

УДК 611-018.8

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ P2Y-РЕЦЕПТОРОВ В НЕЙРОНАХ СПИНАЛЬНОГО ГАНГЛИЯ L5 В ПРОЦЕССЕ НЕЙРООНТОГЕНЕЗА У КРЫС

М.В. Нигметзянова, И.С. Рагинов

Аннотация

В работе иммуногистохимически было исследовано распределение различных типов P2Y-рецепторов в популяциях нейронов спинального ганглия L5 у крысы в течение развития (P0–P90). Нами было показано увеличение количества P2Y1- и P2Y4-рецепторов начиная с рождения и до половой зрелости. Наибольшее количество нейронов, экспрессирующих P2Y2-рецепторы, относится к популяции малых ноцицептивных нейронов. Однако P2Y1-рецепторы локализуются как в больших, так и в малых нейронах. Наши результаты об экспрессии P2Y-рецепторов в нейронах спинальных ганглиев крыс указывают на наличие пуринергической сигнализации в чувствительных ганглиях.

Ключевые слова: нейроны спинального ганглия, P2Y-рецепторы, постнатальное развитие.

Введение

В последнее время накапливается все больше данных о значительной роли метаболитных P2Y-рецепторов в регуляции различных внутриклеточных процессов. Показано, что их активация при помощи уридин трифосфата (УТФ) – производного пиримидина – оказывает нейропротекторное воздействие [1], изменяет уровень внутриклеточного кальция [2], влияет на процесс формирования цитоскелета и стимулирует пролиферацию глиальных клеток [3].

Что касается периферической нервной системы, данные, представленные в литературе, ограничиваются описанием локализации P2Y-рецепторов в различных популяциях нейронов [4] и изучением *in vitro* изменений, происходящих при активации данных рецепторов. Показано, что большинство малых (ноцицептивных) нейронов спинального ганглия экспрессируют P2Y1-рецепторы [4, 5], а большие (проприоцептивные) и средние (тактильные) нейроны экспрессируют преимущественно P2Y4-рецепторы [4]. Однако существуют и другие данные: так, P2Y4-рецепторы не обнаружены в спинальных ганглиях крысы [6]. В спинальных ганглиях кошек большинство малых и средних нейронов экспрессируют P2Y2-рецепторы, а многие большие и малые нейроны экспрессируют еще и P2Y4-рецепторы [7].

В процессе развития нервной системы позвоночных производится избыточное количество нейронов, в дальнейшем избыток нейронов удаляется [8]. Гибель нейронов в нейроонтогенезе и при повреждении происходит путем апоптоза [9–11], однако показаны и принципиальные различия в регуляции запрограм-

мированной и посттравматической гибели чувствительных нейронов [12, 13]. Изучение выживания различных популяций нейронов и влияния на этот процесс P2Y-рецепторов не только имеет самостоятельное значение для понимания процессов становления нервной системы, но и позволит расширить знания о механизмах пластичности периферических нейронов.

1. Методика

Все эксперименты проведены на новорожденных ($n = 14$), 15- ($n = 36$) и 30-дневных ($n = 32$) крыс. У новорожденных крысят и на 15-е, 30-е и 90-е сутки после рождения у остальных животных под эфирным наркозом после ламинэктомии выделяли спинальные ганглии на уровне L5 с обеих сторон, фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, обезжизивали и заключали в парафин. В каждом пятом серийном срезе (толщиной 7 мкм) спинальных ганглиев, окрашенных метиленовым синим, производили подсчет общего количества нейронов с видимыми ядрышками на каждой стороне [14] и с помощью окулярной сетки определяли количество малых, средних и больших нейронов. После проведения иммуногистохимической реакции с антителами против P2Y-рецепторов оценивали общее количество P2Y⁺-нейронов, а также их распределение по нейронам конкретных популяций. Результаты подсчетов обрабатывали с помощью метода Стьюдента.

2. Результаты

Нами не зафиксировано статически значимых различий в количестве нейронов между правой и левой стороной у животных всех экспериментальных групп. У новорожденных крыс в спинальном ганглии L5 общее количество нейронов составляет 647 ± 16.3 (рис. 1), из них малые нейроны составляют 55.4%, средние – 29.6% и большие – 15.8%. На этом сроке развития животных нами не было выявлено нейронов, экспрессирующих какой-либо из P2Y-рецепторов.

