

© Коллектив авторов, 2011
УДК 611.832:599.323.4

В.В. Порсева¹, В.В. Шилкин¹, М.Б. Корзина², А.А. Коробкин² и П.М. Маслюков²

ИЗМЕНЕНИЕ TRPV1-ИММУНОРЕАКТИВНЫХ НЕЙРОНОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ УЗЛОВ СПИНОМОЗГОВЫХ НЕРВОВ КРЫСЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ КАПСАИЦИНА

¹ Кафедра анатомии человека (зав. — проф. В.В. Шилкин); ² кафедра нормальной физиологии с биофизикой (зав. — проф. В.Н. Воловенко), Ярославская государственная медицинская академия Росздрава; e-mail: vvporseva@mail.ru, prm@yma.ac.ru

Морфологические особенности TRPV1-иммунореактивных нейронов изучали в чувствительном узле грудного спинномозгового нерва у крыс 10-, 20-, 30-, 60- и 90-суточного возраста в норме и при химической деафферентации путем подкожного введения капсаицина на 2-е сутки после рождения в дозе 100 мг/кг. TRPV1-иммунореактивные нейроны различались по своим морфометрическим характеристикам: позитивные — имели очень малые и малые размеры, негативные — малые, средние и крупные размеры. Введение новорожденным крыскам капсаицина изменяло возрастную динамику TRPV1-позитивных нейронов, что проявлялось уменьшением средней площади сечения клеток и снижением их количества в течение всего периода наблюдения.

Ключевые слова: чувствительный узел спинномозгового нерва, TRPV1-иммунопозитивные нейроны, капсаицин, онтогенез, крыса

Капсаицин является агонистом ваниллоидных рецепторов типа 1, также известных как TRPV1. В малых дозах этот компонент жгучего перца активизирует, а в больших дозах десенситизирует и оказывает нейротоксическое действие на рецепторы типа TRPV1 первичных афферентных нейронов, что приводит к развитию нейрогенного воспаления, вплоть до гибели нервных клеток [2, 5, 10]. Физиологические эффекты стимуляции капсаицин-чувствительных нервных терминалей опосредуются выделением нейропептидов [1, 4, 9]. Наряду с широко известными данными, что капсаицин-чувствительные нейроны в чувствительных узлах спинномозговых нервов представлены мелкими клетками [4, 6, 8], точные сведения о топографических особенностях клеточного состава и сравнительная характеристика иммунореактивных свойств этих нейронов в норме и при избирательном повреждении отсутствуют.

Цель настоящего исследования — морфометрическая характеристика TRPV1-иммунореактивных нейронов чувствительных узлов спинномозговых нервов при повреждении капсаицин-чувствительных нервов у крыс в постнатальном периоде развития.

