

На правах рукописи



Моисеев Константин Юрьевич

**ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ NO-ОПОСРЕДОВАННОЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ
ПЕРЕДАЧИ В СИМПАТИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ КРЫС**

03.03.01 – физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Ярославль, 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования "Ярославский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: **Маслюков Петр Михайлович**
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии с биофизикой ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ

Официальные оппоненты: **Любашина Ольга Анатольевна**
доктор биологических наук, заведующая лабораторией кортико-висцеральной физиологии, ФГБУН Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН

Мухамедьяров Марат Александрович
доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «25» февраля 2021 года в 11⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д 001.008.01 при ФГБНУ «НИИНФ им. П.К. Анохина» по адресу: 125009, г. Москва, ул. Моховая, д. 11, стр. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина» и на сайте <http://nphys.ru/>. Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью учреждения, просьба направлять по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.

Автореферат разослан «__» декабря 2020 г.

Врио Ученого секретаря
Диссертационного совета,
доктор биологических наук



Башкатова В.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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; Kourosch-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 локализована с ферментом синтеза ацетилхолина – холинацетилтрансферазой (ХАТ) (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 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 ХАТ. 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 (ХАТ), кальбиндином (КБ), кальретинином (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 ХАТ.

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 симпатическую 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 нейрхимических 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 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 - нитропруссид 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, кальретинина, 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.

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, 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, 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 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились на самцах крыс Wistar разного возраста: новорожденные, 10-, 20-, 30-суточные, 2-, 6-месячные, трехлетние. Все 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. Были предприняты все меры для минимизации числа животных, используемых в экспериментах (общее количество используемых животных – 140).

В качестве методов исследования использовали:

1. Нейрофизиологические.

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 с пропусканием газовой смеси «Карбоген» при помощи 4-канальной системы аппликации растворов ("Биотехнологии").

Регистрация фоновой активности в наружном сонном нерве краниального шейного узла, осуществлялась с помощью стеклянных присасывающихся электродов диаметром 50 мкм и подавалась на вход усилителя переменного тока, с предустановленной полосой пропускания от 100 до 2000 Гц. Сигнал оцифровывался с частотой 20 кГц при помощи аналого-цифрового преобразователя E20-10 и записывался на жесткий диск компьютера (время записи 60 с), после чего подвергался off-line анализу с использованием программы Power Graph (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. При обработке данных учитывался собственный шум усилителя биопотенциалов, полученный при регистрации усыпленного животного.

При регистрации вызванной активности в постганглионарных волокнах внутреннего сонного нерва КШГ 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 аналогичных электродов. Полоса пропускания выбиралась от 0 до 100 Гц. Сигнал оцифровывался с частотой 1 кГц при помощи устройства сбора данных CED Micro 1401-3 под управлением программы Signal (Великобритания). Анализ данных также проводился при помощи вышеуказанной программы.

В работе использовали экзогенный донор NO - нитропруссид натрия и неконкурентный ингибитор NO синтазы N^G-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME) в концентрации 100 мкМ. Для увеличения внутриклеточной концентрации цГМФ и активации протеинкиназы G использовали мембранопроникающий аналог 8Br-цГМФ в концентрации 100 мкМ. Для снижения внутриклеточной концентрации цГМФ применяли специфический ингибитор растворимой гуанилатциклазы – ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one) в концентрации 10 мкМ.

2. Иммуногистохимические.

После эвтаназии животного летальной дозой уретана осуществлялась его перфузия 4% раствором параформальдегида на фосфатно-солевом буфере (0,01 М, pH 7.4). После двухчасовой экспозиции изъятых материалов в фиксирующем

растворе осуществлялась их криопротекция в 30% растворе сахарозы, затем, на криостате, готовили серию срезов толщиной 14 мкм. Срезы преинкубировались в течение 30 мин при комнатной температуре в фосфатно-солевом буфере с добавлением 10% сыворотки, 1% тритон X – 100, 0.1% бычьего сывороточного альбумина. Затем срезы инкубировались с первичными антителами в течение 24 ч при комнатной температуре.

Производилось выявление методом двойного мечения нейрональной NO-синтазы (nNOS), холинацетилтрансферазы (ХАТ), кальбиндина (КБ), кальретинина (КР), кокаин- и амфетамин- регулируемого транскрипта (CART) в спинном мозге и КШГ. После кратковременной промывки срезы далее инкубировались с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC), дающим зеленую флуоресценцию, или индокарбоцианином (CY3), дающим красную флуоресценцию в течение 2 ч (разведение 1:150). После чего срезы отмывали в PBS и заключали в среду для иммунофлуоресценции.

