

А.В. Мазниченко

## Вплив м'язового болю на експресію *c-fos* і НАДФН-діафоруазну активність у спинному мозку

*Изучали ламинарное распределение Фос-иммунореактивных (Фос-ир) и НАДФН-д-реактивных нейронов в шейном и поясничном отделах спинного мозга после односторонних (справа) инъекций капсаицина (5 мг/мл) в мышцы шеи (mm. trapezius, splenius) кошек (n = 6), анестезированных  $\alpha$ -хлоралозой. По сравнению с контрольной группой животных (n = 2), которым были сделаны внутримышечные инъекции изотонического физиологического раствора, у животных экспериментальной группы через 2 ч после инъекций капсаицина (болевое раздражение), отмечалось существенное ипсилатеральное увеличение экспрессии *c-fos* на всём протяжении шейного (C1–C8) и билатеральное – поясничного отдела (L1–L7), с преобладающим количеством Фос-ир-нейронов в сегментах C1–C4 и L3–L6. Экспрессия *c-fos* в шейном отделе была в три раза выше по сравнению с поясничным отделом спинного мозга. Болевое раздражение мышц шеи приводило к экспрессии *c-fos* в крупных и малых клетках в пределах пластины I, шейки дорсального рога (пластина V), а также медиальной части промежуточной зоны (пластина VII). В пластинках I–X шейных сегментов локализованы нейроны, которые являются источниками длинных прямых и перекрёстных нисходящих propriospinalных путей к конечным премоторным нейронам поясничных сегментов спинного мозга. Основные фокусы локализации НАДФН-д-реактивных нейронов обнаружены в маргинальной зоне (пластины I и II) и медиальной части промежуточной зоны (пластина VII). Фос-ир-нейроны были перемешаны с НАДФН-д-реактивными клетками в пределах маргинальной зоны, шейки дорсального рога и медиальной части промежуточной зоны, однако двойное мечение спинальных нейронов не регистрировали. Эти результаты дают основание предполагать, что инициация экспрессии *c-fos* в шейных и поясничных отделах существенно зависит от активности ванилоидных рецепторов мышц шеи. Полученные результаты дают основание предполагать, что спино-церебро-спинальные и длинные propriospinalные пути могут быть анатомическим субстратом для обеспечения интерсегментарной передачи ноцицептивных сигналов от шейных мышц к поясничным сегментам.*

### ВСТУП

Важливим питанням в галузі фізіології болю є дослідження механізмів формування скелетно-м'язового болю та запалення. Велику увагу приділяють дослідженню їх впливу на рух та вивченню розподілу провідних шляхів і клітин, активованих у результаті больових подразнень м'язів [11, 22]. Багато експериментальних моделей на тваринах було використано для дослідження цього питання. Внутрішньом'язові ін'єкції речовин, що спричиняють біль, особливо

капсаїцин, стали загальним підходом для вивчення механізмів болю. Капсаїцин (8-метил-ваніліл-6-ноненамід) – головний їдкий інгредієнт гіркового перцю, широко застосовується при вивченні запалення та гіперальгезії в хімічних моделях болю [2, 45]. Відомо, що капсаїцин активує специфічні ванилоїдні (VR1) рецептори, що беруть участь у передачі больових хімічних та термічних стимулів. Ці рецептори були нещодавно ідентифіковані як надзвичайно специфічні мішені для таких стимулів [9, 10, 31]. Периферичні закінчення капсаїцинчут-

© А.В. Мазниченко

ливих первинних нейронів – це місця вивільнення різноманітних речовин, які сприяють [17] та ініціюють каскад нейрогенного м'язового запалення [46]. До того ж відомо, що активація високопорогових м'язових аферентів залучається до модуляції мотонейронного виходу при розвитку стомлення скелетних м'язів [33, 35]. Хоча, за існуючими даними, є припущення, що пропріоспинальні шляхи залучені до міжсегментарного розповсюдження ноцицептивних сигналів, однак роль капсаїцинчутливих аферентів у розвитку міжсегментарних рефлексів все ще недостатньо вивчена [47]. Останнім часом найбільш передовими методами досліджень у цьому напрямку є визначення нейронів, що містять синтазу оксиду азоту (NO-синтазу або NOS) та/або експресують ранній протоонкоген *c-fos* у спинному мозку.

Відомо, що нейрональний варіант НАДФН-д відповідає одній із форм NO-синтази [38, 42]. Нині описані три ізоформи NO-синтази, які відповідають за генерацію NO, а саме: нейрональна NOS (nNOS або NOS I), ендотеліальна NOS (eNOS або NOS II), індукована або мікрогліальна NOS (iNOS або NOS III) [12, 25]. Найбільший інтерес викликає нейрональна NO-синтаза, яка виступає маркером змін в експресії пізніх генів під час патологічних змін у периферичних тканинах. NOS необхідна для генерації газоподібної молекули NO, або вільного радикала, який впливає на різні фізіологічні та патофізіологічні функції центральної та периферичної нервової системи [13, 18]. У спинному мозку NO є також важливим вторинним посередником з функцією нейромедіатора, який відрізняється від нейромедіаторів/модуляторів тим, що легко проникає через біологічні мембрани та не має специфічних механізмів вивільнення або захвату. NO не накопичується в синаптичних пухирцях та має непряму дію на специфічні мембранні рецептори. Після синтезу в сомі або від-

ростках нейрона NO дифундує із клітини та впливає на процеси збудження в оточуючих нервових тканинах [1], а також активує цитоплазматичну гуанілатциклазу, яка є каталізатором вторинного посередника циклічного гуанілатмонофосфату в клітинах-мішенях (цГМФ). Цей вторинний посередник може впливати на функції іонних каналів або фосфодіестеразну активність, чи активувати цГМФ-залежну протеїнкіназу, що згодом впливає на діяльність нейрона [3, 6], включаючи активацію транскрипції генів [34].

У дорсальному розі спинного мозку поверхневі шари I і II є зонами закінчень первинних аферентів малого діаметра, які чутливі до больової стимуляції (A $\delta$  і C або група III та IV) та закінчуються на ланцюгах нейронів, що модулюють аферентні входи. Велика кількість цих нейронів ГАМКергічні, а близько третини їх ще й синтезують NO. Аференти малого діаметра (пептидергічні немієлінізовані волокна групи IV) не утворюють синаптичні контакти з ГАМК- або NOS-вмісними нейронами. Багато ГАМКергічних закінчень містять NO-синтазу, але закінчення мієлінізованих волокон малого діаметра (група A $\delta$ ), що утворюють синаптичні контакти на первинних аферентах, не мають NOS [5].

Ген *c-fos*, повна назва якого – ранній клітинний протоонкоген *c-fos*, використовується як маркер нейрональної активності у спинному та головному мозку при температурному, механічному або хімічному подразненні [20]. Його продукт – протеїн c-Fos, який синтезується у нервовій клітині та визначається в її ядрі за допомогою імуногістохімічного методу [19]. Експресія білка починається вже через кілька хвилин і сягає максимуму за 1,5–2 год [30]. Під час больової стимуляції м'язів інформація надходить до ноцицептивних нейронів спинного мозку через первинні аферентні волокна (група III та IV), що закінчуються у сірій речовині спинного мозку, переважно

у шарі I, верхній частині шару II (По), шарі V, основі дорсального рога (шар VI) та зоні навколо центрального каналу [15].

