

## КЛАСТЕРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ НЕЙРОНОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО УЗЛА СПИННОМОЗГОВОГО НЕРВА КРЫСЫ

© Валентина Вячеславовна Порсева<sup>1</sup>, Петр Михайлович Маслюков<sup>1</sup>,  
Александр Данилович Ноздрачев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ярославский государственный медицинский университет. 150000, Ярославль, Революционная ул., 5

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, медицинский факультет. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9

**Контактная информация:** Валентина Вячеславовна Порсева — старший преподаватель кафедры патологической физиологии. E-mail: vvporseva@mail.ru

**РЕЗЮМЕ:** Цель нашего исследования — анализ топографии и морфометрических особенностей нейронов, содержащих маркеры TRPV1, вещество P (SP), кальцитонин-ген-родственный пептид (CGRP), белок нейрофиламентов 200 кДа (NF200), кальбиндин 28 кДа (CB) в чувствительном узле грудного спинномозгового нерва в постнатальном развитии крысы. **Материал и методы.** Иммунореактивные (ИР) нейроны у самок крыс линии Вистар в возрасте 3, 10, 20, 30, 60 и 90 суток после рождения исследовали с использованием иммуногистохимических методов. **Результаты.** Исследование нейронов чувствительных узлов в различных возрастах показало как общие закономерности химической организации нейронов, так и возрастные особенности динамики становления экспрессии изученных маркеров. В трехдневном возрасте количество нейронов различных ИР популяций составило, в зависимости от маркера, по возрастающей: SP — CGRP — NF200 — TRPV1 — CB (9,5% — 12,8% — 20,6% — 22,6% — 37,4%). В дальнейшем изменения количества были гетерохронными: доля CGRP, NF200 и TRPV1 нейронов увеличивалась, тогда как число клеток, экспрессирующих SP и CB, уменьшалось. Иммунореактивность CGRP, NF200 и CB выявлялась в гетерогенных по размерам популяциях нейронов. Экспрессию TRPV1 и SP проявляли мелкие (до 600 мкм<sup>2</sup>) и очень мелкие нейроны (до 300 мкм<sup>2</sup>). Во все исследуемые возраста крыс популяции ИР-нейронов в большинстве своем формируют групповые клеточные скопления. **Заключение.** На срезе чувствительного узла грудного спинномозгового нерва определяются четкие группировки ИР нейронов, объединяющие от 2–3 до 8–10 клеток. Нейрональные кластеры формируются по принципу гетерогенности: по нейрохимической организации, по размеру — от очень мелких до очень крупных нейронов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** нейрон, спинномозговой узел, иммуногистохимия, крыса, онтогенез.

## CLUSTER ORGANIZATION OF NEURONS OF THE SENSITIVE NODE OF THE RAT SPINAL NERVE

© Valentina V. Porseva<sup>1</sup>, Petr M. Masliukov<sup>1</sup>, Alexandr D. Nozdrachev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Yaroslavl State Medical University  
150000, Russia, Yaroslavl, Revolutsionnaya str., 5

<sup>2</sup> St. Petersburg State University, Faculty of Medicine. 199034, St. Petersburg, Universitetskaya nab., D. 7–9

Contact information: Valentina V. Porseva — Senior Lecturer Department of Pathophysiology. E-mail: vvporseva@mail.ru

**ABSTRACT: Objective** — to analyze the morphological features of neurons containing TRPV1, substance P (SP), calcitonin-a gene-related peptide (CGRP), neurofilament protein 200 kDa (NF200), calbindin 28 kDa (SV) markers of the thoracic spinal ganglion in rat postnatal development. **Material**