Анализ препаратов, подвергнутых процедуре иммуногистохимической обработки, проводился с использованием программно-аппаратного комплекса, включающего флуоресцентный микроскоп Olympus BX45 с набором фильтров, охлаждаемую CCD камеру Tucsen TCH-5.0ICE и компьютер на базе процессора Intel Core i7. Получение и последующая обработка изображений проводилась с использованием программы ISCapture, версия 3.6.

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 nNOS-ИР нейронов определяли их отношение к общему числу иммунопозитивных нейронов, которое принимали за 100%. Плотность волокон определяли по программе ImageJ как процент от площади, занимаемой nNOS-ИР волокнами к общей площади узла на срезе.

3. Вестерн блоттинг.

Определение экспрессии nNOS в сегменте Th2 спинного мозга и краниальном шейном узле.

Из изъятого после предварительной перфузии животного холодным (+ 4⁰ С) раствором фосфатного буфера (PBS), материала готовили гомогенат, смешав его с лизирующим раствором с добавлением ингибитора протеаз. Полученный раствор смешивали с SDS-буфером в соотношении 2:1, затем в течение 5 минут нагревали на водяной бане при 95⁰ С. Готовые пробы хранили при - 25⁰ С.

Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза в 10% полиакриламидном геле. Из каждой пробы для электрофореза брали по 10 мкл, а в первую лунку помещали 5 мкл окрашенного маркера молекулярного веса. 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. Мембраны блокировали раствором, содержащим 3% обезжиренное сухое молоко в TBS-T, в течение 30 мин при комнатной температуре.

После промывки TBS-T, мембраны инкубировали с первичными антителами против nNOS и GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа), при 4°C в течение 18 часов. Промывали в TBS-T, затем мембраны инкубировали с соответствующими вторичными антителами, конъюгированных с пероксидазой хрена. Иммуноблоты обнаруживались хемилюминесценцией в гель-документирующей системе Syngene G: BOX Chemi XR5E.

4. Статистическая обработка.

Математическая, статистическая обработка данных и построение графиков выполнено с использованием программы Sigma Plot («Systat Software», USA). Все величины представлены как средняя арифметическая \pm ошибка среднего ($M \pm m$). Две независимые группы сравнивались с помощью t-критерия Стьюдента, три и более с помощью дисперсионного анализа вариаций ANOVA и критерия Тьюки Post-hoc анализа. Проверку распределения в выборках на нормальность осуществляли с помощью теста Шапиро-Уилка. За уровень статистической значимости был взят $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фоновая эфферентная активность в постганглионарных волокнах КШГ в онтогенезе

Фоновая электрическая активность в постганглионарных волокнах внутреннего сонного нерва КШГ наблюдалась у всех животных. В постнатальном онтогенезе средняя амплитуда разрядов возрастала (табл. 1). 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 (табл. 1). У 10-суточных и более взрослых наибольшую мощность в спектре частот постганглионарных волокон представляли колебания с частотами до 1,5 Гц, синхронные с дыханием. 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).

Таблица 1.

Средняя амплитуда импульсов разрядов симпатических волокон (мкВ) в контроле, при аппликации нитропруссид натрия и L-NAME в КШГ крыс в онтогенезе (n=5 в каждой возрастной группе)

Возраст	Контроль	НН	L-NAME	8Br-цГМФ	ODQ
Новорожденный	15±2,6	14±3,8	14±2,0	13±2,3	16±2,7
10 суток	21±3,2	23±2,8	22±2,6	21±2,8	20±3,1
20 суток	35±4,1	43±3,6*	24±2,5*	45±3,8*	27±2,8*
30 суток	52±5,2	63±4,8*	32±5,6*	68±4,8*	34±4,3*
60 суток	55±4,2	65±5,1*	30±4,6*	63±5,1*	36±4,7*
6 месяцев	51±5,4	66±4,7*	31±3,4*	70±4,9*	33±3,8*
3 года	44±5,6	61±5,1*	28±5,4*	58±4,1*	26±3,1*

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

Таблица 2

Изменения спектра мощности дыхательных (0,7-1,5 Гц) и синхронных с сердечной деятельностью (4-7 Гц) разрядов симпатических волокон при аппликации НН и L-NAME (n=5 в каждой возрастной группе)

Возраст	Синхронных с дыхательной деятельностью (0,7-1,5 Гц) (%)		Синхронных с сердечной деятельностью (4-7 Гц) (%)	
	НН	L-NAME	НН	L-NAME
20 суток	+18,4±4,46	-16,3±3,38	+13,6±1,64	-11,7±2,15
30 суток	+22,3±5,34	-18,8±4,24	+16,5±3,26	-15,6±2,45
60 суток	+16,7±4,18	-18,4±4,76	+12,5±3,56	-16,4±1,18
1 год	+18,8±5,18	-20,6±6,12	+10,5±2,24	-12,3±2,36
3 года	+24,2±3,46	-26,4±5,11	+16,4±3,89	-14,2±2,04

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, увеличение мощности частот в диапазоне дыхания (0,7-1,5 Гц) и сердечной деятельности у 20-суточных и более взрослых крыс (табл. 3).

