

А.В. Мазниченко, В.О. Майський, О.І. Пілявський, О.І. Костюков

Експресія *c-fos* у спинному мозку після електричного подразнення низькопорогових аферентних волокон у складі *n. gastrocnemius-soleus* щура

Специфический паттерн экспрессии гена c-fos в спинальных нейронах люмбо-сакрального отдела спинного мозга регистрировали при 30 мин неболевой стимуляции n. gastrocnemius-Soleus у самцов крыс линии Вистар. Много мелких и крупных Fos-иммунореактивных (Fos-ир) ядер выявлены ипсилатерально главным образом в медиальной и центральной части шейки и основании дорсального рога (слои 5 и 6). Традиционно эти регионы считаются местами окончаний низькопороговых афферентных волокон (группа I). Небольшое количество меченых нейронов было обнаружено в промежуточной зоне серого вещества (слой 7) и около центрального канала (область 10), а также в краевом слое и желатинозной субстанции дорсального рога, т. е. в зоне окончаний высокопороговых мышечных афферентов. После неболевой стимуляции был обнаружен отчётливый паттерн экспрессии c-fos в спинном мозгу, который отличается от паттерна экспрессии c-fos при болевой стимуляции, т. е. подтверждается гипотеза, что паттерн экспрессии c-fos существенно зависит от модальности стимула.

ВСТУП

П.Г. Костюк у першій своїй монографії, присвяченій вивченню двонейронної рефлекторної дуги, писав, що подразнення низькопорогових аферентних волокон від м'язових рецепторів, безперечно, може викликати рефлекторну реакцію за моносинаптичним шляхом [1]. Уже в середині 50-х років ним було висунуто гіпотезу про те, що подразнення м'язових аферентів може призводити до активації також спінальних інтернейронів. Вивчення цієї популяції нейронів було започатковане вченим за допомогою мікроелектродної техніки у співдружності із всесвітньовідомими фізіологами Дж. Еклсом і Р. Шмідтом у м. Канберра в Австралії в 1959–1960 рр. [5, 6].

Нині велику увагу приділяють вивченню проєкцій різних функціональних груп нервових волокон заднього корінця у спинному мозку [3, 14]. Найбільш детально вивчено

інтраспінальні нейрональні ланцюги передачі ноцицептивних сигналів після нанесення хімічних, теплових або механічних подразнень [4, 11, 14]. Виявлено й основні фокуси проєкцій високопорогових м'язових, шкірних, ноцицептивних аферентів від внутрішніх органів, а також стабільні ансамблі ноцицептивних нейронів у сірій речовині спинного мозку. Такі нейрони локалізуються у маргінальному шарі, шийці дорсального рога та навколо центрального каналу [3, 7]. Особливий інтерес приділяють первинним аферентним волокнам великого діаметра (група I), які забезпечують сенсорну іннервацію м'язових рецепторів розслаблення, тобто м'язових веретен, а також сухожилковим рецепторам Гольджи, які відіграють важливу роль у регуляції руху та відчуття положення (пропріоцептивна чутливість). Раніше при вивченні проєкцій шкірних і м'язових аферентів використо-

© А.В. Мазниченко, В.О. Майський, О.І. Пілявський, О.І. Костюков

ували методи претермінальної дегенерації волокон або антероградного аксонного транспорту пероксидази хрому [3]. Але виявити самі спінальні нейрони, які селективно активуються цими аферентами, за допомогою приведених методів неможливо. Нині нейрональну активацію у головному та спинному мозку після больових або інших подразнень можна ефективно вивчати за допомогою імуногістохімічного методу виявлення ядерного Фос-протеїну – продукту активації раннього протоонкогена *c-fos* [7]. Нещодавно ми вже використали цю техніку для вивчення регіонарного розподілу (по пластинах) у сірій речовині поперекових сегментів Фос-імунореактивних (Фос-ір) нейронів при розвитку втоми скелетних м'язів задньої кінцівки щура, тобто після подразнення високопорогових аферентів III та IV групи [17]. Таким чином, реєстрація викликаної експресії протоонкогена *c-fos* відкриває унікальну можливість для розпізнавання популяції спінальних нейронів, які специфічно активуються стимулами певної модальності. Можна припустити, що стійкі патерни експресії *c-fos* у спинному мозку, які створені неноцицептивною стимуляцією, будуть відрізнятися від патернів, викликаних больовими подразненнями.

Метою цієї роботи було виявлення специфічної популяції спінальних нейронів, які активуються низькопороговими пропріоцептивними аферентами групи I.