К 15-м суткам постнатального развития общее количество нейронов увеличивается на 58% ($P < 0.05$), по сравнению с соответствующим показателем у новорожденных, при этом количество больших и малых нейронов увеличивается на 57% и 23% ($P < 0.05$) соответственно, а средних – не изменяется. На данном сроке количество P2Y1⁺-нейронов составило 1.2% от общего количества нейронов ($P < 0.05$) (рис. 1), при этом позитивная реакция не имела четкой локализации по нейронам конкретной популяции и была нами зафиксирована в малых (ноцицептивных), средних (тактильных) и больших (проприоцептивных) нейронах. P2Y2⁺- и P2Y4⁺-нейронов на данном сроке не было выявлено.

На 30-е сутки постнатального развития общее количество нейронов увеличивается на 37% ($P < 0.05$) (рис. 1), по сравнению с измеренным на 15-е сутки. На этом сроке также достоверно увеличивается количество больших, средних и малых нейронов: на 227%, 161% и 136% соответственно. Количество P2Y1⁺-нейронов значительно увеличивается и составляет 38% от общего количества нейронов. Наибольшее количество P2Y1⁺-нейронов относилось к популяции средних (тактильных) нейронов (67.5% от общего числа P2Y1⁺-нейронов), 25.3% – больших (проприоцептивных) нейронов, и только 7.2% P2Y1⁺-нейронов

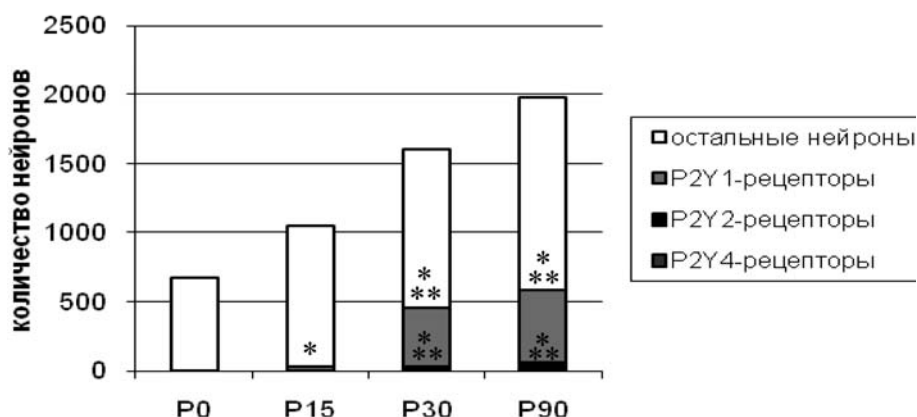


Рис. 1. Количество нейронов различных популяций в спинальном ганглии L5 новорожденных, 15-, 30- и 90-дневных крысят. Серые столбики – количество P2Y1⁺-нейронов, черные – P2Y2⁺-нейронов, синие – P2Y4⁺-нейронов, белые – P2Y1⁻-нейронов. По оси ординат – количество нейронов. (*) – достоверное различие при сравнении с новорожденными, (**) – достоверное различие при сравнении с предыдущим сроком

относились к популяции малых (ноцицептивных) нейронов. На этом сроке нами также выявлены P2Y2⁺-нейроны – 1.2% от общего количества нейронов. P2Y2⁺-нейроны не имели четкой локализации по популяциям, и были обнаружены среди малых, средних и больших нейронов.

К периоду половой зрелости (P90) общее количество нейронов увеличивается на 16% ($P < 0.05$), по сравнению с их количеством на сроке P30. Количество больших нейронов составляет 28.11%, средних – 12.6% и малых – 59.2%. Из них 26.6% – P2Y1⁺-нейроны. При этом количество P2Y1⁺-нейронов в популяциях малых и больших нейронов практически сравнялось и составило по 21% и 19% соответственно, но наибольшее количество P2Y1⁺-нейронов по-прежнему относилось к популяции средних нейронов – 60%. К 90-м суткам постнатального развития P2Y2⁺-нейроны приобрели строгую локализацию в малых проприоцептивных нейронах и составили 3.7% ($P < 0.05$) от общего количества нейронов. P2Y4⁺-нейроны не были выявлены ни в одной из популяций и на этом сроке.