При аппликации ODQ в течение 1 часа происходило уменьшение средней амплитуды разрядов и мощности частот спектра фоновой симпатической активности,

синхронных с дыханием и сердечной деятельностью в КШГ крыс, начиная с 20 суток жизни вплоть до старых трехлетних крыс (табл. 3). Не наблюдалось достоверных различий относительно влияния 8Br-цГМФ и ODQ на мощности частот в диапазоне дыхания и сердечной деятельности между 20-суточными и более взрослыми крысами ($p > 0,05$).

Таблица 3.

Изменения спектра мощности дыхательных (0,7-1,5 Гц) и синхронных с сердечной деятельностью (4-7 Гц) разрядов симпатических волокон при аппликации 8Br-цГМФ и ODQ ($n=5$ в каждой возрастной группе)

Возраст	Синхронных с дыхательной деятельностью (0,7-1,5 Гц) (%)		Синхронных с сердечной деятельностью (4-7 Гц) (%)	
	8Br-цГМФ	ODQ	8Br-цГМФ	ODQ
20 суток	+15,4±4,46	-16,1±2,33	+16,3±2,18	-13,7±2,43
30 суток	+17,3±3,47	-16,3±4,81	+14,6±2,65	-14,6±2,54
60 суток	+11,6±2,19	-13,7±3,48	+13,3±3,18	-15,1±2,81
1 год	+14,5±3,56	-16,6±3,19	+12,6±2,64	-14,6±2,43
3 года	+13,8±3,17	-18,2±4,19	+13,9±2,27	-11,5±1,22

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

Амплитуда вызванных потенциалов в КШГ крыс изменялась под влиянием донора NO нитропрусида натрия и блокатора синтеза NO L-NAME, а также мембранопроникающего аналога цГМФ 8Br-цГМФ и специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы ODQ.

Воздействие нитропрусида натрия (рис. 1) и L-NAME (рис. 2) 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.

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 (табл. 4). 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 ($p < 0,01$).

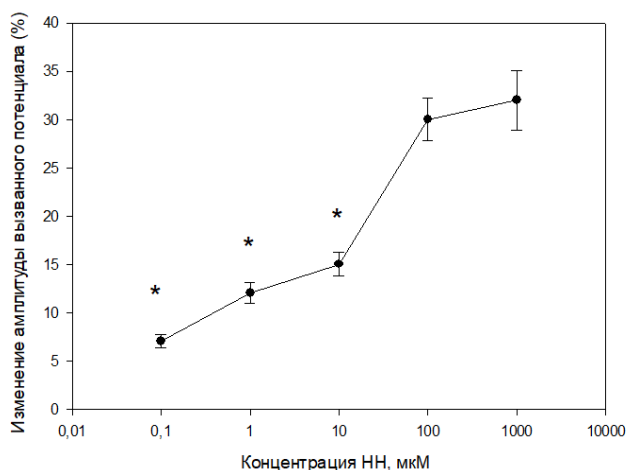


Рис. 1. Влияние различных концентраций НН (мкМ) на амплитуду вызванных ответов внутреннего сонного нерва КШГ при стимуляции шейного симпатического ствола у 30-суточных крыс (n=5).

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

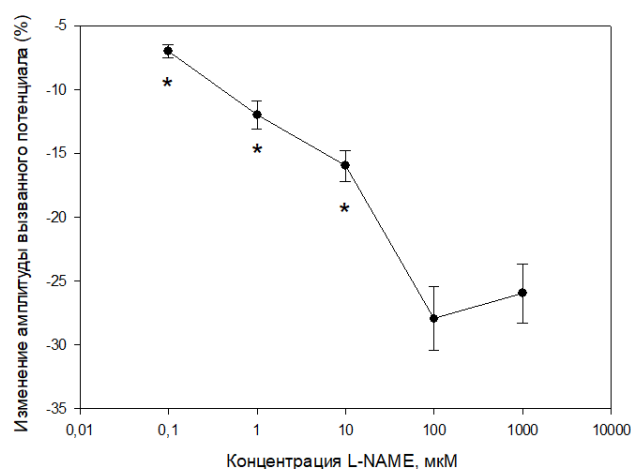


Рис. 2. Влияние различных концентраций L-NAME (мкМ) на амплитуду вызванных ответов внутреннего сонного нерва КШГ при стимуляции шейного симпатического ствола у 30-суточных крыс (n=5).

