

© В.В.Порсева, 2013
УДК 611.82.018.8:599.323.4

В.В.Порсева

ТОПОГРАФИЯ И МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НФ200⁺-НЕЙРОНОВ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА СПИННОГО МОЗГА ПРИ ДЕАФФЕРЕНТАЦИИ КАПСАИЦИНОМ

Кафедра нормальной физиологии с биофизикой (зав. — проф. П.М.Маслюков), Ярославская государственная медицинская академия

Исследование проведено на 80 белых крысах-самках линии Вистар в возрасте 3, 10, 20, 30, 60, 180 и 360 сут с целью изучения влияния деафферентации капсаицином на характер топографии нейронов, содержащих белок нейрофиламентов с массой 200 килодальтон (НФ200⁺) в сером веществе II грудного сегмента спинного мозга. Моделирование деафферентации осуществляли путем подкожного однократного введения крысам на 2-е сутки жизни капсаицина в дозе 150 мг/кг. Контролем служили интактные животные (n=40). Для выявления НФ200⁺-нейронов применяли мечение клеток антителами к НФ200. Для расчета доли иммунореактивных нейронов производили мечение всей популяции нейронов красителем Neuro Trace Green Fluorescent Nissl Stain. Результаты работы показали, что НФ200⁺-нейроны выявляются в вентральном роге, промежуточной зоне и дорсальном роге спинного мозга и различаются морфометрическими характеристиками. Введение капсаицина привело к одинаковому уменьшению количества и средней площади сечения медиально и латерально расположенных НФ200⁺-мотонейронов в спинном мозгу (пластина IX). В промежуточной зоне (пластина VII) и дорсальном роге (пластины III–IV) изменения количества НФ200⁺-нейронов не наблюдалось, но средняя площадь их сечения превышала показатели в норме.

Ключевые слова: нейрон, спинной мозг, нейрофиламенты массой 200 килодальтон, капсаицин

Для изучения строения и функции органов и тканей в условиях нарушенной афферентации используются иссечение чувствительных узлов спинномозговых и черепных нервов, невротомия, создаются модели гипокинезии и гиподинамии. Внедрение в экспериментальную морфологию методов химической деафферентации позволило уделить особое внимание исследованию состояния нервных структур в условиях дефицита чувствительности. Известно, что введение капсаицина в нейротоксических дозах приводит к гибели капсаицин-чувствительных нейронов, содержащих TRPV1-рецепторы [4, 5, 7], и вызывает изменения состава нейрофиламентов (НФ) в нейронах чувствительных узлов [6, 9, 12]. НФ являются основным структурным компонентом цитоскелета аксонов нейронов. В состав НФ входят 3 нейрон-специфичных белка, различающихся по молекулярной массе: легкий (68 килодальтон), средний (160 килодальтон), тяжелый (200 килодальтон). Последние исследования показали, что особый интерес представляет белок НФ с массой 200 килодальтон, степень фосфорилирования которого определяет взаимодействие между тремя белками НФ [3, 9, 11]. Считается, что нарушение структуры данного типа НФ может изменять состояние всего комплекса цитоскелета аксонов и тем самым влиять на функционирование как

аксона, так и нейрона в целом. Однако связь гибели ноцицептивных нейронов, содержащих ваниллоидные рецепторы TRPV1 [1, 2], с развитием нейронов спинного мозга, содержащих иммунореактивный белок НФ, до настоящего времени изучена недостаточно.

Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение влияния капсаицина на нейроны серого вещества спинного мозга, содержащие белок НФ с массой 200 килодальтон в постнатальном развитии крысы.

