

О.В. Власенко, В.О. Майський, А.В. Мазниченко, О.І. Пілявський, В.М. Мороз

## Дослідження експресії *c-fos* і НАДФН-діафоразної активності у спинному та головному мозку при розвитку стомлення м'язів шиї у щурів

*Исследовали в мозгу распределение экспрессии c-fos, как маркера нейронной активности и НАДФН-диафоразной реактивности у анестезированных хлоралгидратом крыс после мышечной усталости, вызванной прерывистым высокочастотным (100 с<sup>-1</sup>) электрическим раздражением дорсальных мышц шеи (mm. trapezius-splenius). По сравнению с контролем или ложной стимуляцией, усталостные сокращения мышц вызывали значительное увеличение экспрессии c-fos ипсилатерально в сегментах С1–С4 и контралатерально в центральном (Ce) и медиальном ядрах миндалины, паравентрикулярном ядре гипоталамуса (Pa) и вентролатеральном отделе околотовопроводного серого вещества (VLPAG). Наибольшее среднее число Фос-иммунореактивных (Фос-ир) нейронов (на срез) было обнаружено в 1, 4 и 5-м слоях дорсального рога спинного мозга (5,8 ± 0,9; 13,1 ± 0,9 и 11,1 ± 0,7, соответственно). Сравнение среднего числа нейронов Фос-ир в различных зонах головного мозга выявило следующую последовательность: Pa > VLPAG > Ce (447,7 ± 23,5; 196,3 ± 12,7; 104,6 ± 12,3 соответственно). Около 50 % нейронов с двойным окрашиванием (Фос-ир и НАДФН-диафоразо-реактивных) были обнаружены в Pa. Полученные результаты показали, что лимбические структуры, гипоталамус и VLPAG проявляют высокую нейронную активность, инициированную усталостью мышц шеи, и могут делать свой вклад в ноцицептивные процессы, а также генерацию вегетативных и эмоциональных компонентов мышечной боли.*

### ВСТУП

Відомо, що довготривале й інтенсивне скорочення м'язів шиї людини часто супроводжується виникненням м'язового болю, порушенням пози та розладнанням моторного контролю [5]. За допомогою методів позитронно-емісійної та магніторезонансної томографії показано, що після стомлюючої стимуляції або тривалого скорочення скелетних м'язів виникають характерні патерни нейронної активації у мозку людини [17, 19]. Встановлено, що зміни у ЦНС після стомлення м'язів ініціюються, головним чином, потоком ноцицептивних сигналів від високопорогових м'язових аферентів [4]. Хант та ін. [12] уперше впровадили в дослідження ноцицепції метод виявлення експ-

ресії раннього онкогена *c-fos* як маркера нейронної активності. Пізніше цей метод став широко використовуватися для визначення розподілу активованих нейронів у мозку при різних умовах, включаючи і довготривалі стомлювальні скорочення м'язів [21, 33].

Больові стимули викликають не тільки дискретне сенсорне сприйняття і соматичні моторні реакції, а також значні зміни в емоційному стані та вегетативних реакціях. Нейроанатомічні й електрофізіологічні дослідження вже продемонстрували наявність прямих і непрямих шляхів від спинного мозку до гіпоталамуса, лімбічних структур головного мозку [3, 8, 10, 25]. У цьому відношенні в останні роки інтенсивно вивчали спіно-парабрахіо-мигдаликоподібного тіла

© О.В. Власенко, В.О. Майський, А.В. Мазниченко, О.І. Пілявський, В.М. Мороз

та спіно-парабрахіо-гіпоталамічний шляхи передачі ноцицептивних сигналів у стані розвитку хронічного, глибокого м'язового або вісцерального болю [7, 13, 24, 37].

Оксид азоту (NO) відіграє важливу роль у деяких функціях і дисфункціях мозку, включаючи регуляцію нейронної збудливості, синаптичної пластичності та депресії [20]. Вплив NO на виділення серотоніну та ГАМК у лімбічних структурах мозку, гіпоталамусі та центральній сірій речовині також відіграє важливу роль у розвитку захисних реакцій. [9, 29]. Відомо, що середнє значення кров'яного тиску і частота серцевих скорочень підвищуються протягом статичного м'язового скорочення у наркотизованих котів [18] і щурів [21]. Ця вегетативна реакція, відома як «пресорний рефлекс на вправу», пов'язується з активацією полімодальних і високопорогових м'язових аферентів групи A $\delta$  і C [4]. Однак у стані тривалого і глибокого м'язового або вісцерального болю подальший розвиток антиноцицепції і серцево-судинних реакцій (зниження симпатичного тону) пояснюють активацією NO-синтазовмісних (НАДФН-діафорозо-позитивних (НАДФН-д(+))-нейронів паравентрикулярного ядра гіпоталамуса (Pa) та вентролатеральної зони навколводопровідної сірої речовини (VLPAG) [37].

Метою нашого дослідження було вивчити зміни активації нейронів спинного та головного мозку щурів у відповідь на тривале скорочення дорсальних м'язів шиї, які викликані прямим електричним подразненням. Але не менш важливим було отримання інформації про можливе залучення NO у ці процеси. Тому ми провели просторовий і кількісний аналіз розподілу Фос-імунореактивних (Фос-ір) та НАДФН-д(+)-нейронів у шийних сегментах спинного мозку та структурах головного мозку.

## МЕТОДИКА

*Експериментальні групи та стимуляційний протокол.* В експерименті було вико-

ристано три групи щурів-самців лінії Вістар масою 250–300 г. До 1-ї контрольної групи ввійшли інтактні тварини (n=4); до 2-ї – тварини з псевдостимуляцією коли електроди були введені у м'язи шиї, але електричну стимуляцію не проводили (n=4); до 3-ї групи – тварини, яким проводили унілатеральну (праворуч) електричну стимуляцію м'язів шиї (*m. trapezius* і *m. splenius*) (n=4). Усі експерименти було виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС).

