

Отчет о проверке на заимствования №2



Автор: Моисеев Константин Юрьевич
 Проверяющий: (mky_yma@mail.ru / ID: 8291247)

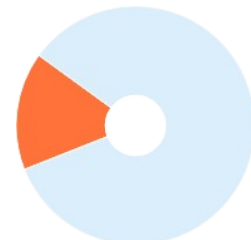
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <https://users.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 1
 Начало загрузки: 01.10.2020 12:19:27
 Длительность загрузки: 00:00:04
 Имя исходного файла:
 moiseev_dissertatsia_final.pdf
 Название документа:
 moiseev_dissertatsia_final
 Размер текста: 1 кБ
 Символов в тексте: 177900
 Слов в тексте: 21404
 Число предложений: 2923

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
 Начало проверки: 01.10.2020 12:33:27
 Длительность проверки: 00:00:27
 Комментарии: не указано
 Модули поиска: Модуль поиска Интернет



ЗАИМСТВОВАНИЯ

15,73%

САМОЦИТИРОВАНИЯ

0%

ЦИТИРОВАНИЯ

0%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

84,27%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
 Самоцитирования — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.
 Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
 Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
 Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
 Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
 Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
 Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

| № | Доля в отчете | Источник | Ссылка | Актуален на | Модуль поиска |
|------|---------------|---|---|-------------|------------------------|
| [01] | 3,15% | [pdf] | http://kpfu.ru | 05 Фев 2017 | Модуль поиска Интернет |
| [02] | 1,06% | [pdf] | http://kpfu.ru | 05 Фев 2017 | Модуль поиска Интернет |
| [03] | 0,77% | [pdf] | http://kpfu.ru | 05 Фев 2017 | Модуль поиска Интернет |
| [04] | 0,44% | Газообразные посредники как эндогенные модуляторы освобождения медиатора... | http://earthpapers.net | 11 Сен 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [05] | 0,54% | Газомедиаторы: от токсических эффектов к регуляции клеточных функций и испо... | https://cyberleninka.ru | 05 Мая 2020 | Модуль поиска Интернет |
| [06] | 1,39% | Диссертация на тему «Морфология краниального шейного узла и функциональн... | http://dissercat.com | 09 Янв 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [07] | 0,68% | [International Review of Cytology] Volume 205 Growth and neurotrophic factors reg... | https://doi.org | 22 Окт 2019 | Модуль поиска Интернет |
| [08] | 0,63% | Нейронный состав серого вещества спинного мозга и спинномозгового узла: стр... | https://iemspb.ru | 11 Июл 2020 | Модуль поиска Интернет |
| [09] | 0,45% | The Spinal Cord Spinal Autonomic Preganglionic Neurons: the visceral efferent syste... | https://doi.org | 06 Сен 2019 | Модуль поиска Интернет |
| [10] | 0,51% | [Vitamins & Hormones] Nitric Oxide Volume 96 Nitric Oxide in the Nervous System | https://doi.org | 24 Авг 2019 | Модуль поиска Интернет |
| [11] | 0,76% | Development of non-catecholaminergic sympathetic neurons in para- and prevertebral... | https://doi.org | 01 Сен 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [12] | 0,62% | Stereological and allometric studies on neurons and axo-dendritic synapses in the supe... | https://doi.org | 12 Мая 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [13] | 0,81% | Полный текст (5/8) | https://istina.msu.ru | 18 Окт 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [14] | 0,72% | Neuronal organization and cell interactions of the cat stellate ganglion | https://doi.org | 20 Сен 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [15] | 0,71% | Диссертация | http://iephb.ru | 26 Окт 2017 | Модуль поиска Интернет |
| [16] | 0,48% | Роль циклических нуклеотидов в реализации эффектов оксида азота (II) на секрец... | http://earthpapers.net | 24 Апр 2016 | Модуль поиска Интернет |
| [17] | 0,59% | The effect of nitric oxide on the efficacy of synaptic transmission through the chick ciliar... | https://doi.org | 06 Сен 2018 | Модуль поиска Интернет |
| [18] | 0,55% | Handbook of Neurotoxicity | https://doi.org | 18 Дек 2018 | Модуль поиска Интернет |

Текст документа

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования "Ярославский государственный медицинский

университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи 8

Моисеев Константин Юрьевич

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НО-ОПОСРЕДОВАННОЙ

СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ В СИМПАТИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ

СИСТЕМЕ КРЫС

03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Ярославль – 2020

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,

профессор Маслюков П.М.

2

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ 5

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 14

1.1. Морфологическая характеристика связей преганглионарных нейронов

спинного мозга с краниальным шейным ганглием 14

1.1.1. Спинномозговые симпатические ядра 14

1.1.2. Связи краниального шейного ганглия с сегментами спинного мозга
..... 16

1.1.3. Нейрохимический состав преганглионарных нейронов 17

1.1.4. Структурная организация шейного симпатического ствола 18

1.1.5. Анатомия КШГ 19

1.1.6. Синаптические окончания в КШГ 20

1.2. Морфологические особенности связей преганглионарных нейронов

спинного мозга с краниальным шейным ганглием в онтогенезе 21

1.2.1. Изменения структурной организации преганглионарных нейронов в
онтогенезе. 21

1.2.2. Возрастные изменения шейного симпатического ствола и нейронов
КШГ 23

1.2.3. Особенности синаптических контактов симпатических
преганглионарных нейронов в онтогенезе 24

1.3. Функциональные особенности фоновой электрической активности и
синаптической передачи в КШГ 26

1.3.1. Проведение возбуждения через КШГ 26

1.3.2. Ритмические разряды в эфферентных симпатических волокнах 27

1.4. Функциональные характеристики фоновой электрической активности и
синаптической передачи в КШГ в онтогенезе 28

1.4.1. Возрастные изменения проведения возбуждения по шейному
симпатическому стволу и через КШГ в онтогенезе 28

1.4.2. Изменения фоновой электрической активности нервных волокон в
постнатальном онтогенезе 29

1.5. Оксид азота – как модулятор синаптической передачи 31

1.5.1. Молекулярные механизмы эффектов оксида азота..... 31

3

1.5.2. Влияние оксида азота на синаптическую передачу в центральной

| | |
|---|-----|
| нервной системе | 33 |
| 1.5.3. Влияние оксида азота на синаптическую передачу в периферической нервной системе | 35 |
| 1.5.4. pNOS-иммунореактивность в симпатических узлах | 39 |
| 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 40 |
| 2.1. Обоснование выбора объектов изучения | 40 |
| 2.2. Постановка эксперимента | 40 |
| 2.3. Электрофизиологические методы исследований | 42 |
| 2.3.1. Регистрация и анализ фоновой активности во внутреннем сонном нерве краниального шейного узла | 42 |
| 2.3.2. Регистрация и анализ вызванных электрических потенциалов в постганглионарных волокнах внутреннего сонного нерва. | 44 |
| 2.4. Иммуногистохимический метод | 45 |
| 2.5. Вестерн – блоттинг | 48 |
| 2.6. Использованные физиологически активные вещества и растворы. | 49 |
| 2.7. Статистическая обработка данных | 50 |
| 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ | 51 |
| 3.1. Влияние оксида азота на фоновую электрическую активность в постганглионарных волокнах КШГ в онтогенезе | 51 |
| 3.1.1. Фоновая эфферентная активность в постганглионарных волокнах КШГ в онтогенезе | 51 |
| 3.1.2. Влияние блокатора синтеза NO и донора NO на фоновую электрическую активность КШГ в онтогенезе | 55 |
| 3.1.3. Влияние мембранопроникающих аналогов цГМФ и специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы на фоновую электрическую активность постганглионарных волокон в онтогенезе | 56 |
| 3.2. Влияние оксида азота на вызванную электрическую активность волокон КШГ в постнатальном онтогенезе | 59 |
| 3.2.1. Вызванные электрические ответы в КШГ в постнатальном онтогенезе | 59 |
| 3.2.2. Влияние донора NO и блокатора синтеза NO на вызванную электрическую активность волокон КШГ в постнатальном онтогенезе .. | 61 |
| 4 | |
| 3.2.3. Воздействие препаратов, влияющих на гуанилатциклазную систему на вызванную электрическую активность волокон КШГ в постнатальном онтогенезе | 65 |
| 3.3. Иммуногистохимические особенности преганглионарных pNOS-ИР нейронов спинного мозга | 69 |
| 3.3.1. Локализация pNOS-ИР нейронов в автономных симпатических ядрах спинного мозга | 69 |
| 3.3.2. Солокализация pNOS с холинацетилтрансферазой | 72 |
| 3.3.3. Солокализация pNOS с кальбиндином | 76 |
| 3.3.4. Солокализация pNOS с кальретином | 78 |
| 3.3.5. Солокализация pNOS с CART | 82 |
| 3.3.6. Экспрессия pNOS по данным вестерн-блоттинга | 85 |
| 3.4. Распределение pNOS в краниальном шейном симпатическом ганглии | 86 |
| 3.4.1. pNOS-позитивные преганглионарные волокна | 86 |
| 3.4.2. Солокализация pNOS с XAT, KP и CART. | 87 |
| 3.4.3. Результаты вестерн-блоттинга. | 90 |
| 4. ОБСУЖДЕНИЕ | 91 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 99 |
| ВЫВОДЫ | 101 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 103 |

АЦП – аналого-цифровой преобразователь

ИР - иммунореактивные

КБ – кальбиндин

КР - кальренин

КШГ - краниальный шейный ганглий

НАДФН - никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат

НН – нитропруссид натрия

ХАТ - холинацетилтрансфераза

цГМФ – циклический гуанозин монофосфат

8Br-цГМФ - мембранопроникающий аналог цГМФ

СА – центральная автономная область

CART - кокаин- и амфетамин- регулируемый транскриптом

СУЗ - индокарбоцианин

FITC – флюоресцеин-изотиоцианат

L- NAME - G-нитро-L-аргинин метиловый эфир, блокатор NO-синтазы 2

nNOS – нейрональная NO-синтаза

NO – монооксид азота

nucl.IC - nucleus intercalatus spinalis

nucl.ICpe - nucleus intercalatus spinalis pars paraependymalis

nucl.IIf - nucleus intermediolateralis thoracolumbalis pars funicularis

nucl.IIp - nucleus intermediolateralis thoracolumbalis pars principalis

ODQ - специфический ингибитор растворимой гуанилатциклазы

PGP9.5 - специфический нейрональный белок (нейромаркер)

6

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Исследование механизмов

синаптической передачи в ганглиях автономной (вегетативной) нервной

системы представляет большой интерес для нейробиологии и

нейрофизиологии в частности. Это связано с тем, что в отличие от

центральной нервной системы, периферические ганглии обладают более

простыми связями, а также более удобны для изучения в связи с их

периферической локализацией. Также изучение различных аспектов

нейронной организации автономных узлов оказывается полезным не только

для фундаментальной, но и для клинической медицины, поскольку

патологические процессы в ганглиях могут вызывать различные заболевания.

К наиболее распространенным относят болезнь Рейно, возникающую при

нарушении работы верхних грудных паравертебральных узлов, а также

болезнь Гиршпрунга, связанную с недостаточным развитием

метасимпатических интрамуральных ганглиев толстой кишки.

Согласно классическим представлениям, передача возбуждения с

преганглионарных волокон на нейроны ганглиев автономной нервной

системы осуществляется за счет медиатора ацетилхолина (А.Д.Ноздрачев,

1969, 1978, 1983; В.И.Скок, 1970; А.Д.Ноздрачев, Ю.П.Пушкарев, 1980). В

последующем было показано, что многие нейроны, в том числе и в

автономной нервной системе, содержат одновременно несколько

нейротрансмиттеров, в том числе помимо классических нейромедиаторов –

нейропептиды, а также молекулы газов – оксида азота, сероводорода и

угарного газа (А.Д.Ноздрачев, П.М.Маслюков, 2014; Furness, Stebbing, 2018).

Оксид азота (NO) является универсальной сигнальной молекулой в

мозге и в других органах тела. Он вовлечен в множество функций, в том

числе в ретроградной передаче сигналов, синаптической пластичности,

внутриклеточной регуляции (Н.В.Гуляева, 1995; В.Г.Башкатова,

К.С.Раевский, 1998; О.А.Любашина, А.Д.Ноздрачев, 2008; Garthwaite, 2008,

2018; Förstermann, Sessa, 2012; Г.Ф.Ситдикова с соавт., 2014; Kourosh-Arami

et al., 2020), регуляции кровотока (Zhang et al., 2014; Gaynullina et al., 2019; Ataei Ataabadi et al., 2020) и психических процессов (Д.И.Перегуд с соавт., 2017; Tripathi et al., 2020). Было показано, что NO участвует в осуществлении различных процессов развития (Gray, Cheung, 2014; Gaynullina et al., 2019). Фермент синтеза NO – нейрональная NO-синтаза (nNOS) - в симпатической нервной системе млекопитающих выявляется в преганглионарных нейронах спинного мозга и солокализована с ферментом синтеза ацетилхолина – холинацетилтрансферазой (XAT) (Grcovic, Anderson, 1997; Navickaite et al., 2020). Установлено, что NO может оказывать как облегчающее, так и тормозное действие на синаптическую передачу в нервно-мышечном синапсе и узлах автономной нервной системы (Cetiner, Bennett, 1993; Alkadhi et al., 2006; Г.Ф.Ситдикова с соавт., 2014).

В постнатальном онтогенезе функциональные характеристики нейронов автономной нервной системы и их нейрохимический состав претерпевают изменения. Трансформируется амплитуда и частота потенциалов действия, возрастают размеры нервных клеток, солокализация нейротрансмиттеров также может модифицироваться (А.Д.Ноздрачев, П.М.Маслюков, 2014).

Тем не менее, несмотря на большое количество работ, посвященных роли NO в регуляции деятельности внутренних органов, прежде всего системы кровообращения, влияние NO на синаптическую передачу в автономной нервной системе, в частности в узлах симпатической нервной системы, остается малоисследованным. Отсутствуют сведения о возрастных особенностях действия NO на передачу возбуждения в синапсах симпатических ганглиев, а также о структурно-функциональных особенностях пре- и постганглионарных нейронов и волокон, содержащих оксид азота и их изменениях в постнатальном онтогенезе.

Степень разработанности темы. В онтогенезе нейронная организация ганглиев автономной нервной системы сопровождается возрастными изменениями, сопровождающимися изменением морфологии

8

нейронов, проявляющейся в увеличении размеров клеток и числа дендритов (Шевелева В.С., 1977; Purves, 1985; Masliukov, 2000; Hao et al., 2016), изменением нейрохимических особенностей (Masliukov, Timmermans, 2004; А.Д.Ноздрачев, П.М.Маслюков, 2014), а также электрофизиологических характеристик нейронов (Foong et al., 2012; 2015). В основном, имеющиеся сведения касаются морфо-функциональных особенностей холинергической передачи. Однако, данные об особенностях модуляции синаптической передачи оксидом азота в постнатальном онтогенезе отсутствуют.

Цель и задачи исследования. В связи с этим, целью данной работы явилось выявление структурно-функциональных особенностей NO-опосредованной синаптической передачи в симпатическом краниальном шейном ганглии (КШГ) крыс в постнатальном онтогенезе.

Конкретные задачи исследования включали:

1. Выявление эффектов NO на фоновую импульсацию симпатических нервов КШГ у крыс в постнатальном онтогенезе.
2. Определение влияния NO на вызванную электрическую активность в КШГ у животных разного возраста.
3. Установление локализации и нейрохимических характеристик нейронов, содержащих нейрональную NO синтазу (nNOS), а также экспрессии nNOS в преганглионарных симпатических нейронах в постнатальном онтогенезе.
4. Выявление экспрессии nNOS и нейрохимических особенностей nNOS-позитивных преганглионарных волокон в КШГ в процессе возрастного развития.

Научная новизна исследования.

В данной работе впервые установлены возрастные особенности влияния донора NO и блокатора nNOS на синаптическую передачу в краниальном шейном симпатическом узле. Показано что NO оказывает облегчающее влияние на синаптическую передачу симпатическом узле с 20 суток жизни. Впервые подтверждено, что действие NO на синаптическую передачу в симпатических узлах опосредуется гуанилатциклазной системой с 20 суток жизни.

Впервые показано, что влияние блокатора синтеза NO и донора NO, а также воздействие мембранопроникающих аналогов цГМФ и специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы на вызванную активность симпатических постганглионарных нейронов у крыс в возрасте 20 суток и старше носит дозозависимый характер.

Впервые выявлено, что в раннем постнатальном онтогенезе в преганглионарных симпатических нейронах происходит снижение экспрессии nNOS и увеличение числа нейронов, содержащих XAT. Также установлено, что преганглионарные nNOS-иммунопозитивные волокна в симпатических узлах отсутствуют к моменту рождения, появляются к 10 суткам. Экспрессия nNOS в симпатических узлах, в отличие от спинного мозга, возрастает с момента рождения.

В данной работе впервые получены данные о солокализации nNOS с холинацетилтрансферазой (XAT), кальбиндином (КБ), кальретицином (КР) и кокаин- и амфетамин- регулируемым транскриптом (CART) в преганглионарных симпатических нейронах в спинном мозге и преганглионарных волокнах КШГ в постнатальном онтогенезе. Впервые показано, что в раннем постнатальном онтогенезе в преганглионарных симпатических нейронах происходит снижение экспрессии nNOS и увеличение числа нейронов, содержащих XAT.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Симпатические узлы новорожденных крыс характеризуются незрелостью синаптической передачи, проявляющейся в низкой амплитуде фоновой импульсации, отсутствием ритмических колебаний, однофазными вызванными потенциалами и нечувствительностью к действию NO.

2. Оксид азота оказывает облегчающее влияние на синаптическую передачу в симпатических узлах с 20 суток жизни. Эффекты оксида

азота на синаптическую передачу в симпатических узлах опосредуются на протяжении постнатального онтогенеза при участии растворимой гуанилатциклазы.

3. Имеется гетерохрония в развитии NO-ергических и холинергических структур на уровне преганглионарных симпатических нейронов и симпатических узлов. Экспрессия nNOS снижается в телах преганглионарных симпатических нейронов и возрастает в преганглионарных терминалях в симпатических ганглиях в раннем постнатальном онтогенезе.

Теоретическая и практическая значимость. В результате исследования получены новые данные, раскрывающие структурно-функциональные особенности NO-ергической модуляции синаптической передачи в симпатических узлах в онтогенезе.

Исследование влияния NO-ергической системы на синаптическую передачу на разных этапах постнатального онтогенеза дает возможность в дальнейшем использовать полученные данные для формирования рекомендаций по коррекции ряда патологических состояний ЦНС,

обусловленных (или связанных) с нарушением синаптической передачи вегетативной нервной системе (болезни Рейно и болезни Гиршпрунга), а также могут быть использованы для разработки новых подходов для создания фармакологических препаратов, влияющих на NO-ергическую передачу.

Полученные сведения о влиянии NO на синаптическую передачу также представляют интерес для понимания нейрохимических и функциональных особенностей пре- и постганглионарных нейронов симпатической нервной системы, а также механизмов регуляции эмбрионального и постнатального развития нервной системы, могут использоваться в проведении морфологического и физиологического эксперимента, в учебном процессе и, с учетом видовых особенностей, экстраполироваться на человека. Конкретные результаты проведенного

11

исследования могут использоваться как новые сведения о структуре и функции пре- и постганглионарных нейронов симпатической нервной системы в учебном процессе на кафедрах анатомии, гистологии и физиологии.

Методология и методы исследования. Эксперименты проводились на самцах крыс Wistar разного возраста: новорожденные, 10- 20-, 30-суточные, 2-, 6-месячные, 3-летние. Экспериментальные протоколы соответствовали этическим нормам по гуманному обращению с животными, принятым в Ярославском государственном медицинском университете и одобрены локальным этическим комитетом. Все меры были предприняты для минимизации числа используемых в экспериментах животных (общее количество используемых животных – 140).

В качестве методов исследования использовали:

1. Нейрофизиологические. Регистрация и анализ фоновой активности в наружном сонном нерве краниального шейного узла, регистрация и анализ вызванных электрических потенциалов в постганглионарных волокнах внутреннего сонного нерва под влиянием донора NO - нитропрусида натрия и неконкурентного ингибитора NO синтазы N(G)-нитро-L-аргинина метилового эфира (L-NAME), а также мембранопроникающего аналога цГМФ 8Br-цГМФ и специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы ODQ.

2. Иммуногистохимические. Выявление методом двойного мечения нейрональной NO-синтазы, холинацетилтрансферазы, кальбиндина, кальретицина, кокаин- и амфетамин- регулируемого транскрипта в спинном мозге и краниальном шейном узле.

3. Вестерн блоттинг. Определение экспрессии нейрональной NO-синтазы в сегменте Th2 спинного мозга и краниальном шейном узле. Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментальных данных и статистическими методами анализа.

12

Степень достоверности данных. Представленные в работе данные получены с использованием современных общепринятых экспериментальных методик; результаты, представленные в работе, статистически достоверны и воспроизводимы. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием актуальной тематической литературы.

Публикации. Апробация результатов. Материалы диссертации представлены на всероссийских и международных конференциях: II

Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные проблемы нейробиологии. Структура и функции нервной системы в норме и патологии» (Ярославль, 2016), XIII Международная

школа-конференция, посвященная 65-летию кафедры охраны здоровья человека института фундаментальной медицины и биологии КФУ. (Казань, 2016), объединенный V съезд физиологов СНГ и V съезд биохимиков России (Сочи – Дагомыс, Россия, 2016), XIII международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». (Судак 4, Крым, Россия, 2017), XXIII съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова (Воронеж, 2017), 10 конгресс International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN) (Нагоя, Япония, 2017), 47 съезд Society for Neuroscience (SfN) (Вашингтон, США, 2017), V съезд фармакологов России "Научные основы поиска и создания новых лекарств (Ярославль, 2018), XIV международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак 4, Крым, Россия, 2018), Медицинский профессорский форум «Межотраслевая интеграция и передовые технологии в здравоохранении» (Ярославль, 2018).

По материалам работы было опубликовано 14 работ: 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, соответствующих перечню ВАК, индексируемых в базах данных Web of Science или Scopus и 10 тезисов докладов всероссийских и международных конференций. Публикации 13

полностью соответствуют теме научно-квалификационного исследования и раскрывают её основные положения.

Личный вклад автора. Соискатель принимал непосредственное личное участие во всех этапах работы: анализе литературы, формулировке цели и задач исследования, планировании и проведении экспериментов, статистической обработке и обобщении результатов, написании статей и тезисов, представлении результатов работы на российских и международных конференциях.

Структура работы. Материалы диссертационной работы изложены на 126 страницах. Работа состоит из обзора литературы по выбранной теме, описания материалов и методов, использованных при выполнении данной работы, описания результатов и их обсуждения, а также заключения и выводов. Диссертация иллюстрирована 18 таблицами и 30 рисунками.

Список использованной литературы включает 228 источников, в том числе 40 отечественных и 188 иностранных.

14

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Морфологическая характеристика связей преганглионарных нейронов спинного мозга с краниальным шейным ганглием

1.1.1. Спинномозговые симпатические ядра

Ранее, довольно длительное время считалось, что симпатические преганглионарные нейроны располагаются только в боковых рогах спинного мозга. Более поздние морфологические исследования, проведенные на обезьянах (Petras, Cummings, 1972), показали, что симпатические преганглионарные нейроны располагаются не только в боковом роге, получившем название интермедиолатерального клеточного столба (nucleus intermediolateralis thoracolumbalis pars principalis - nucl.ILp), но еще в 8 ядрах:

1) nucleus intermediolateralis thoracolumbalis pars funicularis (nucl.ILf); 2) nucleus intercalatus spinalis (nucl.IC); 3) nucleus intercalatus spinalis pars paraependymalis (nucl.ICpe 13); 4) nucleus intermediomedialis (nucl.IMm); nucleus intermediolateralis sacralis (nucl.IMS); 5) nucleus intermediolateralis sacralis pars principalis (nucl.ILsp); 6) nucleus intermediolateralis sacralis pars funicularis (nucl.ILsf); 7) nucleus intercalatus disseminata (nucl.ICd); 8) central autonomic area (CA) (А.Д.Ноздрачев, М.М.Фатеев, 2002; Paxinos, Watson, 2005; Wang et al., 2018; Navickaite et al., 2020).

15

Рис. 1. Схема локализации симпатических ядер на поперечном срезе

спинного мозга макаки резус (по Petras, Cummings, 1972 с изменениями).

ILp - nucl. intermediolateralis thoracolumbalis pars principalis; ILf - nucl.

intermediolateralis thoracolumbalis pars funicularis; IC - nucl. intercalatus spinalis;

ICpe - nucl. intercalatus spinalis pars paraependymalis.