МЕТОДИКА

Усі експерименти було виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС). В дослідках було використано три групи щурів-самців лінії Вістар масою 350–400 г: 1-ша група – контрольна (інтактна) (n=3); 2-га – контрольна група оперованих щурів без електричної стимуляції нерва (n=4); 3-тя – експериментальна група, де щурам прово-

дили електричну стимуляцію *n. gastrocnemius-soleus* (GS), який іннервує двоголовий м'яз литки правої задньої кінцівки (n=4). Перед операцією щурів анестезували хлоралгідратом („Sigma”, 420 мг/кг внутрішньоочеревинно). Після цього виділяли нерв. Для подразнення використовували срібний хлорований біполярний електрод, через який подавали імпульси прямокутної форми тривалістю 0,2 мс. При подразненні нерва парним стимулом силою струму 0,07 мА відбувалося помітне скорочення м'яза. Ця сила визначалася як порогова для найбільш збудливих низькопорогових (Ia) аферентів волокон у нерві. Потім нерв відокремлювали у місці його входження в м'яз, та подразнювали силою 1,5 порога частотою 25 Гц протягом 30 хв. При такому патерні подразнення відбувалася лише активація низькопорогових м'язових аферентів, оскільки не відмічались помітні зміни середнього значення артеріального тиску та частоти серцевих скорочень. Однак при збільшенні частоти подразнення при тій самій силі струму відбувалися помітні зміни цих гемодинамічних показників, пов'язані з додатковою активацією високопорогових м'язових аферентів.

Перфузія. Через 2 год після закінчення стимуляції нерва тварин під глибоким наркозом (пентобарбітал натрію, 90 мг/кг внутрішньоочеревинно) перфузували інтракардіально через висхідну аорту спочатку сольовим фосфатним буфером (СФБ), який містив 0,2 % нітриту натрію та 25000 од/л гепарину. Далі перфузію продовжували 4%-м параформальдегідом, розчиненим у 0,1 моль/л ФБ (рН 7,3). Спинний мозок швидко виділяли, відокремлювали поперекові та крижові сегменти (L4–L6, S1), які додатково фіксували протягом 12 год. Вибрані сегменти витримували протягом 48 год при +4°C у 30%-му розчині сахарози, приготуваному на ФБ. Фронтальні зрізи спинного мозку (40 мкм завтовшки) збирали у кількості 60–80 від кожного сегмента у чотири

лунки, заповнених холодним СФБ для подальшого імуногістохімічного пофарбування.

Фос-імуногістохімія. Імуногістохімічне виявлення Фос-ір-ядер нейронів проводили за допомогою стандартної авідин-біотин-пероксидазної методики з використанням поліклональних кролячих антитіл, спрямованих проти білка *c-Fos* („Oncogene Research”, Ab-5, США) [8] і комерційного набору (ABC; „Vector”, РК 4001, США). Підрахунок Фос-ір-ядер нейронів проводили під мікроскопом, а їх поширенню локалізацію в сірій речовині визначали за атласом [16]. Мічені Фос-ір-нейрони ідентифікували за інтенсивним темно-коричневим забарвленням їх ядер.

Статистика. Кількість Фос-ір-нейронів підраховували окремо для кожного шару (1–10) на іпси- та контралатеральних боках зрізів мозку. Щоб отримати середню кількість \pm стандартна похибка середнього мічених ядер (позитивних нейронів) використовували близько 15 пофарбованих зрізів з кожного сегмента. Результати статистично обробляли з використанням критерію *t* Стьюдента. Різниця вважалася достовірною при $P < 0,05$ та $P < 0,01$. Можлива помилка подвійного підрахунку одних і тих самих мічених нейронів у сусідніх зрізах коректувалася за допомогою рівняння Аберкромбі [2].

РЕЗУЛЬТАТИ

Нами встановлено, що максимальне збільшення експресії *c-fos* у поперекових та крижових сегментах спинного мозку досягалося через 2 год після електричного подразнення GS, який іннервує двоголовий м'яз литки щура. Вихідний рівень експресії *c-fos* в люмбо-сакральному відділі спинного мозку в 1-й (інтактній) контрольній групі щурів був дуже низьким (менше ніж п'ять Фос-ір-ядер нервових клітин у 40 мкм зрізі). Кількість мічених нейронів у різних шарах поперекового потовщення та верхніх крижових сегментах у середньому стано-