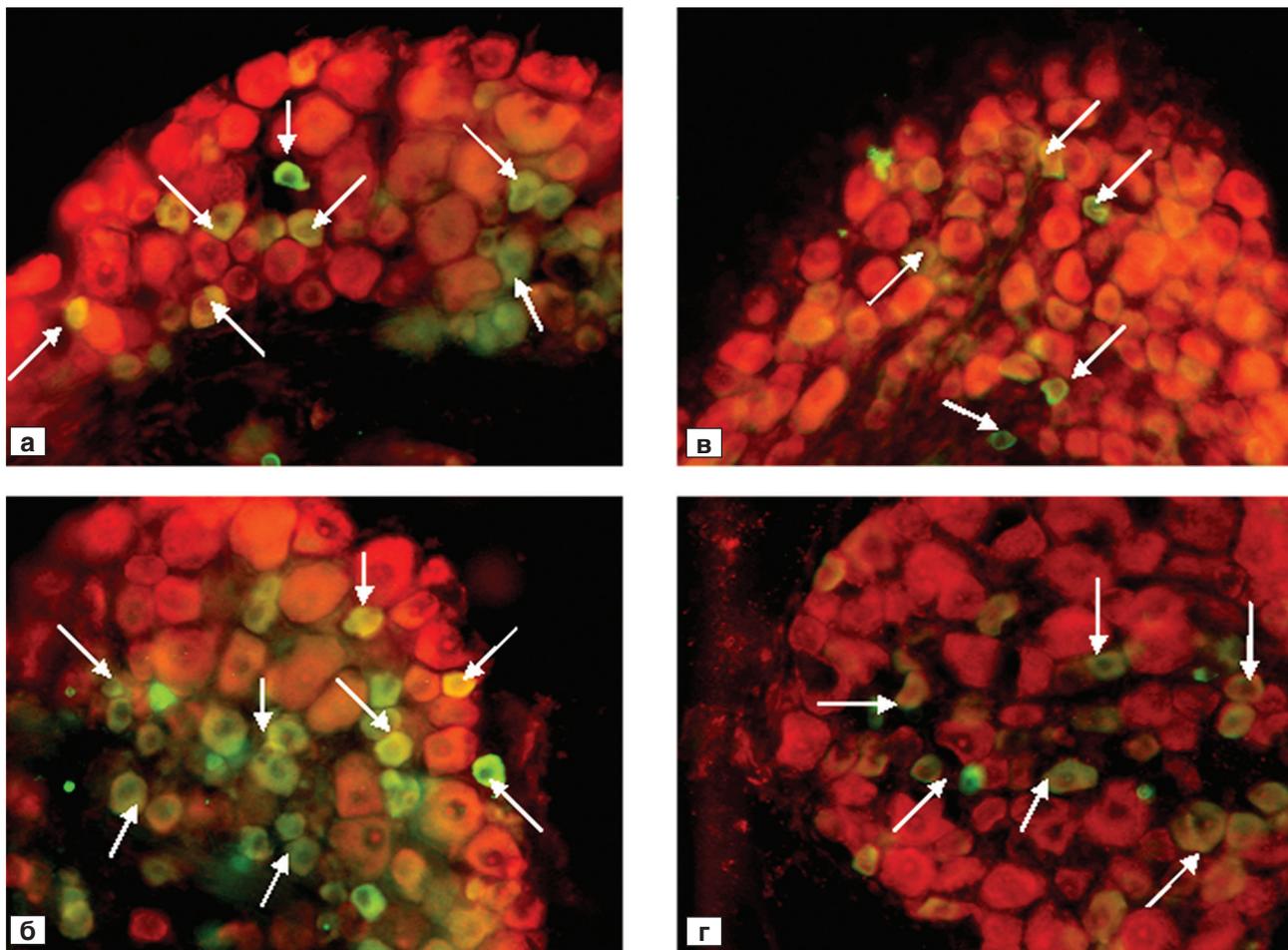
Материал и методы. Исследование проведено на 50 белых крысах-самках линии Вистар в возрасте 10, 20, 30, 60, 90 сут с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). Животные были разделены на 2 группы: контрольную (n=25) и подопытную (n=25). На 2-е сутки жизни у крыс подопытной группы моделировали деафферентацию путем однократного подкожного введения капсаицина (N-vanillylonamide, Sigma,

США), 100 мг/кг в растворе, состоящем из 1 части 96% этилового спирта, 1 части Твин-80, 8 частей 0,9% раствора NaCl. Морфометрические характеристики TRPV1-иммунореактивных нейронов изучали в чувствительном узле II грудного спинномозгового нерва. Эвтаназию животных осуществляли под уретановым наркозом (3 г/кг, внутривенно) путем транскардиальной перфузии изотонического раствора хлорида натрия с гепарином (5 ЕД/л), затем 4% раствора параформальдегида на 0,1 М фосфатно-солевом буфере (PBS). Выделенные узлы фиксировали в течение 2 ч в указанной выше смеси, после чего промывали трехкратно в изотоническом растворе 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.

С целью выявления нейронов, содержащих TRPV1-рецепторы, применяли мечение кроличьими антителами (Abcam, США) при разведении 1:1000. Срезы преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% сыворотки крови, 1% Triton 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 флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC) (Jackson, США) в течение 2 ч (разведение 1:100), дающим зеленую флюоресценцию.

Для расчета доли иммунопозитивных нейронов, кроме мечения TRPV1-рецепторов, производили мечение всей нейронной популяции при помощи другого флюорохрома — Neuro Trace (Molecular Probes, США) с красной флюоресценцией. После промывки в PBS срезы инкубировали в этом растворе в течение 20 мин (разведение 1:200).