Используя пероксидазный метод, были получены более точные

данные по локализации симпатических преганглионарных нейронов, аксоны

которых образуют синапсы на нейронах пре- и паравертебральных ганглиев у

разных видов животных: кошки (Chung et al., 1975; Chung et al., 1979b;

Dembowsky et al., 1985; А.Д.Ноздрачев, М.М.Фатеев, 2002), собаки (Faden et

al., 1978; Petras et al., 1978), морской свинки (Dalsgaard et al., 1979; McLachlan

et al., 1985), крысы (Pyner et al., 1994a; Pyner et al., 1994b; Fenwick et al., 2006).

В этих работах также было установлено, что боковые рога спинного мозга

являются не единственным местом расположения симпатических

преганглионарных нейронов. Наличие неклассических преганглионарных

нейронов было установлено и в электрофизиологических экспериментах

(В.П.Лебедев, В.А.Скобелев, 1974; В.П.Лебедев с соавт., 1976; Wang et al.,

2018). В результате проведенных исследований на кошках, в

тораколумбальном отделе спинного мозга можно выделить 5 ядер,

16

содержащих меченые пероксидазой симпатические преганглионарные

нейроны: nucl.Ilp, nucl.Ilf, nucl.IC, nucl.ICpe, nucl.IMm, а также в

латеральной и медиальной части вентрального рога, вне nucl.Imm.

Преганглионарные нейроны образуют компактные популяции колонок

по висцеротопическому принципу, различные для отдельных органов-

мишеней. Так, например, у крысы преганглионарные нейроны, посылающие

аксоны к краниальному шейному узлу лежат наиболее медиально,

посылающие отростки к звездчатому ганглию - центрально и к мозговому

веществу надпочечников - более латерально. Характер ветвления дендритов и

их направление зависят от типа иннервируемого органа-мишени (Pyner,

Coote, 1994a). Аксоны преганглионарных нейронов выходят из того же

сегмента, где находятся тела этих клеток (Dembowsky et al., 1987; Ladd et al.,

2014; Wang et al., 2018).

1.1.2. Связи краниального шейного ганглия с сегментами

спинного мозга

Связи краниального шейного ганглия с сегментами спинного мозга в

основном были изучены путем ретроградного аксонного транспорта

маркеров, вводимых в сам узел. Так у морской свинки при введении

пероксидазы в краниальный шейный ганглий меченые нейроны были

обнаружены в nucl.Ilp и nucl.Ilf - в сегментах CVIII-ThVI, а в nucl.IC и

nucl.ICpe - в сегментах ThI-ThVII спинного мозга (Dalsgaard, Elfvin, 1979a).

При введении пероксидазы в краниальный шейный ганглий у кошки

меченые нейроны в nucl.Ilp обнаружены в сегментах CVIII-ThVIII

(А.Н.Шабанов, 1981) и ThI-ThVII (В.П.Бабминдра с соавт., 1984), nucl.Ilf - в

сегментах CVIII-ThIV (А.Н.Шабанов, 1981), ThI-ThVI (В.П.Бабминдра с

соавт., 1984), nucl.IC - в сегментах CVIII-ThVI (А.Н.Шабанов, 1981) и ThI-

ThV (В.П.Бабминдра с соавт., 1984), nucl.ICpe - в сегментах CVIII-ThV

(А.Н.Шабанов, 1981) и ThI-ThV (В.П.Бабминдра с соавт., 1984), в

17

вентральном роге - в сегментах ThI-ThIV (А.Н.Шабанов, 1981;

В.П.Бабминдра с соавт., 1984) спинного мозга.

Введение меток Fast blue и пероксидазы в КШГ крысы

продемонстрировало, что 90 % меченых нейронов обнаруживались в nucl.Ilp

и nucl.Ilf, и небольшая часть - в CA и nucl.IC (Yamamoto et al., 1989; Pyner,

Coote, 1994a; Wang et al., 2018). Также у крысы большинство ретроградно

меченых нейронов КШГ были локализованы в Т1-Т3 сегментах спинного мозга и с максимумом в сегменте Т2 (Rando et al., 1981; Klimaschewski et al., 1995; Wang et al., 2018). Тем не менее, данные о спинальном распределении преганглионарных нейронов, связанных с КШГ, в nucl.II_p у крыс противоречиво (Wang et al., 2018): от С8 до Т5 (Rando et al., 1981; Strack et al., 1988; Pyner, Coote, 1994b; Klimaschewski et al., 1995), от С8 до Т7 (Hosoya et al., 1991), от Th1 до Th4 (Teclerariam-Mesbah et al., 1997; Wang et al., 2018) и ThI-ThV (Fenwick et al., 2006).

1.1.3. Нейрохимический состав преганглионарных нейронов

Известно, что основным нейротрансмиттером симпатических преганглионарных нейронов является ацетилхолин. Холинергические нейроны содержат фермент синтеза ацетилхолина – холинацетилтрансферазу (ХАТ) (Barber et al., 1984; Wetts et al., 1994). Литературные данные свидетельствуют о том, что в вышеупомянутых нейронах наряду с ХАТ выявляется фермент синтеза оксида азота NO-синтаза (NOS) (Anderson, 1992; Wetts et al., 1994; Grkovic, Anderson, 1997; Navickaite et al., 2020). В отличие от симпатических узлов, подавляющее большинство симпатических преганглионарных нейронов млекопитающих содержит NO-синтазу **13**, которая при этом солокализована с ферментом синтеза ацетилхолина – холинацетилтрансферазой (ХАТ **13**) (Hinrichs, Llewellyn-Smith, 2009). При этом подавляющая часть таких нейронов является иммунореактивной к ЦГМФ

18

(Powers-Martin et al., 1996). У крысы большинство nNOS-позитивных нейронов содержат также кальций-связывающий белок кальбиндин и кальретинин (Gonsalvez et al., 2010), а также кокаин- и амфетамин-регулируемый транскрипт (CART) (Dun et al., 2000; Fenwick et al., 2006) В II_p 15% преганглионарных нейронов, связанных с КШГ, содержали CART. CART-ИР нейроны в грудном отделе спинного мозга крысы выявлялись в nucl.II_p, nucl.IC и CA. Подавляющее большинство из них было также ХАТ-ИР, и лишь единичные нейроны – ХАТ-негативными. CART иммунореактивность селективно идентифицирует преганглионарные нейроны, регулирующие сердечно-сосудистую систему (Dun et al., 2000; Fenwick et al., 2006).

Большинство КБ-ИР преганглионарных нейронов также солокализовали nNOS, хотя популяция преганглионарных нейронов в средних и нижних грудных сегментах спинного мозга в II_p имела только КБ-иммунореактивность. КБ-ИР нейроны, солокализующие nNOS, являются наиболее распространенными в верхних отделах грудного и поясничного отделов (Gonsalvez et al., 2010). КБ-ИР преганглионарные нейроны посылают свои аксоны в КШГ и звездчатый ганглий (Grkovic, Anderson, 1997).

1.1.4. Структурная организация шейного симпатического ствола

Большая часть преганглионарных волокон этих нервов направляется к краниальному шейному ганглию в составе шейного симпатического ствола. Число преганглионарных волокон, направляющихся к КШГ крысы, варьирует от 970 до 8610 (Wang et al., 1995, 2018). Установлено, что имеются 3 группы нервных проводников: А - около 200 волокон диаметром 6.5-5.0 мкм, В - примерно 2000 волокон диаметром 4.5-3.0 мкм, С - 2000 волокон диаметром 2.5-1.5 мкм (А.Д.Ноздрачев, Ю.П.Пушкарев, 1980).

Шейный симпатический ствол содержит 84% волокон преганглионарных аксонов, 11% нисходящих (постганглионарных) аксонов и

19

около 5% сенсорных волокон (Teclerariam-Mesbah et al., 1997; Wang et al., 2018).

1.1.5. Анатомия КШГ

КШГ является основным источником симпатической иннервации

органов головы и шеи (В.И.Скок, 1970; А.Д.Ноздрачев, 1978, 1983; Ladd et al., 2014). Он расположен в верхней части шеи и прилегает к узловатому ганглию блуждающего нерва. Наиболее крупными нервами ганглия являются шейный симпатический и внутренний сонный нервы. Внутренний сонный нерв может начинаться от КШГ несколькими ветвями, формирует сплетение вокруг внутренней сонной артерии, а также веточки к щитовидной железе, узлам блуждающего нерва, к гортани, глотке (В.И.Скок, 1970; А.Д.Ноздрачев, 1978, 1983; А.А.Коробкин, 2011; Ladd et al., 2014; Wang et al., 2018).

В составе КШГ наблюдаются и другие постоянные ветви, например, идущие к каротидному синусу, подъязычному и языкоглоточному черепномозговому нервам. Кроме этого, 2-3 ветви, соединяясь, образуют краниальный шейный сердечный нерв, составляющий часть сердечного сплетения (А.Д.Ноздрачев, 1978, 1983; Gabella, 2004).

20

Рис. 2. Краниальный шейный ганглий крысы.

1 - внутренний сонный нерв; 2- наружный сонный нерв; 3 - шейный симпатический нерв.

1.1.6. Синаптические окончания в КШГ

В КШГ взрослой крысы имеется 4–12 x 106 синапсов (Field, Raisman, 1985; Siklo s et al., 1990; Smolen, Raisman, 1980) и 19–36 x 103 нейронов (Ostberg et al., 1976; Purves et al., 1986; RibeIPO et al., 2004). Это дает среднее отношение синапс: нейрон около 290:1, и подавляющее большинство из них, 90% или более, являются аксодендритными (Matthews, 1983; Forehand, 1985; Gibbins, Morris, 2006; Ladd et al., 2014). В КШГ крысы число синапсов на одном нейроне варьирует от 250 до 430 (Forehand, 1985; Loesch et al., 2010). Более крупные виды животных обладают нейронами, которые проявляют большую конвергенцию, более сложные арборизации и большую долю аксодендритных по сравнению с аксосоматическими

21

синапсами (Forehand, 1985; Purves, Lichtman, 1985; Purves et al., 1986; Gibbins et al., 1998).

В синаптических ганглиях кошки все нервные элементы окружены отростками шванновских клеток и разделены на отдельные группы прослойками соединительной ткани. Все синаптические соединения осуществляются внутри этих групп. Основную массу синапсов составляют аксодендритические синапсы, меньше аксоаксональных и значительно меньше аксосоматических. Все пресинаптические терминали содержат пузырьки округлой формы с диаметром 0,02 – 0,04 мкм. В некоторых терминалях на ряду с этими пузырьками обнаруживаются более крупные пузырьки с осмиофильным центром. (Elfvin, 1983; С.А.Новоковская с соавт., 2011).

1.2. Морфологические особенности связей преганглионарных нейронов спинного мозга с краниальным шейным ганглием в онтогенезе

1.2.1. Изменения структурной организации преганглионарных нейронов в онтогенезе.

Соматические мотонейроны и преганглионарные нейроны крыс выявляются в вентролатеральном клеточном столбе промежуточной зоны с 11-12 дня эмбрионального развития и экспрессируют фермент синтеза ацетилхолина-ХАТ. Преганглионарные нейроны перемещаются как дорсально, так и медиально между эмбриональными днями 14 и 18, когда они приближаются к своему окончательному расположению в спинном мозге. На 17-й эмбриональный день эти нейроны достигают своих конечных положений в средней части промежуточной зоны спинного мозга. В этот же временной период устанавливаются контакты между преганглионарными

нейронами и органами мишенями. В период эмбрионального развития E14-21

отростки нейронов ориентированы медиолатерально и только после рождения наблюдается их рострокаудальная ориентация (Phelps et al., 1991).

В третью фазу развития, некоторые из преганглионарных нейронов

22

перемещаются в медиальном направлении между *nucl.lpr* и центральным каналом (Markham, Vaughn, 1991).

У новорожденных крыс распределение преганглионарных нейронов в ядрах соответствует взрослому: *ILp*, *ILf*, *IC* и *ICre*. Наибольшее количество нейронов находится в *ILp*. *IC* и *ICre* содержат немного более высокий процент преганглионарных нейронов в ядрах у новорожденного по сравнению со взрослым (Puner, Coote, 1994). Тем не менее, преганглионарные нейроны, иннервирующие мозговое вещество надпочечников у котят, обнаруживались в большем диапазоне сегментов спинного мозга по сравнению с данными, полученными другими авторами на взрослых животных (Puner, Coote, 1995). При этом, у котят обнаруживались не только ипси-, но и контралатеральные проекции, отсутствующие у взрослых (Holets, Elde, 1983).

Размеры преганглионарных нейронов (в среднем, 23.4 мкм), в отличие от постганглионарных, не изменялись в постнатальном онтогенезе.

Морфологические отличия касались лишь характера ветвления дендритов и ориентации тела нейронов. У новорожденных крысят дендриты ветвились более диффузно. Нейроны в *nucl.lpr* были ориентированы в рострокаудальном и в медиолатеральном направлении, менее плотно упакованы в кластеры. У взрослого животного тела клеток имели только рострокаудальную ориентацию (Puner, Coote, 1994b).

Развитие симпатических преганглионарных нейронов находится под влиянием самых разнообразных нейротрофических факторов: нейротрофина, фактора роста фибробластов, нейрокинов (Sendtner et al., 1994; Snider, 1994; Schober, Unsicker, 2001; Coulibaly et al., 2013). Преганглионарные вегетативные двигательные нейроны становятся НАДФН-диафоразо-положительными (NO-ергическими) в начале своего развития во время миграции к своим взрослым позициям (Wetts et al., 1995).

23

Данные об изменении числа симпатических преганглионарных нейронов в онтогенезе остаются противоречивыми. Есть сведения об уменьшении числа аксонов, иннервирующих нейроны краниального шейного ганглия золотистых хомячков в первые две недели постнатального развития с 11-12 до 6-7 на один нейрон (Purves, Lichtman, 1980). В экспериментах, связанных с ретроградным аксонным транспортом, найдено значительное снижение числа преганглионарных нейронов, иннервирующих мозговое вещество надпочечников (Parker et al., 1993). Имеются работы, демонстрирующие гибель клеток дорсальной и интермедиальной части серого вещества спинного мозга по механизму апоптоза (Lawson et al., 1997). В то же время ряд исследователей не подтверждает гибель преганглионарных нейронов в пренатальном (Wetts, Vaughn, 1998) и постнатальном онтогенезе (Puner, Coote, 1994b).

1.2.2. Возрастные изменения шейного симпатического ствола и нейронов КШГ

У новорожденных незрелорождающих животных волокна шейного симпатического ствола являются безмиелиновыми, в то время как у взрослых они в большинстве своем покрыты миелином. Миелинизация волокон начинается на 3-4 день после рождения. Миелиновые волокна вначале появляются лишь в одной или двух группах волокон, формирующих шейный симпатический ствол. При этом процесс

миелинизации волокон происходит постепенно в кранио-каудальном направлении, а не одновременно по всей длине. У 10-дневных кроликов количество миелиновых волокон шейного симпатического ствола у звездчатого ганглия равняется 250-260 на срез, а у КШГ - 50-80 (В.С.Шевелева, 1977).

В КШГ происходит значительный рост дендритного дерева в постнатальный период. Общая длина дендритов увеличивается примерно на 24

50%, размер сомы примерно на 70% и количество дендритных ветвей примерно на 32%. Однако, в отличие от роста общего дерева, число первичных дендритов на нейронах КШГ не увеличивается. У старых крыс дендритное дерево нейронов КШГ показало значительную атрофию. Общая дендритная длина нейронов уменьшается примерно на 40%, количество точек дендритных ветвей примерно на 20%, а размер сомы сокращается примерно на 14%. Аномальные дендритные профили были замечены на всех возрастных стадиях, но были все более частыми в старых нейронах. Эти аномалии проявлялись в 2 разных формах: растянутые дендритные отростки или набухание сомы. Число нейронов с аномальными профилями составило 23% в возрасте 6 недель, 30% в 7 месяцев и 50% в 24 месяца (Andrews et al., 1994; Schmidt et al., 2008).

Ткани-мишени влияют на их иннервирующие симпатические нейроны за счет локальной продукции и высвобождения нейротрофина, фактора роста нервов, который поглощается и ретроградно транспортируется аксоном в клеточную сому (Hendry, Hill, 1980; Schmidt et al., 2008). Аномальные дендритные структуры и атрофия в состарившихся симпатических нейронах, показывают сильное сходство с таковыми в исследованиях молодых взрослых симпатических нейронов после аксотомии (Andrews et al., 1994). Снижение доступности нейротрофических факторов было постулировано как причина возрастной атрофии нейронов (Gavazzi et al., 1992; Gavazzi, Cowen, 1993).

1.2.3. Особенности синаптических контактов симпатических преаглионарных нейронов в онтогенезе

Созревание нервных и глиальных клеток, формирование нейропиля и синапсов ганглиев к моменту рождения не закончено. У новорожденных животных преобладают мало развитые, недостаточно дифференцированные нейроны в стадии созревания разной степени, у которых малые размеры, эксцентрично расположенное ядро, узкий ободок цитоплазмы, мало

органелл. При этом ганглии содержат нейроны с разным уровнем дифференцировки (В.Н.Швалев с соавт., 1992; С.А.Новиковская с соавт., 2011).

Нейропиль симпатических нейронов в раннем постнатальном онтогенезе у новорожденных котят характеризуется асинхронностью дифференцировки, выражающейся в различной степени зрелости как нервных, так и глиальных отростков. На данном этапе развития ганглии имеют области с вполне развитым нейропилем, содержащем окончания аксонов и дендритов с присущей им ультраструктурной организацией. В таком нейропиле наблюдаются аксо-дендритные и аксо-соматические синапсы с характерным набором синаптических везикул – холинергических и адренергических. Области синаптических контактов хорошо выражены и проявляют повышенную электронную плотность контактирующих мембран, их асимметрию, свойственную зрелым дифференцированным синапсам. В ганглиях этого периода развития отмечаются также области с начальными стадиями синаптогенеза, когда тонкие нервные отростки с небольшим количеством органелл начинают формировать синаптический контакт,

который не покрыт глиальной оболочкой и широко сообщается с окружающим интерстициальным пространством, заполненным рыхлой соединительной тканью. Вместе с тем и в данном периоде происходит дегенерация части нейронов и их терминалей, что является показателем активных перестроек в нервной системе, происходящих в этом периоде путем апоптоза (Smolen, 1981; С.А.Новаковская с соавт., 2011).

Уже с первых суток с момента рождения в симпатических узлах кошки обнаруживается большое число колб роста. Они содержат везикулы различных размеров и плотности. При образовании первичных контактов в онтогенезе, в начале появляется отдельные симметричные уплотнения контактирующих мембран по типу десмосом. На пятый день постнатального развития в отдельных соединениях уже обнаруживается наличие поляризации: вблизи пресинаптической мембраны располагается небольшое

26

количество типичных синаптических везикул. При этом отмечается повышение плотности постсинаптической мембраны в сравнение с пресинаптической. На пятнадцатый день после рождения преобладают поляризованные синапсы и обнаруживаются лишь единичные контакты по типу десмосом. Однако даже на этой стадии развития лишь единичные пузырьки расположенные вблизи пресинаптической мембраны, имеют вид типичных синаптических везикул, а основная масса приобретает такой вид везикул в большинстве терминалей только через три недели после рождения (С.А.Новаковская с соавт., 2011).

1.3. Функциональные особенности фоновой электрической

активности и синаптической передачи в КШГ

1.3.1. Проведение возбуждения через КШГ

В шейном симпатическом стволе выделяют несколько групп волокон по скорости проведения возбуждения. Наиболее быстропроводящие волокна шейного симпатического ствола у кошек имели скорость проведения 15-18 м/с, а наиболее медленнопроводящие - 3.5 м/с. (A.Szulczyk, P.Szulczyk, 1987; Woczek-Funcke et al., 1993). По данным (Kamosinska et al., 1991) в шейном симпатическом стволе обнаруживались преганглионарные волокна группы В со скоростями проведения между 3.5 и 18.3 м/с и группы С, где эти скорости колебались от 0.6 до 1.2 м/с соответственно.

Аксоны преганглионарных нейронов боковых рогов спинного мозга верхних грудных сегментов относятся к группе В и имеют скорости проведения возбуждения от 3 до 10 м/с. Неклассические симпатические преганглионарные нейроны в вентральном роге относятся также к группе В, но их аксоны имеют более высокую скорость проведения возбуждения - 10-20 м/с. Аксоны преганглионарных нейронов латеральной части промежуточной зоны относятся к группе С со скоростями проведения

27

возбуждения менее 1.5 м/с (В.П.Лебедев с соавт., 1974, 1976; Woczek-Funcke et al., 1993).

Стимуляция шейного симпатического ствола вызывает в постганглионарных волокнах КШГ, в частности внутреннего сонного нерва, составной потенциал действия (В.И.Скок, 1970; Newberry, 1988; Purnyn' et al., 2007). У крысы сила стимула, вызывающая максимальный постганглионарный ответ, значительно ниже, чем требуется для активации всех волокон симпатического ствола. Таким образом, группа волокон с самым низким порогом и, вероятно, самой быстрой скоростью проводимости, по-видимому, способна активировать большинство нейронов ганглия (Purnyn' et al., 2007). У морской свинки, при повышении силы стимула, амплитуда постганглионарного ответа постепенно увеличивается с возбуждением новых преганглионарных волокон симпатического ствола.

Следовательно, фактор безопасности для ортодромной активации пула ганглиозных клеток у крысы гораздо выше. У морской свинки по меньшей мере два основных компонента присутствуют в постганглионарном вызванном ответе, вызванном соответственно медленными и быстропроводящими преганглионарными волокнами (А.Я.Иванов, В.И.Скок, 1989).

1.3.2. Ритмические разряды в эфферентных симпатических волокнах

Фоновая электрическая активность симпатических нервов характеризуется определенной периодичностью. Паттерны спонтанной активности симпатических нервов можно разделить на несколько групп. В спектрограмме электрической активности симпатических волокон у млекопитающих различают низкочастотный (с частотой меньше 1 Гц) ритм (Montano et al., 1992; Persson et al., 1992; Malpas, 1998; Barman, 2020), связанный с дыханием (0.8-3 Гц) и с сердечной деятельностью с частотой 2-6 Гц (Ю.И.Щербин с соавт., 2000; Guild et al., 2010). В последующем, у 28

млекопитающих была выявлен также "10-Гц ритм" (8-13 Гц) (Ninomiya et al., 1989, 1990; Barman, Gebber, 2007).

Фоновая активность в покое проявляется разрядами лишь от одной десятой до четверти волокон от общего количества в симпатическом нерве (Malpas et al., 1996). С учетом того, что спектральный состав разрядов в целых симпатических нервах содержит высокочастотный компонент, частота импульсации в отдельных волокнах существенно ниже. Например, у кроликов в почечных нервах она равняется 2-2.5 Гц, в чревных нервах у кошек составляет 1-2 Гц (Meckler, Weaver, 1988). Происхождение высокочастотных разрядов объясняется суммацией импульсов от большого числа волокон, разряжающихся синхронно (Malpas, 1998; Barman, 2020).

1.4. Функциональные характеристики фоновой электрической активности и синаптической передачи в КШГ в онтогенезе

1.4.1. Возрастные изменения проведения возбуждения по шейному симпатическому стволу и через КШГ в онтогенезе

Установлено, что в ходе онтогенеза происходит уменьшение латентного периода ответов и, соответственно этому, увеличение скорости проведения возбуждения транзиторных путей. Окончательное созревание волокон по этому показателю приходится на шестой месяц жизни. Кроме того, в онтогенезе происходит возрастание средней амплитуды ответов (Маслюков, 2000; Masliukov et al., 2000).

Средняя скорость проведения возбуждения по волокнам шейного симпатического ствола у новорожденных котят равна 0.5-0.8 м/с, у котят 7-14 дней - 1.4 м/с, 1-1.5 мес - 5-6 м/с, у взрослых кошек - 25 м/с (В.С.Шевелева, 1977). Уменьшение латентного периода ответов и, соответственно этому, увеличение скорости проведения возбуждения транзиторных путей наблюдалось и в звездчатом узле котят. Эта величина равнялась 0.7 ± 0.01 м/с у новорожденного и 1.0 ± 0.02 м/с у 10-дневного котенка. Средняя скорость проведения возбуждения по наиболее быстропроводящим путям у

29
одномесячного котенка равнялась 6.6 ± 0.21 м/с, у двухмесячного - 8.3 ± 0.28 м/с, у четырехмесячного - 9.6 ± 0.37 м/с, у шестимесячного - 10.8 ± 0.41 м/с. Кроме того, в онтогенезе наблюдалось увеличение средней амплитуды ответов от 16.0 ± 0.38 мкВ у новорожденного до 55.7 ± 7.41 мкВ у шестимесячного котенка (Маслюков, 2000; Masliukov et al., 2000).