3. Обсуждение результатов

В постнатальном периоде в спинальных ганглиях параллельно протекают два процесса – физиологическая гибель [15] и дифференцировка нейронов [16]. В постнатальном онтогенезе крысы, по нашим данным, количество нейронов в спинальном ганглии увеличивается, что наблюдается по крайней мере до P90. Эти результаты согласуются с данными М. Девора и др. (1985) [17] и Т. Сечини и др. (1995) [18]. П. Фарел (2003) [16] показал, что в интервале между P1 и P11 численность всей популяции нейронов в спинальном ганглии увеличивается приблизительно на 1500 нейронов. Данное увеличение количества нейронов не является линейным. Оно может быть связано с пролиферацией и последующей достаточно быстрой дифференцировкой нейтральных клеток-предшественниц, сохраняющихся в ганглии в постнатальном онтогенезе. Предположение

о существовании подобных медленно дифференцирующихся нейронов (L-типа) (long-differentiation neurons) было высказано М. Микером и П. Фарелом (1997) [19]. Такого рода нейроны могут формироваться из пула постмитотических нейробластов [20], идентифицируемых при помощи нейроспецифических маркеров, таких, как вещество Р, β (III)тубулин, а также NF200 и нейропептидов [21]. Нами показано, что в раннем постнатальном периоде наиболее динамично изменяется количество малых нейронов. Представляется весьма вероятным, что в условиях физиологической гибели малые нейроны ранее других реагируют на морфогенетические сигналы, поступающие из иннервируемой ткани-мишени. Одним из подобных сигналов, влияющих на малые нейроны и поддерживающих их выживание и дифференцировку, является фактор роста нервов (NGF) [22]. Уровень экспрессии NGF в ткани-мишени сохраняется высоким и в раннем постнатальном периоде [23], что может свидетельствовать о продолжении дифференцировки малых нейронов. Более растянутое в онтогенезе увеличение количества средних и больших нейронов может быть связано с тем, что нейроны этих популяций являются производными предшественников L-типа, которые продолжают дифференцировку после рождения [16].

Увеличение в процессе постнатального развития количества нейронов, экспрессирующих P2Y-рецепторы, вероятно, связано с началом на 15-е сутки самостоятельных передвижений крысят, что сопровождается появлением афферентных стимулов, поступающих по нейронам спинальных ганглиев. Это предположение подтверждает факт непосредственного участия P2Y2-рецепторов в температурной чувствительности [24].

Summary

M.V. Nigmatzyanova, I.S. Raginov. Exchange Expression of Different Type P2Y receptor in L5 Rat Dorsal Ganglia during Development.

The distribution of P2Y receptor subtypes in L5 rat dorsal root ganglia (DRG) during development (P0–P90) has been investigated using immunohistochemistry. Increased P2Y1 and P2Y4 receptors expression since P0 to P90 was showed. Most P2Y2 receptor staining was detected in small-diameter neurons. However, P2Y1 staining was present in large- and small-diameter neurons. The results suggest that P2Y receptors subtypes contribute to purinergic signalling in sensory ganglia.

Key words: dorsal root ganglia, P2Y receptor, postnatal development.

Литература

1. Chorna N.E., Santiago-Pérez L.I., Erb L., Seye C.I., Neary J.T., Sun G.Y., Weisman G.A., González F.A. P2Y receptors activate neuroprotective mechanisms in astrocytic cells // *J. Neurochem.* – 2004. – V. 91, No 1. – P. 119–132.
2. Sanada M., Matsuura H., Omatsu-Kanbe M., Sango K., Kashiwagi A., Yasuda H. Cytosolic Ca^{2+} under high glucose with suppressed Na^+/K^+ pump activity in rat sensory neurons // *Neuroreport.* – 2004. – V. 15, No 1. – P. 197–201.
3. Weisman G.A., Wang M., Kong Q., Chorna N.E., Neary J.T., Sun G.Y., González F.A., Seye C.I., Erb L. Molecular determinants of P2Y2 nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes // *J. Mol. Neurobiol.* – 2005. – V. 31, No 1–3. – P. 169–183.