вила 2 і менше клітин на зріз у шарах 1–5. В інших шарах відмічалися поодинокі забарвлені ядра нейронів. У 2-й контрольній групі вихідний рівень експресії *c-fos* в люмбо-сакральному відділі спинного мозку був трохи вищий. Середня кількості ядер мічених нейронів у різних шарах поперекового потовщення L4 – L6 та верхніх крижових сегментах цієї групи щурів становили 1,5 і менше у шарі 1, у шарах 2–4 – близько 0,7, у шарі 5 – 1,3 ядер. У тварин цієї групи додатково виявлялися маркіровані нейрони у шарах 7 та 10, а середня кількість мічених нейронів у цих шарах не перевищувала 2 клітини на зріз. Слід зазначити, що у щурів реєструвалося збільшення середньої кількості мічених нейронів головним чином в іпсилатеральному шарі 1, власному ядрі (шари 3 і 4), а також у шийці дорсального рога (шар 5), особливо у сегментах L4 і L5. Невелику кількість позитивних нейронів також реєстрували на цих рівнях у вентральному розі і навколо центрального каналу (шар 10). Різниця середніх значень кількості маркірованих клітин у сірій речовині попереково-крижового відділу спинного мозку між 1-ю та 2-ю групами щурів була статистично недостовірною ($P > 0,05$).

Після односторонньої стимуляції GS з частотою 25 Гц у тварин 3-ї групи виявилось, що мічені нейрони в кількості від 8 до 12 були розсіяні іпсилатерально у L4, L5 та S1 головним чином у шийці дорсального рога (шар 5 і 6). Необхідно відзначити, що на іпсилатеральному боці позитивні нейрони (3–6 Фос-ір-ядер на зріз) реєстрували також у поверхневих шарах дорсального рога цих сегментів. На рис. 1 і 2 показано приклади зрізів з виявленими на них міченими клітинами у сірій речовині після 30-хвилинного подразнення GS. Зображення з малим збільшенням (див. рис. 1, а, г і 2, а, г) дають загальне уявлення про розподіл Фос-ір-ядер на іпсилатеральному боці даних сегментів. Великі скупчення мічених нейронів спостерігаються у шийці дорсального