В течение первого полугодия жизни наблюдалось не только линейное увеличение скорости проведения возбуждения, но и усложнение ответов. У новорожденного и 10-дневного котенка ответы были монофазными,

однородными по своему характеру. Среди транзиторных путей в этих возрастных группах не наблюдалось достоверных различий по скоростям проведения. По скорости проведения они соответствуют группе С. У 20-дневных котят впервые появляются коротколатентные ответы волокон, которые по скорости проведения возбуждения могут быть отнесены к группе АБ и В. У 20-дневных котят впервые появляется разделение вызванного ответа на отдельные фазы (Маслюков, 2000; Masliukov et al., 2000).

1.4.2. Изменения фоновой электрической активности нервных волокон в постнатальном онтогенезе

У новорожденных поросят и котят в структуре фоновой активности уже имеются колебания, синхронные с сердечной деятельностью и фазами дыхания (Sica et al., 1990; Sica, Siddiqi, 1993). Различия в основном касаются спектрального состава. У котят низкочастотные компоненты фоновой активности в шейном симпатическом стволе уже сходны с частотами разрядов у взрослых животных и составляют (4-11 Гц). В то же время разряды, связанные со вдохом (8-9 Гц) обнаруживались лишь у животных старше 45 дней (Sica et al., 1990; Sica, Siddiqi, 1993). У более молодых животных инспираторная составляющая включала в себя высокочастотные колебания (50-100 Гц) (Sica, Gandhi, 1990).

Однако в экспериментах на каудальном брыжеечном узле котят были получены другие данные. Активность пре- и постганглионарных нервов

30
возрастала по частоте и амплитуде. У новорожденных котят в ритме дыхания и сердцебиения разряжались лишь постганглионарные волокна. В преганглионарных волокнах такие ритмические колебания выявлялись лишь после первого месяца жизни. Амплитуда колебаний возрастала от 10-25 мкВ у новорожденных до 40-100 мкВ у животных старше двух месяцев (В.С.Шевелева, 1977).

У поросят до 19 дня жизни, несмотря на наличие разрядов в тех же диапазонах, что и у взрослых животных, отсутствует когерентность разрядов в различных симпатических нервах. Также у новорожденных этого вида вплоть до конца 2-й недели жизни барорецепторный вход не влияет на симпатические периферические разряды. Кроме того, в этом возрасте математическое вычитание разрядов диафрагмального нерва ведет к увеличению когерентности разрядов симпатических нервов различных областей. Предполагается, что у столь юных животных существует несколько независимых друг от друга осцилляторов в ЦНС, которые затем образуют функциональные связи друг с другом (Gootman et al., 1996).

У новорожденных и 10-дневных котят синхронные разряды постганглионарных волокон были представлены медленными низкоамплитудными низковольтными колебаниями с частотой дыхания и сердцебиения. Синхронная импульсация с частотой, огибающей около 10 Гц, появлялась с 20 дня жизни. Формирование паттерна разрядов симпатических нервов у кошек заканчивается ко второму месяцу жизни (Masliukov, 2003; П.М.Маслюков, А.Д.Ноздрачев, 2006; Маслюков с соавт., 2009).

Наблюдается гетерохрония в развитии фоновой активности пре- и постганглионарных симпатических волокон у крыс. Электрическая активность преганглионарных волокон выражена с момента рождения, а в постганглионарных наблюдается лишь с 10 суток жизни. В спектральном анализе разрядов обоих типов волокон наибольшее значение спектра мощности выявлено у частот, синхронных с сердечной деятельностью (А.А.Коробкин, 2011).

31

1.5. Оксид азота как модулятор синаптической передачи

1.5.1. Молекулярные механизмы эффектов оксида азота

Оксид азота (NO) является важной регуляторной молекулой, участвующей в различных процессах, включая ретроградную передачу сигналов, синаптическую пластичность, внутриклеточные сигнальные каскады (Garthwaite, 2008, 2018; Förstermann, Sessa, 2012; Kourosh-Arami et al., 2020), регуляцию тонуса сосудов и сердечной деятельности (Zhang et al., 2014; Gaynullina et al., 2019; Ataei Ataabadi et al., 2020). Также установлена роль NO в осуществлении различных процессов развития (Gray, Cheung, 2014; Gaynullina et al., 2019).

NO синтезируется NO-синтазой (NOS), которая участвует в превращении аминокислоты L-аргинина в L-цитрулин. NOS1 (nNOS или нейрональная NOS) является одной из трех основных изоформ NO-синтазы, другие - NOS2 (iNOS или индуцибельная NOS) и NOS3 (eNOS или эндотелиальная NOS). Нейрональная и эндотелиальная изоформы постоянно присутствуют в клетках и называются конститутивными, а макрофагальная или индуцибельная изоформа синтезируется в ответ на определенное внешнее воздействие на клетку (Schuman, Madison, 1991; Kelly et al. 2., 1996; В.П.Ревтов с соавт., 1998; Е.Б.Меньшиков с соавт., 2000; А.А.Сосунов, 2000; Rastaldo et al., 2007; Garthwaite, 2008, 2018).

Важнейшей физиологической мишенью для NO является растворимая гуанилатциклаза, катализирующая биосинтез цГМФ. Большинство физиологических эффектов NO осуществляется через стимуляцию растворимой гуанилатциклазы и накопление цГМФ (Г.Ф.Ситдикова с соавт., 2014; Hardingham et al., 2013; Hollas et al., 2019). Гуанилатциклазная и аденилатциклазная внутриклеточные сигнальные системы опосредуют эффекты оксида азота через изменение активности цГМФ-стимулируемой 32

цАМФ-специфичной фосфодиэстеразы (фосфодиэстеразы II 4) (А.В.Яковлев с соавт., 2002; Г.Ф.Ситдикова с соавт., 2014; Khalid et al., 2020).

Кроме этого, эффекты 5 NO могут реализовываться через химическую модификацию белковых структур. Данный механизм включает прямое взаимодействие 5 NO с белками, ведущее к нитрозилированию 5 (S-нитрозилирование), и опосредованное – через образование 5 пероксинитритов (Roy et al., 2008). Таким модификациям могут подвергаться белки, участвующие в экзоцитозе, субъединицы ионных каналов и рецепторов 5 (Meffert et al, 1994; Wang et al., 2006).

Синаптическая передача характеризуется пластичностью (А.Л.Зефилов, М.А.Мухамедьяров, 2004). Эффекты NO на секрецию медиатора могут быть опосредованы модуляцией К⁺-каналов или через систему вторичных посредников 1. Установлено, что NO снижал потенциалзависимые К⁺-токи и активировал кальций-активируемые К⁺-токи в пресинаптической мембране нервного окончания (А.Л.Зефилов 1 с соавт., 1999). В нейронах улитки NO ингибировал кальций-активируемые К⁺-каналы (Zsombok et al, 2000), в скелетной мышце рака доноры NO, SNAP и гидроксилламин активировали потенциалзависимые К⁺-токи. При этом хелаторы NO – гемоглобин или РТНО подавляли эффекты доноров NO на ранний и задержанный выходящие К⁺-токи (Hermann, Erxleben 1, 2001).

В синапсах NO может действовать на пре- и постсинаптическом уровне (Feiland, Kleppisch, 2008; Garthwaite, 2018; Kourosh-Arami et al., 2020).

Доноры NO способны регулировать вызванную и спонтанную секрецию медиатора в зависимости от концентрации кальция (Lindgren 2, LaIPd, 1994; А.Л.Зефилов с соавт., 1999; А.В.Яковлев с соавт., 2002) путем изменения локальной концентрации Са²⁺ в цитоплазме и взаимодействия непосредственно с белками экзоцитоза (Thomas, Robitaille 2, 2001).

NO в разных тканях активирует или ингибирует 3 Са²⁺ каналы. Так, в

нейронах коры головного мозга мыши NO усиливает кальциевый ток через

L- и P-тип кальциевых каналов ³ (Han et al, 1998; Stamler et al., 2001), но

33

блокирует работу Ca²⁺-каналов в гладкой мускулатуре и N-тип ³ Ca²⁺-каналов в

коре (Courtney et al., 2014). NO и цГМФ облегчают кальциевый ток через

нуклеотидзависимые каналы, деполяризуя нервную клетку до уровня

необходимого для активации потенциалзависимого кальциевого канала

(Andric et al ³, 2001; А.Л.Зефилов, Г.Ф.Ситдикова, 2002, 2010).

1.5.2. Влияние оксида азота на синаптическую передачу в

центральной нервной системе

NO специфически не связывается с рецепторами постсинаптической

мембраны, как в случаях с классическими нейротрансмиттерами, но он

диффундирует в другие участки, включая пресинаптические нейроны (то

есть действует как ретроградный мессенджер) и другие смежные нейроны и

глиальные клетки ¹. Полагают, что NO действует, вероятно, как

нейромодулятор ¹. Источником NO в центральной нервной системе кроме

нейронов являются нейроглиальные клетки и эндотелий кровеносных

сосудов ¹ (А.А.Соснов, 2000; Kourosh-Arami et al., 2020). В основном NO

действует как межклеточный посредник, быстро диффундируя и достигая

клеток-мишеней в пределах до 0.3-0.4 мм ¹ (Garthwaite, 2018). Эффекты NO в

центральной нервной системе ¹ разнообразны, даже в отдельном нейроне NO

может как увеличивать, так и уменьшать возбудимость ¹ (Esplagues, 2002;

Philippi, 2016; Kourosh-Arami et al., 2020). NO контролирует пачечную

активность нейронов, является медиатором ноцицепции, термогенеза,

обоняния, участвует в регуляции жажды и голода, снижает тревожность

(Bishop, Anderson ¹, 2005; Kourosh-Arami et al., 2020). NO играет важную роль

в процессах долговременной потенциации и депрессии и, соответственно,

обучения и памяти (Schuman, Madison ¹, 1994; Pitsikas, 2015; Aso et al., 2019). В

основе ряда эффектов NO лежит его влияние на центральные и

периферические синапсы, где он может оказывать как ингибирующее, так и

активирующее действие (Bredt, Snyder 1992; Schuman, Madison ¹, 1994;

34

Mukhtarov et al., 1999, А.Л.Зефилов с соавт., 1999; Sagi et al., 2014; Garthwaite,

2018).

Установлено, что NO может модулировать синаптическую функцию в

различных регионах мозга ³. Показано влияние NO на высвобождение

возбуждающих и тормозных аминокислот в гиппокампе, в стриатуме и в

других областях мозга ¹ (Philippi, 2016). Причем эффекты NO часто зависят от

концентрации: в низких концентрациях NO уменьшал освобождение

глутамата или ГАМК в гиппокампе, а в высоких - увеличивал (Segieth et al ¹ ,

1995).

Так, в базальных ганглиях NO почти в два раза увеличивает секрецию

ацетилхолина ³ (Philippi, 2016), а в гиппокампе - норадреналина и

ацетилхолина (Lonart et al, 1992), стимулируя Ca²⁺-независимое

высвобождение синаптических везикул (Meffert et al ³, 1994). Снижение

выделения глутамата при низких концентрациях NO сопровождалось

увеличением уровня цГМФ, тогда как увеличение ¹ выделения при действии

высоких концентраций связано с ингибированием митохондриальных

функций и массивным выбросом глутамата из клетки через глутаматный

транспортер (Segieth et al., 1995). NO модулирует освобождение

катехоламинов - дофамина и норадреналина. В стриатуме доноры NO и

субстрат синтеза NO - L-аргинин как уменьшали, так и увеличивали

высвобождение дофамина (West, Galloway, 1998, Silva et al., 1998). В

гиппокампе доноры NO увеличивали высвобождение норадреналина в

условиях in vitro и in vivo ¹. В различных областях мозга эндогенный NO

увеличивает освобождение ацетилхолина за счет активации гуанилатциклазы ¹

(Philippu, 2016).

Было обнаружено, что долговременная потенция в гиппокампе частично или полностью блокируется у мышей, нокаутированных по нейрональной и эндотелиальной NO-синтазам, а также под действием ингибиторов NO-синтазы и в присутствии гемоглобина, который связывает NO во внеклеточном пространстве (Son et al., 1996, Schuman, Madison, 1991; 35

Hopper, Garthwaite, 2006). Напротив, доноры NO облегчали долговременную потенцию при их введении в пресинаптическую клетку ¹.

NO может воздействовать на каналы глутаматных рецепторов NMDA-типа. Модулируя ионный ток через эти каналы, NO может оказывать существенное влияние на многие нейрональные кальций-активируемые процессы, такие как синаптическая передача, пластичность и развитие нервной системы ³. NO и цГМФ облегчают кальциевый ток через нуклеотидзависимые каналы, деполяризуя нервную клетку до уровня необходимого для активации потенциалзависимого кальциевого канала (Andric et al ³, 2001; А.Л.Зефирова, Г.Ф.Ситдикова, 2002, 2010; Garthwaite, 2018).

Диффузия NO в пресинаптическое окончание, ретроградно действует на ² гуанилатциклазу, вызывая образование цГМФ, что приводит к усилению и увеличению длительности выделения нейромедиатора, который, в свою очередь, оказывает возбуждающее действие на постсинаптические нейроны ² по механизму положительной обратной связи (Bredt, Snyder, 1992; Schuman, Madison, 1994).

Существует и цГМФ-независимый механизм действия NO. Депрессия, вызванная высокочастотной стимуляцией нерва, снижалась в присутствии хелатора NO, но не изменялась под действием ингибитора гуанилатциклазы. Таким образом, высокочастотная синаптическая депрессия регулируется NO через цГМФ-независимый механизм (Thomas, Robitaille ¹, 2001; Arrigoni, Rosenberg, 2006).

1.5.3. Влияние оксида азота на синаптическую передачу в периферической нервной системе

В отличие от мозга в энтеральной нервной системе NO обладает физиологическим ингибиторным действием на вызванное освобождение ацетилхолина (Kilbinger ¹, 1996). В нервно-мышечном соединении ящерицы NO вовлечен в пресинаптическую ауторегуляцию освобождения ³⁶

ацетилхолина, участвуя как ингибиторно, так и облегчающем эффекте мускарина (Graves, Lewin, Lindgren, 2004). В нервно-мышечных синапсах теплокровных животных экзогенные доноры NO и субстрат NO – L-аргинин не оказывали влияния на вызванное освобождение медиатора, однако, приводили к значительному усилению квантовой секреции в условиях блокирования A1 рецепторов аденозина. Так как аденозин является ингибитором ¹ Ca²⁺-каналов N-типа, было предположено, что NO увеличивает освобождение медиатора путем усиления входа кальция ¹.

В двигательных нервных окончаниях холоднокровных животных ¹ обнаружена тоническая регуляция освобождения ацетилхолина с помощью NO (Lindgren ¹, LaIPd 1994, А.Л.Зефирова с соавт., 1999, Thomas, Robitaille, 2001, Wang, Xie, Lu, 1995, Etherinton, Everett, 2004). В экспериментах на нервно-мышечных препаратах амфибий было показано угнетение секреции медиатора под действием экзогенных доноров NO ¹ (Lindgren, LaIPd, 1994, А.Л.Зефирова с соавт., 1999; Thomas, Robitaille, 2001; А.В.Яковлев с соавт., 2002). Исследование внутриклеточных механизмов действия NO

предположило роль цГМФ-зависимых систем ¹. Кроме того, NO вызывал локальное изменение концентрации ионов Ca²⁺ в цитоплазме нервного окончания ¹. Предполагается, что NO в нервно-мышечном синапсе синтезируется тонически в области концевой пластинки и шванновскими клетками (Brenman et al, 1996; Descarries et al, 1998) и регулирует синаптическую передачу по принципу отрицательной обратной связи ¹ (Thomas, Robitaille, 2001; Etherington, Everett ¹, 2004). В нервно-мышечном синапсе NO увеличивал амплитуду мышечных сокращений, действуя на пресинаптическом уровне, и уменьшал ее, действуя на постсинаптическом уровне (Ambiel, Alves-Do-Prado ¹, 1997).

В симпатических ганглиях NO уменьшает Ca²⁺-активируемые K⁺ токи в ганглии по механизму, который не зависит от какого-либо влияния на приток Ca²⁺ через кальциевые каналы (Cetiner, Bennett, 1993). Этот результат подтверждает гипотезу о том, что NO может увеличивать секрецию

37 медиатора путем увеличения продолжительности потенциала действия после блокады быстрого Ca²⁺-зависимого K⁺ тока, также NO уменьшает транзиторные и постоянные кальциевые токи в нейронах ганглиев (Khurana, Bennett, 1993). Таким образом, с одной стороны, приток кальция через мембрану может быть увеличен за счет NO, чтобы увеличить продолжительность потенциала действия и, следовательно, время открытия чувствительных к напряжению кальциевых каналов. Однако, с другой стороны, сами эти каналы могут быть подавлены, что уменьшает приток кальция.

NO участвует в процессах долговременной потенциации в ресничном узле и симпатических узлах (Briggs, 1992; Altememi, Alkadhi, 1999; Alkadhi et al., 2006). Нитропруссид натрия (100 мкМ) увеличивал синаптическую эффективность в среднем на 26%. 8-Br-цГМФ (100 мкМ) увеличивал синаптическую эффективность в среднем на 61%. Добавление 8-Br-цАМФ (100 мкМ) имело меньший эффект, увеличивая передачу в среднем на 46%. Блокатор синтазы оксида азота L-NAME (100 мкМ) снижал длительное посттетаническое потенцирование в среднем на 47%, но не изменял существенно посттетаническое потенцирование. После краткого применения 8-Br-цАМФ, 8-Br-цГМФ и нитропруссид натрия наблюдалось повышение эффективности синаптической передачи, которая сохранялась после удаления препаратов (Briggs, 1992; Scott, Bennett, 1993).

Классический путь действия NO, а именно через гемовую группу гуанилатциклазы, захватывающей оксид азота, с последующим конформационным изменением фермента, приводящим к продуцированию цГМФ и фосфорилированию субстрата посредством цГМФ-зависимой киназы (Bredt, Snyder, 1992; Г.Ф.Ситдикова с соавт., 2014), является одним из способов действия, наблюдаемых в симпатических ганглиях (Dun et al., 1978 Southam et al., 1996). В этих ганглиях увеличение цГМФ, сопровождающего стимуляцию нерва, вероятно, ограничивается нервными окончаниями, поскольку деполяризация ганглия с высокими концентрациями K⁺ не

38 приводит к увеличению цГМФ, если ганглий денервирован. Это увеличение терминального цГМФ может быть связано с действием секретируемого ацетилхолина, действующего на терминальные мускариновые рецепторы, для ингибирования секреции, так как ацетилхолин увеличивает содержание цГМФ в ганглии посредством атропин-чувствительного механизма (Morita et al., 1982).

Возможно, что оксид азота также действует через цАМФ. В симпатических ганглиях аналоги цАМФ дают длительное увеличение вызванной секреции ацетилхолина посредством механизма, который не

вовлекает внеклеточный кальций (Briggs et al., 1985; 1988; Hurt et al., 2012).

Один из способов заключается в способности цГМФ ингибировать фосфодиэстеразу (Maurice, Haslam, 1990): этот механизм гарантирует, что если уровни цГМФ в нервном окончании повышаются за счет NO, то и уровень цАМФ возрастает (Pugh et al., 2010; Hurt et al., 2012).

Предполагается, что высокочастотная стимуляция преганглионарных волокон приводит к притоку достаточного количества Ca²⁺ в терминаль для активации nNOS (Garthwaite, 2008, 2018; Socodato et al., 2012); произведенный таким образом NO действует на гуанилатциклазу, расположенную в терминале, что приводит к увеличению секреции передатчика в вегетативных ганглиях, но не меняет чувствительность постсинаптических рецепторов (Kuba, Kumamoto, 1990; Scott, Bennett, 1993).

Основным эффектом получаемого цГМФ является фосфорилирование фосфодиэстеразы, так что она больше не может метаболизировать цАМФ (Maurice, Haslam, 1990). Последующее увеличение цАМФ в терминали приводит к фосфорилированию субстрата протеинкиназы А (Pugh et al., 2010; Hurt et al., 2012), который можно идентифицировать как Ca²⁺-активируемые K⁺ каналы в терминали. Это приводит к уменьшению открытия этих каналов (Cetiner, Bennett, 1993) с последующим увеличением продолжительности потенциала действия в терминали и очень большим увеличением

39

кратковременной концентрации кальция, необходимой во время экзоцитоза везикул в активных зонах терминали (Scott, Bennett, 1993).

В парасимпатическом ресничном узле nNOS ассоциируется с α7 никотиновыми холинорецепторами, многие из которых являются пресинаптическими, а также с гетеромерными α3* никотиновыми холинорецепторами, которые генерируют основную часть синаптической активности. Физическая ассоциация nNOS-никотиновые холинорецепторы будет способствовать выработке NO в пресинаптических и смежных постсинаптических сайтах для усиления фокального высвобождения ацетилхолина из расположенных рядом пресинаптических терминалей (Jayakar et al., 2014).

1.5.4. nNOS-иммунореактивность в симпатических узлах

nNOS-позитивные нейроны отсутствуют в симпатических краниальном шейном, звездчатом ганглии и чревных узлах мыши и крысы на протяжении постнатального онтогенеза, с момента рождения и до старости (Grozdanovic et al., 1992; Santer, Symons, 1993; Emanuilov et al., 2008; Masliukov et al., 2014). Однако большая доля nNOS-позитивных нейронов встречалась в симпатических ганглиях кошек уже с момента рождения (Emanuilov et al., 2008; Masliukov et al., 2015).

40

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Обоснование выбора объектов изучения

Одним из наиболее часто используемых объектов и наиболее подходящих для изучения возрастных изменений автономной нервной системы, является крыса. (Hirst, McLachlan, 1984; А.Д. Ноздрачев, Е.Л. Поляков, 2001; Paxinos, 2004; Т.А.Румянцева, 2004; Masliukov, Timmermans, 2004; Masliukov et al., 2012).

КШГ в связи с его поверхностным расположением (Скок, 1970, Ноздрачев, 1983, Ноздрачев, Маслюков, 2014), а также тем, что преганглионарные волокна к нему проходят в составе единого шейного симпатического ствола, который почти не содержит постганглионарных и афферентных волокон, является наиболее удобным из симпатических узлов для проведения физиологических исследований.

2.2. Постановка эксперимента

Исследование проводилось на самцах крыс линии Wistar. В

соответствии с целью и задачами исследования эксперименты были проведены на 140 животных. Животные были поделены на семь групп по 20 особей в каждой (пять особей для иммуногистохимических экспериментов, пять для вестерн – блоттинг анализа и 10 – для электрофизиологических и фармакологических). Исследовались возрастные группы: новорожденные (масса тела 5 – 7 г.), 10 – суточные (масса тела 15 – 25 г.), 20 – суточные (масса тела 35 – 55 г.) 30 – суточные (масса тела 70 – 90 г.), 2 – месячные (масса тела 160 – 190 г.), 6 – месячные (масса тела 200 – 250 г.) и 3–летние (масса тела 310 – 330 г.).

Все животные содержались в акриловых клетках с наполнителем в виде древесной стружки в акклиматизированном помещении (12/12 – часовой цикл свет / темнота; $22 \pm 3^\circ \text{C}$) со свободным доступом к пище и воде. Все

41

процедуры на животных были одобрены этическим комитетом Ярославского государственного медицинского университета (протокол N 12 от 27.10.2016) и проводились в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях **8**. Были предприняты все усилия, чтобы свести к минимуму количество животных и их страдания на протяжении всего эксперимента.

Для получения потомства к половозрелым самкам подсаживали самцов в соотношении 3:2, через 14 дней самцов отсаживали, а самок помещали в индивидуальные клетки. После родов и до 20-х суток жизни потомство содержали с самками в индивидуальных клетках, крысят отбирали из всех пометов равномерно, что позволяло получать в каждой изучаемой нами возрастной группе животных сходной массы.

Все эксперименты согласно применяемым методам можно разделить на три группы:

1. Нейрофизиологические.

1.1. Регистрация и анализ фоновой активности во внутреннем сонном нерве краниального шейного узла под влиянием донора NO нитропруссид натрия и блокатора синтеза NO L-NAME, а также мембранопроницающего аналога цГМФ 8Br-цГМФ и специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы ODQ. (35 животных: 5 новорожденных, 5 десятидневных, 5 двадцатидневных, 5 одномесячных крысят, 5 двухмесячных, 5 шестимесячных и 5 трехлетних крыс).

1.2. Регистрация и анализ вызванных электрических потенциалов в постганглионарных волокнах внутреннего сонного нерва под влиянием донора NO нитропруссид натрия и блокатора синтеза NO L-NAME, а также мембранопроницающего аналога цГМФ 8Br-цГМФ и специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы ODQ. (35 животных: 5 новорожденных, 5 десятидневных, 5 двадцатидневных, 5 одномесячных крысят, 5 двухмесячных, 5 шестимесячных и 5 трехлетних крыс).