**and methods.** Immunoreactive (IR) neurons in 3-, 10-, 20-, 30-, 60- and 90-day-old female Wistar rats were studied using immunohistochemical methods. **Results.** The study of neurons of sensitive ganglions at various ages shows both the general laws of the chemical organization of neurons and age-related features of the dynamics of formation of the expression of the studied markers. At three days of age, the number of neurons of different IR populations was increasing depending on the marker: SP — CGRP — NF200 — TRPV1 — CB (9,5% — 12,8% — 20,6% — 22,6% — 37,4%). Subsequently, the number changes were heterochronous: the percent of CGRP, NF200 and TRPV1 neurons increased, while the number of cells expressing SP and CB decreased. Immunoreactivity of CGRP, NF200 and CB was detected in heterogeneous sizes of neuron populations. Expression of TRPV1 and SP was shown by small (up to 600  $\mu\text{m}^2$ ) and very small neurons (up to 300  $\mu\text{m}^2$ ). **Conclusion.** On the section of the thoracic spinal ganglion, clear groupings of IR neurons are determined, combining from 2–3 to 8–10 cells. Neuronal clusters are formed according to the principle of heterogeneity: by neurochemical organization, by size-from very small to very large neurons.

**KEY WORDS:** neuron, spinal node, immunohistochemistry, rat, ontogenesis.

## ВВЕДЕНИЕ

Морфологическое разнообразие нейронов в узлах периферической нервной системы обычно устанавливается по неравнозначности нервных клеток по размерам, числу отростков, по содержанию различных белков, липидов, ферментов, медиаторов [2, 3, 4, 5, 9, 10]. Обобщенная характеристика нейронов чувствительных узлов спинномозговых нервов по гистофункциональным параметрам в различные возрастные периоды жизни белой крысы может способствовать пониманию динамики развития центров чувствительной иннервации, уточнению структурно-функциональных особенностей нейронов, выявлению изменений сенсорных нейронов под влиянием различных факторов.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявление характера топографии и морфометрических характеристик нейронов, содержащих TRPV1, вещество P, кальцитонин-ген-родственный пептид, белок нейрофиламентов с молекулярной массой 200 кДа, кальбиндин с молекулярной массой 28 кДа в чувствительном узле грудного спинномозгового нерва в постнатальном развитии крысы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 55 белых крысах-самках линии Вистар в возрасте 3, 10, 20, 30, 60 и 90 суток после рождения. Эвтаназию животных осуществляли под уретановым наркозом (3 г/кг, внутривенно) путем транскардиальной перфузии физиологического раствора, содержащего гепарин (5 ЕД/л), затем 4% раствора параформальдегида на 0.1 М

фосфатном буфере (рН 7,4). Объектом исследования служили нейроны чувствительного узла второго грудного спинномозгового нерва (ЧУГН). Выделенные узлы дополнительно фиксировали в 4% растворе параформальдегида на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) при 4° С в течение 2 часов, после чего промывали трехкратно в физиологическом растворе на фосфатном буферном растворе (PBS) в течение 30 мин и оставляли в 30% растворе сахарозы на 24 часа при 4° С. Из фиксированного материала готовили срезы толщиной 20 мкм на криостате. Выявление нейронов, содержащих рецепторы временного потенциала, ванilloидный тип 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1), вещество P (substance P, SP), кальцитонин-ген-родственный пептид (calcitonin gene-related peptide, CGRP), белок нейрофиламентов 200 кДа (neurofilament protein, NF200), кальбиндин 28 кДа (calbindin, CB), проводили с использованием меченых антител: первичные антитела (Abcam, Великобритания) поликлональные кроличьи против TRPV1, SP, CGRP, CB; моноклональные мышинные против NF200. Вторичные антитела (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США) были конъюгированы с флюорохромами: флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC), дающим зеленую флюоресценцию нейронов, содержащих TRPV1, SP, CGRP, CB; индокарбоданином (Cy3), дающим красную флюоресценцию нейронов, содержащих NF200. Окраску клеток всей популяции нейронов проводили NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stains (Molecular Probes, США) с красной флюоресценцией у TRPV1, SP, CGRP, CB нейронов и Neuro Trace Green Fluorescent Nissl Stains (Molecular Probes, США) с зеленой флюоресценцией у NF200 нейронов. После этого срезы отмывали в PBS и заключали в

среду для иммунофлюоресценции VectaShield (Vector Laboratories, США). Для исключения неспецифической реакции часть срезов инкубировали без первичных и/или вторичных антител. При выявлении NF200 для предотвращения неспецифического окрашивания, перед применением первичных антител, использовали преинкубацию в течение 1 часа с Fab-фрагментом неконъюгированных ослиных антител против мыши (Jackson Immunoresearch, США, разведение 10 мг/мл).