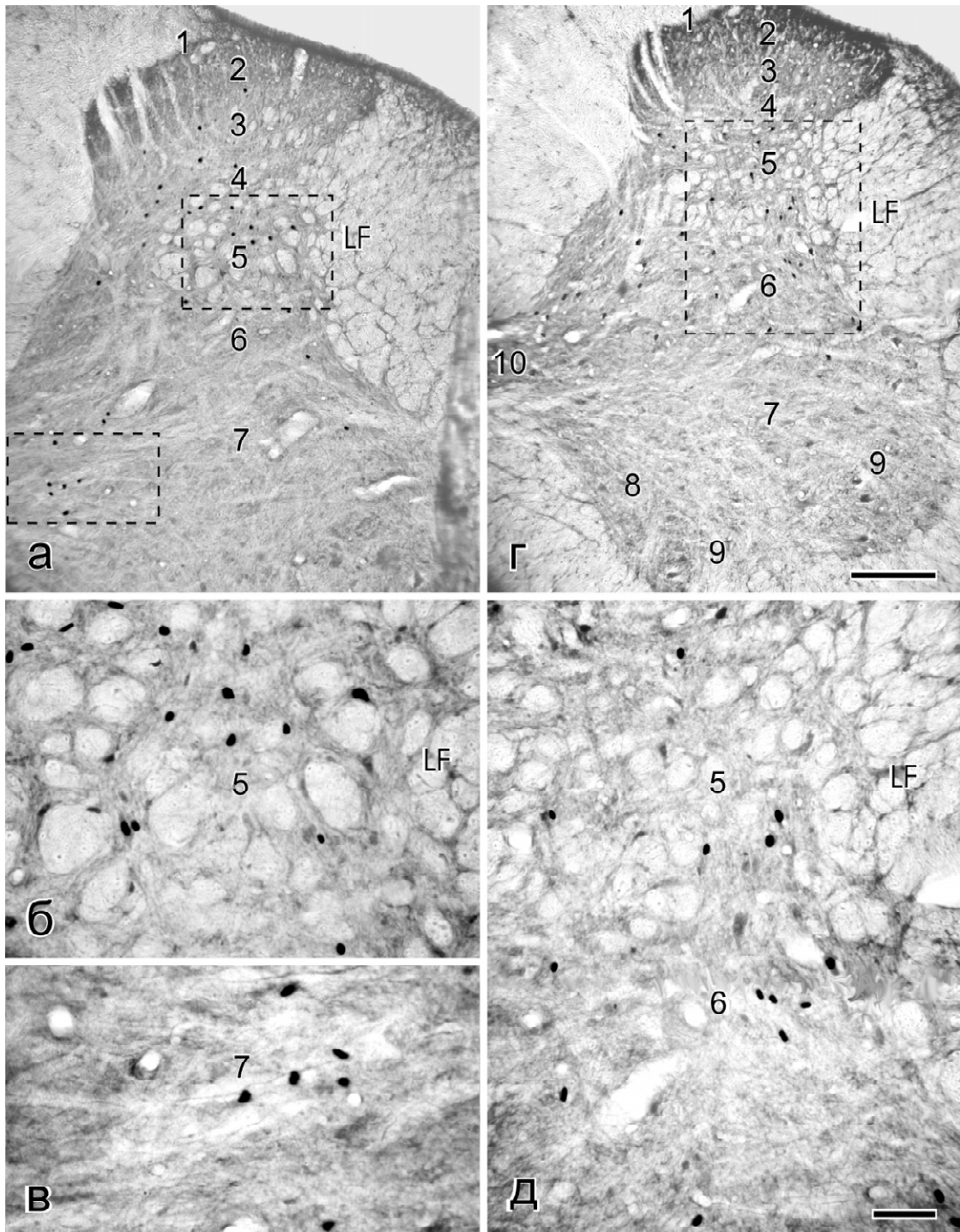


Рис. 1. Фос-імунореактивні нейрони на зрізах спинного мозку щура: а – розподіл позитивних клітин у шарах (1–7) сірої речовини 4-го поперекового сегмента (L4); б, в – нейрони у шарах 5 і 7 при великому збільшенні (зона розташування нейронів позначена пунктирною лінією); г – розподіл позитивних клітин у шарах (1–10) сірої речовини 5-го поперекового сегмента (L5); д – нейрони в шарах 5 і 6 при великому збільшенні. LF – латеральний канатик білої речовини. Масштабна лінія на а та г – 200 мкм, на б, в, д – 50 мкм

рога та у проміжній зоні, ближче до шару 10 (див. рис. 1,а). На зображеннях з великим збільшенням ці скупчення ядер можна побачити більш детально (див. рис. 1,б,в, д та 2, б, в, д). Видно, що Фос-імунореактивність була слабо виражена в поверхневих шарах 1 і 2 і верхній частині власного

ядра (шар 3) та у вентральному розі (медіальна та латеральна частини шару 7, шари 8 та 9) (див. рис. 1,а,г). На мікрофотографіях чітко виділяються великі та малі імунореактивні ядра. Група великих ядер (близько 10 мкм) відповідає великим нейронам, а група малих ядер (близько 6