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

Таблица 4.

Изменение амплитуды фаз вызванных потенциалов в КШГ при электрической стимуляции преганглионарных волокон под влиянием НН / L-NAME и 8Br-цГМФ / ODQ (%) (n=5 в каждой возрастной группе)

Возраст	Изменения амплитуды фаз вызванных потенциалов при аппликации		Изменения амплитуды фаз вызванных потенциалов при аппликации	
	НН	L-NAME	8Br-цГМФ	ODQ
20 суток	+15±2,6	-13±1,8	+14±2,1	-14±1,8
30 суток	+29±1,7*	-28±1,6*	+28±1,9*	-23±1,7*
60 суток	+30±2,9*	-29±3,2*	+29±2,4*	-31±3,2*
1 год	+35±2,6*	-37±2,9*	+31±2,3*	-32±3,6*
3 года	+29±3,1*	-32±3,2*	+27±3,1*	-26±3,3*

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

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

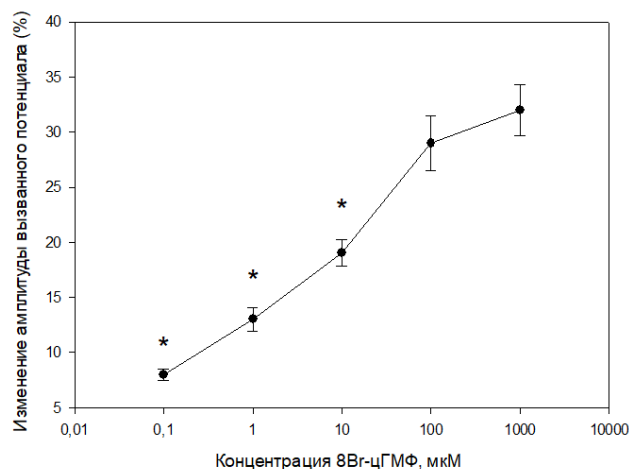


Рис. 3. Влияние различных концентраций 8Br-цГМФ (мкМ) на амплитуду вызванных ответов внутреннего сонного нерва КШГ при стимуляции шейного симпатического ствола у 30-суточных крыс (n=5). * $p < 0,01$, различия достоверны по сравнению с концентрацией 100 мкМ.

Воздействие 8Br-цГМФ (рис. 3) и ODQ (рис. 4) на амплитуду вызванных потенциалов в КШГ так же, как и в случае NH и L-NAME, носило дозозависимый характер. Наибольшее увеличение амплитуды под влиянием 8Br-цГМФ отмечалось при концентрации 100 мкМ. Максимальное же ослабление амплитуды ответов при действии ODQ отмечалось при концентрации 10 мкМ. Дальнейшее увеличение концентрации до 1000 мкМ (8Br-цГМФ) и 100 мкМ (ODQ) не вызывало достоверных изменений амплитуды ответа у 30-суточных крыс.

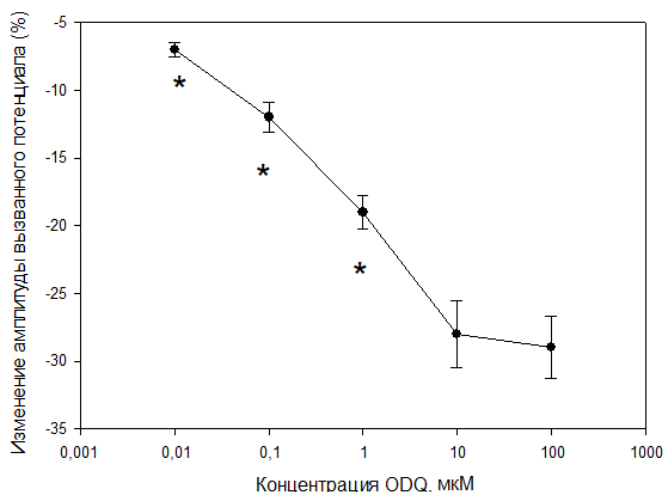


Рис. 4. Влияние различных концентраций ODQ (мкМ) на амплитуду вызванных ответов внутреннего сонного нерва КШГ при стимуляции шейного симпатического ствола у 30-суточных крыс (n=5). * $p < 0,01$, различия достоверны по сравнению с концентрацией 10 мкМ.