Перед операцією щурів анестезували хлоралгідратом („Sigma”, США, 420 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Щоб мінімізувати рух тварини під час стимуляції, її голову та передню праву кінцівку закріплювали на платформі. Для подразнення м'язів використовували три срібні хлоровані електроди з діаметром 0,15 мм, які вводили за допомогою ін'єкційних голок на глибину 2 мм, відстань між електродами була 5 мм. Через електроди подавали імпульси тривалістю 0,2 мс прямокутної форми з частотою 100 с<sup>-1</sup> і тривалістю стимуляції та відпочинку по 500 мс. Було використано 30 стимуляційних сеансів, що склалися з 40 с стимуляції та 20 с відпочинку кожний. Подразнення проводили силою струму 1,5–2 мА. При такому патерні подразнення не відбувалася активація високопорогових м'язових аферентів груп III та IV [28]. В попередніх дослідженнях ми вивчали зміну сили ізометричного скорочення цих м'язів під час стимуляції. Встановлено, що вкінці першого сеансу стимуляції сила скорочення м'язів шиї падала на 50 %, а на 30-му сеансі вона була знижена до 70 % по відношенню до контрольного значення. Це було вагомим показником розвитку втоми м'язів (див. також [21, 33]).

*Перфузія.* Щурів 1-ї (контроль), 2-ї (через 2 год після введення електродів) та 3-ї груп (через 2 год після стимуляції) під глибоким наркозом (пентобарбітал натрію, 90 мг/кг, „Sigma”, США, 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). Головний мозок і сегменти шийного (С1–С8) відділу спинного мозку кожної тварини швидко виділяли і фіксували протягом 12 год, а потім з метою кріопротекції витримували 48 год при 4°C у 30 %-му розчині сахарози, який готувався на ФБ. На заморожувальному мікромомі були зроблені зрізи (40 мкм завтовшки), які збирали у лунки з СФБ для подальшого імуногістохімічного та гістохімічного пофарбування.

**Фос-імуногістохімія.** Виявлення Фос-ір-ядер (мічених нейронів) проводили за допомогою стандартної авідин-біотин-пероксидазної методики з використанням поліклональних кролячих антитіл, спрямованих проти ядерного білка ц-Фос („Oncogene Research”, Ab-5, США) і комерційного набору (ABC; „Vector”, РК 4001, США) [1, 11, 33]. Підрахунок Фос-ір-ядер нейронів у структурах головного і шарах спинного мозку проводили під мікроскопом, а їх локалізацію визначали за атласом [31]. Мічені нейрони ідентифікували за темно-коричневим забарвленням їх ядер.

**НАДФН-діафоразна гістохімія.** Для виявлення НАДФН-д(+)-нейронів пофарбовані на ц-Фос зрізи витримували 1 год при 37 °С у 0,1 моль/л ФБ (рН 7,3), який містив 0,3 % детергенту Triton X-100, 0,2 мг/мл нітроблакитного тетразолію та 0,5 мг/мл редукованого  $\beta$ -НАДФН („Sigma”, США) [38]. НАДФН-д(+)-нейрони ідентифікували у зрізах мозку за блакитним забарвленням їх цитоплазми та відростків.

**Статистика.** Кількість Фос-ір- та НАДФН-д(+)-нейронів підраховували у центральному (Сс), медіальному (Ме), базальному (В), базолатеральному (ВЛ), базомедіальному (ВМ) і кортикальному (Со) ядрах мигдалеподібного тіла, в

агранулярній інсулярній (АІР) і грушоподібній (Ріг) корі, опорному ядрі термінального тяжа (BSTLD), безіменній субстанції (SID), гіпоталамусі, блакитній плямі (LC), парабрахіальному ядрі (LPB/MPB) та навколводопровідній сірій речовині (РАG) білатерально у зрізах головного мозку на рівнях від -0,26 до -10,6 мм за атласом [31] та у сегментах С1–С8 (шарах 1–10 сірої речовини спинного мозку). Щоб отримати середню кількість  $\pm$  стандартна похибка середнього Фос-ір- та НАДФН-д(+)-нейронів, використовували близько 8–12 подвійно пофарбованих зрізів від досліджуваних рівнів головного та спинного мозку кожної тварини. Порівнювали середні кількості пофарбованих клітин за допомогою двопараметричного статистичного дисперсійного аналізу (ANOVA). Різниця вважалася достовірною при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ

**Експресія c-fos у спинному мозку.** У тварин контрольної групи кількість зареєстрованих Фос-ір-нейронів була незначною по всій довжині шийного відділу С1–С8 (< 3 на зріз). Однак у наркотизованих щурів із псевдостимуляцією (короткий гострий біль) або після електричної стомлюючої стимуляції м'язів (тривалий гострий біль) кількість таких нейронів у цих сегментах збільшилася після втоми в порівнянні з псевдостимуляцією. Статистично достовірне збільшення числа Фос-ір-клітин спостерігалось в шарах 1, 4 та 5 сегментів С1–С4. Однак на рівнях С5–С8 у шарі 4 спостерігався зворотний ефект. Розподіл Фос-ір-нейронів, як правило гігантських (> 20 мкм у діаметрі), був асиметричним. Більшість активованих клітин у щурів цих двох груп реєструвалася на іпсилатеральному боці. Невелику кількість мічених нейронів було виявлено також у шарах 3, 7 та 10, і зовсім незначну – в шарах 2 і 8 на боці подразнення та у латеральному цервікальному/спінальному

ядрах білатерально (рис. 1). Послідовність інтенсивності експресії *c-fos* у верхніх шийних сегментах була такою: C2>C3>C4 (рис. 2).

