calcium Binding Adapter Protein 1) Interferes with BV2 Microglia Functioning. *Cell Mol Neurobiol*. 2020; 40(6):1011–1027. DOI: 10.1007/s10571-020-00790-w
17. Лузикова Е. М., Шатских О. А., Сергеева В. Е. Адаптогенное действие мелатонина на лимфоидные органы в условиях разных световых режимов. Чебоксары: Чувашский государственный университет имени И. Н. Ульянова, 2019. 160 с.
18. Hartman K., Steiner G., Siegel M., Looney C. M., et al. Expanding the MAPPs Assay to Accommodate MHC-II Pan Receptors for Improved Predictability of Potential T Cell Epitopes. *Biology (Basel)*. 2023;12(9):1265. DOI: 10.3390/biology12091265
19. Лузикова Е. М., Шатских О. А., Ефремова О. А., Сергеева В. Е. Морфофункциональная реакция Iba-I и MHC-II позитивных клеток селезенки на введение мелатонина // *Морфологические ведомости*. 2016. Т. 24. № 4. С. 92–96.

УДК 577.11:611.8:612.64/.65

¹Маслюков П. М., ¹Порсева В. В., ¹Емануйлов А. И., ²Будник А. Ф.

СОМАТОСТАТИН-ИММУНОПОЗИТИВНЫЕ ЭНТЕРАЛЬНЫЕ НЕЙРОНЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫСЫ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

¹Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль,
Российская Федерация

²Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х. М. Бербекова,
Нальчик, Российская Федерация

Аннотация. Целью работы являлось определение локализации, процентного содержания и морфометрических характеристик соматостатин (СОМ)-иммунореактивных нейронов в интрамуральных ганглиях межмышечного (МС) и подслизистого сплетений (ПС) толстой кишки крыс различных возрастных групп.

Методика работы. Работа выполнена на крысах Вистар в возрасте 1, 10, 20, 30, 60 суток и 2 года с использованием иммуногистохимических методов. Основные результаты показали, что СОМ-иммунореактивные нейроны выявляются в большом количестве в толстой кишке уже с момента рождения и на протяжении остальных изучаемых возрастных периодов. В интрамуральных узлах ПС процент СОМ-иммунореактивных нейронов достоверно возрастал в первые 10 суток жизни, а в МС в период с момента рождения до 30 суток жизни. Средняя площадь сечения СОМ-позитивных нейронов в МС и ПС являлась достоверно меньшей по сравнению с иммунонегативными нейронами у 10-суточных и более взрослых крыс.

Ключевые слова: соматостатин, автономная нервная система, интрамуральные ганглии, толстая кишка, онтогенез.

¹Masliukov P. M., ¹Porseva V. V., ¹Emanuilov A. I., ²Budnik A. F.

SOMATOSTATIN IMMUNOPOSITIVE ENTERAL NEURONS OF THE RAT COLON IN POSTNATAL ONTOGENESIS

¹Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russian Federation

²Kabardino-Balkarian State University named after H. M. Berbekov, Nalchik, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to determine the localization, percentage number and morphometric characteristics of somatostatin (SOM)-immunoreactive (IR) neurons in the intramural ganglia of the intermuscular (MS) and submucosal plexus (PS) of the colon of rats of different age groups.

Methodology of the work. The work was performed on Wistar rats at the age of 1, 10, 20, 30, 60 days and 2 years using immunohistochemical methods.

The main results showed that SOM-IR neurons are detected in large numbers in the colon from birth and throughout the remaining age periods studied. In the intramural nodes of the PS, the percentage of SOM-IR neurons significantly increased in the first 10 days of life, and in the MS in the period from birth to 30 days of life. The average cross-sectional area of SOM-IR neurons in the MS and PS was significantly smaller compared to immunonegative neurons in 10-day and older rats.

Keywords: somatostatin, autonomic nervous system, intramural ganglia, colon, ontogenesis.

ВВЕДЕНИЕ

Соматостатин (СОМ) является нейрогормоном и нейротрансмиттером и существует в двух биологически активных формах, содержащих 14 и 28 аминокислот [1, 2]. Достаточно большой процент нейронов превертебральных симпатических узлов экспрессируют СОМ. У морских свинок, крыс и свиней 45–75% превертебральных симпатических нейронов солнечного сплетения являются СОМ-иммунореактивными (ИР) [3,4]. Установлена локализация СОМ в энтеральных нейронах различных животных, в том числе мыши, крысы, морской свинки, свињи и человека [5, 6].

СОМ транзиторно экспрессируется в эмбриональных нейронах симпатических паравертебральных узлов [7]. При этом в постнатальном онтогенезе у крыс и людей экспрессия СОМ в нейронах симпатических паравертебральных узлов снижается с возрастом [8,9], но увеличивается в превертебральных ганглиях [10]. Тем не менее, возрастные аспекты экспрессии СОМ в метасимпатических интрамуральных энтеральных ганглиях остаются неясными.