Слід зазначити, що на рівні спинного мозку патологічний м'язовий біль традиційно розглядався як такий, що створюється та підтримується виключно нейронами. Глії (мікроглії та астроцитам) у функціонуванні міжклітинної сигналізації приділялося набагато менше уваги. Проте глія спинного мозку активується у стані болю, створеного такими чинниками, як підшкірне м'язове запалення або нейропатія [43].

Нами було висунуто гіпотезу, що стійка стимуляція ванілоїдних рецепторів капсаїцином у шийних м'язах тварин може викликати зміни в межах шийно-поперекового відділу спинного мозку, а також викликати специфічний стійкий патерн експресії раннього протоонкогена *c-fos* – маркера нейрональної активованої мережі, та довести причетність до цього процесу NO-генеруючих нейронів. Отже, одним із напрямків пояснення процесів, що мають відношення до запалення м'язів та м'язового болю, є вивчення ламінарного розподілу спінальних нейронів, активованих внаслідок больового подразнення.

Мета нашої роботи – визначити ламінарний розподіл Фос-імунореактивних (Фос-ір) та НАДФН-д-реактивних нейронів у шийно-поперековому відділі спинного мозку у відповідь на внутрішньом'язові ін'єкції капсаїцину у дорсальні м'язи шиї тварини.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на котах двох груп різної статі масою 2,5–3,5 кг, анестезированих  $\alpha$ -хлоралозою („Sigma” США, 50 мг/кг внутрішньоочеревинно). Усі експерименти було виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС).

Тваринам 1-ї (контрольної) групи вводили ізотонічний фізіологічний розчин з до-

данням детергента Tween 80. Тваринам 2-ї (експериментальної) групи було зроблено внутрішньом'язові ін'єкції капсаїцину (5 мг/мл, розчиненого в детергенті Tween 80 (7%) і 93-му стерильному розчині, „Sigma” США). Капсаїцин вводили односторонньо (праворуч) тонкою ін'єкційною голкою в ростральну частину трапецієвидного (*trapezius*) та ремінного або трикутного (*splenius*) м'язів (100 мкл розчину в кожний з 10 треків на глибину 0,9 см, в ростро-каудальному напрямку). У кожному треку голку після ін'єкції утримували 3 хв, щоб запобігти витіканню розчину капсаїцину в підшкірну тканину.

*Перфузія.* Через 2 год після ін'єкцій тварини були глибоко анестезовані пентобарбіталом натрію („Sigma” США, 70 мг/кг внутрішньоочеревинно) та перфузовані інтракардіально через висхідну аорту спочатку сольовим фосфатним буфером (СФБ), який містив 0,2 % нітриту натрію та 25000 од/л гепарину, а потім 4%-м параформальдегідом, який розчинювали в 0,1 моль/л ФБ (рН 7,4). На заморожувальному мікромомі з шийних (С1–С8) та поперекових (L1–L7) сегментів спинного мозку було зроблено фронтальні зрізи завтовшки 30 мкм (близько 50–70 зрізів з кожного сегмента). Ці зрізи витримували протягом 48 год при 4°C у 30%-му розчині сахарози, який готували на ФБ, а потім переносили у 15 лунок, заповнених холодним СФБ для подальшого імуногістохімічного та гістохімічного фарбування.

*Імуногістохімія та гістохімія.* Імуногістохімічне виявлення Фос-ір-ядер нейронів проводилося за допомогою стандартного авідин-біотин-пероксидазного методу [19] з використанням поліклональних антитіл кролика, спрямованих проти ядерного білка *c-Fos* (1:2000, „Oncogene Research.”, Ab-5, США) і комерційного набору (1:200, „Vectastain” ABC, США). Подальша діамінобензидин-тетрахлоридна гістохімічна реакція, що використовується для пофарбування зрі-

зів, була посилена додаванням нікель-амоній-сульфату. Фос-ір-нейрони ідентифікували за темно-коричневим забарвленням ядер в різних пластинах спинного мозку.

Для гістохімічного виявлення НАДФН-д-реактивних нейронів (вторинне зафарбування) зафарбовані на Фос-ір-зрізи витримували 1 год при 37 °С у 0,1 моль/л ФБ (рН 7,4), який містив 0,3 % детергента Triton X-100, 0,2 мг/мл нітроблакитного тетразолію та 0,5 мг/мл редукованого  $\beta$ -НАДФН („Sigma”, США). Для підсилення гістохімічної реакції у розчин додавали 1,2 мг/мл двонатрієвої солі яблучної кислоти („Sigma”, США). Потім зрізи відмивали у СФБ, розміщували на покритих желатиною предметних скельцях, висушували на відкритому повітрі, просвітлювали у ксилолі та занурювали у бальзам під покривними скельцями. НАДФН-д-позитивні нейрони легко виявлялися у зрізах різних сегментів мозку, особливо при великому збільшенні ( $\times 400$ ), за блакитним забарвленням їх цитоплазми.

*Статистичний аналіз.* Для проведення статистичного аналізу робили підрахунки нейронів з фронтальних зрізів кожного сегмента тварин: зафарбованих на Фос-ір ( $n=12$ ), подвійно-зафарбованих на Фос-ір і НАДФН-д реактивність ( $n=12$ ) і додатково зафарбованих на НАДФН-д активність ( $n=20$ ). Середня кількість  $\pm$  стандартна похибка середнього мічених нейронів на зріз була перерахована з обох його боків (іпси- та контралатерально відносно до боку з ін'єкціями капсаїцину) в шарах I – X сірої речовини спинного мозку за атласом [37]. Кількість цих нейронів з обох боків в одному сегменті порівняли з названими клітинами в інших сегментах за допомогою двопараметричного статистичного дисперсійного аналізу (ANOVA). Варіаційні фактори були такими: іпси- та контралатеральний бік, а також рівні C1–C8 і L1–L7. Різниця вважалася достовірно при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ

*Фос-імунореактивність.* Рівень *c-fos* експресії по всій довжині у спинного мозку в контрольній групі тварин був дуже низьким (менше одного-двох мічених нейронів у 30 мкм зрізі у шийних і менше одного – у поперекових сегментах). Так, відмічалися поодинокі мічені клітини у поверхневих шарах та шийці дорсального рога. Різниця середньої кількості цих клітин (на зріз) між іпси- та контралатеральним боком була статистично недостовірною ( $P > 0,05$ ). Через 2 год після ін'єкцій капсаїцину в дорсальні м'язи шиї кішки спостерігалася значне збільшення Фос-імунореактивності у шийному та поперековому відділах спинного мозку. У експериментальних тварин мічені клітини реєстрували у великій кількості по всій довжині шийного та поперекового відділів спинного мозку з боку ін'єкцій капсаїцину, особливо у I, V та VII шарах сірої речовини з максимумом у шарі I. При цьому найбільша їх кількість знаходилася у верхніх сегментах шийного C1–C4 та L3–L6 поперекового відділів (рис.1). Дуже малу кількість таких клітин спостерігали у шарах VIII і X та моторних ядрах (шар IX). Слід зазначити, що Фос-імунореактивність була утричі вищою у шийному відділі порівняно з поперековим. Гістограми (див. рис. 2, 3) показують ламінарний розподіл мічених нейронів з іпсилатеральним домінуванням Фос-імунореактивності у шийних сегментах та білатеральний розподіл у поперекових сегментах. На контралатеральному боці рівень експресії *c-fos* у шийному відділі не відрізнявся від такого, що був виявлений у тварин контрольної групи на іпси- та контралатеральному боках. Так, у місці максимального скупчення Фос-ір нейронів середня їх кількість на зріз на контралатеральному боці у дослідних тварин та білатерально у контрольній групі тварин становила  $6,6 \pm 1,2$  і  $7,6 \pm 1,1$  у шийному відділі сегмента C3 ( $P > 0,05$ ), та

8,8±0,9 і 2,8±0,7 відповідно у поперековому відділі сегмента L5 ( $P < 0,05$ ). Мічені ядра нейронів були круглої та еліпсоподібної форми і визначалися за розміром як великі (діаметр яких близько 10 мкм) та малі (до 5 мкм), що умовно відповідають великим і малим нервовим клітинам. Розподіл таких клітин на контра- та іпсилатеральному боках був помітно асиметричним. Фос-імунореактивність реєстрували також у моторних ядрах сегмента C4 (великі ядра

у цитоплазмі мотонейронів, які локалізувалися на іпсилатеральному боці).