Препараты анализировали на микроскопе Олимпус ВХ43 (Olympus Corporation, Япония), оснащенный набором флюоресцентных фильтров-блоков. Изображения получали посредством охлаждаемой цифровой видеокамеры ТСС-5.0ICE (Tucsen, Китай). На изображениях гистологических препаратов узлов с помощью программы Image J (NIH, США) определяли площадь сечения нервных клеток и проводили их подсчет. Долю иммунореактивных (ИР) нейронов определяли как их отношение к общему числу выявленных нейронов, которое принимали за 100%. Для характеристики нейронов узлов использовали их деление на 5 размерных классов по площади сечения: 300 мкм<sup>2</sup> и менее (очень малые), 301–600 (малые), 601–900 (средние), 901–1200 (крупные) и 1201 мкм<sup>2</sup> и более (очень крупные). Анализу подлежали нервные клетки, срез которых прошел через ядро с видимым ядрышком с флюоресценцией, превышающей фоновое свечение. Математическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica, версия 10 (StatSoft, Inc., 2011). Статистический анализ включал определение средней арифметической и ее стандартной ошибки. О значимости различий судили по величине t-критерия Стьюдента и считали их достоверными при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ЧУГН выявляются нейроны, содержащие, как правило, один из маркеров во все исследуемые возрасты крысы: TRPV1, SP, CGRP, NF200 и СВ. Подсчет показал, что у трехдневного крысенка большая часть ИР нервных клеток узла принадлежит популяции СВ-ИР нейронов ( $37,4 \pm 1,1\%$ ), а меньшая — SP-ИР нейронам ( $9,5 \pm 0,8\%$ ), чуть больше — CGRP-ИР нейронам ( $12,8 \pm 0,6\%$ ). Популяции TRPV1-ИР и NF200-ИР нейронов занимают промежуточное положение, их доли практически не отличаются и составляют  $22,6 \pm 0,8\%$

и  $20,6 \pm 1,4\%$  соответственно. К 90-дневному возрасту крыс соотношение некоторых популяций меняется. Но самой многочисленной является популяция нейронов, содержащая TRPV1 ( $41,3 \pm 2,7\%$ ), а самой малочисленной — содержащая SP ( $6,5 \pm 0,4\%$ ). Популяции нейронов с CGRP и NF200 увеличиваются до  $26,3 \pm 1,5\%$  и  $29,0 \pm 1,8\%$  соответственно. Обособленно изменяется доля нейронов популяции, содержащей СВ, которая к 90-дневному возрасту крысы характеризуется уменьшением до  $26,0 \pm 3,1\%$ .

Содержание TRPV1-ИР клеток с возрастом животного увеличивается, максимальное повышение доли ИР нейронов отмечается с 10-дневного возраста ( $30,0 \pm 1,8\%$ ) до 20-дневного возраста ( $42,3 \pm 2,7\%$ ) ( $P < 0,05$ ), а в 90-дневном возрасте показатель значимо не отличается от такового в 20-дневном возрасте. Количество нейронов, содержащих SP, уменьшается: в 10-дневном возрасте снижение составляет 1,5 раза, после чего процент позитивных нейронов не меняется до 90-дневного возраста крысы. При этом максимальное количество SP-ИР нейронов отмечается в трехдневном возрасте. Результаты проведенного исследования показали, что лишь небольшая часть нейронов ЧУГН у крыс содержит SP и значительная часть нейронов узла (чуть менее 50%) содержит TRPV1, что соответствует данным других исследований, полученных на взрослых животных [7].