У шийних сегментах усіх трьох груп щурів НАДФН-д(+)-нейрони, які характеризуються специфічним блакитним пофарбу-

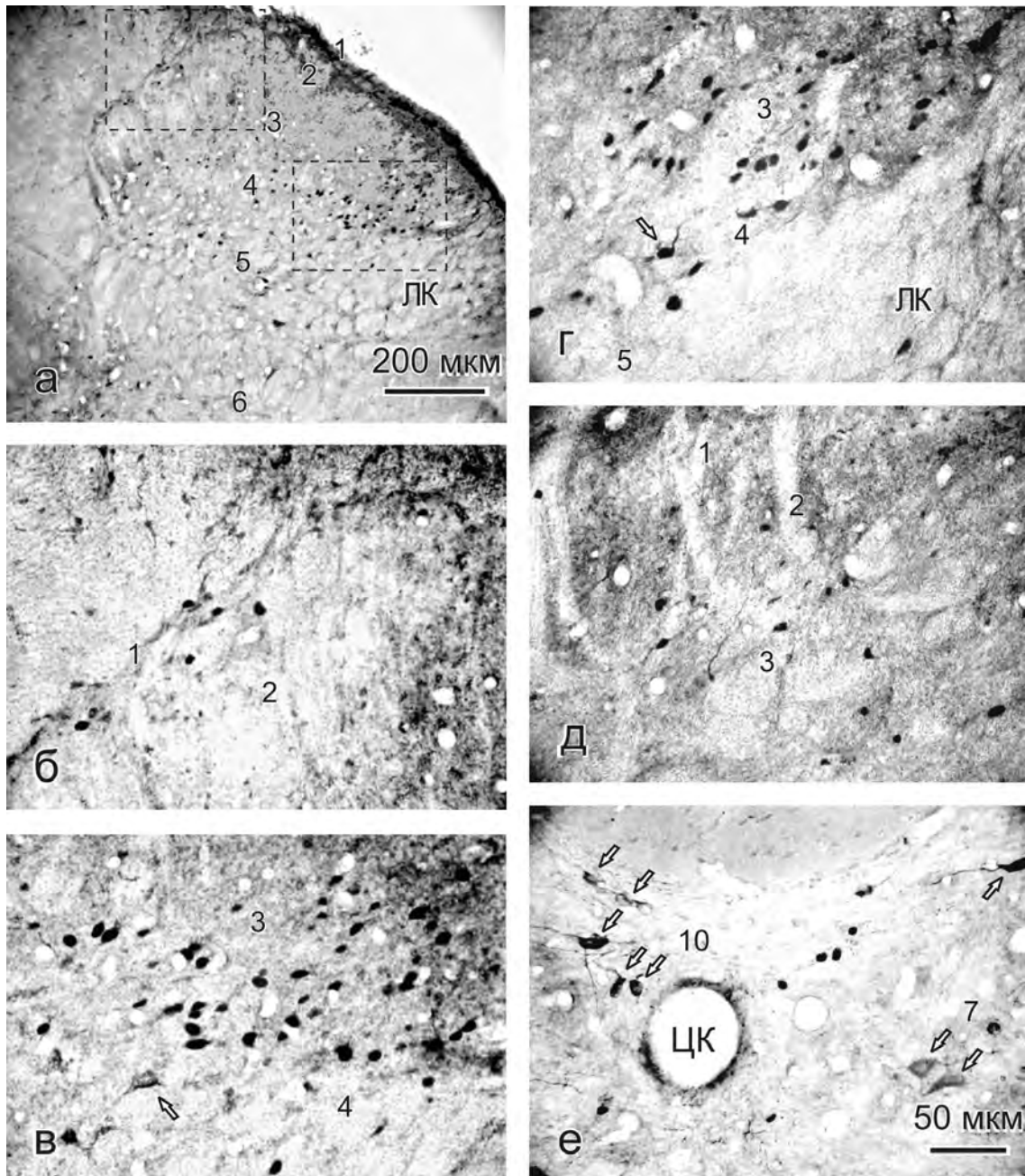


Рис. 1. Фос-імунореактивні (Фос-ір) ядра та НАДФН-діафоразо-позитивні нейрони на зрізах другого (а–в) та третього (г–е) сегментів спинного мозку щура після стомлюючої стимуляції м’язів шиї: а – розподіл мічених клітин у шарах (1–6); б, в – мічені нейрони у шарах 1 і 2 та 3 і 4 сірої речовини другого шийного сегмента при великому збільшенні (зони локалізації нейронів позначені пунктирними лініями на а); г, д, е – розподіл мічених нейронів у шарах 3 і 4, 1–3 та 10 третього шийного сегмента. Стрілки – Фос-ір-ядра, білі – НАДФН-д(+)-нейрони. ЛК – латеральний канатик, ЦК – центральний канал. Масштабна лінія на а – 200 мкм, на б–е – 50 мкм

ванням семи та відростків, були виявлені у шарах 1, 2 і 10 (< 15 мкм у діаметрі) та у шарах 4, 5 і 7 (> 25 мкм у діаметрі). "Ноцицептивні" Фос-ір-нейрони були перемішані з NO-генеруючими клітинами у дорсальному розі та зоні навколо центрального

каналу, але подвійного пофарбування нейронів нами не було виявлено. Слід відмітити наявність у сегментах С1–С3 невеликої кількості поліформних Фос-ір-ядер (можливо, ядер мікроглії) розміром менше ніж 5 мкм у діаметрі в зонах скупчення мічених нейронів.