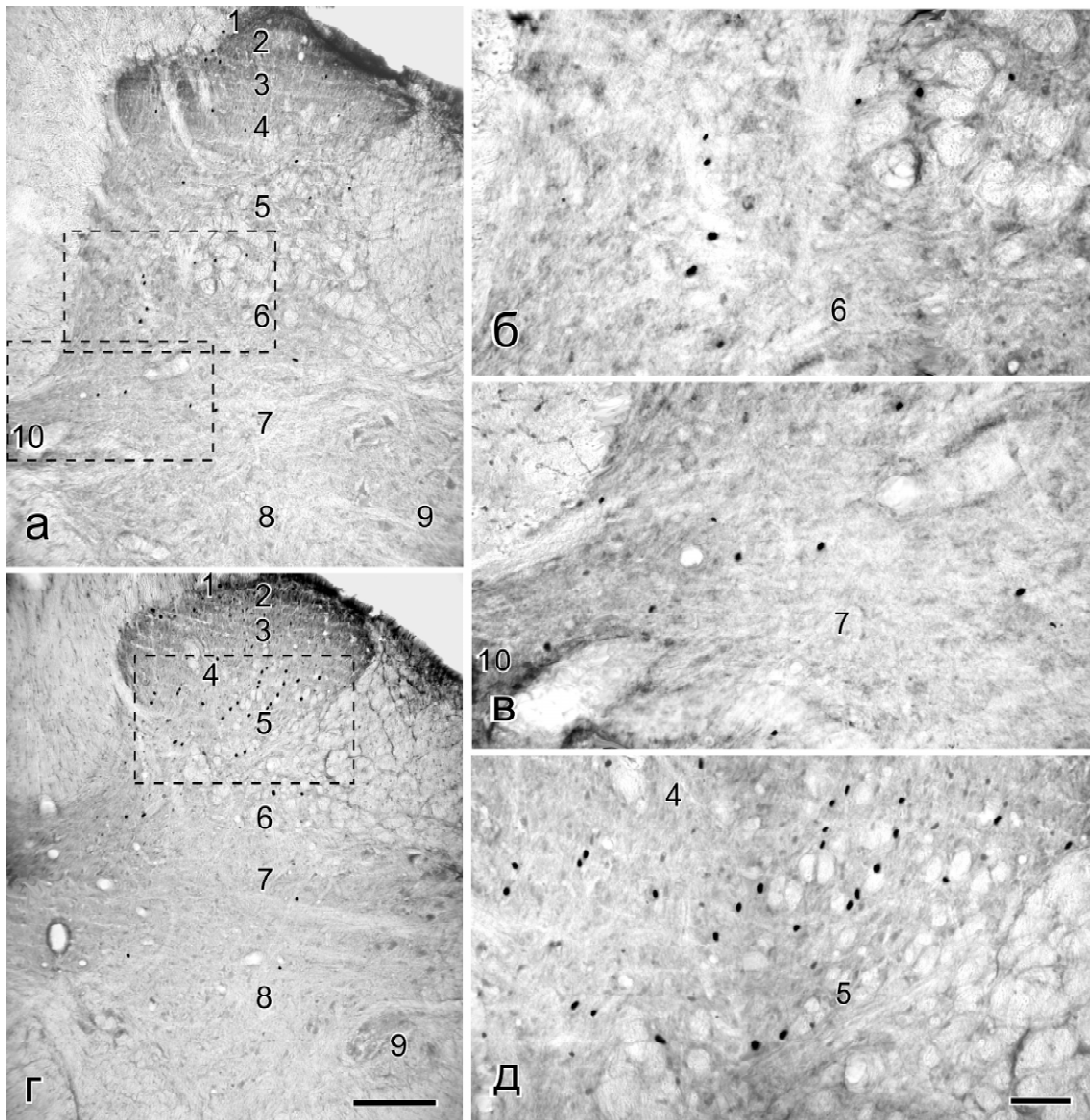


Рис. 2. Фос-імунореактивні нейрони на зрізах спинного мозку щура: а – розподіл позитивних клітин у шарах (1–10) сірої речовини 6-го поперекового сегмента (L6); б, в – нейрони у шарах 6, 7 і 10 при великому збільшенні (зона розташування нейронів позначена пунктирною лінією); г – розподіл позитивних клітин у шарах (1–9) сірої речовини 1-го крижового сегмента (S1); д – нейрони в шарах 4 і 5 при великому збільшенні. Інші позначення див. рис. 1

мкм) – малим нервовим клітинам. Відзначимо також, що у наших експериментах стимуляція низькопорогових спінальних аферентів групи І не призводить до помітної експресії *c-fos* у клітинах глії.

На рис. 3 показано розподіл мічених ядер нейронів на іпси- та латеральному боці сегментів L4–L6 та S1 після прямого подразнення нерва. Розподіл Фос-ір-клітин був помітно асиметричним. На іпсилатеральному боці сегментів порівняно з контралатеральним спостерігається набагато більше маркірованих клітин у кожному шарі. Переважна більшість мічених нейронів у вказаних сегментах локалізувалася у шийці дорсального рога. Розподіл мічених клітин на іпсилатеральному боці разом у шарах 5 та 6 сегментів L4–L6 та S1

становив 41, 38, 35 та 32 % від загальної кількості маркірованих нейронів відповідно. Кількість мічених нейронів у шарі 7 цих самих сегментів була 10, 11 та 4 і 5 % відповідно. Характерні патерни загального розподілу мічених клітин показано на рис. 4 на схемах окремих зрізів визначених сегментів відповідно до атласу мозку щура [16]. Видно, що основна кількість маркірованих нейронів знаходиться у шийці дорсального рога, невелика кількість – у поверхневих шарах 1 і 2, власному ядрі (шари 3 та 4) та навколо центрального каналу. Поодинокі маркіровані клітини також виявляють у проміжній зоні сірої речовини, ближче до центрального каналу, медіальній частині вентрального рога (шар 8), а також у моторних ядрах (шар 9).