Относительное содержание CGRP-ИР нейронов к 10-дневному возрасту увеличивается до  $29,2 \pm 1,5\%$ , затем незначительно снижается к 20-дневному возрасту и остается таким же до 90-дневного возраста крысы. Показано, что только небольшая часть нейронов чувствительного узла грудного нерва содержит CGRP, но в части работ показана их большая выявляемость — до 40–50% [4].

Подсчет NF200-ИР нейронов показал, что в 10-дневном возрасте относительное содержание нейронов уменьшается в 1,5 раза по сравнению с трехдневным возрастом и становится минимальным. А в 30-дневном возрасте доля NF200-ИР нейронов увеличивается в 1,5 раза (по отношению к трехдневному возрасту) и становится максимальной, оставаясь на этих значениях до 90-дневного возраста.

В постнатальном развитии количество нейронов, содержащих СВ, уменьшается в сравнении с предыдущим возрастом крысы: в 10-дневном возрасте снижение составляет 8,8%, в 20-дневном возрасте — 9,7%, в

30-дневном возрасте — 8,4%, в 60-дневном возрасте — 6,7%, после чего процент ИР нейронов не меняется до 90-дневного возраста крысы. Таким образом, у взрослой крысы до 30% нейронов в узлах образуют популяцию, содержащую СВ, что совпадает с данными других исследований [6].

Анализ размеров ИР популяций нейронов у крысы показал, что в трехдневном возрасте крысы самые малые средние размеры имеют популяции нейронов, содержащих TRPV1 и SP, наибольшие средние размеры имеют нейроны ИР к NF200, промежуточные размеры — популяции нейронов с СВ и CGRP. К 90-дневному возрасту крысы соотношение средних размерных показателей некоторых популяций меняется. По-прежнему очень малые средние размеры имеет популяция нейронов, содержащих SP, их размер не превышает 300 мкм<sup>2</sup>. А самые большие средние размеры имеет популяция нейронов ИР к NF200, их площадь аналогична размерам крупных нейронов. Большая часть популяций представляет группу нейронов, имеющих малые размеры (до 600 мкм<sup>2</sup>), в которую входят нейроны с TRPV1, SP, CGRP и СВ.

Анализ клеточного состава TRPV1-ИР нейронов показал, что до 30-дневного возраста крысы более 50% клеток имеют очень малые размеры. В возрасте 60 и 90 дней жизни более 50% клеток принадлежат к классу клеток малых размеров. В популяции ИР нейронов к SP во все исследуемые возраста более половины клеток имеют очень малые размеры. При этом, в течение всего периода наблюдения, популяции нейронов с TRPV1 и SP были представлены только двумя размерными классами: очень малые и малые.

Нейроны, содержащие CGRP, имеют очень малые и малые размеры только у трехдневных крысят. До 30-дневного возраста популяция CGRP-ИР нейронов состоит из клеток очень малых, малых и средних размеров, но малые нейроны составляют более 50% только до 20-дневного возраста, что сохраняется до 90-дневного возраста крысы, что соответствует данным других исследований [9]. Процент нейронов средних размеров нарастает с возрастом, а в 60-дневном возрасте добавляется класс крупных нейронов (5,3 ± 0,7%), которых в 90-дневном возрасте становится значительно больше (15,3 ± 0,7%). В этом же возрасте появляются единичные нейроны очень крупных размеров.

Нейроны, содержащие NF200, до 10-дневного возраста относятся к трем размерным

классам — очень малые, малые и средние. При этом в возрасте трех дней жизни более 50% клеток принадлежат к классу очень малых нейронов, а в возрасте 10 дней жизни более 50% — к классу нейронов малых размеров. В 20-дневном возрасте в узле присутствуют NF200-ИР нейроны всех размерных классов. Преобладающим становится класс средних размеров (более 50%). С 30-дневного возраста и в последующие возрастные периоды жизни крысы отсутствуют нейроны очень малых размеров, происходит возрастное укрупнение нейронов, которое проявляется увеличением доли нейронов крупных и очень крупных размеров. В 90-дневном возрасте треть всех нейронов ЧУГН содержит NF200, в популяции которых преобладающими являются очень крупные размеры нейронов (более 50%), что согласуется с другими исследованиями [8].