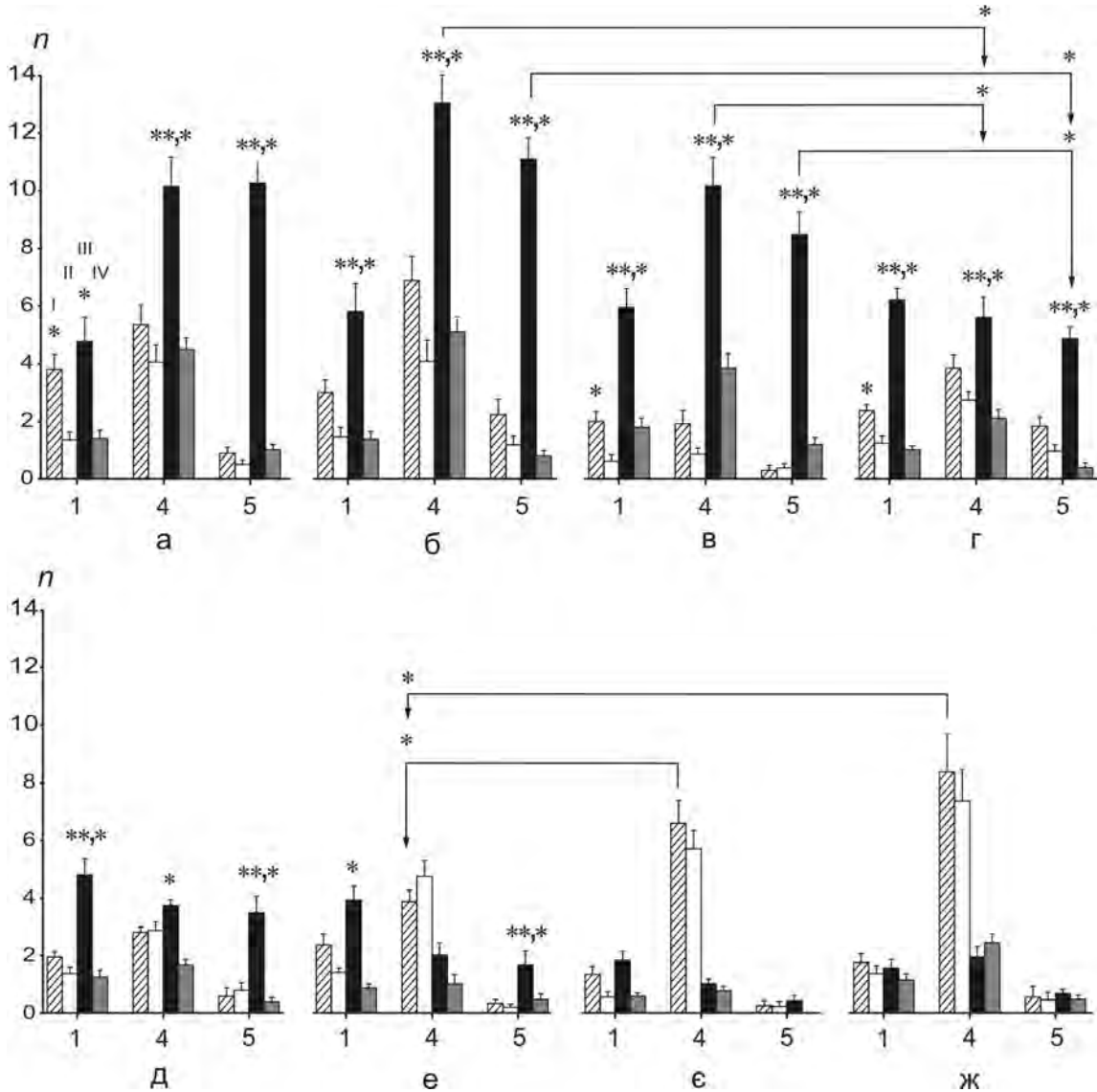


Рис. 2. Кількісний аналіз розподілу Фос-імунореактивних нейронів у шарах 1, 4 і 5 шийних сегментів спинного мозку щура: а–ж – середня кількість (n) ± похибка Фос-імунореактивних нейронів на зріз у сегментах С1–С8 відповідно. I, II – іпси- та контралатеральні боки сегментів у тварин 2-ї групи після псевдостимуляції, III, IV – 3-ї групи після стомлювальної стимуляції відповідно. Зірочки, розташовані над стрілками, означають достовірність різниці середнього числа реактивних нейронів між різними рівнями шийного відділу в одних і тих самих шарах сірої речовини спинного мозку тварин 3-ї групи. Одна зірочка над колонками, – достовірність різниці у кількості нейронів між іпси- і контралатеральним боками одного і того ж шару і рівня у щурів 2-ї та 3-ї груп, дві зірочки – достовірність різниці середнього числа реактивних нейронів між іпсилатеральними боками одного і того ж шару сірої речовини тварин 2-ї та 3-ї груп (P<0,05)

Експресія *c-fos* у ядрах стовбура та переднього мозку. У щурів 2-ї та 3-ї груп інтенсивну експресію *c-fos* було виявлено у парабрахіальному ядрі головним чином на контралатеральному боці стовбура мозку. Слід зазначити, що ця структура є важливою мішенню для висхідних проєкцій

ноцицептивних нейронів дорсального рога спинного мозку. На більш високих рівнях стовбура мозку інтенсивна експресія *c-fos* спостерігалася білатерально у блакитній плямі. Нейрони цього ядра, як відомо [36], також активуються при розвитку соматичного болю (рис. 3,ж). Експресія *c-fos* у