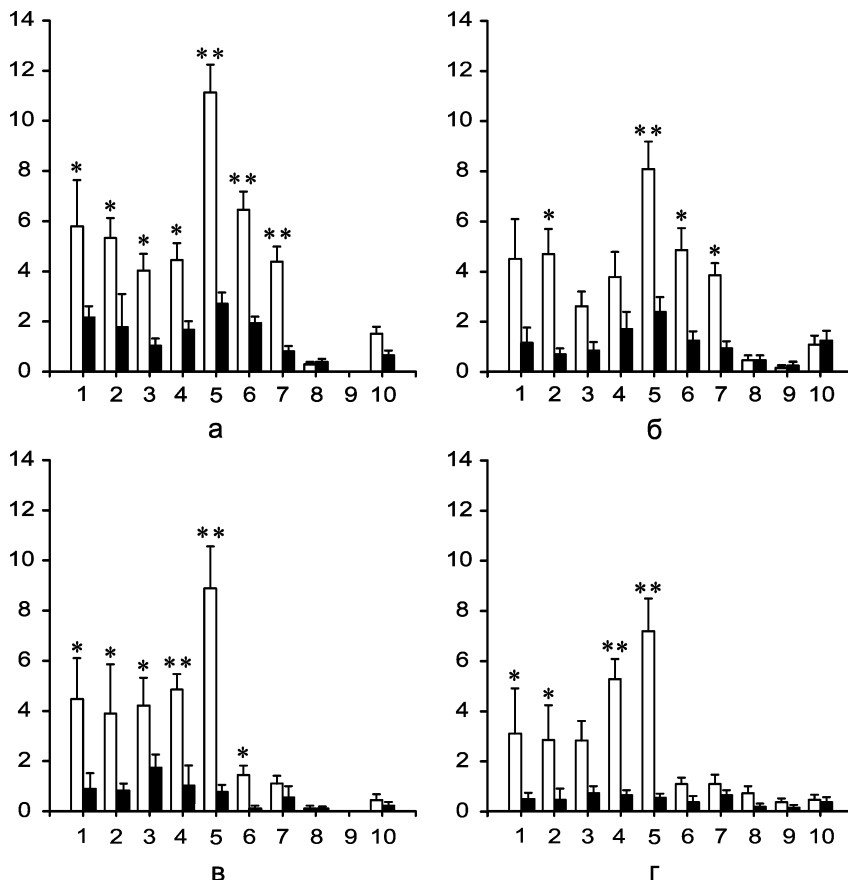


Рис. 3. Кількісний аналіз розподілу Фос-імунореактивних нейронів на зріз у шарах сірої речовини (1–10) різних сегментів. Світлі стовпчики – іпсилатеральні, темні стовпчики – контралатеральні боки сегментів: а – L4, б – L5, в – L6, г – S1. Указано середню кількість мічених нейронів ± стандарта похибна середнього. * P < 0,05, ** P < 0,01

ОБГОВОРЕННЯ

Результати нашої роботи показують, що одностороннє електричне подразнення аферентних волокон групи I у складі GS, дає специфічний патерн розподілу Фос-ір-нейронів у попереково-крижовому відділі спинного мозку. Слід зазначити, що мічені клітини концентрувалися головним чином іпсилатерально в регіонах, традиційно пов'язаних із зонами закінчень проєкцій низькопорогових аферентів, які передають невелику інформацію [3]. Це шийка (шар 5) та основа дорсального рога (шар 6). Крім того, у дорсальному розі мічені нейрони також виявлені у нижній частині желатинозної субстанції (шар 2i), менша кількість таких нейронів локалізувалася у центральній частині власного ядра (шари 3 і 4). При довготривалій стимуляції пропріоцептивних волокон (групи Ia та Ib) ми виявили незначну Фос-імунореактивність також у маргінальній зоні (шар 1) і верхній частині

желатинозної субстанції (шар 2o), тобто в зоні закінчень ноцицептивних аферентів (див. рис. 4). Фос-імунореактивність виявлялась у шарах 1 і 2 також у групі прооперованих тварин без електричної стимуляції GS. Необхідно відмітити відсутність Фос-імунореактивності у місцях локалізації спінальних мотонейронів (шар 9). Раніше було показано [9], що у шурів після тривалого бігу по тредбану (без розвитку втоми м'язів задніх кінцівок) Фос-ір-нейрони виявляються не тільки у медіальній частині шийки та основі дорсального рога, а й у проміжній зоні та моторних ядрах (шари 7 і 9). Такі розбіжності у патернах *c-fos* експресії у люмбальному відділі спинного мозку в наших дослідах та у випадку, коли тварини вільно рухаються тривалий час по тредбану, можливо пов'язані з операцією, яка вносить больову імпульсацію до спинного мозку, а також наркозом, що знижує загальну Фос-імунореактивність, особливо у моторних ядрах [15]. Як і при електричній