Слід зазначити, що внутрішньом'язові ін'єкції капсаїцину призводили до значної експресії *c-fos* у клітинах глії (мікроглії), що добре видно на мікрофотографіях з великим збільшенням (див. рис. 1, г, е, 4, а–г). Основну частину активованих клітин мікроглії спостерігали в поверхневих шарах дорсального рога. За формою зафарбовані ядра були шароподібні, веретено- та

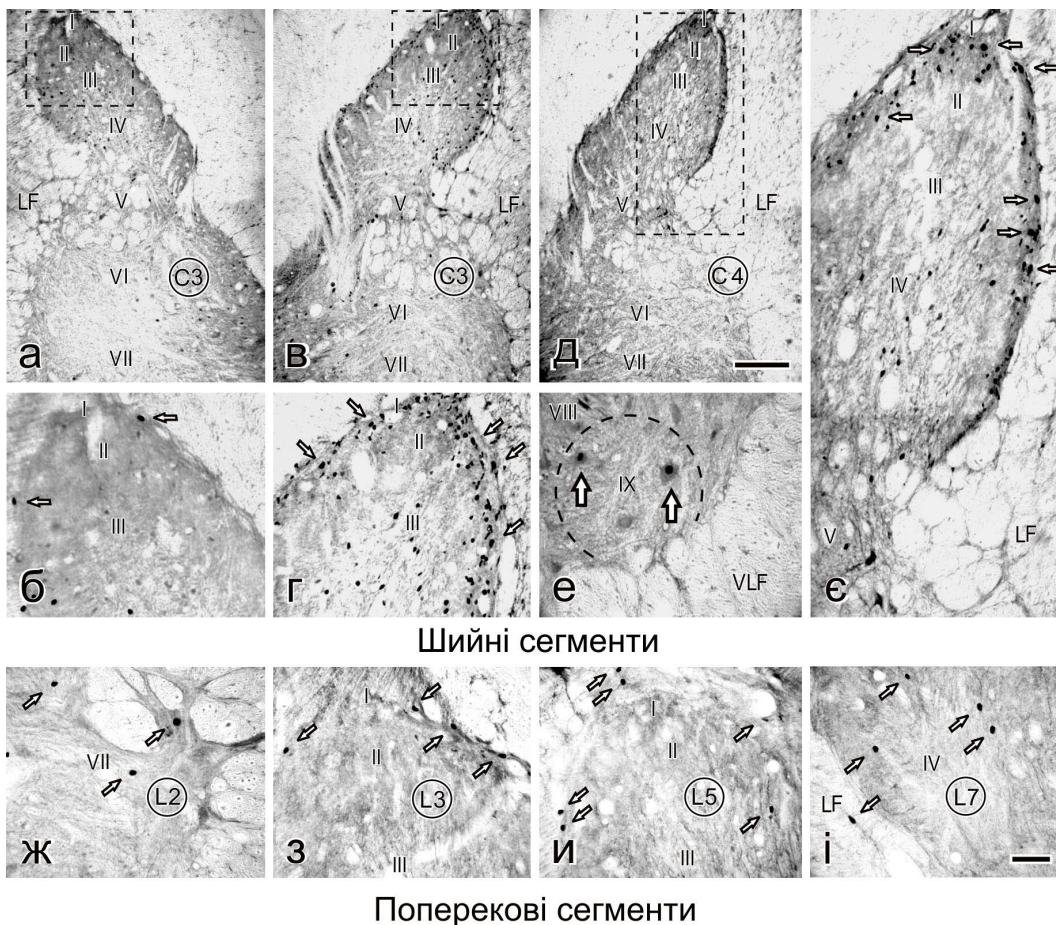


Рис. 1. Фос-імунореактивні (Фос-ір) ядра у нейронах на зрізах спинного мозку кішки: а, в – розподіл позитивних ядер у шарах I – VII сірої речовини сегмента C3 на контра- та іпсилатеральному боці відповідно; б, г – збільшені зображення шарів I – III обох боків цього сегмента відповідно (зони розташування мічених нейронів позначені на а та в пунктирними лініями); д – розподіл мічених ядер у шарах I – VII сірої речовини сегмента C4, іпсилатерально; є – збільшене зображення шарів I – V (зона розташування мічених нейронів позначена на д пунктирною лінією); е – гігантські Фос-ір-ядра в мотонейронах у моторному ядрі (шар IX) цього самого сегмента, іпсилатерально; ж – іпсилатеральний бік сегмента L2; з, і, – контралатеральні боки сегментів L3, L5 (шари I – III); и – контралатеральний бік сегмента L7 (шар IV). LF – латеральний канатик білої речовини. VLF – вентролатеральний канатик. Стрілки показують великі Фос-ір-ядра нейронів. Масштабна лінія на а, в, д – 200 мкм, на б, г, е, є, ж, з, и, і – 50 мкм

паличкоподібні (менше, ніж 5 мкм). Такі активовані гліальні клітини оточували окремі мічені нейрони та локалізувалися досить близько до мічених клітин.

**НАДФН-д-активність.** НАДФН-д-реактивні нейрони в основному концентрувалися в поверхневих шарах I і II дорсального рога та проміжній зоні (шар VII) близько до шару X в сірій речовині шийного та попе-

рекового відділів спинного мозку тварин. Багато їх було на рівні сегментів L1–L4 також у інтермедіолатеральних ядрах, а незначну кількість таких клітин виявляли у шийці дорсального рога (шар V). В інших шарах сірої речовини спостерігалися лише поодинокі активовані нейрони. Слід зазначити, що порівняно із контролем, у кішок дослідної групи кількість НАДФН-д-пози-