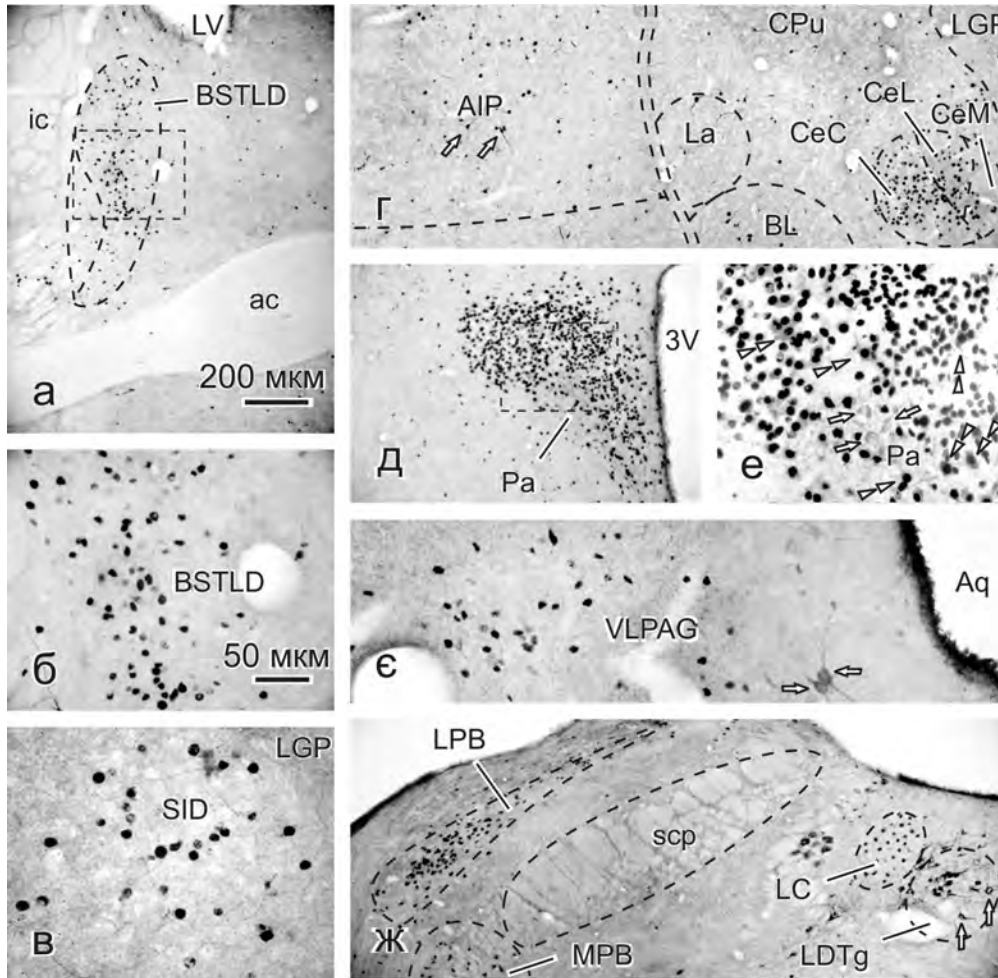


Рис. 3. Фос-імунореактивні ядра та НАДФН-діафорозо-позитивні нейрони на зрізах ядер головного мозку на контралатеральному боці після стомлюючої стимуляції м'язів шиї у щура: а-в – підкоркових, г – мигдалика, д та е – гіпоталамуса, є – навколіводопровідної сірої речовини, ж – моста. Білі стрілки вказують на НАДФН-д(+) нейрони, подвійні – на подвійно мічені клітини. Структури головного мозку: ac – передня комісура; AIP – агранулярна інсулярна кора; Aq – водопровідний канал; BL – базолатеральне ядро мигдалеподібного тіла; BSTLD – опорне ядро термінального тяжа; CPu – хвостате ядро; CeC – центральне капсулярне під'ядро; CeL – центральне латеральне під'ядро; CeM – центральне медіальне під'ядро; ic – внутрішня капсула; LA – латеральне ядро мигдалеподібного тіла; LC – блакитна пляма; LDTg – латеродорсальне ядро покришки; LGP – блідий шар, латеральна частина; LPB – латеральне парабрахіальне ядро; LV – латеральний шлуночок; MPB – медіальне парабрахіальне ядро; Pa – паравентрикулярне ядро гіпоталамуса; Pir – піриформна кора; scp – верхня ніжка мозочка; VLPAG – навколіводопровідна сіра речовина, вентролатеральна частина; 3V – 3-й шлуночок. Скорочення ядер наведено за атласом [31]. Масштабна лінія на а, г, д та ж – 200 мкм, на б, в, е та є – 50 мкм

парабрахіальному ядрі пов'язується з подальшим розвитком емоційних компонентів болю [2]. У тварин контрольної групи в медіальному ядрі мигдалеподібного тіла кількість Фос-ір-нейронів не перевищувала 25–40 одиниць на зріз, а у центральному ядрі та інших ядрах не перевищувала 10 (на досліджуваних рівнях від -2,12 мм до -3,14 мм від брегми). Велику кількість (> 100 одиниць) Фос-позитивних нейронів було зареєстровано у прилеглій до мигдалеподібного тіла агранулярній інсулярній і грушоподібній корі (див. рис. 3,г). Однак значне збільшення числа Фос-ір-нейронів у ядрах цього тіла та характерні патерни експресії *c-fos* було виявлено у щурів 2-ї і, особливо, 3-ї групи зі стомлюючою стимуляцією. М'язове стомлення призводило до підвищення Фос імунореактивності у контралатеральних центральному, медіальному

та базомедіальному ядрах. Найбільша середня кількість Фос-ір-нейронів спостерігалася у центральному капсулярному під'ядрі (CeC), ( $104,6 \pm 12,3/31,3 \pm 4,3$  (контра/іпси), на зріз;  $P < 0,05$ ) на рівні -2,56 мм, в медіальному антеродорсальному під'ядрі (MeAD), ( $84,4 \pm 13,1/39,1 \pm 2,4$  (контра/іпси);  $P < 0,05$ ) та передньому базомедіальному під'ядрі (BMA) ( $48,9 \pm 6,5/21,5 \pm 1,4$  (контра/іпси);  $P < 0,05$ ) на рівні -2,12 мм (див. рис. 3,г, 4). В інших ядрах і під'ядрах мигдалеподібного тіла достовірної різниці середньої кількості Фос-ір-нейронів, розташованих на контра- та іпсилатеральному боці мозку, або між 2-ю та 3-ю групами тварин не зареєстровано. Значне збільшення Фос-імунореактивності відмічалася в грушоподібній корі ( $199,1 \pm 4,14$  порівняно з  $144,2 \pm 3,9$  у контролі;  $P < 0,05$ ), а в агранулярній інсулярній корі вона