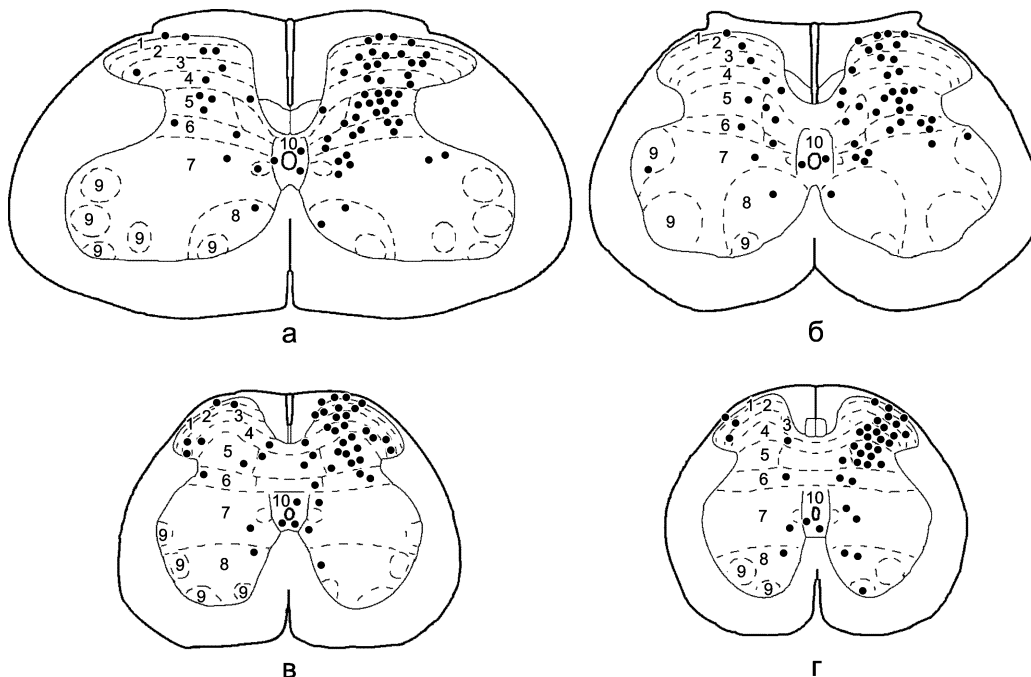


Рис. 4. Характерні патерни розподілу Фос-імунореактивних нейронів (великі крапки) на зрізах поперекових (L4–L6) і крижового (S1) сегментів спинного мозку шура при односторонньому подразненні (праворуч) м'язових низькопорогових аферентів групи Ia *n. Gastrocnemius-Soleus*: а – L4, б – L5, в – L6, г – S1

стимуляції низькопорогових аферентів групи I у щурів, у наших дослідах, так і при тривалому бігу щурів по тредбану [9], Fos-ір-нейронів у латеральній частині шийки (ретикулярна її зона) не було виявлено. Як відомо [3, 4, 7, 10, 11, 13, 17], ця зона є місцем закінчень як м'язових, так і шкірних ноцицептивних аферентів (групи III і IV).

Раніше були використані різні підходи (електрофізіологічний, морфологічний, антеградний транспорт пероксидази хрому), щоб диференціювати проєкції аферентів, які йдуть у складі GS від м'язових веретен (Ia), від таких, що проходять від сухожильних рецепторів Гольджи (Ib). Явна різниця між цими аферентами пояснюється характером їх траєкторій. Так, волокна підгрупи Ia мають колатералі у шийку, основу дорсального рога (шари 4–6) та зону моторних ядер (шар 9), а волокна підгрупи Ib мають колатералі, які розповсюджуються тільки у шийці та основі дорсального рога [3, 14]. Аналіз ламінарного розподілу експресії *c-fos* при подразненні аферентів групи I у наших експериментах та літературні дані [1] дозволяють зробити висновок про те, що впливи від аферентів вказаної групи одержують Ia популяції інтернейронів, які розташовані здебільшого у глибоких шарах сірої речовини спинного мозку. Можна вважати, що такий тип нейронів відноситься до збуджувального типу спінальних інтернейронів, які входять до складу внутрішньосегментарних шляхів. Слід зазначити, що в місцях локалізації гальмівних інтернейронів (верхні шари дорсального рога та проміжна зона [12, 18]) Fos-імунореактивність була слабо виражена.

Таким чином, використавши найбільш сучасну техніку визначення раннього прото-онкогена *c-fos*, нам вдалося виявити стійкий патерн ламінарного розподілу спінальних інтернейронів, що активуються при подразненні м'язових аферентів групи I. Цей патерн суттєво відрізняється від патерну експресії *c-fos* при подразненні ноци-

цептивних аферентів, закінчення яких виявляються головним чином у маргінальній зоні та желатинозній субстанції дорсального рога спинного мозку.

Робота виконана за підтримки гранту INTAS 01-2130, гранту ДФФД № 05.07/00065 Міністерства освіти та науки, гранту „Молекулярні основи функціонування геному” НАН України.