Материал и методы. Исследование проведено с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР) на 80 белых крысах-самках линии Вистар в возрасте 3, 10, 20, 30, 60, 90, 180 и 360 сут. Животные были разделены на 2 группы — контрольную (n=40) (интактные животные) и подопытную (n=40) — экспериментальное моделирование деафферентации. Крысам подопытной группы на 2-е сутки жизни однократно подкожно вводили капсаицин (N-vanillylonanamide, Sigma, США) в дозе 150 мг/кг в растворе, состоящем из 1 части 96% этилового спирта, 1 части Твин-80, 8 частей 0,9% раствора NaCl. Морфометрические и топографические особенности распределения нейронов, содержащих белок НФ 200 килодальтон (НФ200⁺), изучали в сером веществе II грудного сегмента спинного мозга. Эвтаназию животных осуществляли под уретановым наркозом (3 г/кг внутривенно) путем транскардиальной перфузии изотоническим раствором хло-

Сведения об авторе:

Порсева Валентина Вячеславовна (e-mail: vvporseva@mail.ru), кафедра нормальной физиологии с биофизикой, Ярославская государственная медицинская академия, 150000, Ярославль, ул. Революционная, 5

рида натрия с гепарином (5 ЕД/л), затем 4% раствором параформальдегда на 0,1 М фосфатно-солевом (PBS) буфере. Выделенные сегменты фиксировали в течение 2 ч при 4 °С в указанной выше смеси, после чего промывали 3-кратно в изотоническом растворе хлорида натрия на PBS в течение 30 мин и оставляли в 30% растворе сахарозы на 24 ч. Из фиксированного материала на криостате готовили серии срезов толщиной 20 мкм.

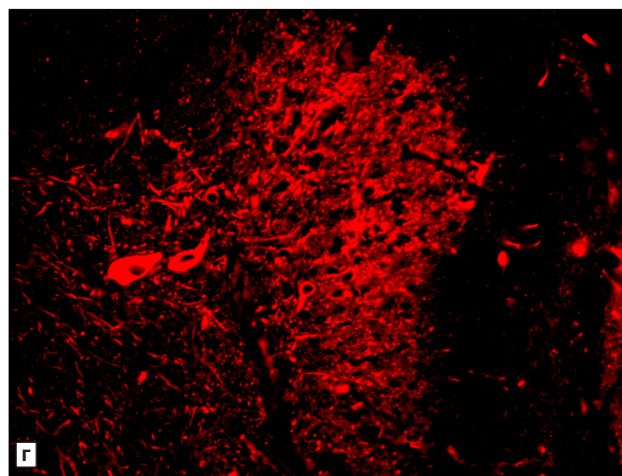
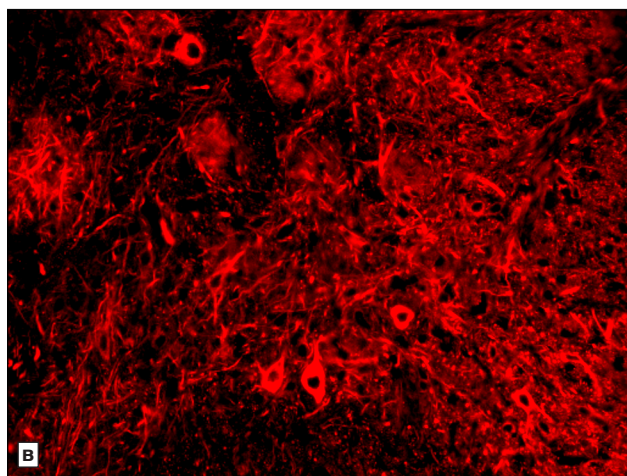
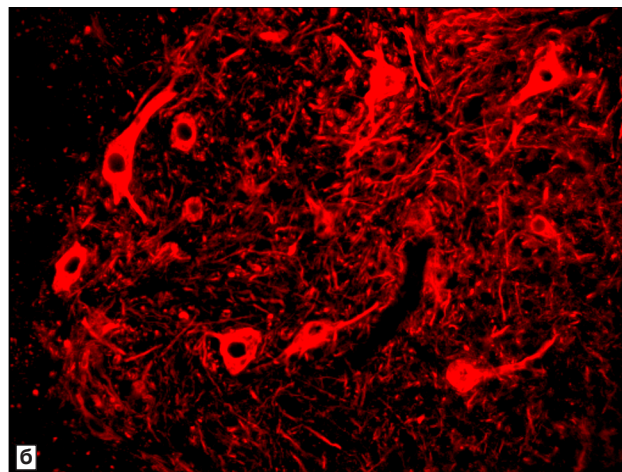
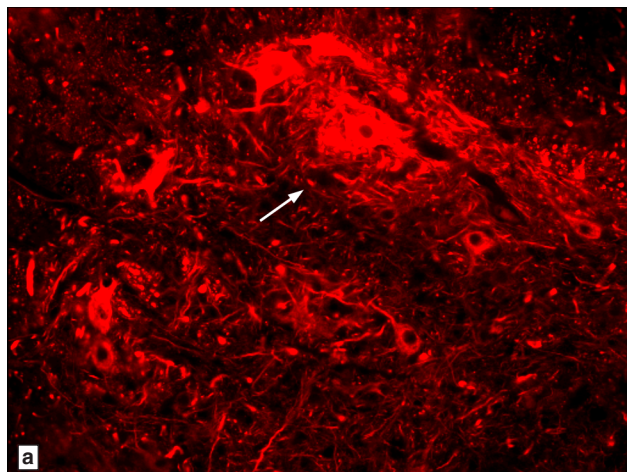
Для выявления НФ200⁺-нейронов применяли мечение мышиными антителами (Abcam, США, разведение 1:300). Срезы преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% нормальной ослиной сыворотки, 1% тритона X-100, 0,1% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% тимерозола. Затем срезы инкубировали с первичными антителами в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом индокарбоцианином (CY3, Jackson, США, разведение 1:100) в течение 2 ч, дающим красную флуоресценцию.