Анализ препаратов проводили с помощью флюоресцентного микроскопа Микмед 2, вариант 12 (ЛОМО, Россия) с соответствующим набором светофильтров и цифровой камеры Score Tec MDC 320 (Китай). На цифровых изображениях гистологических препаратов узлов при увеличении 200 с использованием программы Image J (НИН, США) оце-



TRPV1-иммунореактивные нейроны чувствительного узла грудного спинномозгового нерва в норме (а, б) и после введения капсаицина (в, г) у крыс 10-суточного (а, в) и 20-суточного (б, г) возраста.

Стрелки — TRPV1-позитивные нейроны. Иммуногистохимическая реакция. Об. 30, ок. 7.

нивали площадь сечения нейронов и с помощью квадратно-сетчатой окулярной вставки подсчитывали клетки на площади 100 мкм^2 . Долю иммунореактивных нейронов определяли как их отношение к общему числу нейронов, которое принимали за 100%. Для характеристики нейронов узлов по площади сечения использовали 5 размерных классов: до 300 мкм^2 (очень малые), $301\text{--}600 \text{ мкм}^2$ (малые), $601\text{--}900 \text{ мкм}^2$ (средние), $901\text{--}1200 \text{ мкм}^2$ (крупные), $1201\text{--}1500 \text{ мкм}^2$ (очень крупные). Анализу подлежали только те нейроны, у которых срез прошел через ядро и ядрышко. При статистической обработке цифровых данных использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. У контрольных крыс в чувствительных узлах выявлялись как TRPV1-иммунопозитивные, так и TRPV1-иммунонегативные нейроны во всех исследованных возрастных группах (рисунок, а, б). Группа TRPV1-позитивных нейронов была более однородной по составу и представлена клетками малых размеров. Популяция TRPV1-негативных нейронов узла по мерным параметрам была неоднородна.

Относительное содержание TRPV1-позитивных нейронов с возрастом животного увеличилось в 1,4 раза, при этом максимальное повышение доли TRPV1-позитивных нейронов было отмечено в 30-суточном возрасте, а содержание TRPV1-негативных нейронов — уменьшилось в 1,2 раза (табл. 1). Средняя площадь сечения TRPV1-позитивных нейронов в течение всего периода наблюдения была значимо меньше, чем TRPV1-негативных (см. табл. 1).

У 20-суточных крыс средняя площадь сечения TRPV1-позитивных нейронов была больше в 1,3 раза, чем у 10-суточных, и до 30-суточного возраста это соотношение не менялось. В 60-суточном возрасте средняя площадь этих нейронов увеличилась в 2,1 раза по сравнению с таковой у 10-суточных крыс и не менялась до 90-суточного возраста.

В группе TRPV1-негативных нейронов возрастная динамика была иная и характеризовалась постепенным прогрессивным увеличением площади сечения этих клеток с 10- до 60-суточного воз-

Таблица 1

Характеристика TRPV1-иммунореактивных нейронов в чувствительных узлах спинномозговых нервов крыс в контроле и при химической деафферентации капсаицином ($\bar{x} \pm s_x$)

Исследованные показатели	Возраст, сут	Контрольная группа		Подопытная группа	
		TRPV1-позитивные нейроны	TRPV1-негативные нейроны	TRPV1-позитивные нейроны	TRPV1-негативные нейроны
Относительное содержание, %	10	30,0±1,8	70±5	10,1±2,9**	89,7±1,5**
	20	42,3±2,7*	58±4*	26,2±9,8*,**	74±4*,**
	30	47,1±2,6*	53±3*	27,7±1,9*,**	73±5*,**
	60	44,0±1,8*	56±4*	31,3±0,7*,**	69±4*,**
	90	41,3±2,7*	59±4*	29,2±1,4*,**	71±4*,**
Средняя площадь сечения, мкм ²	10	211±13	289±33	179±19	382±24**
	20	277±48	510±44	166±16**	408±34**
	30	282±84	620±40	207±22**	642±52
	60	454±79	744±55	266±65**	888±70**
	90	416±74	435±74	218±59**	488±30

* P<0,05, различия значимы по сравнению с показателями у 10-суточных крысят.