42

2. Иммуногистохимические. Выявление методом двойного мечения иммунореактивности к нейрональной NO – синтазе (nNOS), холинацетилтрансферазе (ХАТ), кальретиину (КР), кальбиндину (КБ), кокаин- и амфетамин- регулируемому транскрипту (CART) в спинном мозге и краниальном шейном узле (35 животных: 5 новорожденных, 5 десятидневных, 5 двадцатидневных, 5 одномесячных крысят, 5 двухмесячных, 5 шестимесячных и 5 трехлетних крыс).

3. Вестерн блоттинг. Определение экспрессии нейрональной NO-синтазы в сегменте Th2 спинного мозга и краниальном шейном узле (35 животных: 5 новорожденных, 5 десятидневных, 5 двадцатидневных, 5

одномесечных крысят, 5 двухмесечных, 5 шестимесечных и 5 трехлетних крыс).

2.3. Электрофизиологические методы исследований.

2.3.1. Регистрация и анализ фоновой активности во внутреннем

сонном нерве краниального шейного узла

Проводился анализ фоновой электрической активности в

постганглионарных волокнах КШГ у наркотизированных животных при

самостоятельном дыхании с сохраненным шейным симпатическим стволом.

КШГ помещался в ванночку и перфузировался раствором Кребса (120 мМ

NaCl, 5.6 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 26 мМ NaHCO₃, 1.19 мМ MgSO₄, 1.18 мМ

KH₂PO₄, 11 мМ глюкозы) с пропусканием газовой смеси 5% CO₂, 95% O₂ с

помощью 4-канальной системы аппликации растворов ("Биотехнологии").

43

Рис. 3. Схема регистрации фоновой активности КШГ.

1. КШГ; 2. стеклянный присасывающийся электрод; 3. индифферентный

электрод; 4. трубка 4-канальной системы аппликации растворов; 5. трубка

аспиратора.

Электрическая активность от внутреннего сонного нерва

регистрировалась с помощью стеклянных присасывающихся электродов

диаметром 50 мкм и подавалась на вход усилителя переменного тока

(Digitimer Neurolog, Великобритания). Полоса пропускания выбиралась от

100 до 2000 Гц. Сигнал оцифровывался с частотой 20 кГц при помощи АЦП

E20-10 (L-CARD, Россия) и записывался на жесткий диск компьютера (время

записи 60 с), после чего подвергался off-line анализу с использованием

программы Power Graph, версия 3.2 (Россия). При этом сигнал от нервов

подвергался обработке с построением огибающей и последующего

интегрирования с постоянной времени 20 мс. Дальнейший анализ включал

построение спектра мощности, который вычислялся на основании быстрого

преобразования Фурье с использованием окон Хамминга. Также

определялось среднее значение амплитуды.

44

При завершении эксперимента животное усыплялось передозировкой

уретана (3 г/кг массы). Через 20 мин после остановки сердца записывали шум

усилителя биопотенциалов, не снимая нерв с электродов. Данные

регистрации обрабатывали тем же методом, что и в случае записи нервной

активности. Производили сравнение данных анализа нервной активности с

шумом, с последующим вычетом из спектра мощности шумового

компонента.

2.3.2. Регистрация и анализ вызванных электрических

потенциалов в постганглионарных волокнах внутреннего сонного нерва.

Вызванные электрические потенциалы в постганглионарных волокнах

внутреннего сонного нерва КШГ регистрировались in vitro. КШГ выделялся

вместе с шейным симпатическим и внутренним сонным нервом, помещался в

ванночку и перфузировался раствором Кребса (см. п. 2.5.1).

Преганглионарный нерв помещался на вольфрамовые электроды и

стимулировался **прямоугольными электрическими импульсами**

сверхпороговой силы длительностью 0.2-0.3 мс с частотой 0.2-0.4 имп /с.

Электрическая активность от внутреннего сонного нерва

регистрировалась с помощью стеклянных присасывающихся электродов

диаметром 50 мкм и подавалась на вход усилителя переменного тока

(Digitimer Neurolog, Великобритания). Полоса пропускания выбиралась от 0

до 100 Гц. Сигнал оцифровывался с частотой 1 кГц при помощи устройства

сбора данных CED Micro 1401-3 (Великобритания) под управлением

программы Signal версия 5 (Великобритания). Анализ данных также

проводился при помощи вышеуказанной программы.

2.4. Иммуногистохимический метод

Эвтаназию животных осуществляли под уретановым наркозом (3 г/кг, внутривенно), далее проводили транскраниальную перфузию физиологическим раствором с гепарином (5 Ед/л) в следующих объемах: 20 мл (новорожденным и 10-суточным), 100 мл (20-30-суточным) и 500 мл (2-месячным и старше), затем аналогичными объемами 4% раствора параформальдегида на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,4) в соответствующих возрастных группах.

После проведения перфузии производили доступ к сегментам шейного и грудного отделов спинного мозга путем двухсторонней ламинэктомии. У животных всех возрастных групп производился забор Th2 сегментов грудного отдела спинного мозга. Доступ к краниально шейному ганглию симпатического ствола осуществлялся путём послойного рассечения мягких тканей передней поверхности шеи и смещения подлежащих мышц. Выделенный материал фиксировали в течение 2 часов в предыдущей смеси, после чего промывали трехкратно в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (PBS) рН 7,4 (ООО «Биолот», Санкт-Петербург, Россия) в течение 30 минут и оставляли в 30% растворе сахарозы на 24 часа. Из фиксированного материала на криостате готовили серии срезов толщиной 14 мкм.

Выявление иммунореактивности к nNOS, XAT, KP, KB, CART производился при помощи иммуногистохимических методов двойного мечения. Срезы преинкубировались в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% сыворотки, 1% тритон X – 100, 0.1% бычьего сывороточного альбумина. Затем срезы инкубировались с первичными антителами (табл. 1) в течение 24 ч при комнатной температуре.

Исследовались комбинации антител: nNOS+PGP9.5 (для определения процента nNOS в ядрах спинного мозга), а также для исследования локализации nNOS с другими маркерами: nNOS+XAT (в спинном мозге и КШГ), nNOS+KB (в спинном мозге), nNOS+KP (в спинном мозге и КШГ), nNOS+CART (в спинном мозге и КШГ). Выбор nNOS, XAT, KP, KB, CART

46 объясняется тем, что согласно литературным данным, вышеуказанные маркеры в основном присутствуют в преганглионарных нейронах, и отсутствуют или имеются в очень небольшом числе в постганглионарных нейронах (за исключением KB, выявляющего в ганглионарных нейронах). Поэтому распределение nNOS+KB в КШГ не исследовалось, т.к. не представлялось возможным разделить KB-ИР пре- и постганглионарные волокна).

После кратковременной промывки срезы далее инкубировались с вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC), дающим зеленую флуоресценцию, или индокарбозинином (CY3), дающим красную флуоресценцию (Jackson ImmunoResearch, США, разведение 1:150) в течение 2 ч (табл. 2). После чего срезы отмывали в PBS и заключали в среду для иммунофлуоресценции (VectaShield, Vector Laboratories, США).

Анализ препаратов, подвергнутых процедуре иммуногистохимической обработки, проводился с использованием программно-аппаратного комплекса, включающего флуоресцентный микроскоп Olympus BX45 (Япония) с набором фильтров (модуль зеркал U-FBWA - синее возбуждение, фильтр возбуждения BP460-495, барьерный фильтр BA510-550; модуль зеркал U-FGWA - зеленое возбуждение, фильтр возбуждения BP530-550, барьерный фильтр BA575-625), охлаждаемую CCD камеру Tucsen TCH-5.0ICE (Xintu Photonics, Китай) и компьютер на базе процессора Intel Core i7. Получение и последующая обработка изображений

проводилась с использованием программы ISCapture, версия 3.6 (Xintu Photonics, Китай).

Средняя площадь сечения и процент иммунореактивных нейронов, а также плотность ИР волокон определялись при помощи программы ImageJ (NIH, США). Анализу подлежали нервные клетки, срез которых прошел через ядро. Для расчета процента pNOS-ИР нейронов определяли их отношение к общему числу иммунопозитивных нейронов, которое

47 принимали за 100%. Плотность волокон определяли по программе ImageJ как процент от площади, занимаемой pNOS-ИР волокнами к общей площади узла на срезе.

Таблица 1.

Использованные первичные антитела

Тип антител Животное-

донор

Разведение Источник

pNOS Кролик 1:200 Abcam, ab15323, Великобритания

ХАТ Коза 1:100 Millipore, AB144P, США

Кальбиндин Кролик 1:500 Abcam, ab11426, Великобритания

Кальретинин Кролик 1:100 Abcam, ab702, Великобритания

CART Кролик 1:200 Phoenix Pharmaceuticals, H-003-62,

Китай

PGP9.5 Морская Свинка 1:100 Abcam, ab10410, Великобритания

Таблица 2.

Использованные вторичные антитела

Тип антител Животное

-донор

Разведе-

ние

Источник

Антикроличий IgG FITC-

конъюгированный

осел 1:150 Jackson Immunoresearch,

США

Антикроличий IgG CY3-

конъюгированный

осел 1:150 Jackson Immunoresearch,

США

Антикозий IgG FITC-

конъюгированный

осел 1:100 Jackson Immunoresearch,

США

Антикозий IgG CY3-

конъюгированный

осел 1:100 Jackson Immunoresearch,

США

Анти-морская свинка IgG

FITC-конъюгированный

осел 1:150 Jackson Immunoresearch,

США

48

2.5. Вестерн – блоттинг

Методика извлечения Th2 сегмента и КШГ сходна с вышеописанной, применяемой при иммуногистохимических экспериментах, и отличается лишь тем, что после введения летальной дозы осуществляется перфузия

холодным (+ 40 C) 0.1M раствором фосфатного буфера (PBS) и все дальнейшие манипуляции с препаратом осуществляются на куске льда. Необходимый для анализа материал, взвешивали и гомогенизировали в десятикратном растворе лизирующего буфера (0,02M TRIS (hydroxymethyl-aminomethane), 0,15M NaCl, 0,001M EDTA, 1% Triton X-100, pH 7,5), который смешивали с ингибитором протеаз (Sigma, США). После центрифугирования в течение 15 минут (10 000 об./мин. (12 G)), аспирировали прозрачную часть центрифугата не касаясь осадка, количество белка в лизате определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976) с помощью масспектрометра (Analytic Jena Spekol 1300, Германия) при 595 нм и кумаси-G (1 мкл на 1 мл пробы). В качестве стандарта была использована кривая для изменения концентрации белка в бычьем сывороточном альбумине. Количество белка в пробах выравняли лизирующим буфером 15 . Полученный раствор смешивали с SDS-буфером (6% SDS - sodium dodecyl sulfate, 0,2M TRIS-HCl, 15% глицерин, 3% бромфеноловый синий, 10% β-меркаптоэтанол 15 , pH 6,7) в соотношении 2:1, затем в течение 5 минут нагревали на водяной бане при 95 0 C. Готовые пробы хранили при 15 - 25 0 C.

В день проведения электрофореза пробы размораживали 15 , перемешивали и разводили в SDS-буфере (к 300 мкл 6% sodium dodecyl sulfate 15 (SDS), 0,2M TRIS-HCl, 15% глицерин, 3% бромфеноловый синий, добавляли 900 мкл дистиллированной H₂O, и 30 мкл β-меркаптоэтанол 15 , pH 6,7). Затем пробы нагревали в течение 5 минут при 95оС, после чего их сразу же охлаждали на льду.

Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза 15 в 10% полиакриламидном геле, использовали оборудование для 15 электрофореза (Bio-Rad Laboratories, США). Из каждой пробы для электрофореза брали по 5 49 - 15 мкл, а в первую лунку помещали 5 мкл окрашенного маркера молекулярного веса 15 (Pierce™ Prestained Protein MW Marker; Thermo Fisher Scientific, США). Разделение белков проводили сначала при напряжении 80 В, а через 15–20 мин увеличивали до 130 В. Гель с белковыми фракциями переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, Великобритания) в течение 15 1 ч. Мембраны блокировали блокирующим раствором, содержащим 3% обезжиренное сухое молоко (AppliChem, Германия) в TBS-T (0,1% Tween 20, 0,2 мМ Трис, 137 мМ NaCl), в течение 30 мин при комнатной температуре.

После промывки TBS-T, мембраны инкубировали с первичными антителами (Abscam, Великобритания): поликлональные кроличьи против pNOS, разведение 1:1000 (ab15323), против GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа), разведение 1:2500 (ab9485) при 4°C в течение 18 часов. После промывки TBS-T, мембраны инкубировали соответствующими вторичными антителами, конъюгированных с пероксидазой хрена, разведенные на 4% блокирующем растворе (козьи HRP-конъюгированные анти-кроличьи IgG, (Abscam, ab6721, Великобритания) в соотношении 1:3000. Иммуноблоты были обнаружены хемилюминесценцией (ECL Prime детектирующий реагент вестерн-блоттинга, BioRad) с геле-документирующей системой Syngene G:BOX Chemi XR5E (Syngene, Великобритания).

2.6. Использованные физиологически активные вещества и растворы.

Использовали экзогенный донор NO - нитропруссид натрия (Panreac-AppliChem, Германия) и неконкурентный ингибитор NO синтазы NG-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME, Tocris, США) в концентрации 100 мкМ. Для увеличения внутриклеточной концентрации цГМФ и активации протеинкиназы G использовали мембранопроникающий аналог 8Br-цГМФ

(Sidma-Aldrich, США) в концентрации 100 мкМ. Для снижения

внутриклеточной концентрации цГМФ ² применяли специфический ингибитор

растворимой гуанилатциклазы – ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a]

quinoxalin-1-one ²) (Sidma-Aldrich, США) в концентрации 10 мкМ.

2.7. Статистическая обработка данных.

Математическая, статистическая обработка данных и построение

графиков выполнено с использованием программы Sigma Plot («Systat

Software», USA). Все величины представлены как средняя арифметическая ±

ошибка среднего (M±m). Две независимые группы сравнивались с помощью

t-критерия Стьюдента, три и более с помощью дисперсионного анализа

вариаций ANOVA и критерия Тьюки Post-hoc анализа ⁸. Проверку

распределения в выборках на нормальность осуществляли с помощью теста

Шапиро-Уилка. За уровень статистической значимости был взят $p < 0,05$.

51

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Влияние оксида азота на фоновую электрическую активность в

постганглионарных волокнах КШГ в онтогенезе

3.1.1. Фоновая эфферентная активность в постганглионарных волокнах

КШГ в онтогенезе

Фоновая электрическая активность в постганглионарных волокнах

внутреннего сонного нерва КШГ наблюдалась у всех животных.

Достоверные различия между активностью одноименных нервов с правой и

левой сторон не наблюдались, поэтому далее приводятся усредненные

данные для обеих сторон. Различия касались амплитуды разрядов,

выраженности отдельных частот в общем спектре.

В постнатальном онтогенезе средняя амплитуда разрядов возрастала

(рис. 4, табл. 3). Выделялось 3 группы возрастов, достоверно различающихся

по среднему значению амплитуды: 1) новорожденный и 10-дневный, 2) 20-

дневный, 3) более взрослые животные.

У новорожденных фоновая импульсация в постганглионарных

волокнах носила нерегулярный характер, ритмические колебания

отсутствовали. Ритмическая активность появлялась на 10 сутки.

В контроле в спектре мощности у 10-суточных и более взрослых

животных наибольшее значение имели частоты, связанные с дыханием (0,7-

1,5 Гц), сердечной деятельностью (4-7 Гц). С 20 суток в спектре мощности

наблюдался также «10 Гц» ритм (8-12 Гц) и дополнительные частоты в

диапазоне свыше 12 Гц (рис. 5, табл. 4). У 10-суточных и более взрослых

наибольшую мощность в спектре частот постганглионарных волокон

представляли колебания с частотами до 1,5 Гц, синхронные с дыханием.

52

Таблица 3.

Средняя амплитуда импульсов разрядов симпатических волокон (мкВ)

в контроле, при аппликации НН, L-NAME 8Вг-цГМФ и ODQ в КШГ крыс в

онтогенезе

Возраст Контроль НН L-NAME 8Вг-

цГМФ

ODQ

Новорожденный 152,6 143,8 142,0 132,3 162,7

10 суток 213,2 232,8 222,6 212,8 203,1

20 суток 354,1 433,6* 242,5* 453,8* 272,8*

30 суток 525,2 634,8* 325,6* 684,8* 344,3*

60 суток 554,2 655,1* 304,6* 635,1* 364,7*

6 месяцев 515,4 664,7* 313,4* 704,9* 333,8*

3 года 445,6 615,1* 285,4* 584,1* 263,1*

* $p < 0,05$ Различия достоверны по сравнению с контролем в каждой возрастной группе.

53

Рис. 4. Фоновая активность в постганглионарных волокнах КШГ: а – у новорожденной, б – у 30-суточной, в – 3-х летней крысы.

Калибровка: 0,5 с, 25 мкВ

Таблица 4.

Средние значения пиков спектра мощности дыхательных разрядов симпатических волокон в контроле (0,7-1,5 Гц)

Возраст Пики спектра мощности разрядов (мкВ²/Гц x 10⁻²)

0,7-1,5 Гц 4-8 Гц

10 суток 7,10,22 1,30,12

20 суток 8,60,43 1,60,14

30 суток 9,60,24* 1,30,08

60 суток 9,40,34* 1,60,12

1 год 10,10,2* 1,40,24

3 года 9,60,34* 1,80,36

* $P < 0,05$ Различия достоверны по сравнению с новорожденным.

54

Рис. 5. Спектры мощности разрядов симпатических волокон в контроле, при аппликации НН и L-NAME у новорожденных (а) 20-суточных (б) и 3-х летних крыс (в), (мкВ²/Гц).

55

3.1.2. Влияние блокатора синтеза NO и донора NO на фоновую электрическую активность КШГ в онтогенезе

У новорожденного и 10-суточного крысенка 10 мин аппликация НН не

влияла на характер фоновой симпатической активности в КШГ. У 20-

суточных и более взрослых крыс **аппликация НН вызывала увеличение**

средней амплитуды разрядов, увеличение мощности частот в диапазоне

дыхания **13** и сердечной деятельности (рис. 5, табл. 3, 5, 6). НН достоверно не

влиял на частоты свыше 8 Гц.

При аппликации L-NAME в течение 1 часа происходило уменьшение

средней амплитуды разрядов и мощности дыхательной и сердечной частот

спектра (рис. 5, табл. 3, 5, 6) фоновой симпатической активности в КШГ

крыс, начиная с 20 суток жизни. L-NAME достоверно не влиял на частоты

свыше 8 Гц. Не наблюдалось достоверных различий относительно влияния

НН и L-NAME на мощности частот в диапазоне дыхания и сердечной

деятельности между 20 дневными и более взрослыми крысами ($p > 0,05$).

Таблица 5.

Изменения спектра мощности дыхательных разрядов (0,7-1,5 Гц)

симпатических волокон при аппликации НН и L-NAME

Возраст Изменения спектра мощности разрядов (%)

НН L-NAME

20 суток +13,61,64 -11,72,15

30 суток +16,53,26 -15,62,45

60 суток +12,53,56 -16,41,18

1 год +10,52,24 -12,32,36

3 года +16,43,89 -14,22,04

56

Таблица 6.

Изменения спектра мощности разрядов симпатических волокон,

синхронных с сердечной деятельности (4-7 Гц) при аппликации НН и L-

NAME

Возраст

Изменения спектра мощности разрядов (%)

HH L-NAME

20 суток +18,44,46 -16,33,38

30 суток +22,35,34 -18,84,24

60 суток +16,74,18 -18,44,76

1 год +18,85,18 -20,66,12

3 года +24,23,46 -26,45,11

3.1.3. Влияние мембранопроникающих аналогов цГМФ и

специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы на фоновую

электрическую активность постганглионарных волокон в онтогенезе

8Br-цГМФ и ODQ не влияли на характер фоновой электрической

активности постганглионарных симпатических волокон у новорожденных и

10-суточных крыс. 10 мин. аппликация 8Br-цГМФ в концентрации 100 мкМ

вызывала увеличение средней амплитуды разрядов (табл. 3), увеличение

мощности частот в диапазоне дыхания (0,7-1,5 Гц) (рис. 6, табл. 7) и

сердечной деятельности у 20-суточных и более взрослых крыс (рис. 6, табл.

8).

При аппликации ODQ в течение 1 часа происходило уменьшение

средней амплитуды разрядов и мощности частот спектра фоновой

симпатической активности, синхронных с дыханием (рис. 6, табл. 7) и

сердечной деятельностью в КШГ крыс, начиная с 20 суток жизни вплоть до

старых 3-хлетних крыс (рис. 6, табл. 8). Не наблюдалось достоверных

различий относительно влияния 8Br-цГМФ и ODQ на мощности частот в

диапазоне дыхания и сердечной деятельности между 20 дневными и более

взрослыми крысами.

57

Таблица 7.

Изменения спектра мощности дыхательных разрядов (0-1,5 Гц)

симпатических волокон при аппликации 8Br-цГМФ и ODQ

Возраст Изменения спектра мощности разрядов (%)

8Br-цГМФ ODQ

20 суток +16,32,18 -13,72,43

30 суток +14,62,65 -14,62,54

60 суток +13,33,18 -15,12,81

1 год +12,62,64 -14,62,43

3 года +13,92,27 -11,51,22

Таблица 8.

Изменения спектра мощности разрядов симпатических волокон,

синхронных с сердечной деятельности (4-7 Гц) при аппликации 8Br-цГМФ и

ODQ

Возраст Изменения спектра мощности разрядов (%)

8Br-цГМФ ODQ

20 суток +15,44,46 -16,12,33

30 суток +17,33,47 -16,34,81

60 суток +11,62,19 -13,73,48

1 год +14,53,56 -16,63,19

3 года +13,83,17 -18,24,19

58

Рис. 6. Спектры мощности разрядов симпатических потганглионарных

волокон КШГ в контроле, при аппликации 8Br-цГМФ и ODQ у

новорожденных (а), 20-суточных (б) и 3-хлетних крыс (в) (мкВ²/Гц).

59

3.2. Влияние оксида азота на вызванную электрическую

активность волокон КШГ в постнатальном онтогенезе

3.2.1. Вызванные электрические ответы в КШГ в постнатальном

онтогенезе

При стимуляции преганглионарных волокон шейного симпатического ствола регистрировались вызванные электрические потенциалы в постганглионарных волокнах внутреннего сонного нерва КШГ с момента рождения. Достоверные различия между амплитудами ответов с правой и левой сторон не наблюдались, поэтому далее приводятся усредненные данные для обеих сторон. Стимуляция шейного симпатического ствола одиночными импульсами вызывала в КШГ однофазные ответы у новорожденных, двухфазные ответы у 10-суточных крыс и трехфазные - в возрасте 20 суток и более (рис. 7, табл. 9).

Таблица 9.

Средняя амплитуда фаз вызванных потенциалов в постганглионарных волокнах внутреннего сонного нерва КШГ (мкВ) при стимуляции преганглионарных волокон шейного симпатического ствола в онтогенезе

Возраст

Фазы

1 2 3

Новорожденный 242,6 - -

10 суток 413,2* 181,9 -

20 суток 825,5*,** 373,6** 161,5

30 суток 846,7*,** 332,9** 181,6

60

60 суток 828,3*,** 311,7** 201,3

6 месяцев 887,1*,** 353,3** 181,7

3 года 765,9*,** 262,1** 181,3

(* $p < 0,01$, различия достоверны по сравнению с новорожденным,

** $p < 0,001$, различия достоверны по сравнению с 10-суточной крысой)

Рис. 7. Фазы вызванных ответов (1-3) внутреннего сонного нерва КШГ при стимуляции шейного симпатического ствола у новорожденных (а), 20-суточных (б) и 3-хлетних крыс (в). Калибровка: 25 мкВ, 5 мс.

61

3.2.2. Влияние донора NO и блокатора синтеза NO на вызванную электрическую активность волокон КШГ в постнатальном онтогенезе

Воздействие нитропруссиды натрия (НН) (рис. 8) и L-NAME (рис. 9) на амплитуду вызванных потенциалов в КШГ носило дозозависимый характер. Наибольшее увеличение амплитуды под влиянием НН и уменьшение при воздействии L-NAME отмечалось при концентрации 100 мкМ и достоверно не менялось при увеличении концентрации до 1000 мкМ.

Рис. 8. Влияние различных концентраций НН (мкМ) на амплитуду вызванных ответов внутреннего сонного нерва КШГ при стимуляции шейного симпатического ствола у 30-суточных крыс.

* $p < 0,01$, различия достоверны по сравнению с концентрацией 100 мкМ.

62

Рис. 9. Влияние различных концентраций L-NAME (мкМ) на амплитуду вызванных ответов внутреннего сонного нерва КШГ при стимуляции шейного симпатического ствола у 30-суточных крыс.