Для расчета доли иммунореактивных нейронов производили мечение всей нейронной популяции красителем, дающим зеленую флуоресценцию при окраске по Нисслю (NeuroTrace Green Fluorescent Nissl Stain, Molecular Probes,

США). После промывки в PBS срезы инкубировали в этом растворе в течение 20 мин (разведение 1:200).

Анализ препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Микмед 2, вариант 12 (ЛОМО, Россия) с соответствующим набором светофильтров и CCD-камеры MDC320 (ScoreTec, Китай). На цифровых изображениях гистологических препаратов при увеличении 200, используя программу Image J (NIH, США), оценивали площадь сечения нейронов и производили их подсчет на поперечном срезе сегмента спинного мозга. Анализу подлежали нейроны, срез которых прошел через ядро. Для определения топографии нейронов спинного мозга устанавливали соответствие их положения пластинам Рекседа с поправкой для крысы [8, 10]. Статистический анализ включал определение среднего арифметического значения и его стандартной ошибки. О значимости различий судили по величине t-критерия Стьюдента и считали их значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. У контрольных крыс всех возрастных групп на поперечном срезе спинного мозга НФ200⁺-нейроны были выявлены в вентральном роге, промежуточной зоне, в дорсальном роге.



Нейроны, содержащие белок нейрофиламентов с массой 200 килодалтон, в сером веществе спинного мозга крысы 30-суточного возраста.

а, б — вентральный рог — пластина IX: а — медиальная группа мотонейронов (стрелка); б — латеральная группа мотонейронов; в, г — интернейроны промежуточной области: в — пластина VII; г — дорсальный рог — пластины III–IV. Иммуногистохимическая реакция. Об.20, ок.7

В вентральном роге иммунопозитивные нейроны располагались в виде групп в медиальной и латеральной области до промежуточной зоны, что соответствовало локализации мотонейронов в пластине IX (рисунок, а, б). Количество мотонейронов, выявленных красителем по Нисслю, совпадало с числом НФ200⁺-нейронов.