Аппликация 8Br-цГМФ 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 ODQ (10 мкМ) в течение 30 мин (табл. 4). Увеличение амплитуды под влиянием 8Br-цГМФ и уменьшение при воздействии ODQ у 30-суточных и более взрослых крыс было достоверно большим по сравнению с 20-суточными животными ($p < 0,01$).

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.IIp), 2) nucleus intermediolateralis thoracolumbalis pars funicularis (nucl.IIf); 3) nucleus intercalatus spinalis (nucl.IC); 4) nucleus intercalatus spinalis pars paraependymalis (nucl.ICpe) с момента рождения у всех животных (рис. 5).

Наибольший процент nNOS-ИР симпатических преганглионарных нейронов выявлялся у новорожденных и 10-суточных крыс, составляя $88 \pm 5,3\%$ и $84 \pm 6,7\%$ соответственно. К 20 суткам жизни процент снижается до $73 \pm 5,2\%$ и к 30 суткам – до $58 \pm 4,2\%$ (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 наибольший процент nNOS-ИР симпатических преганглионарных нейронов выявлялся в nucl.IIp по сравнению с остальными ядрами (рис. 6). В первые 30 дней процент nNOS-ИР нейронов в nucl.IIf значительно увеличился с $9 \pm 0,8\%$ у новорожденных до $14 \pm 1,2\%$ ($p < 0,05$), а доля иммунопозитивных клеток в nucl.ICpe значительно снизилась с $20 \pm 1,8\%$ до $14 \pm 0,5\%$ ($p < 0,05$). У крысят до 30 суток в nucl.IIf наблюдался меньший процент nNOS-ИР нейронов по сравнению с nucl.IC и nucl.ICpe, а у животных старше 2 месяцев наименьшая доля nNOS-ИР клеток приходилась на nucl.ICpe.

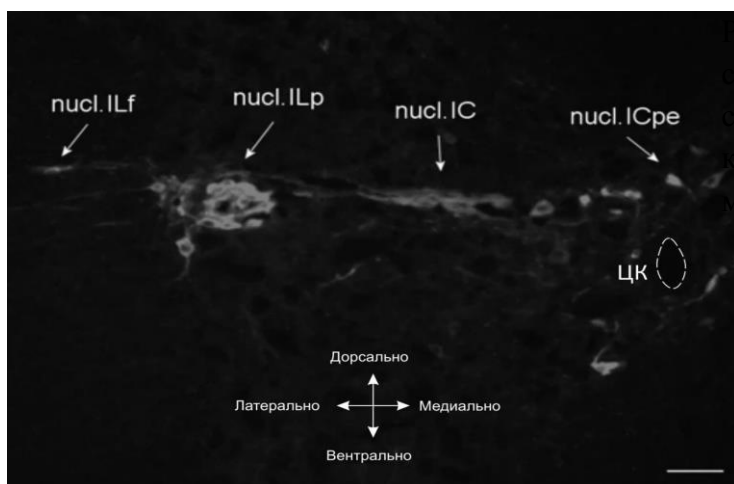


рис. 5. Микрофото. nNOS-ИР нейроны 20-суточной крысы в автономных ядрах спинного мозга крыс. ЦК – центральный канал. Флюоресценция CY3. Масштаб – 100 мкм.

Солокализация nNOS с холинацетилтрансферазой

У новорожденных и 10-суточных крыс большинство нейронов в nucl.IIp являлись nNOS-ИР и одновременно содержали фермент синтеза ацетилхолина - холинацетилтрансферазу (ХАТ). 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 ($26 \pm 3,1\%$ у новорожденных и $8 \pm 1,4\%$ у 10-суточных). В IIp процент nNOS-ИР нейронов уменьшается, а доля ХАТ-ИР клеток увеличивается во время развития. В первый

месяц доля nNOS-ИР нейронов значительно снизилась с $92 \pm 3,4\%$ у новорожденных до $55 \pm 4,6\%$ у 1-месячного ($p < 0,001$), тогда как число ХАТ-ИР нейронов увеличилось с $74 \pm 4,2\%$ до $99 \pm 0,3\%$ соответственно ($p < 0,01$). Не было никаких существенных различий в проценте nNOS(-)/ХАТ(+) нейронов между 30-дневными и более старыми крысами ($p > 0,05$).

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

Солокализация nNOS с кальбиндином

Тела нейронов и их проксимальные дендриты демонстрировали иммунореактивность к кальбиндину (КБ), которая варьировала по интенсивности от слабой до очень сильной. Наибольший процент нейронов КБ-ИР, солокализирующих nNOS, был обнаружен в nucl.II_p, а меньший - в nucl.IC по отношению к суммарному количеству нейронов, ИР к одному или обоим маркерам. Солокализации КБ и nNOS не наблюдалось в nucl.II_f и nucl.IC_{ре}.