Анализ клеточного состава СВ-ИР нейронов показал, что в возрасте 3 и 10 дней жизни более 40% клеток имеют очень малые размеры, а в возрасте 20 дней жизни более 40% клеток принадлежат к классу нейронов малых размеров. В 30-дневном возрасте появляются немногочисленные нейроны крупных размеров (2,1 ± 0,2%), а в 60-дневном возрасте — очень крупных размеров (3,0 ± 0,3%). В возрасте 90 дней жизни более 60% СВ-ИР нейронов имеют малые размеры, класс нейронов крупных и очень крупных размеров не превышает 5%. Размеры СВ-ИР нейронов спинномозговых узлов связывают с выполняемой ими ноцицептивной функцией, о чем свидетельствует присутствие СВ в мелких пептидергических и TRPV1 нейронах [5].

На срезе ЧУГН ИР нейроны располагаются, как правило, клеточными группами. Одиночные клетки присутствуют, но являются редкими. Во все исследуемые возраста крысы популяции ИР нейронов в большинстве своем формируют групповые клеточные скопления. Нейрональные кластеры объединяют ИР нейроны различных размеров, в состав которых входит от 2–3 до 8–10 клеток. Исследование узлов иммуногистохимическими методами позволяет заключить, что проявляется четкая группировка ИР нейронов на ограниченной территории среза узла, свидетельствующая о кластерной организации не только нейронов симпатических и интрамуральных узлов [2, 3], но и нейронов спинномозговых узлов. Кластерный принцип топографии нейронов в узлах отмечался и ранее. Так, показана кластерная локализация нейронов в шейно-грудном