Цитоплазма тел и аксоны НФ-содержащих мотонейронов имели яркую красную флюоресценцию, интенсивность которой с возрастом крысы не менялась. На поперечных срезах сегмента спинного мозга было видно, что аксоны нейронов направлены вентрально с ориентацией к верхушке рога (см. рисунок, а).

Подсчет нейронов, содержащих НФ, показал, что их количество в медиальной и латеральной области в 3-суточном возрасте было одинаковым (табл. 1). В 10-суточном возрасте число иммунореактивных мотонейронов уменьшилось: медиально расположенных — в 4,7 раза, латерально — в 2,5 раза (см. табл. 1). В 20-суточном возрасте количество НФ200⁺-мотонейронов, расположенных в медиальной и латеральной областях, увеличилось по сравнению с таковым в предыдущей возрастной группе и фактически сравнялось (см. табл. 1).

После введения капсаицина НФ200⁺-мотонейроны выявлялись у животных всех исследованных возрастных групп, топография иммунореактивных клеток на срезе вентрального рога спинного мозга не менялась и соответствовала двум областям: медиальной и латеральной, находящимся в пределах пластины IX. В 3-суточном возрасте количество НФ200⁺-мотонейронов в латеральной и медиальной областях было одинаковым. В 10-суточном возрасте число НФ200⁺-мотонейронов уменьшилось: в медиальной области — в 1,7 раза, в латеральной — в 2,0 раза. Минимальное количество выявляемых иммунореактивных мотонейронов наблюдалось в 30–90-суточном возрасте (см. табл. 1). Для подопытной группы существенным являлось значимое снижение числа медиально и латерально расположенных НФ200⁺-мотонейронов во всех возрастных группах по сравнению с контролем. Так, после введения капсаицина у крыс уже в 3-суточном возрасте количество иммунореактивных мотонейронов было меньше, чем в контроле: в медиальной области — на 19%, латеральной — на 17%. С возрастом происходило снижение числа нейронов в опыте по сравнению с контролем и составляло 70% и более в 20-, 30-, 60- и 90-суточном возрасте. В 180- и 360-суточном возрасте

Таблица 1

Характеристика мотонейронов, содержащих белок нейрофиламентов с массой 200 килодальтон, в вентральном роге спинного мозга (пластина IX), в контроле и при химической деафферентации капсаицином у крыс различного возраста ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Исследованные показатели	Возраст (сутки)	Медиально расположенные нейроны		Латерально расположенные нейроны	
		Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Количество мотонейронов	3-и	11,7±0,6	9,5±0,6**	11,3±0,5	9,4±0,5**
	10-е	2,50±0,22*	5,50±0,22*,**	4,5±0,4*	4,5±0,9*
	20-е	7,50±0,22*	2,50±0,22*,**	10,70±0,29	4,0±0,7*,**
	30-е	7,50±0,22*	2,0±0,4*,**	10,30±0,25	2,8±0,3*,**
	60-е	7,6±0,4*	1,80±0,24*,**	9,0±0,22*	2,0±0,27*,**
	90-е	6,30±0,25*	1,60±0,22*,**	8,60±0,20*	2,30±0,25*,**
	180-е	7,21±0,24*	3,51±0,22*,**	8,10±0,27*	4,7±0,5*,**
	360-е	6,80±0,24*	3,50±0,22*,**	8,0±0,26*	4,3±0,6*,**
Площадь сечения мотонейронов, мкм ²	3-и	289±14	313±14	220±13	321±15**
	10-е	612±14*	499±12*,**	519±13*	598±19*
	20-е	656±12*	633±19*	567±19*	699±12*,**
	30-е	669±11*	512±10*,**	572±17*	504±18*
	60-е	601±14*	522±9*,**	629±16*	545±19*
	90-е	663±13*	549±12*,**	623±14*	484±13*,**
	180-е	634±16*	492±13*,**	613±17*	475±14*,**
	360-е	568±17*	502±15*	595±18*	525±19*

Здесь и в табл. 2: * различия значимы по сравнению с показателями у 3-суточных крысят; ** различия значимы по сравнению с контролем при P<0,05.