Целью настоящей работы явилось определение локализации и морфометрических характеристик СОМ-ИР нейронов в интрамуральных ганглиях толстой кишки крыс разного возраста от момента рождения до старости при помощи иммуногистохимических методов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на новорожденных, 10-, 20-, 30-, 60-суточных, 2-летних крысах (по 5 особей в каждой возрастной группе). Исследование проводилось с соблюдением Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ № 775 от 12.08.1977 Минздрава 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 М, pH = 7.4) (БиоЛТ, Россия), затем 4%-ным раствором параформальдегида (Sigma, США) на PBS. После перфузии участок поперечной ободочной 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 СОМ, использовались первичные антитела козы (Santa Cruz, США, разведение 1:300), вторичные антитела были конъюгированы с флуорохромом — индокарбоцианином (Cy3, Jackson, США, разведение 1:100), дающим красную флуоресценцию. Для расчета процента иммунопозитивных нейронов, кроме метки к НPY, 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 флуорохромом флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC, разведение 1:100, Jackson Immunoresearch, США), дающим зеленую флуоресценцию.

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 проведена 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 И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты показали, что СОМ-ИР нейроны обнаруживались в значительном количестве в толстой кишке в интрамуральных ганглиях межмышечного (МС) и подслизистого (ПС) сплетения уже у новорожденных крыс и наблюдались на протяжении остальных изучаемых возрастных периодов (табл. 1). В интрамуральных узлах ПС процент СОМ-ИР нейронов достоверно возрастал в первые 10 суток жизни ($p < 0,05$), а в МС в период с момента рождения до 30 суток жизни ($p < 0,05$, табл. 1).

Таблица 1

ПРОЦЕНТ СОМ-ИР НЕЙРОНОВ В ИНТРАМУРАЛЬНЫХ ГАНГЛИЯХ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ($n = 5$ В КАЖДОЙ ВОЗРАСТНОЙ ГРУППЕ)

Возраст	Межмышечное сплетение	Подслизистое сплетение
Новорожденный	$42 \pm 2,4$	$38 \pm 2,5$
10 суток	$49 \pm 4,3$	$57 \pm 4,7$
20 суток	$51 \pm 5,2^*$	$59 \pm 4,3^*$
30 суток	$64 \pm 4,6^*$	$56 \pm 5,2^*$
2 месяца	$62 \pm 3,2^*$	$58 \pm 5,3^*$
2 года	$66 \pm 4,2^*$	$61 \pm 5,8^*$

* — $p < 0,05$, различия достоверны по сравнению с новорожденными и 10-суточными животными.

Средняя площадь сечения СОМ-ИР нейронов увеличивалась в онтогенезе с момента рождения в течение первых двух месяцев жизни (табл. 2). В МС и ПС средний размер СОМ-ИР клеток был достоверно меньше средней площади сечения иммунонегативных нейронов у 10-суточных и более взрослых крыс ($p < 0,05$).

Таблица 2

СРЕДНИЕ ПЛОЩАДИ СЕЧЕНИЯ СОМ-ИР (+) И СОМ-НЕГАТИВНЫХ (–) НЕЙРОНОВ В ИНТРАМУРАЛЬНЫХ ГАНГЛИЯХ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ($n = 100$ В КАЖДОЙ ВОЗРАСТНОЙ ГРУППЕ)

Возраст	Межмышечное сплетение		Подслизистое сплетение	
	СОМ +	СОМ –	СОМ +	СОМ –
Новорожденный	$85 \pm 6,4$	$93 \pm 6,8$	$78 \pm 6,4$	$84 \pm 7,5$
10 суток	$126 \pm 5,7$	$154 \pm 6,3^*$	$112 \pm 3,9$	$137 \pm 6,3^*$
20 суток	$135 \pm 5,9$	$161 \pm 7,1^*$	$123 \pm 6,3$	$155 \pm 9,3^*$
30 суток	$144 \pm 6,3$	$167 \pm 8,4^*$	$132 \pm 9,6$	$168 \pm 11,2^*$
2 месяца	$151 \pm 8,2$	$186 \pm 8,7^*$	$143 \pm 11,1$	$183 \pm 9,5^*$
2 года	$165 \pm 12,4$	$201 \pm 11,5^*$	$154 \pm 8,9$	$197 \pm 12,3^*$

* — $p < 0,05$, различия достоверны по сравнению с СОМ-ИР нейронами.

Мы обнаружили СОМ-ИР нейроны в МС и ПС толстой кишки в большом количестве уже у новорожденных. При этом доля СОМ-ИР энтеральных нейронов увеличивается в раннем онтогенезе и не изменяется у взрослых и старых крыс. В превертебральных симпатических узлах у крыс также наблюдается возрастание процента СОМ-ИР нейронов в течение первого месяца жизни [8], однако в паравертебральных узлах доля СОМ-ИР нейронов уменьшается.

В онтогенезе размеры нейронов узлов автономной нервной системы возрастают [11, 12]. Основное увеличение размеров нейронов интрамуральных ганглиев тонкой кишки, в том числе СОМ-ИР, мы наблюдали в первые 10 суток жизни, что соответствует нашим ранее полученным данным [11, 12].