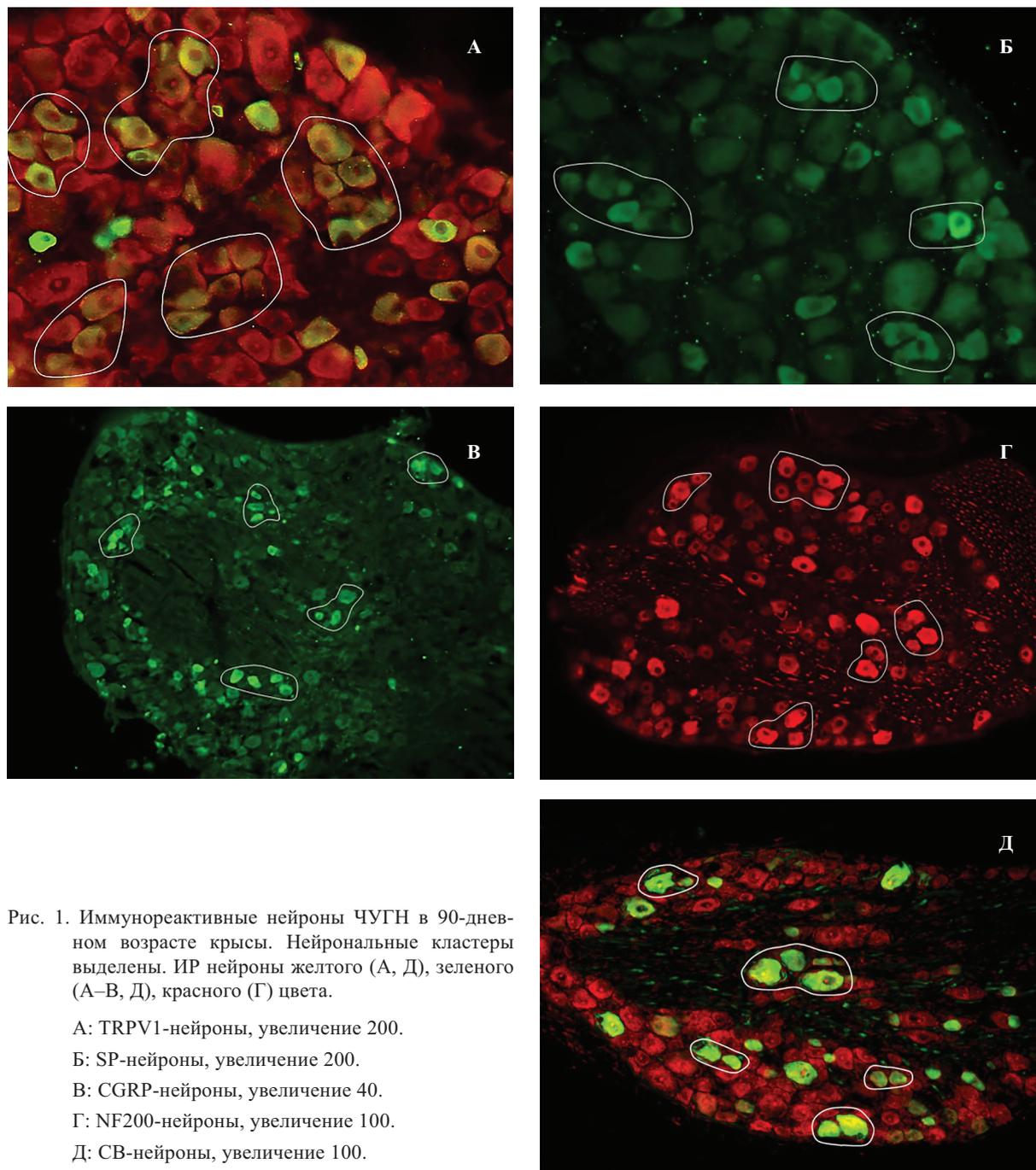


Рис. 1. Иммунореактивные нейроны ЧУГН в 90-дневном возрасте крысы. Нейрональные кластеры выделены. ИР нейроны желтого (А, Д), зеленого (А–В, Д), красного (Г) цвета.

А: TRPV1-нейроны, увеличение 200.

Б: SP-нейроны, увеличение 200.

В: CGRP-нейроны, увеличение 40.

Г: NF200-нейроны, увеличение 100.

Д: СВ-нейроны, увеличение 100.

узле различных животных, включая человека [1, 2], а исследования по локализации нейрорепептидов в паравертебральных, превертебральных и чувствительных узлах также свидетельствуют о кластерном характере топографии нейронов [10].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ нейрохимических особенностей популяций нейронов чувствительного узла грудного спинномозгового нерва позволяет

подтвердить гипотезу о гетерогенности чувствительных узлов, а анализ их топографических особенностей позволяет подтвердить гипотезу о кластерном типе организации нейронов чувствительных узлов. Кластеры формируются по принципу разнородности: по нейрохимической организации, по размеру — от очень мелких до очень крупных нейронов. Большинство сенсорных нейронов являются модально-специфичными в физиологических условиях, но эта специфичность нарушается при различных патологических процессах.