количество НФ200⁺-мотонейронов в опыте было меньше, чем у контрольных животных в медиальной области на 51,4 и на 48,5% — в латеральных на 42 и 46,4% соответственно.

В контрольной группе крыс средняя площадь сечения НФ200⁺-мотонейронов в течение 1-го года жизни увеличилась: в медиальной области — в 2,0 раза, в латеральной — в 2,7 раза (см. табл. 1). При этом отмечено значимое прогрессивное возрастание средней площади сечения НФ200⁺-мотонейронов к 10-суточному возрасту, после чего показатели практически не менялись до 360-суточного возраста крысы.

У подопытных животных средняя площадь сечения НФ200⁺-мотонейронов в 3-суточном возрасте превышала контрольные значения только в латеральной группе мотонейронов — на 46%. После введения капсаицина возрастные изменения средней площади сечения иммунопозитивных мотонейронов медиальной и латеральной групп имели иную динамику, с 3-суточного возраста значения этого показателя прогрессивно увеличивались, достигая максимума в 20-суточном возрасте, после чего практически не менялись до конца наблюдения.

Анализ средней площади сечения мотонейронов в подопытной группе показал, что медиально расположенные НФ200⁺-мотонейроны в 10-, 30-, 60-, 90- и 180-суточные возрастные сроки наблюдения имели значимо меньшую среднюю площадь сечения по сравнению с контролем, латеральные НФ200⁺-мотонейроны — в 3- и 20-суточном возрасте — большую среднюю площадь сечения, чем в контроле, а в 90- и 180-суточном возрасте — меньшую площадь.

Таким образом, проведенная химическая деафферентация вызвала изменения в развитии популяции медиальной и латеральной групп

НФ200⁺-мотонейронов, что проявилось уменьшением числа последних и замедленным ростом их площади сечения.

Выявляемые НФ200⁺-нейроны в промежуточной зоне (пластина VII) и в дорсальном роге (пластина III–IV) давали яркую красную флюоресценцию с характерной окрашиваемостью отростков (см. рисунок, в, г).

В контроле и опыте в пластинах VII и III–IV, где определялось большое количество нейронов флюоресцентным красителем по Нисслю, выявлялись лишь единичные НФ200⁺-нейроны — 1–2 клетки на поперечном срезе. Возрастных изменений количества иммунореактивных нейронов в указанных пластинах не выявлено, влияния капсаицина на изменения клеточного состава также не наблюдалось.

Анализ средней площади сечения НФ200⁺-нейронов показал, что в контрольной группе клетки имели одинаковые размеры (табл. 2). Так, в пластине VII средняя площадь сечения нейронов за весь период наблюдения увеличилась на 4%, в пластине III–IV — на 13%. Большее увеличение размеров иммунореактивных нейронов в дорсальном роге связано с меньшими их размерами в 3-суточном возрасте по сравнению с таковым в промежуточной зоне. В целом, возрастная динамика средней площади сечения НФ200⁺-нейронов в указанных пластинах проявилась в увеличении показателя к 90-суточному возрасту с последующим незначительным снижением — к 360-суточному.

В подопытной группе животных средняя площадь сечения НФ200⁺-нейронов в 3-суточном возрасте превышала контрольные значения на 6% в пластине VII и на 6,5% — в пластине III–IV. Возрастные изменения средней площади сечения иммунореактивных нейронов после

Таблица 2

Средняя площадь сечения интернейронов, содержащих белок нейрофиламентов с массой 200 килодальтон, в промежуточной зоне — пластина VII и дорсальном роге — пластины III–IV в контроле и при химической деафферентации капсаицином у крыс различного возраста ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, мкм²)