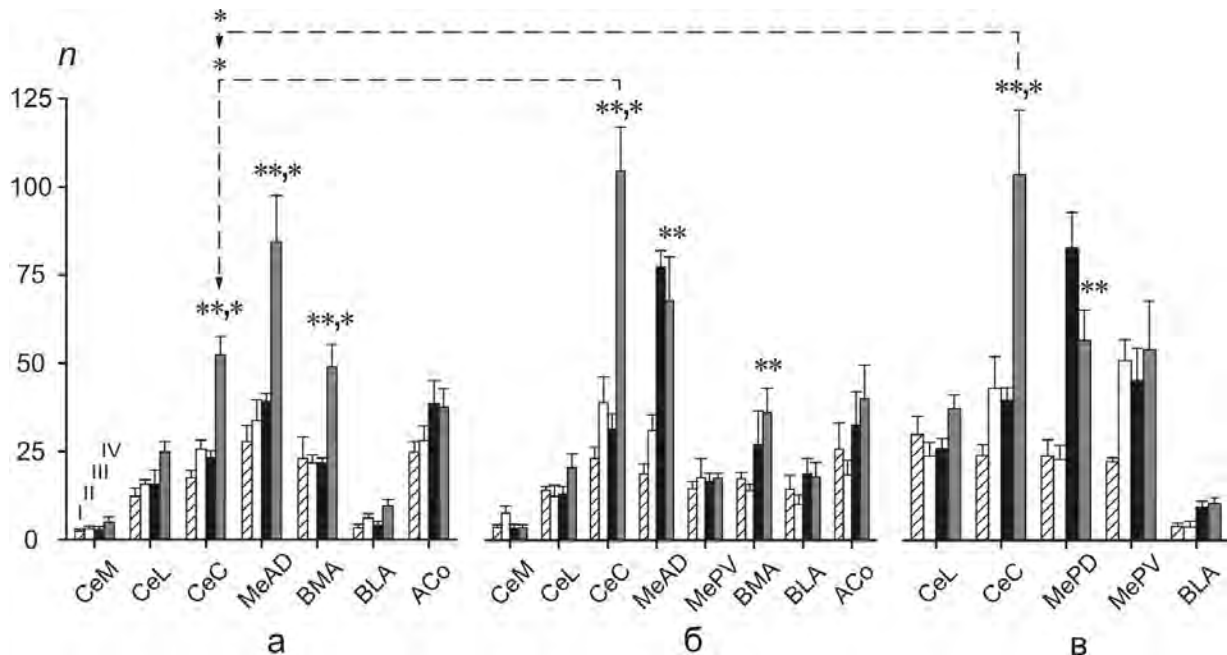


Рис. 4. Гістограми розподілу середнього числа (n) ± похибка Фос-імунореактивних нейронів на зріз у різних під'ядрах мигдалеподібного тіла: а,б,в – на рівнях -2,12, -2,56, -3,14 від брегми відповідно. I, II – іпси- та контралатеральні боки зрізів головного мозку тварин після псевдостимуляції, III, IV – після стомлюючої стимуляції відповідно. Під'ядра: АСо – передне кортикальне; BLA – базолатеральне, передня частина; BMA – базомедіальне, передня частина; CeC – центральне капсулярне; CeL – центральне латеральне; CeM – центральне медіальне; MeAD – медіальне, антеродорсальна частина; MePD – медіальне, постеродорсальна частина; MePV – медіальне, постеровентральна частина. Зірочки, розташовані над стрілочками, означають достовірність різниці числа мічених нейронів в окремому під'ядрі на контралатеральному боці між різними рівнями (тварини 3-ї групи)

залишалася на рівні контролю ( $240,9 \pm 5,1$ ). Після стомлення м'язів збільшується нейронна активність в надсегментарних структурах, які входять до інтегрованого "ноцицептивного" шляху, що послідовно включає ланцюг LPB/MPB → Pa → VLPAg (див. рис. 3,д,е,ж та таблицю). Відомо, що основними роstralними підкірковими структурами для висхідних "ноцицептивних" проєкцій від парабрахіального ядра та мигдалеподібного тіла є опорне ядро термінального тяжа і безіменна субстанція, які активуються при розвитку негативних емоційних реакцій [7]. У цих структурах ми реєстрували велику кількість Fos-ір-нейронів, головним чином на контралатеральному боці мозку (див. рис. 3,а–в, таблиця), а Fos-ір-ядра були перемішані з поодинокими НАДФН-д(+)-клітинами. Встановлено, що у шурів контрольної групи рівень експресії *c-fos* у більшості ядер гіпоталамуса та у навіоловодопровідній сірій речовині був дуже низьким, за винятком супрахіазматичного ядра (див. таблицю). Однак після псевдо- та стомлювальної стимуляції м'язів шії Fos-імунореактивність у цих підрозділах переднього та середнього мозку різко підвищувалась, особливо на контралатеральному боці. Дуже велику середню кількість Fos-ір-нейронів було зареєстровано у вентролатеральній зоні навіоловодопровідної сірої речовини, а також у паравентрикулярному, перивентрикулярному (Pe), ветромедіальному (VMH) та латеральному (LH) ядрах гіпоталамуса (див. рис. 3,д,е; таблицю). Вентральна (великоклітинна) та дорсальна (дрібноклітинна) частини паравентрикулярного ядра гіпоталамуса утримують також NO-генеруючі нейрони, причому більше ніж 50 % цих клітин подвійно пофарбовані на Fos та НАДФН-д у вентральній частині, в той час як у дорсальній частині знаходили їх менше ніж 20 % (рис. 3,д,е). Зауважимо, що в супраоптичному ядрі (SO) подвійно пофарбовані були майже всі нейрони, а в

Середня кількість Fos-імунореактивних нейронів (на зрізі) у різних структурах головного мозку шурів у контролі, з псевдостимуляцією та з 30-хвилинною стомлювальною стимуляцією м'язів шії (M±п, n = 4)