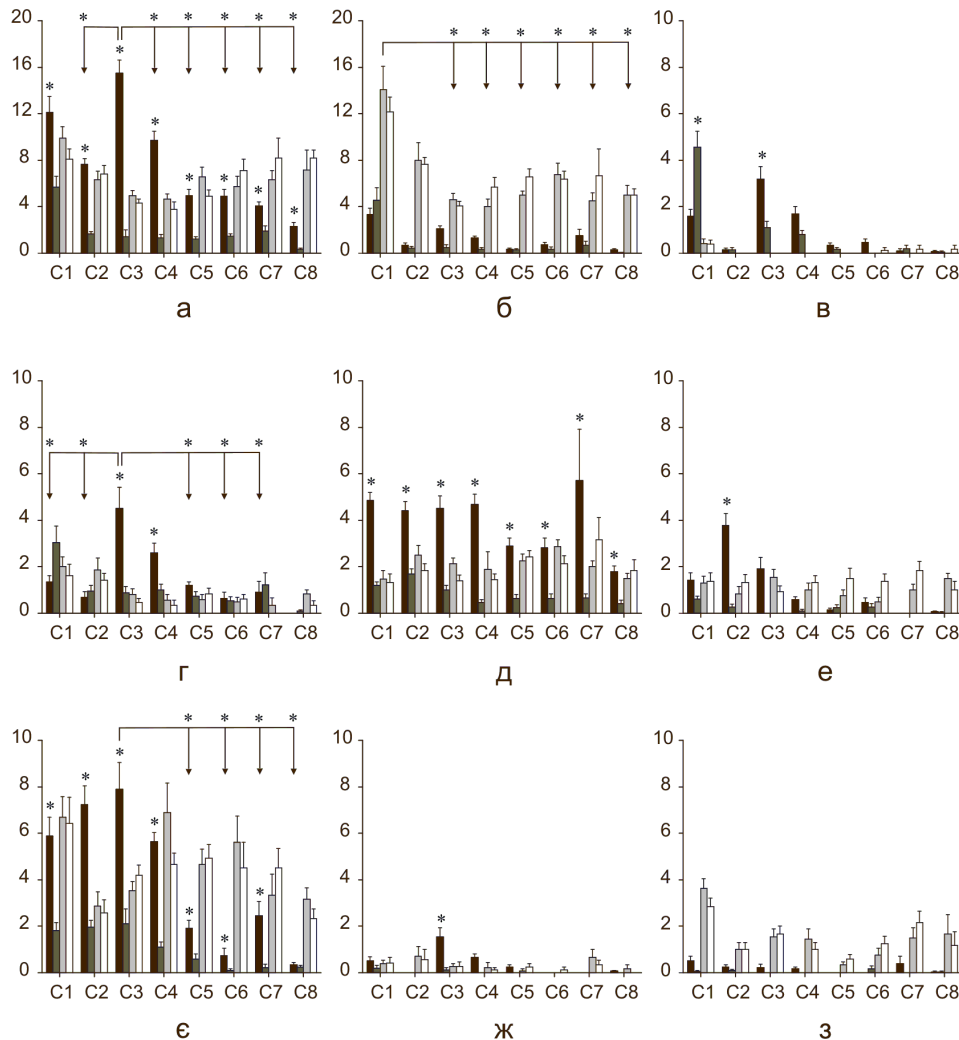


Рис. 2. Кількісний аналіз розподілу Фос-імунореактивних ядер та NO-генеруючих нейронів у шарах сірої речовини сегментів С1 – С8 після односторонніх ін'єкцій капсаїцину. а – ж – шари I – VIII, з – шар X. Середня кількість  $\pm$  стандартна похибка середнього мічених нейронів на зріз визначались у групі із шести тварин. Зірочки над стовпчиками вказують на різницю в кількості мічених нейронів між іпси- та контралатеральним боком, а зірочки над стрілками вказують на різницю в кількості маркірованих нейронів між шийними сегментами. Різниця була статистично достовірною при  $* P < 0,05$ . Чорні та темно-сірі стовпчики відображають кількісний розподіл ядер Фос-ір нейронів з іпси- та контралатерального боків зрізу відповідно, а світло-сірі та білі – NO-генеруючих нейронів на цих боках

тивних клітин у межах маргінальної зони була значно більшою ( $P < 0,05$ ). Забарвлення НАДФН-д-реактивних нейронів на зрізах не було однаковим. Так, у поверхневих шарах I і II його інтенсивність була незначною, а в інших шарах досить сильною. Необхідно відмітити, що розподіл реактивних нейронів на контра- та іпсилатеральному боках зрізів був симетричним. Ці клітини були, в основному продовгуваті за

формою з середнім діаметром близько 30 мкм у шарі VII і до 20 мкм в інших шарах. Переважна більшість NO-генеруючих нейронів у шарах I і II були біполярними, а в інших зустрічалися мультиполярні з численними розгалуженнями відростків. На рис. 4, д показано зріз, зафарбований виключно для виявлення NO-генеруючих нейронів, а на рис. 4, а–г – приклади подвійного зафарбування зрізів. На рис. 3, 4

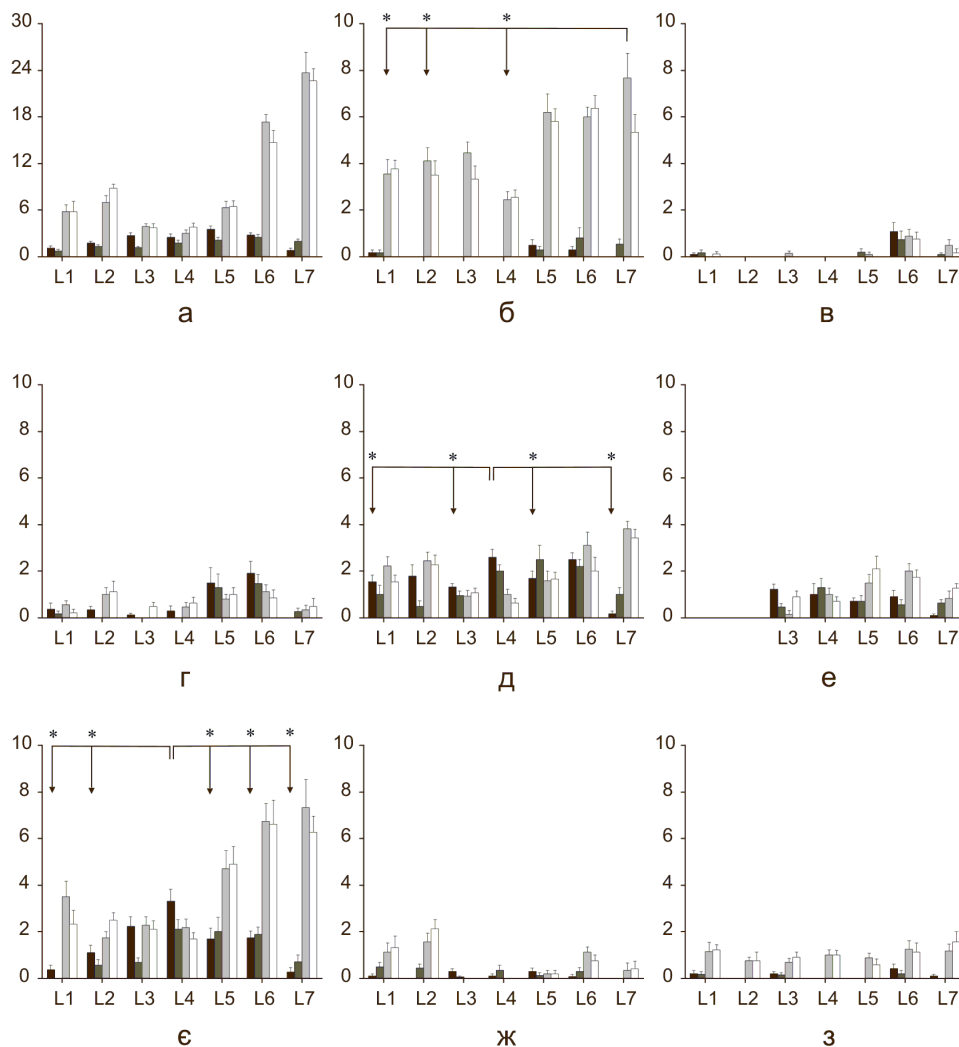


Рис. 3. Кількісний аналіз розподілу Фос-ір ядер та NO-генеруючих нейронів у шарах сірої речовини сегментів L1 – L7 після односторонніх ін'єкцій капсаїцину: а – ж – шари I – VIII, з – шар X. Середня кількість  $\pm$  стандартна похибка середнього мічених нейронів на зріз визначались у групі із шести тварин. Зірочки над стовпчиками вказують на різницю в кількості мічених нейронів між іпси- та контралатеральним боком, а зірочки над стрілками вказують на різницю в кількості маркованих нейронів між поперековими сегментами. Різниця була статистично достовірною при  $* P < 0,05$ . Чорні та темно-сірі стовпчики відображають кількісний розподіл ядер Фос-ір нейронів з іпси- та контралатерального боків зрізу відповідно, а світло-сірі та білі – NO-генеруючих нейронів на цих боках