Возраст (сутки)	Пластина VII		Пластины III–IV	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
3-и	327±15	347±16	310±10	330±10
10-е	321±14	382±21	293±18	349±18**
20-е	387±12*	478±28*,**	376±17*	452±23*,**
30-е	352±19	503±23*,**	389±20*	536±23*,**
60-е	373±17*	489±18*,**	375±18*	476±17*,**
90-е	410±21*	516±23*	390±20*	510±22*,**
180-е	365±19	512±29*,**	363±18	468±21*,**
360-е	340±14	340±13	350±17	371±19

введения капсаицина имели сходную динамику во всех пластинах, но отличались от таковых в контрольной группе: с 3-суточного возраста этот показатель прогрессивно увеличивался до 30-суточного возраста, после чего оставался высоким до 180-суточного возраста и уменьшался в 360-суточном возрасте. Характерным было и то, что в опыте средняя площадь сечения НФ200⁺-нейронов превышала контрольные значения во все сроки наблюдения (см. табл. 2).

Таким образом, изменения НФ200⁺-нейронов промежуточной зоны и дорсального рога при моделировании деафферентации отличались от изменений НФ200⁺-нейронов вентрального рога: при стабильном количестве площадь их сечения увеличивалась.

Обсуждение полученных данных. В результате проведенного исследования установлено, что НФ200⁺-нейроны выявляются в вентральном роге, промежуточной зоне, дорсальном роге серого вещества спинного мозга и отличаются по морфометрическим характеристикам и реакции на деафферентацию.

В вентральном роге НФ200⁺-клетки представлены медиально и латерально расположенными мотонейронами (пластина IX). Проведенное иммуногистохимическое двойное маркирование популяции мотонейронов позволяет сделать заключение, что все мотонейроны НФ200⁺ иммунореактивны.

В промежуточной зоне (пластина VII) и дорсальном роге (пластины III–IV) выявлялись единичные НФ200⁺-нейроны, которые отличались от иммунонегативных отчетливо выраженной флюоресценцией, а от мотонейронов вентрального рога — размерами. Двойное маркирование нейронов серого вещества спинного мозга убедительно свидетельствует о том, что только единичные интернейроны промежуточной зоны и дорсального рога содержат НФ200.

Ранее было установлено, что введение капсаицина при использованной модели деафферентации в чувствительных узлах спинномозговых нервов вызывает потерю нейронов, содержащих ваниллоидные рецепторы TRPV1 [1, 2]. Это дает основание связать выявленные изменения НФ200⁺-нейронов серого вещества спинного мозга с констатированной деафферентацией. Дефицит афферентации приводит практически к одинаковому уменьшению количества и средней площади сечения медиально и латерально расположенных НФ200⁺-мотонейронов. В промежуточной зоне и дорсальном роге изменения количества НФ200⁺-интернейронов в условиях дефицита афферен-

тации не наблюдается, но их средняя площадь сечения превышает показатели в норме.

Таким образом, уменьшение числа нейронов в чувствительных узлах спинномозговых нервов приводит к неоднозначной реакции НФ200⁺-нейронов спинного мозга: в вентральном роге уменьшается количество медиально и латерально расположенных мотонейронов и замедляется их рост; размеры интернейронов промежуточной зоны и дорсального рога увеличиваются до 6-месячного возраста, что совпадает с периодом отчетливо выраженных преобразований мотонейронов и может свидетельствовать об их морфофункциональной общности именно с мотонейронами.