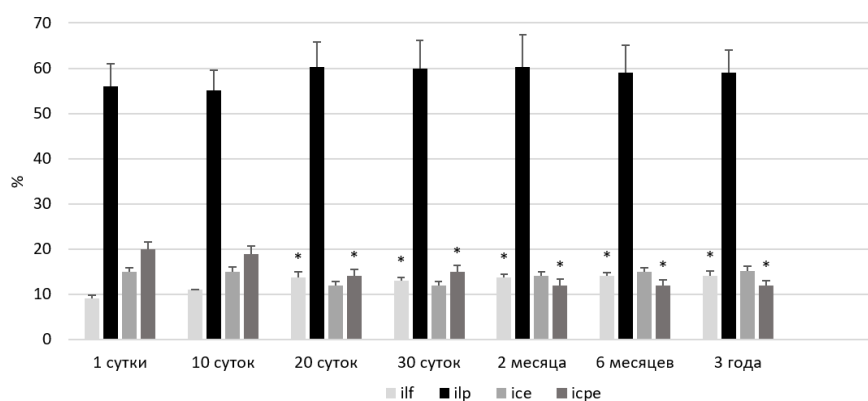


Рис. 6. Распределение nNOS-ИР преганглионарных нейронов в ядрах спинного мозга крысы (в %). (* $p < 0,05$, различия достоверны по сравнению с новорожденным).

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

В nucl.IC процент nNOS(+)/КБ(+) нейронов был высоким и увеличился с $40 \pm 4,8\%$ у новорожденных и $43 \pm 5,1\%$ у 10-дневных крыс до $61 \pm 5,5\%$ у 20-дневные крысы (статистически значимые различия, $p < 0,05$). Доля nNOS(+)/КБ(-) нейронов также увеличилась с $18 \pm 2,4\%$ у новорожденных и с $20 \pm 2,1\%$ у 10-дневных до $30 \pm 3,5\%$ у 20-дневных крыс (статистически значимые различия, $p < 0,05$). Мы не наблюдали статистически значимых различий между различными 20-дневными и более старыми крысами ($p > 0,05$).

Солокализация nNOS с кальретинином

У новорожденных большая часть в nucl.IIpr содержит кальретицин (КР) ($68 \pm 5,7\%$). 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 ($64 \pm 5,7\%$) и 10-суточных ($46 \pm 3,1\%$) большинство составляли nNOS(-)/КР(+) нейроны, с 20 суток - nNOS(+)/КР(+) ($68 \pm 4,9\%$). В nucl.IC и nucl.ICpe содержание nNOS-ИР/КР-негативных, nNOS-ИР/КР-ИР, nNOS-негативных/КР-ИР достоверно не отличалось между собой у животных всех возрастных групп ($p < 0,05$).

Солокализация nNOS с CART

Наибольшее количество CART-ИР нейронов, солокализованных с nNOS, было обнаружено в nucl.IIpr с меньшим числом в nucl.IC. Солокализация не наблюдалась в nucl.IIf и nucl.ICpe.

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

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, $p < 0,001$). Доля nNOS(+)/CART(-) нейронов снизилась с $62 \pm 5,6\%$ у 10-дневных до $33 \pm 4,1\%$ у 1-месячных крыс ($p < 0,001$).

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. 7). Не наблюдалось достоверных различий по экспрессии nNOS у крыс старше 10 суток ($p > 0,05$).

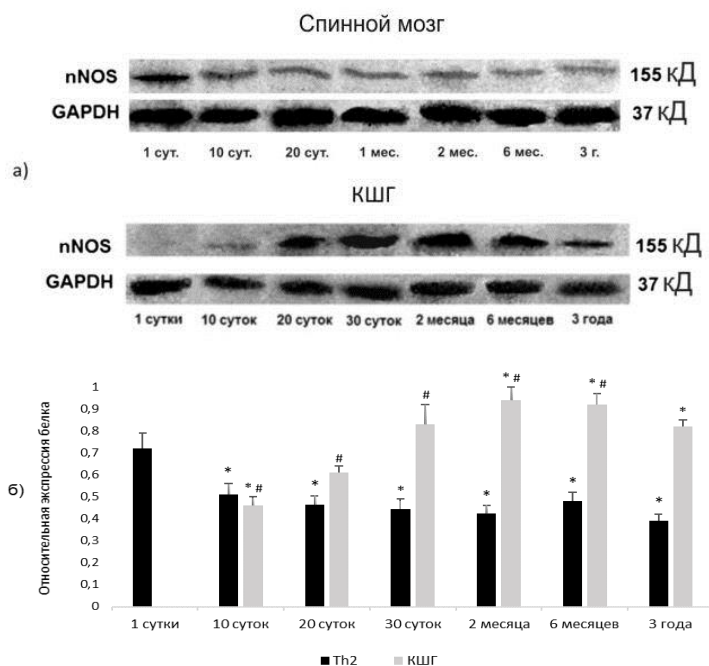


Рис. 7. Изменение экспрессии nNOS в спинном мозге и КШГ крыс в постнатальном онтогенезе.