дано детальний ламінарний розподіл NO-генеруючих нейронів у шарах сірої речовини спинного мозку сегментів С1–С8 та L1–L7. Слід зазначити, що у зоні розташування основної маси НАДФН-д-реактивних нейронів (шари I і II) спостерігалася велика кількість НАДФН-д-позитивних претерміналей і волокон аферентів груп III та IV.

*НАДФН-д-активність та Фос-імунореактивність.* Подвійне зафарбування зрізів шийних сегментів наведено на рис. 4, а–г. Як видно з рисунку, Фос-ір- та НАДФН-д-позитивні нейрони перемішані у сірій речовині. Також можна відзначити, що більшість Фос-ір-нейронів локалізуються у шарі I, а НАДФН-д-позитивні клітини –

переважно у шарі II. За короткий термін після больової стимуляції (у нашому випадку 2 год) подвійне мічення нервових клітин не спостерігається. Основні патерни ламінарного розподілу НАДФН-д-активних та Фос-ір-нейронів у сегментах шийного та поперекового відділів можна побачити на рис. 5, а–ж. Слід зазначити, що Фос-ір-нейрони виявляються також у невеликій кількості в цервікальному латеральному ядрі сегментів С1 та С2. В інтермедіалатеральному ядрі сегментів L1–L4 зареєстровані як Фос-ір- так і НАДФН-д-позитивні нейрони. Незначна Фос-імунореактивність та НАДФН-д-активність визначалася і в моторних ядрах (шар IX) шийного та поперекового відділів спинного мозку.

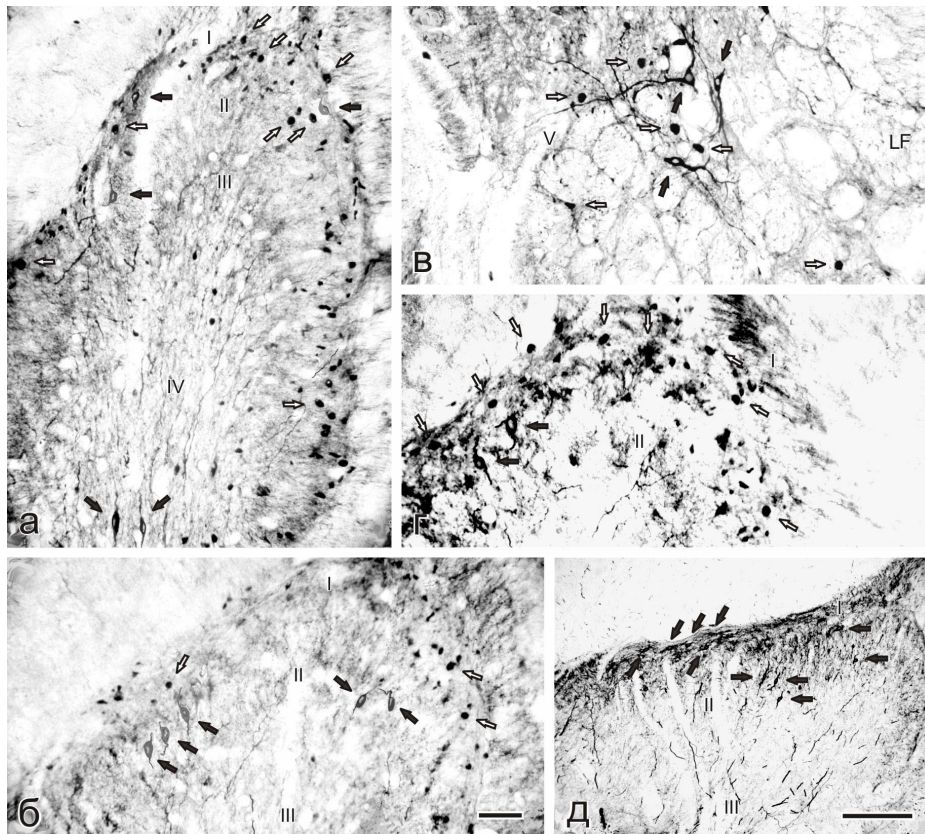


Рис. 4. Фос-імунореактивні (Фос-ір) ядра нейронів та НАДФН-д позитивні нервові клітини на зрізах спинного мозку кішки: а, б, г – розподіл позитивних клітин у шарах I – III сірої речовини шийних сегментів С2, С4 та С5 відповідно; в – розподіл таких клітин у шийці дорсального рога (шар V) сегмента С4; д – виключно NO-генеруючі нейрони в шарах I – III сегмента С6. Білі стрілки вказують на великі Фос-ір ядра нейронів, чорні – на NO-генеруючі нейрони. Масштабна лінія на а, б, в, г – 50 мкм, на д – 200 мкм. Інші позначення, як на рис. 1