** P<0,05, различия значимы по сравнению с показателями в контрольной группе.

раста. При этом данный показатель увеличился в 2,7 раза. У 90-суточных крыс было отмечено резкое (в 1,7 раза) уменьшение средней площади сечения нейронов по сравнению с таковой в предыдущей возрастной группе (см. табл. 1).

Таким образом, в процессе развития животного к концу наблюдения в обеих группах нейронов отмечался рост клеток: в группе TRPV1-позитивных нейронов средняя площадь их сечения увеличилась в 2 раза, а в группе негативных — в 1,5 раза.

После введения капсаицина у крыс во всех возрастных группах также имелись как TRPV1-позитивные, так и TRPV1-негативные нейроны (см. рисунок, 1, в, г). Даже в 10-суточном возрасте у крыс наблюдалось значительно меньшее количество TRPV1-позитивных нейронов, чем в контроле, что сохранялось и в последующих возрастных группах (см. рисунок). При этом группы TRPV1-позитивных нейронов включали от 1 до 3 клеток, так же, как и в контроле, с преимущественной локализацией в центре среза узла. При сравнительном анализе изображений популяций нейронов узла видно, что так же, как и в контроле, группа TRPV1-позитивных клеток однородна и представлена нейронами малых размеров, а популяция TRPV1-негативных клеток узла гетерогенна.

В подопытной группе (см. табл. 1) в 10-суточном возрасте наблюдалось уменьшение доли TRPV1-позитивных нейронов в 3 раза по сравнению с контролем, в последующих возрастных группах снижение доли этих нейронов было в 1,5 раза и сохранялось таким до конца наблюдения.

Анализ средней площади сечения нейронов узла в подопытной группе выявил, что TRPV1-позитивные нейроны в течение всего периода наблюдения имели меньшие размеры (см. табл. 1). Так, в 10-суточном возрасте средняя площадь сечения нейронов была ниже в 2,1 раза по сравнению с таковой TRPV1-негативных нейронов, в 20-суточном возрасте — в 2,5 раза, в 30-суточном — в 3,1 раза, в 60-суточном — в 3,3 раза, в 90-суточном — в 2,2 раза. За весь период наблюдения площадь сечения нейронов узла после введения капсаицина увеличилась, но меньше, чем в контроле. В популяции TRPV1-позитивных нейронов это уменьшение было в 1,2 раза, негативных — в 1,3 раза.

Возрастное изменение средней площади сечения клеток после введения капсаицина имело в обеих группах нейронов разную динамику развития. Так, в популяции TRPV1-позитивных нейронов средняя площадь клеток была стабильной в течение всего периода наблюдения. Это отличало данный показатель от такового в контрольной группе, где отмечался его рост на 60-е и 90-е сутки наблюдения. В популяции негативных нейронов возрастная динамика изменения средней площади сечения клеток проявлялась прогрессивным увеличением до 60-х суток и падением на 90-е сутки наблюдения, что было характерно и для возрастной динамики в контрольной группе.

Анализ клеточного состава TRPV1-позитивных нейронов показал, что у крыс контрольной группы 10-, 20- и 30-суточного возраста более 50% клеток имели очень малые размеры (табл. 2).

Таблица 2

Относительное содержание нейронов различных размерных классов в контроле и при химической деафферентации капсаицином ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, %)