Очевидно, неизученное до настоящего времени совмещение в одной клетке различных веществ обуславливает их полимодальную рецептивность. С позиций функциональной морфологии гетерогенный состав кластеров может служить иллюстрацией надежности биологической системы, обладающей максимальной степенью свободы изменения своего состояния.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ноздрачев А.Д., Фатеев М.М. Морфология звездчатого ганглия. Нейронная организация звездчатого ганглия. В кн.: Звездчатый ганглий. Структура и функция. СПб.: Наука; 2002: 12–73.
2. Порсева В.В., Шилкин В.В. Морфометрическая и гистохимическая характеристика кластерной организации нейронов чувствительного узла спинномозгового нерва и шейно-грудного узла симпатического ствола крысы. Морфология. 2011; 139(2): 27–30.
3. Чусовитина С.В., Варакин А.А. Нитроксидагическая иннервация пищеварительного тракта японского анчоуса. Морфология. 2003; 123(3): 50–3.
4. Aoki Y., Ohtori S., Takahashi K., Ino H., Douya H., Ozawa T., Saito T., Moriya H. Expression and co-expression of VR1, CGRP, and IB4-binding glycoprotein in dorsal root ganglion neurons in rats: differences between the disc afferents and the cutaneous afferents. Spine. 2005; 30: 1496–1500.
5. Ichikawa H., Sugimoto T. Co-expression of VRL-1 and calbindin D-28k in the rat sensory ganglia. Brain Res. 2002; 924(1): 109–12.
6. Li H.Y., Say E.H., Zhou X.F. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. Stem Cells. 2007; 25: 2053–65.
7. Ma C., LaMotte R.H. Enhanced excitability of dissociated primary sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion in the rat. Pain. 2005; 113(1–2): 106–12.
8. Russo D., Clavenzani P., Mazzoni M., Chiochetti R., Di Guardo G., Lalatta-Costerbosa G. Immunohistochemical characterization of TH13-L2 spinal ganglia neurons in sheep. Microsc. Res. Techn. 2010; 73(2): 128–39.
9. Xu P., Van Slambrouck C., Berti-Mattera L., Hall A.K. Activin induces tactile allodynia and increases calcitonin gene-related peptide after peripheral inflammation. Neurosci. 2005; 25: 9227–35.
10. Zhou X.F., Cameron D., Rush R.A. Endogenous neurotrophin-3 supports the survival of a subpopulation of sensory neurons in neonatal rat. Neurosci. 1998; 86(4): 1155–64.

#### REFERENCES

1. Nozdrachev A.D., Fateyev M.M. Morfologiya zvezdchatogo gangliya. Neyronnaya organizatsiya zvezdchatogo gangliya. [Neural organization of the stellate ganglion]. V kn.: Zvezdchaty gangliy. Struktura i funktsiya. St.-Petersburg: Nauka; 2002: 12–73. (In Russian).
2. Porseva V.V., Shilkin V.V. Morfometricheskaya i gistokhimicheskaya kharakteristika klasternoy organizatsii neyronov chuvstvitel'nogo uzla spinnomozgovogo nerva i sheyno-grudnogo uzla simpaticheskogo stvola krysy. [Morphometric and histochemical characteristics of the cluster organization of neurons of the sensitive node of the spinal nerve and the cervicothoracic node of the sympathetic trunk of the rat]. Morfologiya. 2011; 139(2): 27–30. (In Russian).
3. Chusovitina S.V., Varaksin A.A. Nitroksidergicheskaya innervatsiya pishchevaritel'nogo trakta yaponskogo anchousa. [Nitroxydergic innervation of the digestive tract of Japanese anchovy]. Morfologiya. 2003; 123(3): 50–3. (In Russian).
4. Aoki Y., Ohtori S., Takahashi K., Ino H., Douya H., Ozawa T., Saito T., Moriya H. Expression and co-expression of VR1, CGRP, and IB4-binding glycoprotein in dorsal root ganglion neurons in rats: differences between the disc afferents and the cutaneous afferents. Spine. 2005; 30: 1496–1500.
5. Ichikawa H., Sugimoto T. Co-expression of VRL-1 and calbindin D-28k in the rat sensory ganglia. Brain Res. 2002; 924(1): 109–12.
6. Li H.Y., Say E.H., Zhou X.F. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. Stem Cells. 2007; 25: 2053–65.
7. Ma C., LaMotte R.H. Enhanced excitability of dissociated primary sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion in the rat. Pain. 2005; 113(1–2): 106–12.
8. Russo D., Clavenzani P., Mazzoni M., Chiochetti R., Di Guardo G., Lalatta-Costerbosa G. Immunohistochemical characterization of TH13-L2 spinal ganglia neurons in sheep. Microsc. Res. Techn. 2010; 73(2): 128–39.
9. Xu P., Van Slambrouck C., Berti-Mattera L., Hall A.K. Activin induces tactile allodynia and increases calcitonin gene-related peptide after peripheral inflammation. Neurosci. 2005; 25: 9227–35.
10. Zhou X.F., Cameron D., Rush R.A. Endogenous neurotrophin-3 supports the survival of a subpopulation of sensory neurons in neonatal rat. Neurosci. 1998; 86(4): 1155–64.