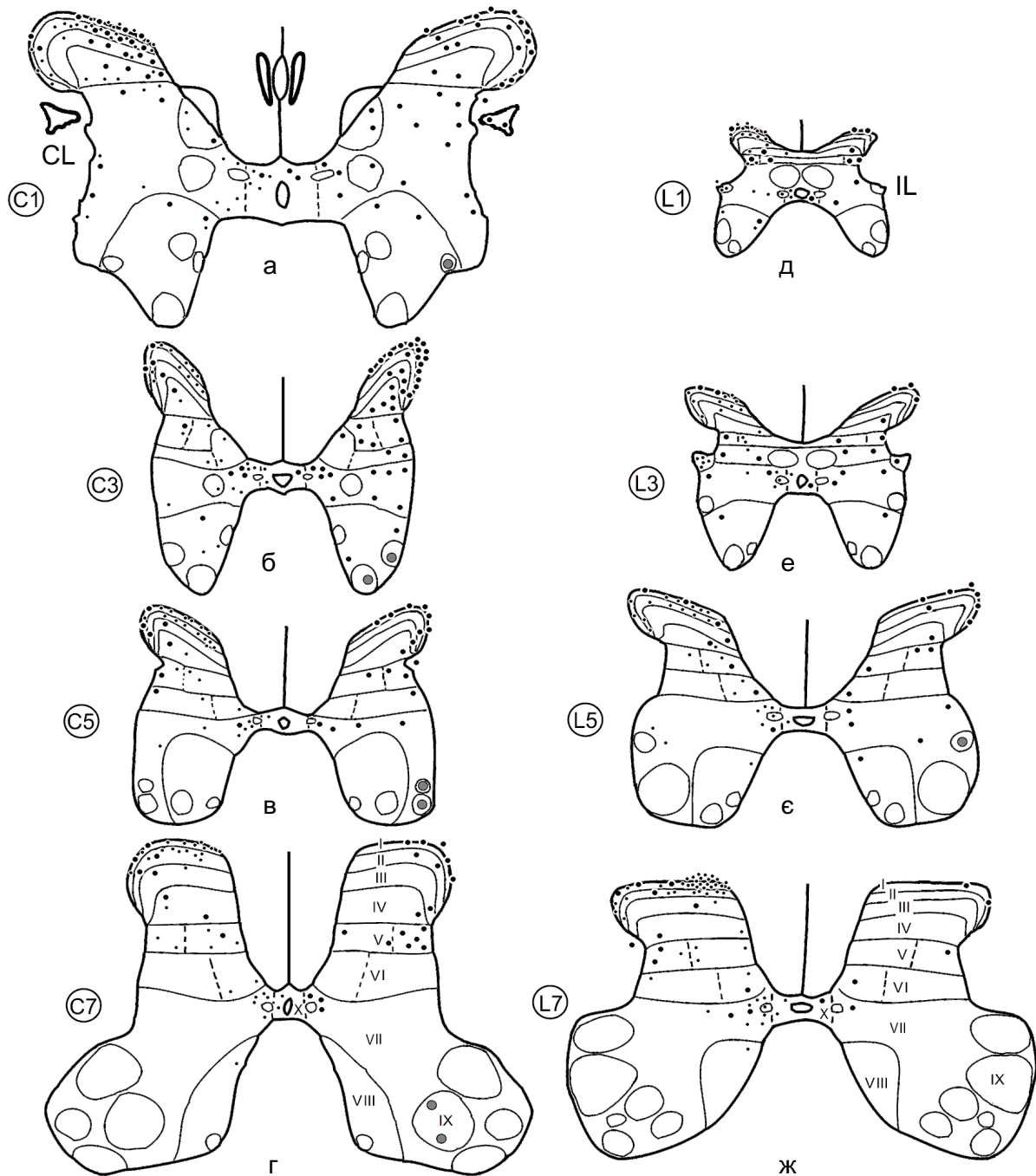


Рис. 5. Характерні патерни розподілу НАДФН-д реактивних (малі крапки) та Фос-ір ядер спінальних нейронів (великі крапки) на зрізах шийних (C1, C3, C5, C7) та поперекових (L1, L3, L5, L7) сегментів на зрізі спинного мозку кішки через 2 год після ін'єкції капсаїцину (праворуч) у дорсальні м'язи шиї кішки. Великі чорні крапки – Фос-ір ядра нейронів, малі чорні крапки – NO-генеруючі нейрони, великі сірі кружки в сегментах C1, C3, C5, C7 – Фос імунореактивні ядра мотонейронів, а в сегменті L5 – НАДФН-д позитивний мотонейрон. Симетричний розподіл NO-генеруючих нейронів позначений на схематичних зрізах односторонньо (ліворуч)

## ОБГОВОРЕННЯ

В результаті наших досліджень були зареєстровані специфічні патерни нейрональної активації або патерни ламінарного розподілу Fos-імунореактивних ядер (мічених нейронів) у сірій речовині шийного та поперекового відділів спинного мозку, які виникали після 2 год стимуляції ванілоїдних рецепторів. Ламінарний розподіл мічених клітин не був однаковим у сегментах досліджуваних відділів (див. рис. 5). Так, Fos-імунореактивність у шийному відділі мала досить виразне іпсилатеральне домінування у всіх сегментах з переважною більшістю Fos-ір-ядер клітин у сегментах С3 та С4. У поперековому ж відділі іпсилатеральне домінування відмічалось тільки у сегментах L1–L4, хоча і не було таким виразним, як у шийному відділі, а в сегментах L5–L7 спостерігався білатеральний розподіл мічених клітин. В нашій роботі зафіксовано, що основні фокуси розміщення Fos-ір-нейронів локалізовані у маргінальній зоні, шийці дорсального рога та проміжній зоні близько до зони навколо центрального каналу (шари I, V та VII), тобто у місцях закінчень високопорогових м'язових аферентних волокон Aδ та C [7, 15]. Слід зазначити, що шар I дорсального рога як шийних, так і поперекових сегментів спинного мозку містить у собі закінчення первинних аферентів та нейрони, що відповідають на больову стимуляцію. В цьому шарі локалізується багато великих і малих нервових клітин. Групи гігантських нервових клітин, так звані клітини Вальдеєра, є джерелами висхідних спіно-церебральних проєкцій у шляхах передачі ноцицептивних сигналів до лімбічних структур головного мозку [14, 44]. Відмітимо, що проєкції аксонів клітин шару I знайдені у парабрахіальних ядрах, а сам спіно-парабрахіальний тракт відіграє дуже важливу роль під час впливу больової стимуляції на розвиток емоційних, мотиваційно-афективних і вегетативних реакцій. Припускають, що більшість таких клітин

знаходяться під сильним гальмівним контролем близько розташованих аксонів ГАМКергічних нейронів [36]. Є відомості, що 14–20% *c-fos*-імунореактивних/ноцицептивних нейронів у шарах I і II є ГАМК-або гліцинімунореактивними [41]. У наших дослідах ми також спостерігали велику кількість гігантських та малих Fos-ір-ядер нейронів, які переважно локалізувалися у маргінальній зоні (шари I і II). Показано, що малі мічені нервові клітини можуть бути як джерелами спіно-таламічних проєкцій [24], так і гальмівними нейронами, які модулюють активність проєкційних нейронів та беруть участь у пресинаптичному гальмуванні передачі сигналів первинних ноцицептивних аферентів [5, 36]. Слід зазначити, що різні типи болю можуть викликати неоднакову Fos-імунореактивність у шарах I і II, які пов'язують із шкірним та підшкірним болем. Хоча після м'язової, суглобної або вісцеральної больової стимуляції більше Fos-ір-нейронів спостерігається у шарі I й рідше у шарі II. Також відомо, що у шарах III та IV експресія *c-fos* зазвичай виникає після невеликого подразнення [20]. У шарах III і IV нами не було зафіксовано високого рівня імунореактивності. Є припущення, що ноцицептивні первинні аференти не мають значного розгалуження в шарах III і IV, але багато нейронів цих шарів спрямовують свої дендрити до шарів I і II. Таким чином, деякі з них мають прямі контакти з первинними ноцицептивними аферентами у поверхневих шарах [40]. У глибоких шарах V та X також локалізується багато закінчень таких аферентів, але в шарах VII та VIII їх немає. Ноцицептивна імпульсація до нейронів цих шарів передається полісинаптичними шляхами [39]. Зазначимо, що у шарах V–VII розміщуються кінцеві премоторні інтернейрони та клітини, які є джерелами довгих прямих та перехресних пропріоспінальних шляхів, що сполучаються з поперековим відділом спинного мозку [26]. Активація таких шляхів лежить в

основі розвитку так званого проєкційного та віддзеркаленого болю, що супроводжує больові синдроми, котрі пов'язані з міальгіями скелетних м'язів [28]. Крім того, такі зв'язки між джерелом виникаючої м'язової болі та проєкціями такої болі на інші групи м'язів є однією із захисних реакцій організму, яка призводить до зміни пози та обмеження руху, що зменшує біль у місці його виникнення [11, 21].