* $p < 0,01$, различия достоверны по сравнению с концентрацией 100 мкМ.

В онтогенезе, аппликация НН в концентрации 100 мкМ приводила к увеличению амплитуды вызванных потенциалов, которое достигало максимума через 10 мин у 20-суточных и более взрослых крыс. Это увеличение амплитуды полностью устранялось под влиянием L-NAME в течение 30 мин **13** (рис. 10, табл. 10). У 30-суточных и более взрослых крыс, увеличение амплитуды под влиянием НН и уменьшение при воздействии L-NAME, было достоверно большим по сравнению с 20-суточными крысами ($p < 0,01$).

63

Таблица 10.

Изменение амплитуды фаз вызванных потенциалов в КШГ при электрической стимуляции преганглионарных волокон под влиянием НН и L-NAME (%)

Возраст Изменения амплитуды фаз вызванных потенциалов при аппликации

НН L-NAME

20 суток +15±2,6 -13±1,8

30 суток +29±1,7* -28±1,6*

60 суток +30±2,9* -29±3,2*

1 год +35±2,6* -37±2,9*

3 года +29±3,1* -32±3,2*

* $p < 0,01$, различия достоверны по сравнению с 20-суточной крысой

64

Рис. 10. Вызванные ответы внутреннего сонного нерва КШГ при стимуляции шейного симпатического ствола в контроле, при аппликации нитропруссиды нария (100 мкМ) и L-NAME (100 мкМ) у новорожденных (а), 20-суточных (б) и 3-х летних крыс (в). Калибровка: 25 мкВ, 5 мс.

65

3.2.3. Воздействие препаратов, влияющих на гуанилатциклазную систему на вызванную электрическую активность волокон КШГ в постнатальном онтогенезе

Рис. 11. Влияние различных концентраций 8Вг-цГМФ (мкМ) на амплитуду вызванных ответов внутреннего сонного нерва КШГ при стимуляции шейного симпатического ствола у 30-суточных крыс.

* $p < 0,01$, различия достоверны по сравнению с концентрацией 100 мкМ.

Воздействие 8Вг-цГМФ (рис. 11) и ODQ (рис. 12) на амплитуду вызванных потенциалов в КШГ так же, как и в случае НН и L-NAME, носило дозозависимый характер. Наибольшее увеличение амплитуды под влиянием 8Вг-цГМФ отмечалось при концентрации 100 мкМ. Максимальное же ослабление амплитуды ответы при действии ODQ отмечалось при концентрации 10 мкМ. Дальнейшее увеличении концентрации до 1000 мкМ

66

(8Вг-цГМФ) и 100 мкМ (ODQ) не вызывало достоверных изменений амплитуды ответа у 30-суточных крыс.

Рис. 12. Влияние различных концентраций ODQ (нМ) на амплитуду вызванных ответов внутреннего сонного нерва КШГ при стимуляции шейного симпатического ствола у 30-суточных крыс.

* $p < 0,01$, различия достоверны по сравнению с концентрацией 10 мкМ.

Аппликация 8Вг-цГМФ в концентрации 100 мкМ привела к увеличению амплитуды вызванных потенциалов, которое достигало максимума через 10 мин у 20-суточных и более взрослых крыс. Это увеличение амплитуды полностью устранялось под влиянием ODQ (10 мкМ) в течение 30 мин (рис. 13, табл. 11). Увеличение амплитуды под влиянием 8Вг-цГМФ и уменьшение при воздействии ODQ у 30-суточных и более взрослых крыс было достоверно большим по сравнению с 20-суточными животными ($p < 0,01$).

67

Рис. 13. Вызванные ответы внутреннего сонного нерва КШГ при стимуляции шейного симпатического ствола в контроле, при аппликации 8Вг-цГМФ (100 мкМ) и ODQ (10 мкМ) у новорожденных (а), 20-суточных (б) и 3-х летних крыс (в). Калибровка: 25 мкВ, 5 мс.

68

Таблица 11. Изменение амплитуды фаз вызванных потенциалов в КШГ при электрической стимуляции преганглионарных волокон под влиянием

8Bг-цГМФ и ODQ (%)

Возраст

Изменения амплитуды фаз вызванных потенциалов при
аппликации

8Bг-цГМФ ODQ

20 суток +14±2,1 -14±1,8*

30 суток +28±1,9* -23±1,7*

60 суток +29±2,4* -31±3,2*

1 год +31±2,3* -32±3,6*

3 года +27±3,1* -26±3,3*

* $p < 0,01$, различия достоверны по сравнению с 20-суточной крысой

69

3.3. Иммуногистохимические особенности преганглионарных

nNOS-ИР нейронов спинного мозга

3.3.1. Локализация nNOS-ИР нейронов в автономных симпатических

ядрах спинного мозга

В спинном мозге в боковых рогах нейрональная NO-синтаза (nNOS)

выявлялась в автономных симпатических ядрах: 1) nucleus intermediolateralis

thoracolumbalis pars principalis (nucl.ILp), 2) nucleus intermediolateralis

thoracolumbalis pars funicularis (nucl.ILf); 3) nucleus intercalatus spinalis

(nucl.IC); 4) nucleus intercalatus spinalis pars paraependymalis (nucl.ICpe) с

момента рождения у всех животных **13** (рис. 14). Выявлялись отдельные nNOS-

ИР клетки также в области дорсального рога, промежуточного серого

вещества (partition cell), и в вентральной части области вокруг центрального

каналы, которые, по литературным данным не относятся к автономной

нервной системе (Phleps et al., 1991).

Наибольший процент nNOS-ИР симпатических преганглионарных

нейронов выявлялся у новорожденных и 10-суточных крыс, составляя

88±5,3% и 84±6,7% соответственно. К 20 суткам жизни процент снижается до

73±5,2% и к 30 суткам – до 58±4,2% (различия достоверны по сравнению с

новорожденными и 10-суточными, $p < 0,05$). После 30 суток жизни процент

nNOS-ИР симпатических преганглионарных нейронов не изменялся до

старости ($p > 0,05$).

При этом у крыс всех возрастов наибольшее количество nNOS-ИР

симпатических преганглионарных нейронов выявлялось в nucl.ILp (рис. 15).

В первые 30 дней процент nNOS-ИР нейронов в nucl.ILf значительно

увеличился с 9±0,8% у новорожденных до 14±1,2% ($p < 0,05$), а доля

иммунопозитивных клеток в nucl.ICpe значительно снизилась с 20±1,8% до

14±0,5% ($p < 0,05$). У крысят до 30 суток в nucl.ILf наблюдался меньший

процент nNOS-ИР нейронов по сравнению с nucl.IC и nucl.ICpe, а у

70

животных старше 2 месяцев наименьшая доля nNOS-ИР клеток приходилась

на nucl.ICpe.

У всех животных преганглионарные нейроны, иммунореактивные к

nNOS, показали сильное цитоплазматическое окрашивание, которое

распространялось на проксимальные дендриты. Большинство nNOS-ИР

нейронов были тесно сгруппированы в nucl.ILp. Многие отростки были

ориентированы медиально, некоторые простирались до желудочка, тогда как

другие отростки распространялись в соседний боковой пучок. Большинство

нейронов nNOS-ИР на срезах имели круглую или веретенообразную форму.

Также отмечались отдельные клетки треугольной формы.

Во всех четырех ядрах среднее значение площади поперечного сечения

профилей nNOS-ИР нейронов достоверно увеличивалось в первые 10 дней

развития с 176±8 до 208±14 мкм² ($p < 0,05$, табл. 12). В ILp, ILf, IC и ICpe

среднее значение площади поперечного сечения профилей nNOS-ИР

нейронов достоверно не различалось у 10-дневных и более старых крыс ($p > 0,05$). Не наблюдалось достоверных различий между областями поперечного сечения nNOS-ИР профилей нейронов в разных ядрах ($p > 0,05$).

71

Рис. 14. Микрофото. nNOS-ИР (красная флуоресценция) нейроны 20-суточной крысы в автономных ядрах спинного мозга крыс. ЦК – центральный канал. Флуоресценция CY3 (красный). Масштаб – 100 мкм.

Рис. 15. Распределение nNOS-ИР преганглионарных нейронов в ядрах спинного мозга крысы (в %). (* $p < 0,05$, различия достоверны по сравнению с новорожденным).

72

Таблица 12.

Площадь поперечного сечения nNOS-ИР-нейронов (мкм²) (n = 100 в каждом ядре, в каждой возрастной группе).

3.3.2. Солокализация nNOS с холинацетилтрансферазой

У новорожденных и 10-суточных крыс большинство нейронов в nucl.IIр являлись nNOS-ИР одновременно содержали фермент синтеза ацетилхолина - холинацетилтрансферазу (ХАТ) (рис. 16 и 17). Однако при этом в этих возрастных группах в вентро-медиальной области ядра обнаруживалась группа nNOS-ИР/ХАТ-негативных нейронов, которые не наблюдались у более взрослых животных (26±3,1% у новорожденных и 8±1,4% у 10-суточных). В IIр процент nNOS-ИР нейронов уменьшается, а доля ХАТ-ИР клеток увеличивается во время развития. В первый месяц доля nNOS-ИР нейронов значительно снизилась с 92±3,4% у новорожденных до 55±4,6% у 1-месячного ($p < 0,001$), тогда как число ХАТ-ИР нейронов увеличилось с 74±4,2% до 99±0,3% соответственно ($p < 0,01$). Не было никаких существенных различий в проценте nNOS(-)/ХАТ(+) нейронов между 30-дневными и более старыми крысами ($p > 0,05$).

Возраст nucl.IIр nucl.IIf nucl.IC nucl.ICре

Новорожденный 176 ± 8 163 ± 11 182 ± 19 166 ± 12

10 суток 208 ± 14* 215 ± 15* 222 ± 20* 189 ± 17

20 суток 213 ± 14* 205 ± 9* 218 ± 14* 200 ± 16*

30 суток 220 ± 13* 214 ± 16* 230 ± 12* 226 ± 18*

2 месяца 225 ± 12* 225 ± 23* 225 ± 19* 225 ± 17*

6 месяцев 216 ± 15* 221 ± 18* 218 ± 14* 232 ± 18*

3 года 230 ± 28* 212 ± 15* 214 ± 19* 206 ± 32*

73

Доля nNOS(+)/ХАТ(+) нейронов достоверно достоверно увеличивалась с 8±0,7% у новорожденных до 18±2,3% у 10-суточных и 22±1,6% у 20-суточных ($p < 0,05$) и далее вновь достоверно возрастала до 45±4,5% у 30-суточных ($p < 0,05$) и после этого достоверно не изменялась у более взрослых крыс ($p > 0,05$).

Рис. 16. Микрофото. NOS-иммунореактивные (красная флуоресценция) и

ХАТ-позитивные (зеленая флуоресценция) нейроны в nucl.IIр спинного мозга крыс: новорожденной (а), 10-суточной (б), 30-суточной (в), трехлетней (г). NOS-позитивные нейроны, не содержащие ХАТ, указаны стрелками. Флуоресценция FITC (зеленый цвет), CY3 (красный). Масштаб – 30 мкм (а), 50 мкм (б-г).

74

Рис. 17. Процент ХАТ-ИР и nNOS-ИР нейронов nucl.IIр в онтогенезе.

(* $p < 0,01$, различия достоверны по сравнению с новорожденным, ** $p < 0,05$, различия достоверны по сравнению с 20-суточной крысой).

В nucl.IIf у всех животных nNOS-ИР нейроны являлись ХАТ-позитивными.

В nucl.IC и nucl.ICре содержание nNOS-ИР/ХАТ-негативных, nNOS-

ИР/ХАТ-ИР, nNOS-негативных/ХАТ-ИР достоверно не отличалось между собой у животных всех возрастных групп (табл. 13, 14).

75

Таблица 13.

Процентное содержание нейронов nNOS(+)/ХАТ(-), nNOS (+)/ХАТ(+), nNOS(-)/ХАТ(+) в nucl.IC у крыс разных возрастов. (n = 5 в каждой возрастной группе)

Возраст nNOS(+)/ХАТ(-) nNOS(+)/ХАТ(+) nNOS(-)/ХАТ(+)

Новорожденный 35 ± 1,7 31 ± 2,5 34 ± 2,1

10 суток 32 ± 2,8 36 ± 2,4 32 ± 1,5

20 суток 33 ± 1,9 32 ± 2,5 35 ± 2,1

30 суток 36 ± 1,4 31 ± 2,3 33 ± 1,6

2 месяца 32 ± 2,7 33 ± 1,5 35 ± 1,1

6 месяцев 33 ± 1,7 33 ± 1,5 34 ± 1,1

3 года 34 ± 0,7 35 ± 1,5 31 ± 2,1

Таблица 14.

Процентное содержание нейронов nNOS (+)/ХАТ (-), nNOS (+)/ХАТ (+), nNOS(-)/ХАТ(+) в nucl. ICре у крыс разных возрастов. (n = 5 в каждой возрастной группе)

Возраст nNOS(+)/ХАТ(-) nNOS(+)/ХАТ(+) nNOS(-)/ХАТ(+)

Новорожденный 36 ± 2,5 31 ± 1,2 33 ± 2,6

10 суток 30 ± 2,2 34 ± 1,6 36 ± 2,5

20 суток 35 ± 2,3 33 ± 1,1 32 ± 1,1

30 суток 36 ± 2,5 33 ± 1,1 31 ± 1,3

2 месяца 36 ± 1,5 31 ± 2,2 33 ± 1,8

6 месяцев 32 ± 1,5 34 ± 2,2 34 ± 2,8

3 года 35 ± 1,5 34 ± 1,2 31 ± 1,8

76

3.3.3. Солокализация nNOS с кальбиндином

Тела нейронов и их проксимальные дендриты демонстрировали иммунореактивность к кальбиндину (КБ), которая варьировала по интенсивности от слабой до очень сильной (рис. 18). Наибольший процент нейронов КБ-ИР, солокализирующих nNOS, был обнаружен в nucl.IIр, а меньший - в nucl.IC. Солокализации КБ и nNOS не наблюдалось в nucl.IIf и nucl.ICре.

Процент nNOS(+)/КБ(-) в nucl.IIр увеличился с 22±3,3% у новорожденных и 23±3,6% у 10-дневных крыс до 36±4,2% у двухмесячных (статистически значимые различия между 10-дневными и двухмесячными крысами, p<0,05) (рис. 19). Однако доля nNOS(-)/КБ(+) не изменилась в первый месяц жизни и достоверно увеличилась с 8±2,5% в возрасте одного месяца до 17±3,4% в возрасте шести месяцев (p <0,05).

77

Рис. 18. Микрофото. nNOS-иммунореактивные (зеленая флуоресценция) и КБ-позитивные (красная флуоресценция) нейроны в nucl.IIр спинного мозга крыс: 10-суточной (а), 20-суточной (б), 30-суточной (в), 3-х летней (г).

Флуоресценция FITC (зеленый цвет), CY3 (красный). Масштаб - 50

мкм.

Рис. 19. Процент КБ-ИР и nNOS-ИР нейронов nucl.IIр в онтогенезе. (*p<0,01, различия достоверны по сравнению с новорожденным, **p<0,05, различия достоверны по сравнению с 20-суточной крысой).

В nucl.IC процент nNOS(+)/КБ(+) нейронов был высоким и увеличился с 40±4,8% у новорожденных и 43±5,1% у 10-дневных крыс до 61 ± 5,5% у 20-дневные крысы (статистически значимые различия, p <0,05) (рис. 20). Доля nNOS(+)/КБ(-) нейронов также увеличилась с 18±2,4% у новорожденных и с 20±2,1% у 10-дневных до 30±3,5% у 20-дневных крыс (статистически

значимые различия, $p < 0,05$). Мы не наблюдали статистически значимых различий между различными 20-дневными и более старыми крысами ($p > 0,05$).

78

Рис. 20. Процент КБ-ИР и nNOS-ИР нейронов в $nucl.IC$ в онтогенезе. (* $p < 0,05$, различия достоверны по сравнению с 10-суточной крысой).

3.3.4. Солокализация nNOS с кальретином

У новорожденных большая часть в $nucl.IIpr$ содержит кальретинин (КР) ($68 \pm 5,7\%$) (рис. 21, 22). Процент КР-ИР нейронов в $nucl.IIpr$ от момента рождения до 20 суток ($67 \pm 6,5\%$) достоверно меньше по сравнению со старыми 3-летними крысами ($88 \pm 7,1\%$, $p < 0,05$).

В $nucl.IIf$ у новорожденных и 10-суточных большинство составляли nNOS(-)/КР(+) нейроны, с 20 суток - nNOS(+)/КР(+) (табл. 15).

79

Рис. 21. Микрофото. NOS-иммунореактивные (зеленая флуоресценция) и КР-позитивные (красная флуоресценция) нейроны в $nucl.IIpr$ спинного мозга крыс: новорожденной (а), 10-суточной (б), 20-суточной (в), 3-летней (г). Флуоресценция FITC (зеленый цвет), CY3 (красный). Масштаб - 50 мкм.

80

Рис. 22. Процент КР-ИР и nNOS-ИР нейронов в $nucl.IIpr$ в онтогенезе. (* $p < 0,05$, различия достоверны по сравнению со старой крысой).

Таблица 15.

Процентное содержание нейронов nNOS(+)/КР(-), nNOS (+)/КР(+), nNOS(-)/КР(+) в $nucl.IIf$ у крыс разных возрастов. (n=5 в каждой возрастной группе)

Возраст nNOS(+)/КР(-) nNOS(+)/КР(+) nNOS(-)/КР(+)

Новорожденный $9 \pm 0,7$ $27 \pm 2,6$ $64 \pm 5,7$

10 суток $12 \pm 1,1$ $42 \pm 3,6$ $46 \pm 3,1$

20 суток $14 \pm 1,3$ $68 \pm 4,9^*$ $18 \pm 1,2^{**}$

30 суток $12 \pm 1,2$ $72 \pm 5,5^*$ $16 \pm 1,2^{**}$

2 месяца $16 \pm 1,5$ $66 \pm 4,8^*$ $18 \pm 1,5^{**}$

6 месяцев $15 \pm 1,5$ $69 \pm 5,7^*$ $16 \pm 1,9^{**}$

3 года $8 \pm 0,7$ $81 \pm 6,3^*$ $11 \pm 1,0^{**}$

(* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, различия достоверны по сравнению с новорожденной и 10-суточной крысой).

81

В $nucl.IC$ и $nucl.IIcpe$ содержание nNOS-ИР/КР-негативных, nNOS-ИР/КР-ИР, nNOS-негативных/КР-ИР достоверно не отличалось между собой у животных всех возрастных групп (табл. 16, 17).

Таблица 16.

Процентное содержание нейронов nNOS(+)/КР(-), nNOS (+)/КР(+), nNOS(-)/КР(+) в $nucl.IC$ у крыс разных возрастов. (n=5 в каждой возрастной группе)

Возраст nNOS(+)/КР(-) nNOS(+)/КР(+) nNOS(-)/КР(+)

Новорожденный $32 \pm 1,5$ $36 \pm 2,8$ $32 \pm 2,4$

10 суток $33 \pm 2,1$ $32 \pm 1,9$ $35 \pm 2,5$

20 суток $33 \pm 1,4$ $31 \pm 1,6$ $36 \pm 2,3$

30 суток $33 \pm 1,1$ $32 \pm 2,7$ $35 \pm 1,5$

2 месяца $31 \pm 2,1$ $34 \pm 1,5$ $35 \pm 0,7$

6 месяцев $33 \pm 1,5$ $33 \pm 1,7$ $34 \pm 1,1$

3 года $34 \pm 2,5$ $31 \pm 2,1$ $35 \pm 1,7$

82

Таблица 17.

Процентное содержание нейронов nNOS (+)/КР (-), nNOS (+)/КР (+), nNOS(-)/КР(+) в $nucl.IIcpe$ у крыс разных возрастов. (n = 5 в каждой возрастной группе)

Возраст nNOS(+)/KP(-) nNOS(+)/KP(+) nNOS(-)/KP(+)

Новорожденный $31 \pm 1,5$ $34 \pm 1,1$ $35 \pm 2,5$

10 суток $33 \pm 2,2$ $36 \pm 2,2$ $31 \pm 1,1$

20 суток $34 \pm 2,5$ $32 \pm 1,1$ $34 \pm 2,6$

30 суток $31 \pm 2,5$ $36 \pm 1,6$ $33 \pm 1,8$

2 месяца $33 \pm 1,5$ $36 \pm 2,2$ $31 \pm 1,3$

6 месяцев $32 \pm 2,3$ $35 \pm 1,2$ $33 \pm 1,8$

3 года $36 \pm 1,5$ $30 \pm 1,2$ $34 \pm 2,8$

3.3.5. Солокализация nNOS с CART

Интенсивность флуоресценции CART-ИР нейронов также варьировала, некоторые нейроны CART были слабо, а другие интенсивно окрашены (рис. 23). Наибольшее количество CART-ИР нейронов, солокализованных с nNOS, было обнаружено в nucl.IIр с меньшим числом в nucl.IC. Солокализация не наблюдалась в nucl.IIf и nucl.ICре.

В nucl.IIр доля nNOS(+)/CART(-) нейронов снижалась с $82 \pm 4,7\%$ у 10-дневных до $53 \pm 6,1\%$ у одномесячных крыс ($p < 0,001$) (рис. 24).

Противоположная динамика была показана для нейронов nNOS(-)/CART(+), где процент значительно увеличился с $4 \pm 0,9\%$ у 10-дневных животных до $27 \pm 3,7\%$ у одномесячных крыс ($p < 0,001$).

83

Рис. 23. Микрофото. NOS-ИР (зеленая флуоресценция) и CART-ИР (красная флуоресценция) нейроны в nucl.IIр спинного мозга крыс: новорожденной (а), 10-суточной (б), 30-суточной (в), трехлетней (г). Флюоресценция FITC (зеленый цвет), CY3 (красный). Масштаб – 50 мкм.

84

Рис. 24. Процент CART-ИР и nNOS-ИР нейронов nucl.IIр в онтогенезе.

(* $p < 0,01$, различия достоверны по сравнению с новорожденным, ** $p < 0,05$, различия достоверны по сравнению с 20-суточной крысой).

Рис. 25. Процент CART-ИР и nNOS-ИР нейронов nucl.IC в онтогенезе.

(* $p < 0,05$, различия достоверны по сравнению с 10-суточной крысой).

85

В nucl.IC процент nNOS(+)/CART(+) преганглионарных симпатических нейронов увеличился с $12 \pm 1,7\%$ у новорожденных до $29 \pm 3,6\%$ у 20-дневных крыс (статистически значимые различия, $p < 0,001$) (рис. 25). Доля nNOS(+)/CART(-) нейронов снизилась с $62 \pm 5,6\%$ у 10-дневных до $33 \pm 4,1\%$ у 1-месячных крыс ($p < 0,001$).

3.3.6. Экспрессия nNOS по данным вестерн-блоттинга

По данным вестерн-блот анализа, экспрессия nNOS в спинном мозге была максимальной у новорожденного и достоверно снижалась в первые 10 суток жизни ($p < 0,01$, рис. 26). Не наблюдалось достоверных различий по экспрессии nNOS у крыс старше 10 суток ($p > 0,05$).

Рис. 26. Изменение экспрессии nNOS в спинном мозге крыс в постнатальном онтогенезе. а) Иммуноблоты nNOS и GAPDH спинного мозга крыс (GAPDH – контрольный белок), б) Изменение соотношения экспрессии nNOS относительно GAPDH у крыс разного возраста.

86

3.4. Распределение nNOS в краниальном шейном симпатическом ганглии

У крыс от момента рождения до зрелого возраста (6 месяцев) nNOS-позитивные нейроны отсутствовали в КШГ. Однако у старых 3-летних крыс наблюдались nNOS-ИР скопления в виде глыбок и отдельные nNOS-ИР нейроны. nNOS в КШГ выявлялась в преганглионарных волокнах.

3.4.1. nNOS-позитивные преганглионарные волокна

Терминали nNOS-позитивных преганглионарных волокон в КШГ у

новорожденных крысят не выявлялись, а появлялись лишь в 10-суточном возрасте. Плотность nNOS -иммунореактивных волокон возрастала между 10 и 30 сутками жизни и оставалась постоянной в последующем (табл. 18, рис. 27-29).

Таблица 18.

Плотность nNOS-иммунореактивных волокон в КШГ (n=5 в каждой возрастной группе)

Возраст Плотность (на мм²)

10 суток 18±8,8

20 суток 126±26,2*

30 суток 202±15,6*,**

2 месяца 194±28,2*,**

6 месяцев 218±29,0*,**

3 года 178±12,4*,**

* p<0,001, различия достоверны по сравнению с 10-суточной, **p<0,05,

различия достоверны по сравнению с 20-суточной крысой

87

3.4.2. Солокализация nNOS с ХАТ, КР и САРТ.