A.V. Maznychenko, V.A. Maisky, A.I. Pilyavskii, A.I. Kostyukov

EXPRESSION OF *C-FOS* IN THE SPINAL CORD AFTER ELECTRICAL STIMULATION OF THE LOW-THRESHOLD AFFERENT FIBRES *N. GASTROCNEMIUS-SOLEUS* OF THE RAT

The specific pattern of *c-fos* gene expression was evaluated within the lumbo-sacral spinal cord during 30 min non-noxious stimulation *n. gastrocnemius-soleus* of male Wistar rats. A lot of small and large Fos-immunoreactive (Fos-ir) nuclei were located ipsilaterally, mainly in the middle of the neck and base of the dorsal horn (layers 5 and 6). Traditionally, these layers are considered to be the region of termination of the low-threshold afferent fibers. A few Fos-ir neurons were recorded in the intermediate zone (layer 7) and the area around central canal (layer 10). The scarce labeled cells were also revealed within the marginal zone and substantia gelatinosa of the dorsal horn, i. e. the zones of termination of the high-threshold muscle afferents. In conclusion, the revealed pattern of *c-fos* expression in the spinal cord following non-noxious stimulation differs from that induced by noxious stimulation. Thus, the pattern of *c-fos* expression in the spinal cord is dependent on the stimulus modality.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Костюк П.Г. Двухнейронная рефлекторная дуга. – М.: Медгиз, 1959. – 256 с.
2. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome section // *Anat. Res.* – 1946. – **94**. – P. 239–247.
3. Brown A.G. Organization of the Spinal Cord. The Anatomy and Physiology of Identified Neurons. – New York: Springer, 1981. – 238 p.
4. Buritova J., Honore P., Chapman V., Besson J.-M. Carrageenan oedema and spinal Fos-LI neurons are reduced by piroxicam in the rat // *Neuroreport.* – 1995. – **6**. – P. 1257–1262.
5. Eccles J.C., Kostyuk P.G., Schmidt R.F. Central pathways responsible for depolarization of primary afferent fibres // *J. Physiol. (Lond.)* – 1962. – **161**. – P. 237–257.

6. Eccles J.C., Kostyuk P.G., Schmidt R.F. The effect of electric polarization of the spinal cord on central afferent fibres and on their excitatory synaptic action // *Ibid.* – **162**. – P. 138–150.
7. Herdegen T., Rudiger S., Mayer B. et al. Expression of nitric oxide synthase and colocalization with Jun, Fos and Krox transcription factors in spinal cord neurons following noxious stimulation of the rat hindpaw // *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* – 1994. – **22**. – P. 245–258.
8. Hsu S.-M., Raine L., Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures // *J. Histochem. Cytochem.* – 1981. – **29**. – P. 577–580.
9. Jasmin L., Gogas K.R., Ahlgren S.C. et al. Walking evokes a distinctive pattern of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem and spinal cord of the rat // *Neurosci.* – 1994. – **58**, №2. – P. 27–286.
10. Kalueff A.V., Maisky V.A., Pilyavskii A.I., Makarchuk N.E. Persistent *c-fos* expression and NADPH-d reactivity in the medulla and the lumbar spinal cord in rat with short-term peripheral anosmia // *Neurosci. Lett.* – 2001. – **301**. – P. 13–134.
11. Lima D., Avelino A. Spinal expression is differentially induced by brief and persistent noxious stimulation // *Neuroreport.* – 1994. – **5**. – P. 1853–1856.
12. McLaughlin B.J., Barber R., Saito K. et al. Immunocytochemical localization of glutamate decarboxylase in rat spinal cord // *J. Comp. Neurol.* – 1975. – **164**. – P. 305–322.
13. Menetrey D., Gannon A., Levine J.D., Basbaum A.I. Expression of *c-fos* protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular and visceral stimulation // *Ibid.* – 1989. – **285**. – P. 177–195.
14. Mense S., Craig A.D., Jr. Spinal and supraspinal terminations of primary afferent fibers from the gastrocnemius-soleus muscle in the cat // *Neurosci.* – 1988. – **26**, №3. – P. 1023–1035.
15. Molander C., Hongpaisan J., Grant G. Changing pattern of *c-fos* expression in spinal cord neurons after electrical stimulation of the chronically injured sciatic nerve in the rat // *Ibid.* – 1992. – **50**, №1. – P. 223–236.
16. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* – San Diego: Acad. Press. – 1997.
17. Pilyavskii A.I., Maisky V.A., Kalezic I. et al. *c-fos* expression and NADPH-diaphorase reactivity in spinal neurons after fatiguing stimulation of hindlimb muscles in the rat // *Brain. Res.* – 2001. – **923**. – P. 91–102.
18. Todd A.J., Spice R.C., Brodbelt A.R. et al. Some inhibitory neurons in spinal cord develop *c-fos* immunoreactivity after noxious stimulation // *Neurosci.* – 1994. – **63**. – P. 805–816.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 18.03.2004*