Учитывая, что нейроны ПС участвуют в регуляции секреции, можно предположить, что в возрасте 20–30 суток происходит окончательное формирование секреторной функции толстой кишки, связанное с переходом с молочного питания на самостоятельное. При этом СОМ может играть особую роль в становлении функции толстой кишки, действуя не только в качестве котрансммиттера, но и как трофический фактор. Основной медиатор симпатических нейронов норадреналин, а также СОМ модулируют моторику и секрецию органов пищеварения, оказывая тормозное влияние. В кишке СОМ играет также важную роль в модулировании функций иммунных клеток и эпителиального барьера. Имеются данные о том, что СОМ участвует в уменьшении воспалительных реакций в кишечнике [13, 14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в большинстве узлов автономной нервной системы у грызунов в процессе возрастного развития происходит увеличение доли СОМ-содержащих нейронов. Этот процесс в различных ганглиях протекает гетерохронно. Наряду с этим СОМ играет важную роль в процессах возрастного развития нейронов автономной нервной системы. Детальное исследование СОМ-ергической системы позволит существенно расширить наши представления о нейропептидной системе регуляции функций организма.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-25-00141).

ЛИТЕРАТУРА

1. Kumar U., Grant M. Somatostatin and somatostatin receptors. *Results Probl Cell Differ.* 2010; 50:137–184. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/400_2009_29
2. Ampofe E., Nalbach L., Menger M. D., et al. Regulatory Mechanisms of Somatostatin Expression. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(11):4170. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21114170>
3. Szurszewski J. H., Linden D. R. Physiology of Prevertebral Sympathetic Ganglia / In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* Vol. 1. Elsevier Inc., 2012. P. 583–627.
4. Masliukov P. M., Emanuilov A. I., Nozdrachev A. D. Developmental changes of neurotransmitter properties in sympathetic neurons. *Adv Gerontol.* 2016; 29(3):442–453.
5. Mongardi Fantaguzzi C., Thacker M., Chiochetti R., Furness J. B. Identification of neuron types in the submucosal ganglia of the mouse ileum. *Cell Tissue Res.* 2009; 336:179–189. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0773-2>

6. *Gonkowski S., Całka J.* Changes in the somatostatin (SOM)-like immunoreactivity within nervous structures of the porcine descending colon under various pathological factors. *Exp. Mol. Pathol.* 2010; 88:416–423. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2010.01.011>.
7. *Huang T., Hu J., Wang B., Nie Y., Geng J., Cheng L.* Tlx3 controls cholinergic transmitter and Peptide phenotypes in a subset of prenatal sympathetic neurons. *J Neurosci.* 2013; 33(26):10667–10675. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0192-13.2013>.
8. *Маслюков П. М., Ноздрачев А. Д., Тиммерманс Дж. П.* Возрастные особенности нейротрансмиттерного состава нейронов звездчатого узла // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2006. Т. 92(2). С. 214–221.
9. *Roudenok V., Kuhnel W.* Distribution of vasoactive intestinal polypeptide-, calcitonin gene-related peptide-, somatostatin- and neurofilament-immunoreactivities in sympathetic ganglia of human fetuses and premature neonates. *Ann Anat.* 2001; 183:213–216.
10. *Емануйлов А. И., Порсева В. В., Павлов А. В., Маслюков П. М.* Возрастное развитие соматостатинергических нейронов симпатических превертебральных узлов // Сеченовский вестник. 2023. Т. 14(3). С. 28–36. DOI: <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2023.14.3.28-36>
11. *Маслюков П. М., Будник А. Ф., Ноздрачев А. Д.* Нейрохимические особенности узлов метасимпатической системы в онтогенезе // Успехи геронтологии. — 2017. Т. 30. № 3. С. 347–355.
12. *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.* 2017; 37(7):1257–1267. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0457-x>
13. *Van Op den Bosch J., Adriaensen D., Van Nassauw L., Timmermans J. P.* The role(s) of somatostatin, structurally related peptides and somatostatin receptors in the gastrointestinal tract: a review. *Regul Pept.* 2009; 156(1-3):1–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.04.003>
14. *Masliukov P. M., Emanuilov A. I., Budnik A. F.* Sympathetic innervation of the development, maturity, and aging of the gastrointestinal tract. *Anat Rec (Hoboken).* 2023; 306(9):2249–2263. DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.25015>

УДК [572.776:616.71-001.5]-089

¹Матчин А. А., ¹Стадников А. А., ¹Носов Е. В., ²Клевцов Г. В., ²Растегаев И. А.

КОНФОКАЛЬНАЯ ЛАЗЕРНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ОСТЕОИНТЕГРАЦИОННЫХ СВОЙСТВ ТИТАНОВЫХ МАТЕРИАЛОВ

¹Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург,
Российская Федерация

²Тольяттинский государственный университет, Тольятти, Российская Федерация

Аннотация. Цель работы — продемонстрировать возможности использования конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) для оценки остеointegrационных свойств медицинских изделий, применяемых в челюстно-лицевой хирургии.