У новорожденного выявлялись хорошо выраженные ХАТ-ИР (рис. 27)

и КР-ИР (рис. 28) волокна. Солокализация nNOS с ХАТ и КР отмечалась с 10

суток жизни. У 20-суточных, 1, 2, 6-месячных и 3-летних крыс в

большинстве волокон отмечалась солокализация nNOS с ХАТ и КР.

В отличие от ХАТ и КР, лишь отдельные САРТ-ИР волокна и

точечные структуры обнаруживались у новорожденного (рис. 29). В возрасте

от 10 суток до 6 месяцев жизни, обнаруживалось небольшое количество

САРТ-ИР волокон, не солокализованных с nNOS. Однако у старых 3-летних

крыс плотность САРТ-ИР волокон возрастает, при этом большая часть их

солокализует nNOS.

88

Рис. 27. nNOS-ИР (зеленые) и ХАТ-ИР (красные) волокна в КШГ

новорожденной (а), 20-суточной (б), 30-суточной (в), трехлетней (г).

Флуоресценция FITC, CY3, масштаб 50 мкм.

Рис. 28. nNOS-ИР (красные) и КР-ИР (зеленые) волокна в КШГ

новорожденной (а), 20-суточной (б), 30-суточной (в), трехлетней (г).

Флуоресценция FITC, CY3, масштаб 50 мкм.

89

Рис. 29. nNOS-ИР (красные) и САРТ-ИР (зеленые) волокна в КШГ

новорожденной (а), 20-суточной (б), 30-суточной (в), трехлетней (г).

Флуоресценция FITC, CY3, масштаб 50 мкм.

90

3.4.3. Результаты вестерн-блоттинга.

В КШГ nNOS определялась лишь с 10 суток жизни при помощи

вестерн-блоттинга. В постнатальном онтогенезе интенсивность

иммуномечения блотов достоверно увеличивалась в диапазоне 10-30 суток,

далее достоверно не менялась у 2- и 6-месячных животных, и далее опять

достоверно уменьшалась у старых крыс по сравнению с 2 и 6 месяцами

жизни (p<0,05) (рис. 30). Учитывая отсутствие nNOS-ИР нейронов в КШГ по

данным иммуногистохимического исследования, данные вестерн-блоттинга в

КШГ отражают экспрессию nNOS в преганглионарных волокнах.

Рис. 30. Изменение экспрессии nNOS в КШГ в постнатальном

онтогенезе. а) Иммуноблоты nNOS и GAPDH КШГ крыс (GAPDH –

контрольный белок), б) Изменение соотношения экспрессии nNOS

относительно GAPDH у крыс разного возраста.

p<0,05 по сравнению *с 20-м днём жизни, #с 3 годами.

91

4. ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенной работы проанализировано влияние эффектов оксида азота и гуанилатциклазной системы на фоновую импульсацию и на вызванную электрическую активность симпатических постганглионарных волокон краниального шейного ганглия у крыс в постнатальном онтогенезе.

Выявлена локализация, процент NO-содержащих преганглионарных симпатических нейронов в спинном мозге и солокализация с другими маркерами, а также экспрессия нейрональной NO-синтазы в спинном мозге и краниальном шейном ганглии в постнатальном онтогенезе.

Исследование проведено с использованием иммуногистохимических методов, вестерн-блоттинга, электрофизиологических и фармакологических методов. Нейрональная NO-синтаза, холинацетилтрансфераза, кальбиндин, кальретицин, кокаин- и амфетамин-регулируемый транскрипт в спинном мозге и краниальном шейном узле выявлены методом двойного мечения антителами. Экспрессия нейрональной NO-синтазы в сегменте Th2 спинного мозга и краниальном шейном узле выявлены методом вестерн-блоттинга.

Регистрация и анализ фоновой активности в наружном сонном нерве краниального шейного узла, регистрация и анализ вызванных электрических потенциалов в постганглионарных волокнах внутреннего сонного нерва под влиянием донора NO нитропрусида натрия и блокатора синтеза NO L-NAME, а также мембранопроницающего аналога цГМФ 8Br-цГМФ и специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы ODQ электрофизиологическими и фармакологическими методами.

В работе продемонстрировано, что в постнатальном онтогенезе средняя амплитуда разрядов фоновой электрической активности в постганглионарных волокнах внутреннего сонного нерва КШГ возрастает. У новорожденных фоновая импульсация в постганглионарных волокнах носит

92 нерегулярный характер, ритмические колебания отсутствуют. Ритмическая активность появляется на 10 сутки. В контроле в спектре мощности фоновой электрической активности у 10-суточных и более взрослых животных наибольшее значение имеют частоты, связанные с дыханием (0,7-1,5 Гц) и сердечной деятельностью (4-7 Гц). Это соответствует ранее полученным данным о характере фоновой электрической активности в наружном сонном нерве КШГ крысы (А.А.Коробкин, 2011), а также фоновой электрической активности нервов звездчатого ганглия кошки (Masliukov, 2003; П.М.Маслюков, А.Д.Ноздрачев, 2006; П.М.Маслюков с соавт., 2009).

Формирование паттерна разрядов симпатических нервов у кошек заканчивается ко второму месяцу жизни (Masliukov, 2003; П.М.Маслюков, А.Д.Ноздрачев, 2006; П.М.Маслюков с соавт., 2009).

Блокатор синтеза NO L-NAME и донор NO нитропрусид натрия, а также мембранопроницающий аналог цГМФ 8Br-цГМФ и специфический ингибитор растворимой гуанилатциклазы ODQ оказывают влияние на фоновую электрическую активность КШГ, начиная с 20 суток жизни. Под влиянием донора NO - нитропрусида натрия, а также мембранопроницающего аналога цГМФ 8Br-цГМФ происходит **увеличение средней амплитуды разрядов, увеличение мощности частот в диапазоне дыхания** **13** и сердечной деятельности. Блокатор синтеза NO L-NAME и специфический ингибитор растворимой гуанилатциклазы ODQ оказывают обратный эффект на амплитуду и спектр мощности фоновой активности.

Стимуляция шейного симпатического ствола одиночными импульсами вызывала в постганглионарных волокнах КШГ однофазные ответы у новорожденных, двухфазные ответы у 10-суточных крыс и трехфазные - в возрасте 20 суток и более. Литературные данные свидетельствуют, что в течение первого полугодия жизни у кошек наблюдаются не только линейное

увеличение скорости проведения возбуждения, но и усложнение ответов. У

новорожденного и 10-дневного котенка ответы были монофазными,

93

однородными по своему характеру. Среди транзиторных путей в этих возрастных группах не наблюдалось достоверных различий по скоростям проведения. По скорости проведения они соответствуют группе С. У 20-дневных котят впервые появляются коротколатентные ответы волокон, которые по скорости проведения возбуждения могут быть отнесены к группе АБ и В. У 20-дневных котят впервые появляется разделение вызванного ответа на отдельные фазы (Masliukov et al., 2000).

Амплитуда вызванных ответов в КШГ крыс изменялась под влиянием донора NO нитропруссид натрия и блокатора синтеза NO L-NAME, а также мембранопроницающего аналога цГМФ 8Br-цГМФ и специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы ODQ. Апликация нитропруссид натрия и 8Br-цГМФ приводила к увеличению амплитуды вызванных потенциалов. Это увеличение амплитуды полностью устранялось под влиянием L-NAME и ODQ.

Влияние нитропруссид натрия, 8Br-цГМФ, L-NAME и ODQ носило дозозависимый эффект. Наибольшая степень выраженности эффекта препаратов наблюдалась в дозировке 100 мкМ для нитропруссид натрия, 8Br-цГМФ, L-NAME и 10 мкМ для ODQ.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии NO в процессах нейромодуляции в симпатических ганглиях, при этом сходные механизмы имеют место и в ресничном узле (Briggs, 1992; Altememi, Alkadhi, 1999; Alkadhi et al., 2005) и этот эффект связан с активацией гуанилатциклазной системы (Briggs, 1992; Scott, Bennett, 1993).

Предполагается, что высокочастотная стимуляция преганглионарных волокон приводит к притоку достаточного количества Ca^{2+} в терминаль для активации nNOS (Garthwaite, 2008; Socodato et al., 2012); произведенный таким образом NO действует на гуанилатциклазу, расположенную в терминале, что приводит к увеличению секреции передатчика в вегетативных

94

ганглиях, но не меняет чувствительность постсинаптических рецепторов (Kuba, Kumamoto, 1990; Scott, Bennett, 1993).

Настоящее исследование показывает снижение экспрессии nNOS в преганглионарных симпатических нейронах у крыс в раннем постнатальном развитии. Соматические мотонейроны и преганглионарные нейроны формируются синхронно в одном вентролатерально расположенном столбе в промежуточной зоне в течение эмбриональных дней 11–12 и экспрессируют ХАТ. На 17-й день эмбриональной жизни, эти преганглионарные нейроны достигают своих конечных положений в средней части промежуточной зоны спинного мозга (Phleps et al. 1991). Таким образом, симпатические преганглионарные нейроны становятся NADPH-d- и nNOS-ИР в начале своего развития в то время, как они мигрируют к своим взрослым позициям (Wetts et al. 1995).

В работе продемонстрировано, что даже у новорожденных нейроны nNOS-ИР были расположены в промежуточном сером веществе спинного мозга в четырех группах, соответствующих четырем ядрам: ILp, ILf, IC и ICpe. Самый большой процент nNOS-ИР нейронов был локализован в ILp. IC и ICpe содержат несколько более высокий процент nNOS-ИР преганглионарных нейронов у новорожденного по сравнению со взрослым. Наши результаты согласуются с предыдущими данными, касающимися общего распределения симпатических преганглионарных нейронов в спинном мозге и его изменений в раннем постнатальном развитии (Pueg, Coote 1994a).

Площадь поперечного сечения nNOS-IP симпатических

преганглионарных нейронов увеличивается в первые 10 дней жизни у крыс.

Однако увеличение размеров сомы в симпатических и кишечных ганглиях происходит медленнее. Области поперечного сечения симпатических нейронов становятся похожими на параметры взрослых в конце 20–30 дней

95

(П.М.Маслюков с соавт. 2012), а в кишечных ганглиях созревание нейронов заканчивается только в конце второго месяца жизни (П.М.Маслюков с соавт. 2017). Однако мы обнаружили, что у новорожденных животных наибольший процент преганглионарных нейронов составляли nNOS-IP, а небольшая часть из них была ХАТ-негативной. В течение первого месяца жизни доля nNOS-IP преганглионарных нейронов значительно снижалась, тогда как доля нейронов ХАТ-IP увеличивалась. У 1-месячных крыс 45% симпатических преганглионарных нейронов были nNOS(-). Впоследствии эта доля практически не изменялась, в том числе у старых крыс.

Сведения об уменьшении процента nNOS-IP преганглионарных нейронов, полученные иммуногистохимическими методами были также впервые подтверждены с помощью вестерн-блоттинга. Данные, полученные этим методом свидетельствуют, что экспрессия nNOS значительно снижается в первые 10 суток жизни.

Некоторые литературные данные также указывают на временную сверхэкспрессию nNOS как в нейропиле, так и в специфических популяциях нейронов развивающейся коры головного мозга (Judas et al. 1999). NO участвует в различных формах ремоделирования и пластичности нейронов. Например, NO необходим как для образования синапсов, опосредованных активностью (Nikonenko et al. 2013), так и для экспрессии белка, ассоциированного с нейропластичностью (Gallo, Iadecola 2011). NO может нитрозировать различные белки, в результате чего он может модулировать рост дендритов во время развития. Ингибирование nNOS во время развития приводит к нарушениям морфологии дендритов и снижению числа синапсов (Sanchez-Islas, Leon-Olea 2004).

Тем не менее, в ганглиях автономной нервной системы, паттерны

экспрессии nNOS и ХАТ различны. Повышенный уровень экспрессии nNOS также наблюдается во время развития кишечных ганглиев. В тонкой кишке

96

морской свинки доля нейронов, экспрессирующих nNOS, уменьшается во время постнатального развития. Круговая гладкая мышца кишечника, по-видимому, получает иннервацию от nNOS(+) волокон до появления ХАТ(+) волокон (Patel et al. 2010). Напротив, у новорожденных грызунов количество NADPH-d-позитивных преганглионарных волокон в симпатических ганглиях довольно мало, а количество волокон увеличивается в раннем постнатальном развитии (Emanuilov et al. 2008).

Ряд исследований показал, что NO может регулировать высвобождение нейромедиатора. NO повышает эффективность ганглионарной синаптической холинергической передачи и вызывает длительное усиление ганглионарной передачи в цилиарном ганглии цыплят и симпатическом шейном ганглии крысы (Southam et al. 1996; Alkadhi et al. 2005). Кроме того, NO также может влиять на экспрессию постсинаптических рецепторов к ацетилхолину (Godfrey, Schwarte 2010). В других работах NO уменьшал вызванное высвобождение ацетилхолина из мышечного нервного окончания мышцы (О.В.Яковлева с соавт., 2013; Mukhutdinova et al. 2018). У новорожденных амплитуда выделения медиатора из симпатического нерва низкая, и это можно объяснить низкой эффективностью холинергических синапсов в симпатических ганглиях. Ранние синапсы слабы, быстро утомляются и мало проявляют спонтанную активность (Rubin, 1985). На ранних этапах развития

амплитуда синаптических потенциалов в симпатических ганглиях увеличивается, а плотность тока, вызванного ацетилхолином, удваивается в период формирования большинства синапсов (Gardette et al. 1991). В паравертебральных симпатических ганглиях наблюдается быстрое увеличение количества ультраструктурно детектируемых синапсов во время развития плода и новорожденного (Smolen, Raisman, 1980). Таким образом, увеличение солокализации nNOS/XAT в симпатических преганглионарных нейронах в первые недели жизни может отражать созревание синаптической передачи во время развития. Мы предполагаем, что на экспрессию XAT в

97

симпатических преганглионарных нейронах в раннем постнатальном развитии влияют мишени - симпатические ганглионарные нейроны. Таким образом, мы также можем предложить двойную роль NO в развитии симпатических преганглионарных нейронов. Он действует как возможный трофический фактор и способен опосредовать взаимодействие между преганглионарными и ганглионарными нейронами до образования синапса или даже физических контактов. Кроме того, NO регулирует высвобождение ацетилхолина из пресинаптических волокон и облегчает холинергическую нейротрансмиссию в симпатических ганглиях. Большая часть nNOS-IP симпатических преганглионарных нейронов также содержали CART, КР и КБ. Мы обнаружили, что процент nNOS (+)/КБ (+) нейронов уменьшается в процессе развития. Эти данные согласуются с нашими предыдущими данными о снижении экспрессии КБ в симпатических ганглиях крыс и кошек (Masliukov et al. 2012, 2015). В зрелых нейронах кальций-связывающие белки участвуют в многочисленных функциях, включая передачу сигналов клетками, поглощение и транспорт кальция, подвижность клеток и внутриклеточную буферизацию кальция. КБ и КР могут защитить нейроны от значительных колебаний свободного внутриклеточного Ca²⁺ и может предотвратить гибель клеток (Andressen et al. 1993; Schwaller 2012). Возможно, КБ и КР необходимы для установления новых синаптических контактов между аксонами главных ганглионарных нейронов и органами-мишенями, преганглионарными волокнами и главными ганглионарными нейронами. (Siechen et al. 2009; Heiman, 2010).

Между тем, доля nNOS(+)/CART(-) спинномозговых нейронов уменьшается по сравнению с клетками nNOS(-)/CART(+) в первые 20 суток жизни, и это очень похоже на изменения колокализации nNOS/XAT.

Значительная часть CART-IP симпатических преганглионарных нейронов может участвовать в регуляции сердечно-сосудистой системы, поскольку

98

около 40% CART-IP нейронов в ILp экспрессируют Fos в ответ на гипотензивный стимул. В спинном мозге низкие дозы CART усиливают гипертонию и тахикардию, вызванную интратекальным глутаматом, и при более высоких дозах сам пептид может увеличивать среднее артериальное давление и частоту сердечных сокращений (Scruggs et al. 2005). Таким образом, можно предположить, что процесс увеличения доли CART-IP и XAT-IP преганглионарных нейронов в спинном мозге может соответствовать повышению частоты сердечных сокращений и артериального давления в раннем периоде постнатального развития. Тем не менее, возрастные изменения нейрохимических характеристик в преганглионарных нейронах спинного мозга и периферических симпатических узлах существенно различаются. В отличие от спинного мозга, в КШГ крыс nNOS-позитивные нейроны отсутствовали от момента рождения до зрелого возраста (6 месяцев). Тем не менее, у старых 3-летних крыс наблюдались nNOS-IP скопления в виде глыбок и отдельные nNOS-IP нейроны. В симпатических узлах экспрессия nNOS и плотность nNOS-IP

симпатических преганглионарных волокон увеличивается в раннем постнатальном онтогенезе с момента рождения до 30 дней жизни и уменьшается у старых животных. Полученные данные соответствуют ранее полученным сведениям по изменению НАДФН-диафоразы в симпатических узлах (Emanuilov et al., 2008; П.М.Маслюков с соавт., 2016).

В КШГ на протяжении всех исследованных возрастов отсутствовали КР-ИР и CART-ИР нейроны, а ХАТ-ИР нейроны выявлялись в небольшом числе, менее 1%, что соответствует литературным данным (Anderson, 2006; Richardson, 2006; Masliukov et al., 2015). У крыс с 20 суток жизни в КШГ в большинстве волокон отмечалась солокализация nNOS с ХАТ и КР. У юных и взрослых крыс CART-ИР волокна представлены в малом количестве без солокализации с nNOS. Однако у старых 3-летних крыс плотность CART-ИР волокон возрастает, при этом большая часть их солокализует nNOS.

99

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У новорожденных крыс в преганглионарных симпатических нейронах отмечается наиболее высокий уровень экспрессии нейрональной NO синтазы.

В раннем постнатальном онтогенезе в преганглионарных симпатических нейронах происходит снижение экспрессии нейрональной NO синтазы и увеличение числа нейронов, содержащих холинацетилтрансферазу. В отличие от тел преганглионарных нейронов в спинном мозге, nNOS в преганглионарных волокнах в симпатических узлах к моменту рождения присутствует в очень малом количестве и экспрессия nNOS в симпатических узлах, в отличие от спинного мозга, возрастает с момента рождения в раннем постнатальном периоде.

Симпатические узлы новорожденных крыс характеризуются незрелостью синаптической передачи, проявляющейся в низкой амплитуде фоновой импульсации, отсутствием ритмических колебаний, однофазными вызванными потенциалами и нечувствительностью к действию NO. NO оказывает облегчающее влияние на синаптическую передачу в симпатических узлах крысы с 20 суток жизни **13**. Эффекты NO на синаптическую передачу в симпатических узлах опосредуются через гуанилатциклазную систему.

Таким образом, NO может играть двойную роль в развитии симпатических преганглионарных нейронов. Он действует как возможный трофический фактор и способен опосредовать взаимодействие между преганглионарными и ганглионарными нейронами до образования синапса или даже физических контактов. Кроме того, NO регулирует высвобождение ацетилхолина из пресинаптических волокон и облегчает холинергическую нейротрансмиссию в симпатических ганглиях.

NO за счет объемной передачи сигнала, способен активировать соседние преганглионарные волокна, способствовать увеличенному

100

выделению ацетилхолина из преганглионарных терминалей. Такой способ наиболее эффективен при вовлечении большого количества пресинаптических волокон и способствует координированному синхронному возбуждению большого числа ганглионарных симпатических нейронов, что важно для осуществления генерализованного ответа со стороны симпатической нервной системы в условиях стресса.

Вероятно, в первые дни жизни NO выделяется из преганглионарных нейронов на уровне клеточных тел или дендритов, что способствует окончательному формированию симпатических спинальных ядер и связей преганглионарных нейронов с центрами ствола мозга за счет возможного ретроградного действия NO. По мере взросления животного начинает преобладать выделение NO из пресинаптических терминалей аксонов

преганглионарных симпатических нейронов.

101

ВЫВОДЫ

1. NO оказывает облегчающее влияние на синаптическую передачу в симпатическом ганглии крысы с 20 суток жизни. Частота и амплитуда импульсов в постганглионарных волокнах возрастает под влиянием донора NO и уменьшается при действии блокатора синтеза NO. Действие NO на синаптическую передачу в симпатическом ганглии крысы опосредуется гуанилатциклазной системой.
2. Ритмические колебания в постганглионарных симпатических волокнах краниального шейного ганглия крысы появляются с 10 суток жизни. У 10-суточных и более взрослых животных, включая старых, наибольшую мощность в спектре частот разрядов постганглионарных волокон представляют колебания с частотами, связанными с дыханием (0,7-1,5 Гц) и сердечной деятельностью (4-7 Гц). Действие NO сопровождалось увеличением мощности спектра частот в диапазоне дыхания и сердечной деятельности.
3. Влияние NO на синаптическую передачу в краниальном шейном ганглии крысы носит дозозависимый характер. Наибольшее увеличение амплитуды под влиянием нитропрусида натрия и уменьшение при воздействии L-NAME отмечалось при концентрации 100 мкМ. Наибольшее увеличение амплитуды под влиянием 8Br-цГМФ отмечалось при концентрации 100 мкМ. Максимальное же ослабление амплитуды ответа при действии ODQ отмечалось при концентрации 10 мкМ.
4. В раннем постнатальном онтогенезе в преганглионарных симпатических нейронах в спинном мозге происходит снижение экспрессии pNOS и изменение солокализации с другими маркерами. В течение первого месяца жизни доля pNOS(+)/холинацетилтрансфераза(+), pNOS(+)/кальбиндин(+) преганглионарных нейронов уменьшается, тогда как

102

- регулируемый транскрипт(+) увеличивается по отношению к проценту нейронов, иммунореактивных только к одному из указанной пары маркеров.
5. В краниальном шейном ганглии экспрессия pNOS и плотность pNOS-иммунореактивных симпатических преганглионарных волокон увеличивается в раннем постнатальном онтогенезе с момента рождения до 30 дней жизни и уменьшается у старых животных.

103

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабминдра В. П., Брагина Т. А., Шабанов А. Н. Структурная организация преганглионарных симпатических нейронов // Физиол. журнал СССР. – 1984. – Т. 70, No 6. – С. 773-778.
2. Башкатова В. Г., Раевский К. С. Оксид азота в механизмах повреждения мозга, обусловленных нейротоксическим действием глутамата // Биохимия. – 1998. – Т. 63. – No. 7. – С. 1020-1028.
3. Гуляева Н. В. Роль и регуляция метаболизма NO в центральной нервной системе // Нейрохимия. – 1995. – Т. 12. – No. 3. – С. 63.
4. Зефилов А. Л., Мухамедьяров М. А. Механизмы кратковременных форм синаптической пластичности // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2004. - Т. 90, No 8. - С. 1041-1059.
5. Зефилов А. Л., Ситдикова Г. Ф. Ионные каналы нервного окончания // Успехи физиол. наук **16**. – 2002. – Т. 33, No 4. – С. 3-33.
6. Зефилов А. Л., Ситдикова Г. Ф. Ионные каналы **16** возбудимой клетки (структура, функция, патология) // Казань: Арт-кафе. – 2010. 270 с.
7. Зефилов А. Л., Халиуллина Р. Р., Анучин А. А. Эффекты экзогенного

оксида азота на секрецию медиатора и ионные токи двигательного нервного

окончания // Бюлл. exper. биол. и мед. 16 . – 1999. – Т. 128, No 8. – С. 144-147.

8. Коробкин А. А. Морфология краниального шейного узла и функциональные характеристики его нейронов в постнатальном онтогенезе крысы: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Ярославль, 2011. 18 с.

9. Коробкин А. А., Васильева О. А., Емануйлов А. И., Корзина М. Б., Маслюков П. М. Возрастные особенности фоновой электрической активности нейронов краниального шейного ганглия крысы // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2010. – Т. 96, No 6. – С. 566-572.

10. Лебедев В. П., Петров В. И., Басова А. Д. Особенности отдельных симпатических преганглионарных нейронов и их аксонов в верхнем грудном отделе спинного мозга // Физиол. журнал СССР. – 1976. – Т. 62, No 10. – С. 104-143-1442.

11. Лебедев В. П., Скобелев В. А. Неклассические симпатические преганглионарные нейроны спинного мозга // Докл. АН СССР. – 1974. – Т. 219, No 2. – С. 502-504.

12. Любашина О. А., Ноздрачев А. Д. NO-зависимые механизмы амигдалокортикальных влияний // Доклады Академии наук. – 2008. – Т. 421. – No. 2. – С. 282-285.

13. Маслюков П. М. Связи нейронов звездчатого ганглия кошки с органами-мишенями в постнатальном онтогенезе // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова 6 . – 2000. – Т. 86, No 6. – С. 703-710.