У місцях найбільшого скупчення Фос-ір-нейронів (шари I, V та медіальна частина шару VII) зареєстровані NO-генеруючі нейрони. Медіально у зазначених шарах розташовані як НАДФН-д-позитивні, так і негативні ГАМК-імунореактивні клітини. Зауважимо, що тільки в шарах III та IV усі NOS-вміщуючі нейрони є гальмівними ГАМК-ергічними клітинами [38]. Слід зазначити, що подвійного мічення нервових клітин на Фос-імунореактивність та НАДФН-д-активність в нашому дослідженні ми не виявили. Хоча є дані [16], що у разі довготривалого (24 год) больового подразнення задньої кінцівки щура у спінальних нейронах таке подвійне мічення визначається. Ми виявили збільшення кількості НАДФН-д-реактивних клітин у маргінальній зоні (шари I та II) дорсального рога спинного мозку обох відділів. Літературні дані свідчать про те, що зміна НАДФН-д-активності після подразнення в той чи інший бік залежить від способу стимуляції та її тривалості. Зокрема, під час короткотривалої стимуляції (до 2 год) відмічено збільшення NOS-вміщуючих нейронів, а згодом їх кількість стає значно меншою [8].

У тварин з больовим подразненням м'язів ший ми спостерігали масову активацію глії у сірій речовині шийних та поперекових сегментів, особливо в поверхневих шарах дорсального рога, як з іпси-, так і з контралатерального боку. Можна припустити, що за період короткотривалої (до 2 год) больової стимуляції м'язів ший ін'єкціями капсаїцину головним чином активу-

валася мікроглія. Зараз підкреслюють важливу роль глії, яка може виступати "новим гравцем" у стані болю [43]. Гліальні клітини (мікроглія, астроцити та олігодендроцити) становлять більше ніж 70 % від загальної популяції клітин у спинному та головному мозку. У спинному мозку мікроглія та астроцити можуть створювати та керувати посиленням больовим станом. Глія активується у відповідь на дію патогенних вірусів і бактерій, а також на дію речовин, що виділяються закінченнями первинних аферентів тих нейронів, які передають біль при збудженні або довготривалій деполяризації під час пресинаптичного гальмування (субстанція Р, АТФ, збуджувальні амінокислоти, простагландини, NO). Сама ж активована глія також може виділяти різноманітні нейроактивні речовини, включаючи інтерлейкіни, продукти арахідонової кислоти, збуджувальні амінокислоти, АТФ та NO. По черзі ці активні речовини здатні змінювати біль, підсилюючи виділення первинними аферентами субстанції Р і збуджувальних амінокислот та підсилювати реактивність нейронів, що передають біль [32].

Відомо, що у відповідь на больове подразнення (через шкіру або м'язи) активується значна кількість спінальних нейронів [23, 27]. Такі активовані нейрони, які локалізовані переважно у поверхневих шарах та шийці дорсального рогу, є джерелами висхідних спіно-бульбарних та спіно-таламічних проєкцій. Нейрони дорсального рога, які активуються ноцицепторами, знаходяться під впливом тонічного низхідного гальмування більшості супраспінальних структур, що залучені до модуляції болю [4, 29].

Результати проведених досліджень свідчать, що короткотривала (2 год) больова стимуляція капсаїцином шийних м'язів кішки викликає патерни експресії *c-fos* з вираженим іпсилатеральним домінуванням та патерни НАДФН-д-активності з білатеральним розподілом мічених клітин у

шийних сегментах спинного мозку. Дуже важливо, що при такому больовому подразненні спостерігається стійкий патерн експресії *c-fos* в поперекових сегментах (L1–L7). Фос-ір-нейрони та НАДФН-д-реактивні клітини перемішані у шарах I–VII, але при цьому подвійного мічення спінальних нейронів не спостерігається. Інтенсивна активація нейронів у шийних сегментах може призводити до розповсюдження їх дії на спінальні нейрони віддалених сегментів, в тому числі й поперекового відділу. Слід відзначити, що в таких процесах особливу роль відіграють прорпріоспінальні шляхи, які зв'язують шийний та поперековий відділи. Наші результати можуть бути підтвердженням залучення інтерсегментарних шляхів до здійснення ноцицептивних впливів на спінальні нейрони по всій довжині спинного мозку. Не виключається й роль спіно-церебро-спінальної петлі в модуляції експресії *c-fos* у шийно-поперекових сегментах спинного мозку при такому больовому подразненні. Ми вважаємо, що наша робота може бути корисна при подальшому вивченні сегментарних та міжсегментарних механізмів проведення ноцицептивних подразнень.

*Робота виконана за підтримки гранту ДФФД № 05.07/00065 Міністерства освіти та науки і гранту „Молекулярні основи функціонування геному” НАН України.*

**A.V. Maznychenko**

#### **EFFECT OF MUSCLE PAIN ON C-FOS EXPRESSION AND NADPH-DIAPHORASE ACTIVITY IN THE SPINAL CORD**

Capsaicin (Sigma, 5 mg/1 ml) was unilaterally injected into dorsal neck muscles (mm. trapezius, splenius) of the cat (n = 6) anesthetized with  $\alpha$ -chloralose. The laminar distribution of Fos-immunoreactive (Fos-ir) and NADPH-d-reactive neurons was studied in the sections of the cervical and lumbar segments. In comparison to sham operated animals (n = 2), 2 h after capsaicin injection the significant *c-fos* expression was found throughout the cervical cord (C1 – C8) ipsilaterally and lumbar cord bilaterally (L1 – L7), while the predominant mean

number of Fos-ir neurons was detected in the C1 – C4 and L3 – L6 segments. In cervical spinal cord, *c-fos* expression was three times more than in lumbar spinal cord. Dorsal neck noxious stimulation produced widespread *c-fos* expression in the large and small labeled cells within lamina I, at the neck of the dorsal horn (lamina V) and also in the medial part of the intermediate zone (lamina VII) where cells of origin of the long crossed and uncrossed descending propriospinal pathways to the lumbar cord were known to be localized. The main accumulations of NADPH-d-reactive cells were registered within the marginal zone (laminae I and II) and medial part of the intermediate zone (lamina VII). Fos-ir neurons were co-distributed with NADPH-d-reactive cells within the marginal zone, and the neck of the dorsal horn, however, double-staining spinal neurons were not registered. These results strongly suggest that the revealed *c-fos* expression in cervical and lumbar segments depends on the activity of vanilloid receptors of the cervical muscles and confirmed the anatomical coupling of both regions through long propriospinal pathways which may be underlying in the cervico-lumbar nociceptive processing. An influence of the spino-cerebro-spinal loop on modulation *c-fos* expression in these regions is not excluded also.