4. Ruan H.Z., Burnstock G. Localisation of P2Y1 and P2Y4 receptors in dorsal root, nodose and trigeminal ganglia of the rat // *J. Histochem Cell Biol.* – 2003. – V. 120, No 5. – P. 415–426.
5. Gerevich Z., Illes P. P2Y receptors and pain transmission // *Purinergic Signal.* – 2004. – V. 1, No 1. – P. 3–10.
6. Kobayashi K., Fukuoka T., Yamanaka H., Dai Y., Obata K., Tokunaga A., Noguchi K. Neurons and glial cells differentially express P2Y receptor mRNAs in the rat dorsal root ganglion and spinal cord // *J. Comp Neurol.* – 2006. – V. 498, No 4. – P. 443–454.
7. Ruan H.Z., Birder L.A., de Groat W.C., Tai C., Roppolo J., Buffington C.A., Burnstock G. Localization of P2X and P2Y receptors in dorsal root ganglia of the cat // *J. Histochem Cytochem.* – 2005. – V. 53, No 10. – P. 1273–1282.
8. Oppenheim R. Cell death during development of the nervous system // *Annu. Rev. Neurosci.* – 1991. – V. 14. – P. 453–501.
9. Berkelaar M. et al. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats // *J. Neurosci.* – 1994. – V. 14, No 7. – P. 4368–4374.
10. Garcia-Valenzuela E. et al. Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy // *J. Neurobiol.* – 1994. – V. 25. – P. 431–438.
11. Rossiter J.P., Riopelle R.J., Bisby M.A. Axotomy-induced apoptotic cell death of neonatal rat facial motoneurons: time course analysis and relation to NADPH-diaphorase activity // *J. Exp Neurol.* – 1996. – V. 138, No 1. – P. 33–44.
12. Liu R., Snider W. Different signaling pathways mediate regenerative versus developmental sensory axon growth // *J. Neurosci.* – 2001. – V. 21, No 5. – P. RC164-1–RC164-5.
13. Nguyen M., Mushynski W., Julien J. Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration // *J. Cell Death Differ.* – 2002. – V. 9, No 12. – P. 1294–1306.
14. Рагинов И.С., Челышев Ю.А. Чувствительные нейроны и шванновские клетки при фармакологической стимуляции регенерации нерва // *Морфология.* – 2000. – Т. 118, № 6. – С. 36–40.
15. Coggeshall R., Pover C., Fitzgerald M. Dorsal root ganglion cell death and surviving cell numbers in relation to the development of sensory innervation in the rat hindlimb // *J. Dev. Brain. Res.* – 1994. – V. 82, No 1–2. – P. 193–212.
16. Farel P. Late differentiation contributes to the apparent increase in sensory neuron number in juvenile rat // *J. Brain Res. Dev.* – 2003. – V. 144, No 1. – P. 91–98.
17. Devor M. et al. Proliferation of primary sensory neurons in adult rat dorsal root ganglion and the kinetics of retrograde cell loss after sciatic nerve section // *J. Somatosensory Res.* – 1985. – V. 3. – P. 139–167.
18. Cecchini T. et al. Changes in the number of primary sensory neurons in normal and vitamin-E-deficient rats during aging // *Somatosens. Mot. Res.* – 1995. – V. 12, No 3–4. – P. 317–327.
19. Meeker M., Farel P. Neuron addition during growth of the postmetamorphic bullfrog: sensory neuron and axon number // *J. Comp. Neurol.* – 1997. – V. 389, No 4. – P. 569–576.
20. Perry V., Brown M., Andersson P. Macrophage responses to central and peripheral nerve injury // *Advances in Neurology, Neural Injury and Regeneration* / Ed. F.J. Seil. – N. Y.: Raven, 1991. – V. 59. – P. 309–314.
21. Chen C., Akopian A., Sivilotti L. P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons // *Nature.* – 1995. – V. 377, No 6548. – P. 428–431.
22. Geffen R., Goldstein R.S. Rescue of sensory ganglia that are programmed to degenerate in normal development: evidence that NGF modulates proliferation of DRG cells in vivo // *Dev. Biol.* – 1996. – V. 178, No 1. – P. 51–62.

23. *Wong J., Oblinger M.M.* NGF rescues substance P expression but not neurofilament or tubulin gene expression in axotomized sensory neurons // *J. Neurosci.* – 1991. – V. 11, No 2. – P. 543–552.
24. *Malin S.A., Davis B.M., Koerber H.R., Reynolds I.J., Albers K.M., Molliver D.C.* Thermal nociception and TRPV1 function are attenuated in mice lacking the nucleotide receptor P2Y(2) // *J. Pain.* – 2008. – V. 138, No 3. – P. 484–496.

Поступила в редакцию
15.03.10

Нигметзянова Мария Владимировна – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры «Водные биоресурсы и аквакультура» Казанского государственного энергетического университета.

E-mail: marianigmatzanova@yandex.ru

Рагинов Иван Сергеевич – доктор медицинских наук, ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Казанского государственного медицинского университета.

E-mail: raginovi@mail.ru