14. Маслюков П. М., Будник А. Ф., Ноздрачев А. Д. Нейрохимические особенности узлов метасимпатической системы в онтогенезе // Успехи геронтологии. – 2017. – Т. 30, No 3. – С. 347-355.

15. Маслюков П.М., Емануйлов А.И., Ноздрачев А.Д. Возрастные изменения нейротрансмиттерного состава нейронов симпатических узлов. Успехи геронтологии. 2016. - Т. 29, No 3. - С. 442-453.

16. Маслюков П. М., Корзина М. Б., Емануйлов А. И. Возрастные изменения ритмической электрической активности в шейном симпатическом стволе крысы и кошки // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2009. – Т. 95, No 1. – С. 58-64.

17. Маслюков П. М., Коробкин А. А., Коновалов В. В., Порсева В. В., Емануйлов А. И. Возрастное развитие кальбиндин-иммунопозитивных нейронов симпатических узлов крысы // Морфология. – 2012. – Т. 141, No 1. – С. 77-80.

18. Маслюков П. М., Ноздрачев А. Д. Ритмическая электрическая активность в ветвях звездчатого ганглия кошки в постнатальном онтогенезе 6 // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова 6 . – 2006. – Т. 92, No 3. – С. 324-329.

19. Меньшиков Е. Б., Зенков Н. К., Реутов В. П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. – 2000. – Т. 65, No 4. – С. 485-503.

20. Новаковская С. А., Арчакова Л. И., Маслюков П. М. Ультраструктура нейронов каудального брыжеечного узла котят в постнатальном онтогенезе // Морфология. – 2011. – Т. 139, No 1. – С. 38-42.

21. Ноздрачев А. Д. Кортикостероиды и симпатическая нервная система. – Л.: Наука, 1969. – 172 с.

22. Ноздрачев А. Д. Вегетативная рефлекторная дуга. – Л.: Наука, 1978. – 232 с.

23. Ноздрачев А. Д. Физиология вегетативной нервной системы. – Л.:

Наука, 1983. – 296 с.

24. Ноздрачев А.Д., Маслюков П.М. Возрастное развитие нейронов автономных ганглиев. СПб.: Информ-Навигатор, 2014. – 320 с.
25. Ноздрачев А. Д., Пушкарев Ю. П. Характеристика медиаторных превращений. – Л.: Наука, 1980. – 230 с.
26. Ноздрачев А. Д., Фатеев М. М. Звездчатый ганглий. Структура и функция. – СПб.: Наука, 2002. – 239 с.
27. Ноздрачев А. Д., Янцев А. В. Автономная передача. – СПб.: СПбГУ, 1995. – 283 с.
28. Перегуд Д. И., Панченко Л. Ф., Гуляева Н. В. Нейрохимические основы опийной абстиненции: оксид азота и нейротрофические факторы // Вопросы наркологии. – 2017. – No. 6. – С. 18-19.
29. Реутов В. П., Сорокина Е. Г., Охотин В. Е., Косицин Н. С. Циклические превращения NO в организме млекопитающих. – М.: Наука **16**, 1998. – 159 с.
30. Ситдикова Г. Ф., Яковлев А. В., Зефилов **5** А. Л. Газомедиаторы: от токсических эффектов к регуляции клеточных функций и использованию в клинике **5** // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13, No 6. – С. 185-200.
31. Скок В. И. Физиология вегетативных ганглиев. – Л.: Наука, 1970. – 236 с.
32. Скок В. И., Иванов А. Я. Естественная активность вегетативных ганглиев. – Киев: Наукова думка, 1989. – 179 с.
33. Сосунув А.А. Оксид азота как межклеточный посредник // Соросовский образовательный журнал **16**. – 2000. – Т. 6, No 12. С. 27-34.
34. Фатеев М. М. Эфферентные симпатические преганглионарные и афферентные спинальные транзиторные пути звездчатого ганглия кошки // Российский физиологический журнал. – 1997. – Т. 83, No 4. – С. 52-58.
35. Шабанов А. Н. Структура и локализация симпатических нейронов в спинном мозгу у кошки // Архив анатом., гистол. и эмбриол **6**. – 1981. – Т. 81, No 8. – С. 28-34.
36. Швалев В. Н., Сосунув А. А., Гуски Г. Морфологические основы иннервации сердца. – М., 1992. – 368 с.
37. Шевелева В. С. Эволюция функции симпатических ганглиев в онтогенезе **6**. – Л., 1977. – 438 с.
38. Щербин **6** Ю. И., Хрусталева Р. С., Цырлин В. А. Изучение тонической и вызванной электрической активности эфферентных волокон симпатического нерва у белых крыс // Российский физиол. журн. – 2000. – Т. 86, No 3. – С. 320-328.
39. Яковлев А. В., Ситдикова Г.Ф., Зефилов А. Л. Роль циклических нуклеотидов в реализации **2** в реализации эффектов оксида азота (II) на секрецию медиатора и электрогенез двигательного нервного окончания // Доклады Академии Наук **16**. – 2002. – Т. 382, No 2/3. – С. 273-276.
40. Яковлева О. В., Шафигуллин М. У., Ситдикова **3** Г. Ф. Роль оксида азота в регуляции секреции медиатора и процессов экзо-и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании мышцы **3** // Нейрохимия. – 2013. – Т. 30. – No. 2. – С. 109-109.
41. Alkadhi K. A., Alzoubi K. H., Aleisa A. M. Plasticity of synaptic transmission in autonomic ganglia // Progress in Neurobiology. – 2005. – V. 75, No 2. – P. 83-108.
42. Altememi G. F., Alkadhi K. A. Nitric oxide is required for the maintenance but not initiation of ganglionic long-term potentiation // Neuroscience. – 1999. – V. 94, No 3. – P. 897-902.
43. Ambiel C. R., **4** Alves-Do-Prado W. Neuromuscular facilitation and blockade

- induced by L-arginine and nitric oxide in the rat isolated diaphragm **16** // General Pharmacology-the Vascular System. – 1997. – V. 28, No 5. – P. 789-794.
44. Anderson C. R. NADPH diaphorase-positive neurons in the rat spinal-cord include a subpopulation of autonomic preganglionic neurons **7** // Neuroscience Letters. – 1992. – V. 139, No 2. – P. 280-284.
45. Anderson C. R., Bergner A., Murphy S. M. How many types of cholinergic sympathetic neuron are there in the rat stellate ganglion? // Neuroscience **11**. – 2006. – V. 140, No 2. – P. 567-576.
46. Andressen C., Blumcke I., Celio M. R. Calcium-binding proteins - selective markers of nerve-cells // Cell **11** and Tissue Research. – 1993. – V. 271, No 2. – P. 181-208.
47. Andrews T. J., Li D. Q., Halliwell J., Cowen T. The effect of age on dendrites in the rat superior cervical ganglion // Journal of Anatomy. – 1994. – V. 184. – P. 111-117.
48. Andric S. A., Kostic T. S., Tomic M., Koshimizu T., Stojilkovic S. S. Dependence of soluble guanylyl cyclase activity on calcium signaling in pituitary **16** cells // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – V. 276, No 1. – P. 844-849.
49. Arrigoni E., Rosenberg P. A. Nitric oxide-induced adenosine inhibition of hippocampal synaptic transmission depends on adenosine kinase inhibition and is cyclic GMP independent // Eur. J. Neurosci. – 2006. – V. 24. – N 9. – P. 2471-2480.
50. Aso Y., Ray R. P., Long X., Bushey D., Cichewicz K., Ngo T. T., Sharp B., Christoferou C., Hu A., LemIPe A. L., Tillberg P., HIPsh J., Litwin-Kumar A., Rubin G.M. Nitric oxide acts as a cotransmitter in a subset of dopaminergic neurons to diversify memory dynamics // Elife. – 2019. – V. 8. – e49257.
51. Ataei Ataabadi E., GolshIPI K., Jüttner A., Krenning G., Danser A.H.J., Roks A.J.M. Nitric Oxide-cGMP Signaling in Hypertension: Current and Future Options for Pharmacotherapy // Hypertension. – 2020. – V. 24. – P. HYPERTENSIONAHA12015856.
52. Barber R. P., Phelps P. E., Houser C. R., Crawford G. D., Salvaterra P. M., Vaughn J. E. The morphology and distribution of neurons containing choline-acetyltransferase in the adult-rat spinal-cord - an immunocytochemical study **8** // Journal of Comparative Neurology. – 1984. – V. 229, No 3. – P. 329-346.
53. Barman S. M. 2019 Ludwig Lecture: Rhythms in sympathetic nerve activity are a key to understanding neural control of the cardiovascular system // American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology **18**. – 2020. – V. 318, No 2. – P. R191-R205.
54. Barman S. M., Gebber G. L. Role of ventrolateral medulla in generating the 10-Hz rhythm in sympathetic nerve discharge **6** // American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology **18**. – 2007. – V. 293, No 1. – P. R223-R233.
55. Bishop A., Anderson J. E. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological // Toxicology **5**. – 2005. – V. 208, No 2. – P. 193-205.
56. Boczek-Funcke A., Dembowski K., Habler H. J., Janig W., Michaelis M. Spontaneous activity, conduction-velocity and segmental origin of different classes of thoracic preganglionic neurons projecting into the cat cervical sympathetic trunk // Journal of the Autonomic Nervous System. – 1993. – V. 43, No 3. – P. 189-200.
57. Bredt D. S., Snyder S. H. Nitric-oxide, a novel neuronal messenger // Neuron **17**. – 1992. – V. 8, No 1. – P. 3-11.
58. Brenman J. E., Chao D. S., Gee S. H., McGee A. W., Craven S. E., Santillano D. R., Wu Z. Q., Huang F., Xia H. H., Peters M. F., Froehner S. C., Bredt D. S. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha 1-syntrophin mediated by PDZ domains // Cell **18**. – 1996. – V. 84, No 5. – P. 757-767.

59. Briggs C. A. Potentiation of nicotinic transmission in the rat superior cervical sympathetic-ganglion - effects of cyclic-gmp and nitric-oxide generators // Brain 17 Research. – 1992. – V. 573, No 1. – P. 139-146.
- 109
60. Briggs C. A., McAfee D. A., McCaman R. E. Long-term potentiation of synaptic acetylcholine-release in the superior cervical-ganglion of the rat 17 // Journal of Physiology-London. – 1985. – V. 363, No JUN. – P. 181-190.
61. Briggs C. A., McAfee D. A., McCaman R. E. Long-term regulation of synaptic acetylcholine-release and 17 nicotinic transmission - the role of cyclic-AMP 17 // British Journal of Pharmacology. – 1988. – V. 93, No 2. – P. 399-411.
62. Cetiner M., Bennett M. R. Nitric-oxide modulation of calcium-activated potassium channels in 17 postganglionic neurons of avian cultured ciliary ganglia // British Journal of Pharmacology. – 1993. – V. 110, No 3. – P. 995-1002.
63. Chung J. M., Chung K., Wurster R. D. Sympathetic preganglionic neurons of 14 cat spinal-cord - horseradish-peroxidase study // Brain 14 Research. – 1975. – V. 91, No 1. – P. 126-131.
64. Chung K., Chung J. M., Lavelle F. W., Wurster R. D. Sympathetic neurons in the cat spinal cord projecting to the stellate ganglion 14 // Journal of Comparative Neurology. – 1979. – V. 185, No 1. – P. 23-29.
65. Coulibaly A. P., Gannon S. M., Hawk K., Walsh B. F., Isaacson L. G. Transection of preganglionic axons leads to CNS neuronal plasticity followed by survival and target reinnervation // Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical. – 2013. – V. 179, No 1-2. – P. 49-59.
66. Courtney M. J., Li L.-L., Lai Y. Y. Mechanisms of NOS1AP action on NMDA receptor-nNOS signaling // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2014. – V. 8.
67. Dalsgaard C. J., Elfvin L. G. Spinal origin of preganglionic fibers projecting onto the superior cervical-ganglion and inferior mesenteric ganglion of the guinea-pig, as demonstrated by the horseradish-peroxidase technique // Brain 14 Research. – 1979. – V. 172, No 1. – P. 139-143.
68. Dembowsky K., Czachurski J., Seller H. Morphology of sympathetic preganglionic 9 neurones in the thoracic spinal cord of the cat: An intracellular horseradish peroxidase study 9 // Journal of Comparative Neurology. – 1985. – V. 238, No 4. – P. 453-465.
- 110
69. Dembowsky K., Czachurski J., Seller H. Rostrocaudal location of sympathetic preganglionic neurons within the 3rd thoracic segment of the cat spinal-cord investigated by the retrograde transport of horseradish-peroxidase and by recording of antidromic field potentials // Neuroscience Letters. – 1987. – V. 77, No 1. – P. 31-36.
70. Descarries L. M., 3 Cai S. F., Robitaille R. Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction 2 // Journal of Neurocytology. – 1998. – V. 27, No 11. – P. 829-840.
71. Dun S. L., Chianca D. A., Dun N. J., Yang J., Chang J. K. Differential expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactivity in the rat spinal preganglionic nuclei // Neuroscience Letters. – 2000. – V. 294, No 3. – P. 143-146.
72. Elfvin L.G. (Ed.) Autonomic Ganglia. - Chichester, 1983. - 385 p.
73. Emanuilov A. I., Korzina M. B., Archakova L. I., Novakovskaya S. A., Nozdrachev A. D., Masliukov P. M. Development of the NADPH-diaphorase-positive neurons in the sympathetic ganglia 11 // Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger. – 2008. – V. 190, No 6. – P. 516-524.
74. Esplugues J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system // British Journal of Pharmacology 18 . – 2002. – V. 135, No 5. – P. 1079-1095.
75. Etherington S. J., Everett A. W. Postsynaptic production of nitric oxide

- implicated in long-term depression at the mature amphibian (*Bufo marinus*) neuromuscular junction **20** // Journal of Physiology-London. – 2004. – V. 559, No 2. – P. 507-517.
76. Faden A. I., Petras J. M. Intra-spinal sympathetic preganglionic pathway: Anatomic evidence in dog // Brain Research. – 1978. – V. 144, No 2. – P. 358-362.
77. Feil R., Kleppisch T. NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission // Handbook of experimental pharmacology. – 2008. No 184. – P. 529-60.
78. Fenwick N. M., Martin C. L., Llewellyn-Smith I. J. Immunoreactivity for cocaine- and amphetamine-regulated transcript in rat sympathetic preganglionic neurons projecting to sympathetic ganglia and the adrenal medulla **9** // Journal of Comparative Neurology. – 2006. – V. 495, No 4. – P. 422-433.
79. Field P. M., Raisman G. The density of reinnervation of adult-rat superior cervical sympathetic ganglionic neurons is limited by the number of available postsynaptic sites // Brain **12** Research **19**. – 1985. – V. 360, No 1-2. – P. 398-402.
80. Foerstermann U., Sessa W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function // European Heart Journal. – 2012. – V. 33, No 7. – P. 829-837.
81. Foong J.P., Nguyen T.V., Furness J.B., Bornstein J.C., Young H.M. Myenteric neurons of the mouse small intestine undergo significant electrophysiological and morphological changes during postnatal development // Journal of Physiology. – 2012. – V. 590. - No 10. – P. 2375-2390.
82. Foong J.P., HfPst C.S., Hao M.M., McKeown S.J., Boesmans W., Young H.M., Bornstein J.C., Vanden Berghe P. Changes in Nicotinic Neurotransmission during Enteric Nervous System Development // Journal of Neuroscience. – 2015. – V. 35. - No 18. – P. 7106-7115.
83. Forehand C. J. Density of somatic innervation on mammalian autonomic ganglion-cells is inversely related to dendritic complexity and preganglionic convergence **12** // Journal of Neuroscience. – 1985. – V. 5, No 12. – P. 3403-3408.
84. Furness J. B. Types of neurons in the enteric nervous system // Journal of the Autonomic Nervous System. – 2000. – V. 81, No 1-3. – P. 87-96.
85. Furness J.B., Stebbing M.J. The fHPst brain: Species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems // Neurogastroenterol. Motil. – 2018. - V. 30. – N 2. - e13234.
86. Gabella G. The rat autonomic nervous system // The Rat Nervous System. 3rd Edition. – 2004.
87. Gallo E. F., Iadecola C. Neuronal Nitric Oxide Contributes to Neuroplasticity-Associated Protein Expression through cGMP, Protein Kinase G, and Extracellular Signal-Regulated Kinase **10** // Journal of Neuroscience. – 2011. – V. 31, No 19. – P. 6947-6955.
88. Gardette R., Listerud M. D., Brussaard A. B., Role L. W. Developmental changes in transmitter sensitivity and synaptic transmission in embryonic chicken sympathetic neurons innervated invitro // Developmental Biology. – 1991. – V. 147, No 1. – P. 83-95.
89. Garthwaite J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission // European Journal of Neuroscience **20**. – 2008. – V. 27, No 11. – P. 2783-2802.
90. Garthwaite J. Nitric oxide as a multimodal brain transmitter // Brain Neurosci. Adv. – 2018. – V. 2. P. 2398212818810683.
91. Gavazzi I., Andrews T. J., Thrasivoulou C., Cowen T. Influence of target tissues on theHP innervation in old-age - a transplantation study // Neuroreport. – 1992. – V. 3, No 8. – P. 717-720.
92. Gavazzi I., Cowen T. Axonal regeneration from transplanted sympathetic ganglia is not impaHPed by age // Experimental Neurology. – 1993. – V. 122, No 1. – P. 57-64.

93. 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 // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – V. 20. – N 6. – P.1421.
94. Gibbins I. L., Rodgers H. F., Matthew S. E., Murphy S. M. Synaptic organisation of lumbar sympathetic ganglia of guinea pigs: Serial section ultrastructural analysis of dye-filled sympathetic final motor neurons **12** // Journal of Comparative Neurology. – 1998. – V. 402, No 3. – P. 285-302.
95. Gibbins I. L., Morris J. L. Structure of peripheral synapses: autonomic ganglia // Cell and Tissue Research. – 2006. – V. 326, No 2. – P. 205-220.
96. Godfrey E. W., Schwarte R. C. Nitric oxide and cyclic GMP regulate early events in agrin signaling in skeletal muscle cells // Experimental Cell Research **10**. – 2010. – V. 316, No 12. – P. 1935-1945.
97. Gonsalvez D. G., Kerman I. A., McAllen R. M., Anderson C. R. Chemical Coding for Cardiovascular Sympathetic Preganglionic Neurons in Rats **6** // Journal of Neuroscience. – 2010. – V. 30, No 35. – P. 11781-11791.
98. Gootman P. M., Hundley B. W., Sica A. L. The presence of coherence in **113** sympathetic and phrenic activities in a developing mammal // Acta **6** Neurobiologiae Experimentalis. – 1996. – V. 56, No 1. – P. 137-145.
99. Graves A. R., Lewin K. A., Lindgren C. A. Nitric oxide, cAMP and the biphasic muscarinic modulation of ACh release at the lizard neuromuscular junction **1** // Journal of Physiology-London. – 2004. – V. 559, No 2. – P. 423-432.
100. Gray W. P., Cheung A. Nitric oxide regulation of adult neurogenesis // Vitamins and Hormones. 2014. - V. 96. – P. 59-77.
101. Grkovic I., Anderson C. R. Calbindin D28K-immunoreactivity identifies distinct subpopulations of sympathetic pre- and postganglionic neurons in the rat **6** // Journal of Comparative Neurology. – 1997. – V. 386, No 2. – P. 245-259.
102. Grozdanovic Z., Baumgarten H. G., Bruning G. Histochemistry of naphthylphosphoryl diaphorase, a marker for neuronal nitric-oxide synthase, in the peripheral autonomic nervous-system of the mouse **17** // Neuroscience. – 1992. – V. 48, No 1. – P. 225-235.
103. Guild S.-J., Barrett C. J., McBryde F. D., Van Vliet B. N., Head G. A., Burke S. L., Malpas S. C. Quantifying sympathetic nerve activity: problems, pitfalls and the need for standardization **6** // Experimental Physiology. – 2010. – V. 95, No 1. – P. 41-50.
104. Han X., Kobzik L., Severson D., Shimoni Y. Characteristics of nitric oxide-mediated cholinergic modulation of calcium current in rabbit sino-atrial node **2** // Journal of Physiology-London. – 1998. – V. 509, No 3. – P. 741-754.
105. Hardingham N., Dachtler J., Fox K. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis **20** // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2013. – V. 7.
106. Heiman M. G., Shaham S. Twigs into branches: how a filopodium becomes a dendrite // Current Opinion in Neurobiology. – 2010. – V. 20, No 1. – P. 86-91.
107. Hendry I. A., Hill C. E. Retrograde axonal-transport of target tissue-derived macromolecules // Nature. – 1980. – V. 287, No 5783. – P. 647-649.
108. Hermann A., Erxleben C. Nitric oxide activates voltage-dependent potassium currents of **2** crustacean skeletal muscle // Nitric Oxide-Biology and Chemistry **2**. – 2001. – V. 5, No 4. – P. 361-369.
- 114
109. Hinrichs J.M., Llewellyn-Smith I.J. Variability in the occurrence of nitric oxide synthase immunoreactivity in different populations of rat sympathetic preganglionic neurons // J. Comp. Neurol. – 2009. – V. 514, No 5. – P. 492-506.
110. Holets V., Elde R. Sympathoadrenal preganglionic neurons - the IPI distribution and relationship to chemically-coded fibers in the kitten intermediolateral cell column // Journal of the Autonomic Nervous System. – 1983.

– V. 7, No 2. – P. 149-163.

111. Hollas M. A., Ben Aissa M., Lee S. H., Gordon-Blake J. M., Thatcher G. R. J.

Pharmacological manipulation of cGMP and NO/cGMP in CNS drug discovery //

Nitric Oxide. – 2019. – V. 82. – P. 59-74.

112. Hopper R. A., Garthwaite J. Tonic and phasic nitric oxide signals in

hippocampal long-term potentiation **5** // Journal of Neuroscience **18**. – 2006. – V. 26, No

45. – P. 11513-11521.

113. Hosoya Y., Okado N., Sugiura Y., Kohno K. Coincidence of ladder-like

patterns in distributions of monoaminergic terminals and sympathetic

preganglionic neurons in the rat spinal-cord **9** // Experimental Brain Research. –

1991. – V. 86, No 1. – P. 224-228.

114. Hurt K. J., Sezen S. F., Lagoda G. F., Musicki B., Rameau G. A., Snyder S.

H., Burnett A. L. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide

synthase mediates penile erection **20** // Proceedings of the National Academy of

Sciences of the United States of America **18**. – 2012. – V. 109, No 41. – P. 16624-

16629.

115. Jayakar S. S., Pugh P. C., Dale Z., Starr E. R., Cole S., Margiotta J. F.

PACAP induces plasticity at autonomic synapses by nAChR-dependent NOS1

activation and AKAP-mediated PKA targeting // Molecular and Cellular

Neuroscience **20**. – 2014. – V. 63. – P. 1-12.

116. Judas M., Sestan N., Kostovic I. Nitrinergic neurons in the developing and

adult human telencephalon: Transient and permanent patterns of expression in

comparison to other mammals **11** // Microscopy Research and Technique. – 1999. –

V. 45, No 6. – P. 401-419.

115

117. Kamosinska B., Nowicki D., Szulczyk A., Szulczyk P. Spinal segmental

sympathetic outflow to cervical sympathetic trunk, vertebral nerve, inferior cardiac

nerve and sympathetic fibers in the thoracic vagus // Journal of the Autonomic

Nervous System. – 1991. – V. 32, No 3. – P. 199-204.

118. Kawai Y. Ultrastructure of neuronal cNIPcuity in sympathetic ganglia //

Microscopy Research and Technique. – 1996. – V. 35, No 2. – P. 146-156.

119. Kelly R.A., Balligand J.L., Smith T.W. Nitric oxide and cardiac function **5** //

Circulation Research. – 1996. – V. 79, No 3. – P. 363-380.

120. Khalid R. R., Maryam A., Sezerman O. U., Mylonas E., Siddiqi A. R.,

Kokkinidis M. Probing the Structural Dynamics of the Catalytic Domain of Human

Soluble Guanylate Cyclase // Scientific Reports. – 2020. – V. 10. – N 1. – P. 9488.

121. Khurana G., Bennett M. R. Nitric-oxide and arachidonic-acid modulation of

calcium currents in postganglionic **17** neurons of avian cultured ciliary ganglia //

British Journal of Pharmacology. – 1993. – V. 109, No 2. – P. 480-485.

122. Kilbinger H. Modulation of acetylcholine release by nitric oxide **4** //

Cholinergic Mechanisms: from Molecular Biology to Clinical Significance. –

1996. – V. 109. – P. 219-224.

123. Klimaschewski L., Benndorf K., KIPchmaIP R., Fischercolbrie R., Heym

C. Secretoneurin-immunoreactivity in nerve-terminals apposing identified

preganglionic sympathetic neurons in the rat - colocalization with substance-p and

enkephalin // Journal of Chemical Neuroanatomy. – 1995. – V. 9, No 1. – P. 55-63.