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

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Agnati L.F., Zoli M., Stromberg I., Fuxe K. Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission // *Neuroscience* – 1995. – **69**. – P. 711–726.
2. Arima T., Svensson P., Arendt-Nielsen L. Capsaicin-induced muscle hyperalgesia in the exercised and non-exercised human masseter muscle // *J. Orofac. Pain* – 2000. – **14**. – P. 213–223.
3. Arnold W.P., Mittal C.K., Katsuki S., Murad F. Nitric oxide activates guanylyl cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1977. – **74**. – P. 3203–3207.
4. Basbaum A.I., Fields H.L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis // *Ann. Neurol.* – 1978. – **4**. – P. 451–462.
5. Bernardi P.S., Valtschanoff J.G., Weinberg R.J. et al. Synaptic interactions between primary afferent terminals and GABA and nitric oxide-synthesizing neurons in superficial laminae of the rat spinal cord // *J. Neurosci.* – 1995. – **15**, №2. – P. 1363–1371.
6. Bredt D.S., Snyder S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1989. – **86**. – P. 9030–9033.
7. Brown A.G. Organization of the Spinal Cord. The Anatomy and Physiology of Identified Neurons. – New York: Springer, 1981. – 238 p.
8. Callsen-Cencic P., Hoheisel U., Kaske A. et al. The controversy about spinal neuronal nitric oxide synthase: under which conditions is it up- or downre-

- gulated? // *Cell and Tissue Res.* – 1999. – **295**. – P. 183–194.
9. Caterina M.J., Rosen T.A., Tominaga M. et al. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat // *Nature.* – 1999. – **398**. – P. 436–441.
  10. Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway // *Ibid.* – 1997. – **389**. – P. 816–824.
  11. Ellaway P.H., Murthy K.S. Reflex effects from high threshold neck muscle afferents on hind limb extensor gamma motoneurons in the cat // *Exp. Brain Res.* – 1984. – **54**, №2. – 212–216.
  12. Forstermann U., Gath I., Schwarz P. et al. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control // *Biochem. Pharmacol.* – 1995. – **50**. – P. 1321–1332.
  13. Garthwaite J., Boulton C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system // *Ann. Rev. Physiol.* – 1995. – **57**. – P. 683–707.
  14. Govsa F., Kayalioplu G., Erdem B. et al. Laminar distribution of the sources of ascending spino-supraspinal pathways involved in nociceptive transmission and pain modulation // *Tr. J. Med. Sci.* – 1998. – **28**. – P. 41–46.
  15. Harris J.A. Using *c-fos* as a Neural Marker of Pain // *Brain. Res. Bull.* – 1998. – **45**, №1 – P. 1–8.
  16. 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.
  17. Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve ending: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides // *Neuroscience.* – 1988. – **24**. – P. 739–768.
  18. Holscher C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity // *Trends Neurosci.* – 1997. – **20**. – P. 298–303.
  19. 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. and Cytochem.* – 1981. – **29**. – P. 577–580.
  20. Hunt S.P., Pini A., Evan G. Induction of *c-fos*-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation // *Nature.* – 1987. – 328. – P. 632–634.
  21. Irving R.E. The tonic protective reflexes: a proposed nomenclature and classifications system // *J. Manipulative Physiol. Ther.* – 1980. – **3**. – P. 244–252.
  22. Johansson H., Windhorst U., Djupsjobacka M., Passatore M. Chronic work-related myalgia: neuromuscular mechanisms behind work-related chronic muscle pain syndromes. – Gavle: Gavle University Press, 2003. – 310 p.
  23. Kayalioglu G., Hariri N.I., Govsa F., Erdem B., Peker G., Maiskii V.A. Laminar distribution of the cells of origin of the spinocerebral pathways involved in nociceptive transmission and pain modulation in the rat // *Neurophysiology/Neirofiziologiya.* – 1996. – **28**. – P. 111–122.
  24. Marshall G.E., Shehab S.A.S., Spike R.C., Todd A.J. Neurokinin-1 receptors on lumbar spinothalamic neurons in the rat // *Neuroscience.* – 1996. – **72**. – P. 255–263.
  25. Mayer B. Biochemistry and molecular pharmacology of nitric oxide synthase. – In: Vincent SR (ed). *Nitric oxide in the nervous system.* – New York: Acad. Press, 1995. – P. 21–42.
  26. Menetrey D., de Pommery J., Roudier F. Propriospinal fibers reaching the lumbar enlargement in the rat // *Neurosci. Lett.* – 1985. – **58**. – P. 257–261.
  27. 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 // *J. Comp. Neurol.* – 1989. – **285**. – P. 177–195.
  28. Mense S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain // *Pain.* – 1993. – **54**. – P. 241–289.
  29. Millan M.J. Descending control of pain // *Prog. Neurobiol.* – 2002. – **66**. – P. 355–474.
  30. Mitsikostas D.D., Sanchez del Rio M. Receptor systems mediating *c-fos* expression within trigeminal nucleus caudalis in animal models of migraine // *Brain Res. Rev.* – 2001. – **35**. – P. 20–35.
  31. Nakamura A., Shiomi H. Recent advances in neuropharmacology of cutaneous nociceptors // *Jpan. J. Pharmacol.* – 1999. – **79**. – P. 427–431.
  32. Oka T., Hori T. Brain cytokines and pain. – In: Watkins LR, Maier SF, eds. *Cytokines and pain.* – Basel: Birkhauser Verlag, 1999. – P. 183–204.
  33. Pettorossi V.E., Della Torre G., Bortolami R., Brunetti O. The role of capsaicin-sensitive muscle afferents in fatigue-induced modulation of the monosynaptic reflex in the rat // *J. Physiol. (Lond.)* – 1999. – **515**. – P. 599–607.
  34. Peunova N., Enikolopov G. Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells // *Nature.* – 1993. – **364**. – P. 450–453.
  35. Pilyavskii A.I., Maisky V.A. 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.
  36. Puskar Z., Polgar E., Todd A.J. A population of large lamina I projection neurons with selective inhibitory input in rat spinal cord // *Neuroscience.* – 2001. – **102**, №1. – P. 167–176.
  37. Rexed B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat // *J. Comp. Neurol.* – 1954. – **100**, №2. – P. 297–379.
  38. Spike R.C., Todd A.J., Johnston H.M. Coexistence of NADPH-diaphorase with GABA, glycine, and acetylcholine in rat spinal cord // *Ibid.* – 1993. – **335**, №3. – P. 320–333.
  39. Sugiura Y., Lee C.L., Perl E.R. Central projections of identified, unmyelinated (C) afferent fibers innervating

- mammalian skin // Science. – 1987 – **234**. – P. 358–361.
40. Todd A. J. Cells in laminae III and IV of rat spinal dorsal horn receive monosynaptic primary afferent input in lamina II // J. Comp. Neurol. – 1989. – **289**. – P. 676–686.
41. Todd A.J., Spike R.C., Brodbelt A.R. et al. Some inhibitory neurons in the spinal cord develop c-fos-immunoreactivity after noxious stimulation // Neuroscience – 1994. – **63**, № 3, – P. 805–816.
42. Vizzard M.A., Erdman S.L., Roppolo J.R. et al. Differential localization of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase activity in the cat spinal cord // Cell Tissue Res. – 1994. – **278**, №2. – P. 299–309.
43. Watkins L.R., Milligan E.D., Maier S.F. Spinal cord  
glia: new players in pain // Pain. – 2001. – **93**. – P. 201–205.
44. Willis W. D., Coggeshall R. E. Sensory Mechanisms of the Spinal Cord. – New York: Plenum, 1991. – 230 p.
45. Witting N., Svensson P., Gottrup H. et al. Intramuscular and intradermal injection of capsaicin: a comparison of local and referred pain // Pain. – 2000. – **84**. – P. 407–412.
46. Wu J., Fang L., Lin Q., Willis W.D. Nitric oxide synthase in spinal cord central sensitization following intradermal injection of capsaicin // Ibid. – 2001. – **94**. – P. 47–58.
47. Yeziarski R.P., Culbertson J.L., Brown P.B. Cells of origin of propriospinal connections to cat lumbosacral gray as determined with horseradish peroxidase // Exp. Neurol. – 1980. – **69**, №3. – P. 493–512.

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

*Матеріал надійшов до  
редакції 06.09.2004*