Работа поддержана РФФИ, грантами 12-04-00621-а Президента РФ для поддержки молодых ученых; ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маслюков П. М., Порсева В. В., Шилкин В. В. и др. Возрастные изменения TRPV1-иммунореактивных афферентных нейронов при химической деафферентации капсаицином. В кн.: Научные труды: Современные проблемы боли: механизмы возникновения и способы коррекции. Минск, Бизнесофсет, 2010, с. 66–69.
2. Порсева В. В., Шилкин В. В., Корзина М. Б. и др. Изменение TRPV1-иммунореактивных нейронов чувствительных узлов спинномозговых нервов крысы под влиянием капсаицина. Морфология, 2011, т. 139, вып. 3, с. 41–45.
3. Capano C. P., Pernas-Alonso R. and Porzio U. Neurofilament homeostasis and motoneurone degeneration. Bioessays, 2001, v. 23, p. 24–33.
4. Jancsó G., Juhász A., Dux M. et al. Axotomy prevents capsaicin-induced sensory ganglion cell degeneration. Primary Sensory Neuron, 1997, v. 2, p. 159–165.
5. Kirifides M. L., Kurnellas M. P., Clark L. and Bryant B. P. Calcium responses of chicken trigeminal ganglion neurons to methyl anthranilate and capsaicin. J. Exp. Biol., 2004, v. 207, p. 715–722.
6. Ma Q. P. Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats. Neurosci. Lett., 2002, v. 319, p. 87–90.
7. Obreja O., Klusch A., Ponelies N. et al. A subpopulation of capsaicin-sensitive porcine dorsal root ganglion neurons is lacking hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. Eur. J. Pain, 2008, v. 12, p. 775–789.
8. Rexed B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord of the cat. J. Comp. Neurol., 1952, v. 96, p. 415–495.
9. Shaw G., Yang C., Ellis R. et al. Hyperphosphorylated neurofilaments NF-H is a serum biomarker of axonal injury. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005, v. 336, p. 1268–1277.
10. Steiner T. J. and Turner L. M. Cytoarchitecture of the rat spinal cord. J. Physiol., 1972, v. 222, p. 123–125.
11. Ueno T., Ohori Y., Ito J. et al. Hyperphosphorylated neurofilaments NF-H as a biomarker of the efficacy of minocycline therapy for spinal cord injury. Spinal Cord, 2011, v. 49, p. 333–336.

12. Yoshimura N., Erdman S.L., Snider M.W. and de Groat W.C. Effects of spinal cord injury on neurofilament immunoreactivity and capsaicin sensitivity in rat dorsal root ganglion neurons innervating the urinary bladder. *Neuroscience*, 1998, v. 83, № 2, p. 633–643.

Поступила в редакцию 21.10.2011
Получена после доработки 16.09.2013

**TOPOGRAPHY AND MORPHOMETRIC
CHARACTERISTICS OF NF200⁺-NEURONS
OF THE SPINAL CORD GRAY MATTER
AFTER DEAFFERENTATION WITH CAPSAICIN**

V.V.Porseva

The study was performed in 80 female Wistar rats aged 3, 10, 20, 30, 60, 180 and 360 days to examine the effect of capsaicin deafferentation on the topography of neurons containing 200 kD neurofilaments (NF200⁺-neurons) in the gray matter of the spinal cord II thoracic segment. The deafferentation was modeled by a

single subcutaneous administration of 150 mg/kg of capsaicin to 2-day-old rats. Intact rats (n=40) served as a control. To demonstrate NF200⁺-neurons the cells were labeled with antibodies against NF200. To count the proportion of immunoreactive neurons, the total neuronal population was marked with NeuroTrace Fluorescent Nissl stain. The results of the work have shown that NF200⁺-neurons were found in the ventral horn, intermediate zone and the dorsal horn of the spinal cord and differed from each other in their morphometric characteristics. In capsaicin-treated animals, the numbers of medial and lateral NF200⁺-motoneurons and their cross-sectional area were similarly reduced in the spinal cord (plate IX). In the intermediate zone (plate VII) and in the dorsal horn (plates III–IV) the number of NF200⁺-neurons in capsaicin-treated animals was not changed but their cross-sectional area exceeded normal values.

Key words: *neuron, spinal cord, 200 kD neurofilaments, capsaicin, ontogenesis, rat*

Department of Physiology and Biophysics, Yaroslavl' State Medical Academy