Нейроны	Возраст, сутки	Группа животных	Размерные классы, мкм ²					
			До 300	301–600	601–900	901–1200	1201–1500	
TRPV1-иммунопозитивные	10-е	Контрольная	87,4±0,6	12,6±0,6	0	0	0	
		Подопытная	95,7±1,1	4,3±1,1	0	0	0	
	20-е	Контрольная	75±5	23±4	2,0±0,7	0	0	
		Подопытная	98,30±0,29	1,70±0,29	0	0	0	
	30-е	Контрольная	77,3±0,6	22,7±0,6	0	0	0	
		Подопытная	87,3±0,5	11,1±0,4	1,60±0,24	0	0	
	60-е	Контрольная	37,2±0,9	62,8±0,9	0	0	0	
		Подопытная	66,50±0,19	32,0±0,4	1,50±0,19	0	0	
	90-е	Контрольная	36,4±0,9	63,6±0,9	0	0	0	
		Подопытная	67,8±0,3	32,2±0,3	0	0	0	
	TRPV1-иммунонегативные	10-е	Контрольная	70,7±0,5	29,3±0,5	0	0	0
			Подопытная	55,3±0,7	44,7±0,7	0	0	0
20-е		Контрольная	10,4±0,5	28,0±0,6	43,0±0,4	14,3±0,5	4,3±0,3	
		Подопытная	26,2±2,2	47±3	26,8±1,9	0	0	
30-е		Контрольная	11,2±0,6	38,8±0,6	43,2±0,5	4,8±0,4	2,0±0,3	
		Подопытная	14,2±0,4	47,5±0,4	24,0±0,6	8,2±0,4	6,1±0,3	
60-е		Контрольная	31,4±0,5	42,6±0,5	15,0±0,4	6,6±0,4	4,4±0,4	
		Подопытная	10±4	42,4±2,8	30±3	12±4	5,5±1,5	
90-е		Контрольная	38,6±0,4	41,4±0,4	15,0±0,3	5,0±0,3	0	
		Подопытная	34,6±1,2	40,4±1,2	19,2±0,4	5,8±0,4	0	

В 60- и 90-суточном возрасте более 50% клеток имели площадь от 301 до 600 мкм² и были малых размеров. В подопытной группе во всех возрастных группах TRPV1-позитивные нейроны имели очень малые размеры. У крыс с 30-х суток доля нейронов очень малых размеров снижалась, а малых размеров — повышалась и сохранялась до конца наблюдения. При этом после введения капсаицина с возрастом животных TRPV1-позитивные нейроны укрупнялись, тем не менее более 50% этих клеток имели очень малые размеры до конца наблюдения.

При рассмотрении клеточного состава TRPV1-негативных нейронов обнаружено, что в контрольной группе в 10-суточном возрасте у крыс преобладали клетки очень малых размеров (см. табл. 2). С 20-суточного по 60-суточный возраст в узле наблюдалось стабильно 5 классов TRPV1-негативных нейронов, но на 60-е сутки, наряду с наличием клеток очень крупного размера, увеличилось содержание клеток очень малого размера, а в 90-суточном возрасте отсутствовал класс очень крупных нейронов. После введения капсаицина возрастная динамика клеточного состава TRPV1-негативных нейронов не изменялась.

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенного исследования показали, что меньшая часть нейронов грудного чувствительного узла содержат рецепторы TRPV1. В процессе развития крысы доля TRPV1-позитивных нейронов увеличивалась к 20-м суткам и не менялась до конца наблюдения, что соответствует данным, полученным при исследовании взрослых крыс [1, 6]. Нарастание средней площади сечения нейронов в обеих популяциях клеток происходило одновременно к 60-м суткам наблюдения. Увеличение размеров нейронов не изменяло соотношения их обеих популяций. Анализ топографических особенностей популяций иммунопозитивных нейронов позволил подтвердить гипотезу о неоднородности и кластерном типе организации нейронов автономных, а также чувствительных узлов [1, 4, 7]. Нейроны в чувствительных узлах различались по своим морфологическим характеристикам. TRPV1-позитивные были представлены клетками очень малых и малых размеров, а негативные — малых, средних и крупных размеров.

Введение капсаицина, агониста рецепторов TRPV1, вызвало снижение доли TRPV1-позитивных нейронов на 20% к 10-м суткам наблюдения, что очевидно связано с физиологическими