а) Иммуноблоты nNOS и GAPDH спинного мозга и КШГ крыс (GAPDH – контрольный белок), б) Изменение соотношения экспрессии nNOS относительно GAPDH у крыс разного возраста. $p < 0,05$, различия достоверны по сравнению *с 20 сутками жизни, # с 3 годами.

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). Таким образом, увеличение солокализации nNOS/ХАТ в симпатических преганглионарных нейронах в первые недели жизни может отражать созревание синаптической передачи во время развития. Мы предполагаем, что на экспрессию ХАТ в симпатических преганглионарных нейронах в раннем постнатальном развитии влияют мишени - симпатические ганглионарные нейроны. Возможно, КБ и КР необходимы для установления новых синаптических контактов между аксонами ганглионарных нейронов и органами-мишенями, преганглионарными волокнами и ганглионарными нейронами (Siechen et al. 2009; Heiman, 2010).

Распределение nNOS в краниальном шейном симпатическом ганглии

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 трехлетних крыс наблюдались nNOS-ИР скопления в виде глыбок и отдельные nNOS-ИР нейроны.

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 с $18 \pm 8,8$ до $202 \pm 15,6$ на мм^2 и оставалась в последующем постоянной, составляя в двухмесячном возрасте $194 \pm 28,2$ на мм^2 . Полученные данные соответствуют ранее полученным сведениям по изменению НАДФН-диафоразы в симпатических узлах (Emanuilov et al., 2008; П.М.Маслюков с соавт., 2016).

Солокализация nNOS с ХАТ, КР и CART.

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 новорожденных крыс выявлялись хорошо выраженные ХАТ-ИР и КР-ИР волокна. Солокализация nNOS с ХАТ и КР отмечалась с 10 суток жизни. У 20-суточных, 1, 2, 6-месячных и трехлетних крыс в большинстве волокон отмечалась солокализация nNOS с ХАТ и КР.

В отличие от ХАТ и КР, лишь отдельные CART-ИР волокна и точечные структуры обнаруживались у новорожденных крыс. В возрасте от 10 суток до 6 месяцев жизни, обнаруживалось небольшое количество CART-ИР волокон, не солокализованных с nNOS. Однако у старых трехлетних крыс плотность CART-ИР волокон возрастает, при этом большая часть их солокализует nNOS.

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. 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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.

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. 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 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.

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 nNOS и изменение солокализации с другими маркерами. В течение первого месяца жизни доля nNOS(+)/холинацетилтрансфераза(+), nNOS(+)/кальбиндин(+), преганглионарных нейронов уменьшается, тогда как доля нейронов nNOS(+)/кальретинин(+), nNOS(+)/кокаин- и амфетамин-регулируемый транскрипт(+) увеличивается по отношению к проценту нейронов, иммунореактивных только к одному из указанной пары маркеров.
5. В краниальном шейном ганглии экспрессия nNOS и плотность nNOS-иммунореактивных симпатических преганглионарных волокон увеличивается в раннем постнатальном онтогенезе с момента рождения до 30 дней жизни и уменьшается у старых животных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах из списка ВАК, Scopus, Web of Science

1. Моисеев К. Ю. Возрастные изменения NO-содержащих симпатических нейронов в спинном мозгу у крыс / **Моисеев К. Ю.**, Маслюков П. М. Возрастные изменения NO-содержащих симпатических нейронов в спинном мозгу у крыс // Морфология. – 2018. – Т. 153, № 1. – С. 23-27.
2. Моисеев К. Ю. Возрастные аспекты влияния NO на ритмическую активность постганглионарных симпатических волокон / **Моисеев К. Ю.** Вербовецкая А. И. Маслюков А. П. Маслюков П. М. Возрастные аспекты влияния NO на ритмическую активность постганглионарных симпатических волокон. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 167, № 7. – С. 136-139.
3. Moiseev K. Y. Development of nNOS-positive preganglionic sympathetic neurons in the rat thoracic spinal cord / **Moiseev K. Y.**, Romanova I. V., Masliukov A. P., Masliukov P. M. Development of nNOS-positive preganglionic sympathetic neurons in the rat thoracic spinal cord // Cell and Tissue Research. – 2019. – V. 375, № 2. – P. 345-357.
4. Моисеев К. Ю. Изменение экспрессии нейрональной NO-синтазы в симпатических узлах крыс в онтогенезе / **Моисеев К. Ю.**, Юхманкова А. В., Маслюков П. М. Изменение экспрессии нейрональной NO-синтазы в симпатических узлах крыс в онтогенезе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168, № 7. – С. 88-90.