Група тварин	Структури головного мозку									
	Опорне ядро термінального тяжа, латеральне (BSTLD), -0,26 мм	Безіменна субстанція, дорсальна частина (SID), -1,3 мм	Паравентрикулярне ядро гіпоталамуса (Pa)		Вентро-медіальне ядро гіпоталамуса (VMH), -3,14 мм	Навіоловодопровідна сіра речовина, вентролатеральна ділянка (MPAG), 8,72 мм	Парабрахіальне ядро (PB), -9,30 мм	Блакитна пляма (LC), -9,68 мм		
			Переднє, -1,40 мм	Середнє, -1,80 мм					заднє, -2,12 мм	
Контроль	3,0±0,6	1,5±0,5	32,2±4,3	81,8±11,1	20,1±1,6	21,8±2,6	12,6±2,6	8,1±2,3		
Псевдостимуляція										
іпси-	40,8±5,1	16,2±2,0	154,0±25,1	245,9±26,2	20,5±1,8	22,6±1,6	59,8±9,6	39,0±8,1		
контра-	70,7±12,5***	26,1±2,9*	288,2±40,1***	447,7±23,5*	37,5±5,4*	34,4±2,4*	90,8±11,3*	44,17±9,8		
Стомлювальна стимуляція										
іпси-	25,7±3,6	21,5±2,5	78,0±7,5	471,8±43,1	23,5±5,5	82,7±3,9	70,6±9,6	53,4±7,3		
контра-	42,6±7,1*	30,0±3,4*	153,2±19,7*	705,5±70,5***	41,6±9,9*	196,3±12,7***	175,6±21,2***	96,0±13,3***		

Примітка. Латинськими літерами позначені скорочені назви структур головного мозку та їх координати в міліметрах у каудальному напрямку від брегми за атласом [31]. \*  $P < 0,05$  між контра- та іпсилатеральним боком даної структури на зрізі в одній групі тварин; \*\*  $P < 0,05$  між контралатеральними боками такої ж структури у різних груп тварин.



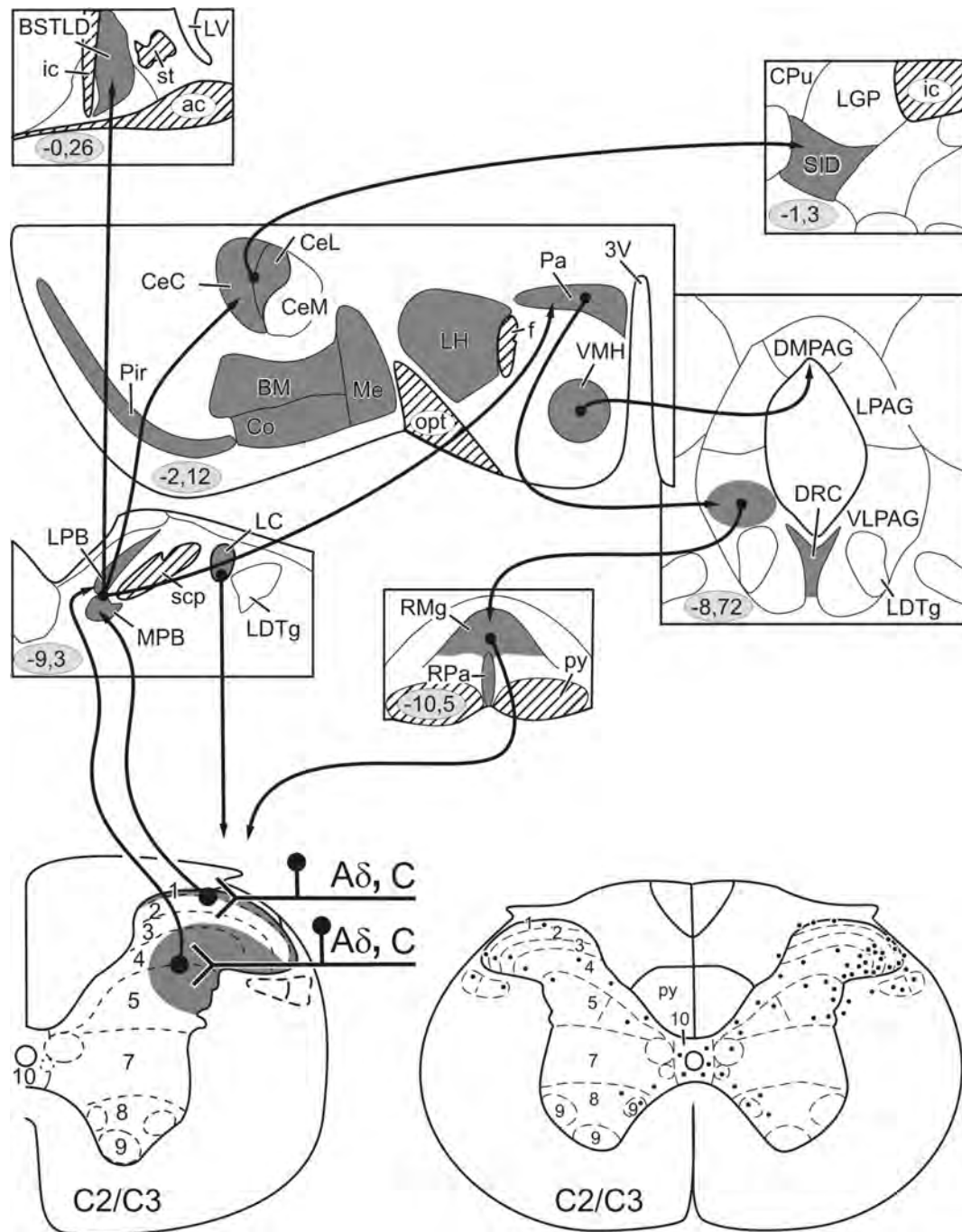


Рис. 5. Спіно-парабрахіально-лімбічний шлях і його проєкційні мішені в мозку (позначено темно-сірим кольором), де виявлено підвищення експресії *c-fos* при односторонньому розвитку стомлення дорсальних м'язів шиї у щура. Знизу праворуч – план зрізу спинного мозку на рівні другого/третього шийних сегментів з Фос-імунореактивними нейронами у шарах 1–10 сірої речовини. Провідні шляхи у мозку заштриховані. Рівні наведено за атласом [31]. Аδ і С – високопорогові м'язові аференти. Структури: ВМ – базомедіальне ядро; Со – кортикальне ядро; DMPAG – навколводопровідна сіра речовина, дорсомедіальна частина; DRC – дорсальне ядро шва; f – склепіння; LH – гіпоталамус, латеральна частина; LPAG – навколводопровідна сіра речовина, латеральна частина; Me – медіальне ядро мигдалеподібного тіла; opt – оптичний тракт; py – пірамідний тракт; RMg – велике ядро шва; RPa – біле ядро шва; st – термінальний тяж. Інші позначення як на рис. 3