эффектами активации капсаицин-чувствительных терминалей, которые заключаются в повышении проводимости неселективных катионных каналов, что ведет к внутриклеточному накоплению Ca^{2+} и, в конечном итоге, к гибели клеток [3, 5]. У более взрослых животных доля TRPV1-иммунопозитивных нейронов в узле также была меньше — на 12–20%. По мнению одних авторов, после введения капсаицина происходит массовая гибель нейронов разных размеров [2, 10]. В то же время есть данные, что после введения капсаицина гибнут мелкие нейроны [1, 6, 8]. Настоящая работа показала, что популяция TRPV1-позитивных нейронов в основном представлена клетками со средней площадью сечения до 450 мкм^2 , введение капсаицина вызывает изменения не всех, а только этой определенной популяции нейронов чувствительного узла, что выражается в уменьшении средней площади TRPV1-позитивных клеток до 260 мкм^2 и снижении их количества на протяжении 3 мес жизни крысы. При этом в процессе развития животного после введения капсаицина в обеих популяциях нейронов отмечался рост клеток, который сопровождался изменением возрастной динамики TRPV1-позитивных нейронов и проявлялся незначительным увеличением площади сечения всех нейронов узла к концу наблюдения. При анализе клеточного состава TRPV1-позитивных нейронов становится очевидным относительно стабильность возрастной динамики показателя средней площади их сечения в условиях химической деафферентации за счет большого количества нейронов очень малых размеров в узле в течение всего периода наблюдения.

Работа поддержана РФФИ, гранты 08-04-00470, 10-04-00509; ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Золотарев В.А. и Ноздрачев А.Д. Капсаицин-чувствительные афференты блуждающего нерва. Рос. физиол. журн., 2001, т. 87, № 2, с. 182–204.
2. Румянцева Т.А. Клеточный состав спинномозгового узла белой крысы после неонатального введения капсаицина. Морфология, 2000, т. 118, вып. 5, с. 22–25.
3. Fuchs A., Lirk P., Stucky C. et al. Painful nerve injury decreased resting cytosolic calcium concentrations in sensory neurons of rats. Anesthesiology, 2005, v. 102, № 6, p. 1217–1225.
4. Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachikininins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. J. Neurosci., 1988, v. 24, № 3, p. 739–768.
5. Jin H.W., Ichikawa H., Fujita M. et al. Involvement of caspase cascade in capsaicin-induced apoptosis of dorsal root ganglion neurons. Brain Res., 2005, v. 1056, № 2, p. 139–146.
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. Maslyukov P.M., Korzina M.B., Emanuilov A.I. and Shilkin V.V. Neurotransmitter composition of neurons in the cranial cervical and celiac sympathetic ganglia in postnatal ontogenesis. Neurosci. Behav. Physiol., 2010, v. 40, № 2, p. 143–147.
8. Piper A.S. and Docherty R.J. One-way cross-desensitization between P2X purinoceptors and vanilloid receptors in adult rat dorsal root ganglion neurons. J. Physiol., 2000, v. 15, № 523, p. 685–696.
9. Szolcsanyi J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. Neuropeptides, 2004, v. 38, № 6, p. 377–384.
10. Torsney C., Meredith-Middleton J. and Fitzgerald M. Neonatal capsaicin treatment prevents the normal postnatal withdrawal of A fibres from lamina II without affecting fos responses to innocuous peripheral stimulation. Brain Res. Dev. Brain Res., 2000, v. 11, № 121 (1), p. 55–65.

Поступила в редакцию 09.12.2010
Получена после доработки 04.04.2011

CHANGES THE TRPV1-IMMUNOREACTIVE NEURONS OF RAT SPINAL NERVE SENSORY GANGLIA INDUCED BY CAPSAICIN TREATMENT

V.V. Porseva, V.V. Shilkin, M.B. Korzina, A.A. Korobkin and P.M. Maslyukov

Morphological features of the TRPV1-immunoreactive neurons were studied in thoracic spinal nerve sensory ganglion in 10-, 20-, 30-, 60- and 90-day-old rats under normal conditions and after chemical deafferentation caused by capsaicin (100 mg/kg) subcutaneous injection at postnatal day 2. TRPV1-immunoreactive neurons differed in their morphometric characteristics: positive neurons had very small and small sizes, negative cells had the small, medium and large sizes. Capsaicin treatment of newborn rats was shown to change age dynamics of TRPV1-positive neurons resulting in the reduction of the average cell cross-sectional area and cell numbers during the whole period of observation.

Key words: *spinal nerve sensory ganglion, TRPV1-immunopositive neurons, capsaicin, ontogenesis, rat*

Department of Human Anatomy, Department of Normal Physiology with the Course of Biophysics, Yaroslavl State Medical Academy