124. Kourosch-Arami M., Hosseini N., Mohsenzadegan M., Komaki A., Joghataei

M.T. Neurophysiologic implications of neuronal nitric oxide synthase // Reviews

in the Neurosciences. – 2020. – V. 31. – N 6. – P. 617-636.

125. Kuba K., Kumamoto E. Long-term **17** potentiations in vertebrate synapses - A

variety of cascades with common subprocesses **17** // Progress in Neurobiology. –

1990. – V. 34, No 3. – P. 197-269.

126. Lawson S. J., Davies H. J., Bennett **7** J. P., Lowrie M. B. Evidence that spinal

interneurons undergo programmed cell death postnatally in the rat **7** // European

Journal of Neuroscience. – 1997. – V. 9, No 4. – P. 794-799.

127. Lindgren C. A., LaIPd M. V. Nitroprusside inhibits neurotransmitter release at the frog neuromuscular - junction // *Neuroreport* **2**. – 1994. – V. 5, No 16. – P. 2205-2208.
128. Lobo Ladd F. V., Lobo Ladd A. A. B., da Silva A. A. P., Coppi A. A. Stereological and Allometric Studies on Neurons and Axo-Dendritic Synapses in Superior Cervical Ganglia // *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol 311. – 2014. – V. 311. – P. 123-155.
129. Loesch A., Mayhew T. M., Tang H., Lobo Ladd F. V., Lobo Ladd A. A. B., de Melo M. P., da Silva A. A. P., Coppi A. A. Stereological and allometric studies on neurons and axo-dendritic synapses in the superior cervical ganglia of rats, capybaras and horses **12** // *Cell and Tissue Research*. – 2010. – V. 341, No 2. – P. 223-237.
130. Lonart G., Wang J., Johnson K. M. Nitric-oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices // *European Journal of Pharmacology* **10**. – 1992. – V. 220, No 2-3. – P. 271-272.
131. Malpas S. C. The rhythmicity of sympathetic nerve activity // *Progress in Neurobiology*. – 1998. – V. 56, No 1. – P. 65-96.
132. Malpas S. C., Bendle R. D., Head G. A., Ricketts J. H. Frequency and amplitude of sympathetic discharges by baroreflexes during hypoxia in conscious rabbits **6** // *The American journal of physiology*. – 1996. – V. 271, No 6 Pt 2. – P. H2563-74.
133. Markham J. A., Vaughn J. E. Migration patterns of sympathetic preganglionic neurons in embryonic rat spinal-cord **7** // *Journal of Neurobiology*. – 1991. – V. 22, No 8. – P. 811-822.
134. Masliukov P. M. Discharge pattern of the sympathetic vertebral nerve activity in kittens in postnatal ontogenesis // *Neuroscience Letters*. – 2003. – V. 344, No 2. – P. 141-143.
135. Masliukov P. M., Emanuilov A. I., Madalieva L. V., Moiseev K. Y., Bulibin A. V., Korzina M. B., Porseva V. V., Korobkin **11** A. A., SmIPnova V. P.

Development of nNOS-positive neurons in the rat sensory and sympathetic ganglia

117

- // *Neuroscience* **11**. – 2014. – V. 256. – P. 271-281.
136. Masliukov P.M., Emanuilov A.I., Moiseev K., Nozdrachev A.D., Dobrotvorskaya S., Timmermans J.P. Development of non-catecholaminergic sympathetic neurons in para- and prevertebral ganglia of cats **11** // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2015. V. 40. – P. 76-84.
137. Masliukov P. M., Fateev M. M., Nozdrachev A. D. Age-dependent changes of electrophysiologic characteristics of the stellate ganglion conducting pathways in kittens // *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical*. – 2000. – V. 83, No 1-2. – P. 12-18.
138. Masliukov P. M., Korobkin A. A., Nozdrachev A. D., Timmermans J. P. Calbindin-D28k immunoreactivity in sympathetic ganglionic neurons during development **11** // *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical*. – 2012. – V. 167, No 1-2. – P. 27-33.
139. Masliukov P. M., Moiseev K. Y., Korzina M. B., Porseva V. V. Development of nNOS-positive neurons in the rat sensory ganglia after capsaicin treatment. // *Brain* **8** Research. – 2015. – V. 1618. – P. 212-221.
140. Masliukov P.M., Fateev M.M., Nozdrachev A.D. Age-dependent changes of electrophysiologic characteristics of the stellate ganglion conducting pathways in kittens // *Auton. Neurosci.* - 2000. - V.83. - P.12-18.
141. Masliukov P. M., Timmermans J. P. Immunocytochemical properties of stellate ganglion neurons during early postnatal development // *Histochemistry and Cell Biology*. – 2004. – V. 122, No 3. – P. 201-209.
142. Matthews M.R. 1983. The ultrastructure of junctions in sympathetic ganglia

of mammals **12** / Autonomic Ganglia. Elfvin L.G. (Ed.), Wiley, pp. 27-66.

143. Maurice D. H., Haslam R. J. Nitroprusside enhances isoprenaline-induced increases in camp in rat aortic smooth-muscle. // European Journal of Pharmacology. – 1990. – V. 191, No 3. – P. 471-475.

144. Meckler R. L., Weaver L. C. Characteristics of ongoing and reflex discharges of single splenic and renal sympathetic postganglionic fibres in cats **6** // Journal of Physiology-London. – 1988. – V. 396. – P. 139-153.

118

145. Meffert M. K., Premack B. A., Schulman H. Nitric-oxide stimulates Ca²⁺ - independent synaptic vesicle release // Neuron **10** . – 1994. – V. 12, No 6. – P. 1235-1244.

146. Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology // Pharmacological Reviews. – 1991. – V. 43, No 2. – P. 109-142.

147. Montano N., Lombardi F., Ruscone T. G., Contini M., Finocchiaro M. L., Baselli G., Porta A., Cerutti S., Malliani A. Spectral analysis of sympathetic discharge, R-R interval, and systolic arterial pressure in decerebrated cats // Journal of the Autonomic Nervous System. – 1992. – V. 40, No 1. – P. 21-31.

148. Morita K., North R. A., Tokimasa T. Muscarinic **17** pre-synaptic inhibition of synaptic transmission in myenteric plexus of guinea-pig ileum **17** // Journal of Physiology-London. – 1982. – V. 333, No DEC. – P. 141-149.

149. Mukhtarov M. R., Vyskocil F., Urazaev A. K. H., Nikolsky E. E. Non-quantal acetylcholine release is increased after nitric oxide synthase inhibition // Physiological Research. – 1999. – V. 48, No 4. – P. 315-317.

150. Mukhutdinova K. A., Kasimov M. R., Giniatullin A. R., Zakyrganova G. F., Petrov A. M. 24S-hydroxycholesterol suppresses neuromuscular transmission in SOD1(G93A) mice: A possible role of NO and lipid rafts // Molecular and Cellular Neuroscience. – 2018. – V. 88. – P. 308-318.

151. Navickaite I., Pauziene N., Pauza D. H. Anatomical evidence of non-parasympathetic cardiac nitrergic nerve fibres in rat // J. Anat. – 2020. – P. 10.1111/joa.13291.

152. Newberry N. R. M1 and M2 receptors mediate different effects on synaptically evoked-potentials of the rat superior cervical-ganglion // Neuroscience Letters. – 1988. – V. 88, No 1. – P. 100-106.

153. Nikonenko I., Nikonenko A., Mendez P., Michurina T.V., Enikolopov G., Muller D. Nitric oxide mediates local activity-dependent excitatory synapse development // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013. - V. 110, N 44. - E4142-4151.

154. Ninomiya I., Akiyama T., Nishiura N. Mechanism of cardiac-related **119** synchronized cardiac sympathetic nerve activity in awake cats **6** // American Journal of Physiology. – 1990. – V. 259, No 3. – P. R499-R506.

155. Ninomiya I., Nishiura N., Matsukawa K., Akiyama T. Fundamental rhythm of cardiac sympathetic nerve activity in awake cats at rest and during body movement // Japanese Journal of Physiology. – 1989. – V. 39, No 5. – P. 743-753.

156. Ostberg A. J. C., Raisman G., Field P. M., Iversen L. L., Zigmond R. E. Quantitative comparison of **19** formation of synapses in **19** rat superior cervical sympathetic-ganglion by its own and by foreign nerve **19** -fibers // Brain Research. – 1976. – V. 107, No 3. – P. 445-470.

157. Parker T.L., Kesse W.K., Mohamed **7** A.A., Afework M. The innervation of the mammalian adrenal gland // J. Anat. **7** . – 1993. - V. 183, Pt 2. – P. 265-276.

158. Patel B.A., Dai X., Burda J.E., Zhao H., Swain G.M., Galligan J.J., Bian X. Inhibitory neuromuscular transmission to ileal longitudinal muscle predominates in neonatal guinea pigs. Neurogastroenterol. Motil. – 2010. – V. 22. – P. 909-918

159. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates // Elsevier Academic Press. – 2005. No 5th Edition. – P. 209.

160. Persson P. B., Stauss H., Chung O., Wittmann U., Unger T. Spectrum analysis of sympathetic-nerve activity and blood-pressure in conscious rats // American Journal of Physiology. – 1992. – V. 263, No 5. – P. H1348-H1355.
161. Petras J. M., Cummings J. F. Autonomic neurons in the spinal cord of the Rhesus monkey: a correlation of the findings of cytoarchitectonics and sympathectomy with fiber degeneration following dorsal rhizotomy **14** // The Journal of comparative neurology. – 1972. – V. 146, No 2. – P. 189-218.
162. Petras J. M., Faden A. I. Origin of sympathetic preganglionic neurons in dog // Brain Research. – 1978. – V. 144, No 2. – P. 353-357.
163. Phelps P. E., Barber R. P., Vaughn J. E. Embryonic-development of choline-acetyltransferase in thoracic spinal motor neurons - somatic and autonomic neurons may be derived from a common cellular group **7** // Journal of Comparative Neurology. – 1991. – V. 307, No 1. – P. 77-86.
164. Philippu A. Nitric Oxide: A Universal Modulator of Brain Function // 120 Current Medical Chemistry. – 2016. – V. 23. – N 24. – P. 2643-2652.
165. Picón-Pagès P., García-Buendía J., Muñoz FJ. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. – 2019. – V. 1865. – N 8. – P. 1949-1967.
166. Pitsikas N. The role of nitric oxide in the object recognition memory // Behavioral Brain Research. – 2015. – V. 285. – P. 200-207.
167. Powers-Martin K., McKittrick D.J., Arnold L.F., Phillips J.K. Distinct subpopulations of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) containing sympathetic preganglionic neurons in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats // J. Comp. Neurol **9**. – 2006. V. 497, No 4. – P. 566-74.
168. Prast H., Philippu A. Nitric-oxide releases acetylcholine in the basal forebrain **3** // European Journal of Pharmacology. – 1992. – V. 216, No 1. – P. 139-140.
169. Pugh P. C., Jayakar S. S., Margiotta J. F. PACAP/PAC(1)R signaling modulates acetylcholine release at neuronal nicotinic synapses **20** // Molecular and Cellular Neuroscience. – 2010. – V. 43, No 2. – P. 244-257.
170. Purnyn O. E., Rykhal's'kyi O. V., Fedulova S. A., Veselov's'kyi M. S. Synaptic responses and intraganglionic connections of rat superior cervical ganglia neurons // Fiziolohichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine: 1994). – 2007. – V. 53, No 5. – P. 14-21.
171. Purves D. The trophic theory of neural connections // Trends in Neurosciences. – 1986. – V. 9, No 10. – P. 486-489.
172. Purves D., Hadley R. D., Voyvodic J. T. Dynamic changes in the dendritic geometry of individual neurons visualized over periods of up to 3 months in the superior cervical-ganglion of living mice // Journal of Neuroscience. – 1986. – V. 6, No 4. – P. 1051-1060.
173. Purves D., Lichtman J. W. Elimination of synapses in the developing nervous-system // Science. – 1980. – V. 210, No 4466. – P. 153-157.
174. Purves D., Lichtman J. W. Geometrical differences among homologous neurons in mammals // Science **12**. – 1985. – V. 228, No 4697. – P. 298-302.
175. Purves D., Rubin E., Snider **12** W. D., Lichtman J. Relation of animal size to convergence, divergence, and neuronal number in peripheral sympathetic pathways **12** // Journal of Neuroscience. – 1986. – V. 6, No 1. – P. 158-163.
176. Pyner S., Coote J. H. A comparison between the adult rat and neonate rat of the architecture of sympathetic preganglionic neurons projecting to the superior cervical ganglion, stellate ganglion and adrenal medulla **14** // Journal of the Autonomic Nervous System. – 1994. – V. 48, No 2. – P. 153-166.
177. Pyner S., Coote J. H. Evidence that sympathetic preganglionic neurones are

- arranged in target 7-specific columns in the thoracic spinal cord of the rat 9 // Journal of Comparative Neurology. – 1994. – V. 342, No 1. – P. 15-22.
178. Pyner S., Coote J. H. Arrangement of dendrites and morphological characteristics of sympathetic preganglionic neurons projecting to the superior cervical ganglion 14 and adrenal medulla 14 in adult cat // Journal of the Autonomic Nervous System. – 1995. – V. 52, No 1. – P. 35-41.
179. Rando T. A., Bowers C. W., Zigmond R. E. Localization of neurons in the rat spinal-cord which project to the superior cervical-ganglion 7 // Journal of Comparative Neurology. – 1981. – V. 196, No 1. – P. 73-83.
180. Rastaldo R., Pagliaro P., Cappello S., Penna C., Mancardi D., Westerhof N., Losano G. Nitric oxide and cardiac function // Life Sciences. – 2007. – V. 81, No 10. – P. 779-793.
181. RibeIPo A.A.C.M., Davis C., Gabella G. Estimate of size and total number of neurons in superior cervical ganglion of rat, capybara and horse // Anat. Embryol 6. – 2004. – V. 208. – P. 367-380.
182. Richardson R. J., Grkovic I., Allen A. M., Anderson C. R. Separate neurochemical classes of sympathetic postganglionic neurons project to the left ventricle of the rat heart // Cell 6 and Tissue Research. – 2006. – V. 324, No 1. – P. 9-16.
183. Roy J.F., Chrétien M.N., Woodside B., English A.M. Reduction and S-nitrosation of the Neuropeptide Oxytocin: Implications for Its Biological Function // Nitric Oxide. – 2007. – V. 17, No 2. – P. 82-90.
184. Rubin E. Development of the rat superior cervical ganglion: ganglion cell maturation // J. Neurosci 6. 1985. - V. 5. - P. 673-684.
185. Sagi Y., Heiman M., Peterson J. D., Musatov S., Scarduzio M., Logan S. M., Kaplitt M. G., Surmeier D. J., Heintz N., Greengard P. Nitric oxide regulates synaptic transmission between spiny projection neurons // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2014 Dec 9;111(49):17636-41.
186. Sanchez-Islas E., Leon-Olea M. Nitric oxide synthase inhibition during synaptic maturation decreases synapsin I immunoreactivity in rat brain // Nitric Oxide 10 -Biology and Chemistry. – 2004. – V. 10, No 3. – P. 141-149.
187. Santer R. M., Symons D. Distribution of nadph-diaphorase activity in rat paravertebral, prevertebral and pelvic sympathetic-ganglia // Cell 6 and Tissue Research. – 1993. – V. 271, No 1. – P. 115-121.
188. Schmidt R. E., Parvin C. A., Green K. G. Synaptic ultrastructural alterations anticipate the development of neuroaxonal dystrophy in sympathetic ganglia of aged and diabetic mice // Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. – 2008. – V. 67, No 12. – P. 1166-1186.
189. Schober A., Unsicker K. Growth and neurotrophic factors regulating development and maintenance of sympathetic preganglionic neurons 7 // International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 205. – 2001. – V. 205. – P. 37-76.
190. Schuman E. M., Madison D. V. A requirement for the intercellular messenger nitric-oxide in long-term potentiation // Science. – 1991. – V. 254, No 5037. – P. 1503-1506.
191. Schuman E. M., Madison D. V. Nitric-oxide and synaptic function // Annual Review of Neuroscience. – 1994. – V. 17. – P. 153-183.
192. Schwaller B. The use of transgenic mouse models to reveal the functions of Ca2+ buffer proteins in excitable cells 11 // Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects. – 2012. – V. 1820, No 8. – P. 1294-1303.
193. Scott T. R. D., Bennett M. R. The effect of nitric-oxide on the efficacy of synaptic transmission through the chick ciliary ganglion 2 // British Journal of Pharmacology. – 1993. – V. 110, No 2. – P. 627-632.

194. Scruggs P., Lai C. C., Scruggs J. E., Dun N. J. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide potentiates spinal glutamatergic sympathoexcitation in anesthetized rats // *Regulatory Peptides*. – 2005. – V. 127, No 1-3. – P. 79-85.
195. Segieth J., Getting S. J., Biggs C. S., Whitton P. S. Nitric-oxide regulates excitatory amino-acid release in a biphasic manner in freely moving rats // *Neuroscience Letters* **10**. – 1995. – V. 200, No 2. – P. 101-104.
196. Sendtner M., Carroll P., Holtmann B., Hughes R. A., Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor // *Journal of Neurobiology*. – 1994. – V. 25, No 11. – P. 1436-1453.
197. Sica A. L., Gandhi M. R. Efferent phrenic-nerve and respiratory neuron activities in the developing kitten - spontaneous discharges and hypoxic responses // *Brain Research*. – 1990. – V. 524, No 2. – P. 254-262.
198. Sica A. L., Siddiqi Z. A. Respiration-related features of sympathetic discharges in the developing kitten **6** // *Journal of the Autonomic Nervous System*. – 1993. – V. 44, No 1. – P. 77-84.
199. Siechen S., Yang S., Chiba A., Saif T. Mechanical tension contributes to clustering of neurotransmitter vesicles at presynaptic terminals **11** // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **18**. – 2009. – V. 106, No 31. – P. 12611-12616.
200. Siklos L., Parducz A., Halasz N., Rickmann M., Joo **19** F., Wolff J. R. An unbiased estimation of the total number of synapses in the superior cervical ganglion of adult-rats established by the disector method - lack of change after long-lasting sodium-bromide administration **19** // *Journal of Neurocytology* **19**. – 1990. – V. 19, No 4. – P. 443-454.
201. Silva M.T., Rose S., Hindmarsh **4** J.G., Jenner P., Marsden C.D. L-arginine produces NO-independent increases in dopamine efflux in rat striatum **4**. *Neuroreport*. 1998. – V. 9, N 1. P. 149-152.
202. Smolen A. J. Postnatal-development of ganglionic neurons in the absence of preganglionic input **19** - morphological observations on synapse formation // *Developmental Brain Research* **19**. – 1981. – V. 1, No 1. – P. 49-58.
203. Smolen A., **19** Raisman G. Synapse formation in the rat superior cervical-ganglion during normal development and after neonatal deafferentation // *Brain Research* **19**. – 1980. – V. 181, No 2. – P. 315-323.
204. Snider W. D. Functions of the neurotrophins during nervous-system development - what the knockouts are teaching us // *Cell* **18**. – 1994. – V. 77, No 5. – P. 627-638.
205. Socolato R., Santiago F. N., Portugal C. C., Domingues A. F., Santiago A. R., Relvas J. B., Ambrosio A. F., Paes-de-Carvalho R. Calcium-permeable **20** alpha-**10** Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid Receptors Trigger Neuronal Nitric-oxide Synthase Activation to Promote Nerve Cell Death in an Src Kinase-dependent Fashion // *Journal of Biological Chemistry* **20**. – 2012. – V. 287, No 46. – P. 38680-38694.
206. Son H., Hawkins R. D., Martin K., Kiebler M., Huang P. L., Fishman M. C., Kandel E. R. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase **4** // *Cell*. – 1996. – V. 87, No 6. – P. 1015-1023.
207. Southam E., Charles S. L., Garthwaite J. The nitric oxide-cyclic GMP pathway and synaptic plasticity in the rat superior cervical ganglion // *British Journal of Pharmacology*. – 1996. – V. 119, No 3. – P. 527-532.
208. Stamler J. S., Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle **2** // *Physiological Reviews*. – 2001. – V. 81, No 1. – P. 209-237.
209. Starr E. R., Margiotta J. F. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide induces long-term, transcription-dependent plasticity and remodeling at autonomic synapses // *Molecular and Cellular Neuroscience*. – 2017. – V. 85. – P. 170-182.

210. Steinert J. R., Chernova T., Forsythe I. D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia **18** // *Neuroscientist*. – 2010. – V. 16, No 4. – P. 435-452.
211. Strack A. M., Sawyer W. B., Marubio **7** L. M., Loewy A. D. Spinal origin of sympathetic preganglionic neurons in the rat // *Brain **7** Research*. – 1988. – V. 455, No 1. – P. 187-191.
212. Szulczyk A., Szulczyk P. Spinal segmental preganglionic outflow to cervical sympathetic trunk and postganglionic cardiac sympathetic-nerve // *Brain Research*. – 1987. – V. 421, No 1-2. – P. 127-134.
213. Teclemariam-Mesbah R., Kalsbeek A., Buijs R. M., Pevet P. Oxytocin innervation of spinal preganglionic neurons projecting to the superior cervical ganglion **14** in the rat // *Cell and Tissue Research*. – 1997. – V. 287, No 3. – P. 481-486.
214. Thomas S., Robitaille R. Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse **1** // *Journal of Neuroscience*. – 2001. – V. 21, No 4. – P. 1087-1095.
215. Tripathi M. K., Kartawy M., Amal H. The role of nitric oxide in brain disorders: Autism spectrum disorder and other psychiatric, neurological, and neurodegenerative disorders // *Redox Biology*. – 2020. – V. 34. – P. 101567.
216. Wang F. B., Holst M. C., Powley T. L. The ratio of preganglionic to postganglionic neurons and related issues in the autonomic nervous-system // *Brain Research Reviews*. – 1995. – V. 21, No 1. – P. 93-115.
217. Wang F.-B., Cheng P.-M., Chi H.-C., Kao C.-K., Liao Y.-H. Axons of Passage and Inputs to Superior Cervical Ganglion in Rat // *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. – 2018. – V. 301, No 11. – P. 1906-1916.
218. Wang G., MonIPi N.H., Ozawa K. Nitric oxide regulates en-docytosis by S-nitrosylation of dynamin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA **5***. – 2006. – V. 103, N 5. - P. 1295-1300.
219. Wang T., Xie K. W., Lu B. Neurotrophins promote maturation of developing neuromuscular synapses // *Journal of Neuroscience*. – 1995. – V. 15, No 7. – P. 4796-4805.
220. West A. R., Galloway M. P. Nitric oxide and potassium chloride facilitated striatal dopamine efflux in vivo: role of calcium-dependent release mechanisms **1** // *Neurochemistry International*. – 1998. – V. 33, No 6. – P. 493-501.
221. Wetts R., Phelps P. E., Vaughn J. E. Transient and continuous expression of nadph diaphorase in different neuronal populations of developing rat spinal-cord **8** // *Developmental Dynamics*. – 1995. – V. 202, No 3. – P. 215-228.
222. Wetts R., Vaughn J. E. Choline-acetyltransferase and NADPH diaphorase are coexpressed in rat spinal-cord neurons // *Neuroscience **7***. – 1994. – V. 63, No 4. – P. 1117-1124.
223. Wetts R., Vaughn J. E. Differences in developmental cell death between somatic and autonomic motor neurons of rat spinal cord **7** // *Journal of Comparative Neurology*. – 1998. – V. 396, No 4. – P. 483-492.
224. Wright L. L., Cunningham T. J., Smolen A. J. Developmental neuron death in the rat superior cervical sympathetic ganglion cell counts and ultrastructure **6** // *Journal of Neurocytology*. – 1983. – V. 12, No 5. – P. 727-738.
225. Yamamoto K., Senba E., Matsunaga T., Tohyama M. Calcitonin gene-related peptide containing sympathetic preganglionic and sensory neurons projecting to the superior cervical-ganglion of the rat // *Brain **14** Research*. – 1989. – V. 487, No 1. – P. 158-164.
226. Zhang Y. H., Jin C.Z., Jang J.H., Wang Y. Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology // *Journal*

of Physiology. -2014. – V. 592. – P. 3189–3200.

227. Zhuo M., Laitinen J. T., Li X. C., Hawkins R. D. On the respective roles of nitric oxide and carbon monoxide in long-term potentiation in the hippocampus **5** // Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.). – 1999. – V. 6, No 1. – P. 63-76.
228. Zsombok A., Schrofner S., Hermann A., Kerschbaum H. H. Nitric oxide increases excitability by depressing a calcium activated potassium current in snail neurons **2** // Neuroscience Letters. – 2000. – V. 295, No 3. – P. 85-88.