Тезисы докладов в сборниках материалов конференций

1. Моисеев К. Ю. NO-ергические симпатические нейроны крыс в онтогенезе / Маслюков П. М., Каткова Е. В., **Моисеев К. Ю.** NO-ергические симпатические нейроны крыс в онтогенезе // Материалы XIII Международной школы-конференции, посвященной 65-летию кафедры охраны здоровья человека института фундаментальной медицины и биологии КФУ. – 2016. – С. 72-73.
2. Моисеев К. Ю. NO-ергическая синаптическая передача в симпатических узлах крыс в онтогенезе / Маслюков П. М., **Моисеев К. Ю.**, Каткова Е. В. NO-ергическая синаптическая передача в симпатических узлах крыс в онтогенезе // Научные труды V съезда физиологов СНГ, V съезда биохимиков России, Конференции ADFLIM. – 2016. № Спецвыпуск Том 1. – С. 94.
3. Моисеев К. Ю. NO-ергическая синаптическая передача в симпатических узлах крысы в онтогенезе / Маслюков П. М., **Моисеев К. Ю.** NO-ергическая синаптическая передача в симпатических узлах крысы в онтогенезе // Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова. – 2017. – С. 2328-2329.
4. Моисеев К. Ю. Возрастные изменения NO-ергической синаптической передачи в симпатических узлах / Маслюков П. М., **Моисеев К. Ю.** Возрастные изменения NO-ергической синаптической передачи в симпатических узлах // Тезисы докладов XIII международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». – 2017. – С. 275-276.

5. Moiseev K. Y. Development of NO-ergic synaptic sympathetic transmission / Masliukov P. M., Emanuilov A. I., **Moiseev K. Y.**, Budnik A. F. Development of NO-ergic synaptic sympathetic transmission // Abstracts of the International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN) meeting. – 2017. IP85.
6. Moiseev K. Y. Development of NO-ergic synaptic transmission in sympathetic ganglia / Masliukov P. M., **Moiseev K. Y.** Development of NO-ergic synaptic transmission in sympathetic ganglia // Society for neuroscience abstracts. – 2017. 506.03/MM10.
7. Моисеев К. Ю. Нейрофармакология NO-ергической синаптической передачи в автономной нервной системе / Маслюков П. М., **Моисеев К. Ю.**, Маслюков А. П., Ноздрачев А. Д. Нейрофармакология NO-ергической синаптической передачи в автономной нервной системе // Экспериментальная и клиническая фармакология. Материалы V съезда фармакологов России "Научные основы поиска и создания новых лекарств. – 2018. – С. 155.
8. Моисеев К. Ю. Влияние NO на синаптическую передачу в симпатических узлах в онтогенезе / **Моисеев К. Ю.** Влияние NO на синаптическую передачу в симпатических узлах в онтогенезе // Тезисы докладов XIV международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». – 2018. – С. 317-318.
9. Моисеев К. Ю. Иммуногистохимические особенности NO-содержащих преганглионарных симпатических нейронов в онтогенезе / **Моисеев К. Ю.** Иммуногистохимические особенности NO-содержащих преганглионарных симпатических нейронов в онтогенезе // Тезисы докладов XIV международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». – 2018. – С. 332-333.
10. Моисеев К. Ю. Влияние оксида азота на ритмическую активность постганглионарных симпатических волокон в онтогенезе / **Моисеев К. Ю.**, Маслюков П. М. Влияние оксида азота на ритмическую активность постганглионарных симпатических волокон в онтогенезе // Сборник тезисов медицинского профессорского форума «Межотраслевая интеграция и передовые технологии в здравоохранении». – 2018. – С. 34-35.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЦП – аналого-цифровой преобразователь

ИР - иммунореактивные

КБ – кальбиндин

КР - кальретинин

КШГ - краниальный шейный ганглий

НАДФН - никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат

НН – нитропруссид натрия

ПКГ - цГМФ-зависимая протеинкиназа

ПКА - цАМФ-зависимая протеинкиназа

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

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 (нейромаркёр)