перивентрикулярному ядрі гіпоталамуса – лише поодинокі клітини. При стомленні м'язів шиї ми реєстрували підвищення експресії *c-fos* також і у великому та блідому ядрах шва (RMg, RPa).

## ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У нашій моделі стомлення м'язів шиї патерни експресії *c-fos* у шийних сегментах збігаються з такими у поперекових сегментах після стомлювальної стимуляції м'язів задньої кінцівки у щура [33]. Слід зазначити, що основним центром активації в мигдалеподібному тілі при розвитку вісцерального болю у ненаркотизованих щурів є центральне капсулярне під'ядро мигдалеподібного тіла [24]. Збільшення числа публікацій за даною темою свідчать про те, що багато залежних від втоми ефектів на сегментарному або супраспінальному рівнях (модуляція моносинаптичних рефлексів, м'язовий пресорний рефлекс) викликані активацією високопорогових м'язових аферентів груп Аδ і С [6, 14, 15, 18, 32]. Центральне капсулярне під'ядро розглядається як "ноцицептивний" центр у мигдалеподібному тілі, який функціонально пов'язаний з безіменною субстанцією, опорним ядром термінального тяжа і гіпоталамусом [2, 7, 26]. Це під'ядро відіграє роль не тільки реципієнта ноцицептивної інформації, а і включається в низхідну модуляцію ноцицепції і генерацію автономних та афективних компонентів при розвитку м'язового болю через свої тісні еферентні зв'язки з іншими лімбічними структурами і гіпоталамусом [22, 23]. Про це свідчать і результати нашого дослідження експресії *c-fos* (нейронної активації) і НАДФН-д-реактивності у структурах гіпоталамуса, навколводопровідної сірої речовини і ядрах шва (рис. 5). Ці результати збігаються з уже опублікованими даними про значну активацію експресії *c-fos* у паравентрикулярному і супраоптичному

ядрах гіпоталамуса у стані розвитку м'язового стомлення або вісцерального болю [18, 35]. Велика частина цих нейронів є NO-синтазовмісними або НАДФН-д-реактивними. В останні роки в літературі підкреслюється важливе значення NO-сигналу і самих NO-синтазовмісних нейронів у центральних структурах, котрі беруть участь у формуванні емоційних, афективних і вегетативних реакцій [1, 16, 21, 29]. Нещодавно встановлено, що багато Фос-ір-нейронів у паравентрикулярному, вентромедіальному і супраоптичному ядрах гіпоталамуса можуть бути джерелами прямих низхідних проєкцій у вентролатеральну зону навколводопровідної сірої речовини [30, 37]. У нашій роботі також встановлено, що число Фос-ір-нейронів підвищується у вентролатеральній зоні навколводопровідної сірої речовини приблизно в 10 разів у порівнянні з контролем, у тварин після тривалої стимуляції м'язів шиї (див. таблицю).

Важливу роль у передачі болю відіграє латеральний перехресний спіно-таламо-кортикальний шлях. Він пов'язується з передачею сенсорної інформації при розвитку гострого болю і, таким чином, може відігравати важливу роль у сенсорній дискримінації болю [7, 13, 18, 34, 37]. Слід зазначити, що ноцицептивна інформація передається також по перехресному лімбічному шляху від спинного мозку до різних центрів стовбура та кори головного мозку через парабрахіальне ядро [7, 13]. Відомо, що спінальні нейрони, які локалізуються в ретикулярній ділянці дорсального та у медіальній частині вентрального рога, є джерелами прямих перехресних і неперехресних висхідних шляхів до гіпоталамуса, вентрального стріатума, мигдалеподібного тіла, безіменної субстанції, а також до орбітальної кори мозку [3, 10, 27]. Спінальні нейрони, які зареєстровані в глибоких шарах дорсального рога (3–5) і ділянці навколо центрального каналу (див. рис. 5), можуть бути джерелами більш дифузних висхідних

проекцій до структур переднього мозку, які входять у систему висхідного лімбічного шляху.

Таким чином, використання методу імуногістохімічного виявлення білка ц-Фос та НАДФН-д гістохімії є дуже ефективним для виявлення спінальних і супраспінальних структур, що беруть участь в організації не тільки висхідних ноцицептивних, але й низхідних антиноцицептивних шляхів і функціональної інтеграції деяких структур мозку в цих шляхах.

Роботу виконано за підтримки гранту „Молекулярні основи функціонування геному” НАН України

**O.V. Vlasenko, V.A. Maisky, A.V. Maznychenko, A.I. Pilyavskii, V.M. Moroz**

#### **INVESTIGATION OF *c-fos* EXPRESSION AND NADPH-DIAPHORASE REACTIVITY IN CERVICAL CORD AND BRAIN AFTER FATIGUING STIMULATION OF THE NECK MUSCLES IN THE RAT**

The distribution of *c-fos* expression as a marker of neuronal activation and NADPH-diaphorase reactivity were examined in the cervical spinal cord, limbic structures and hypothalamus in anaesthetized rats after fatigue induced by intermittent high-rate ( $100 \text{ s}^{-1}$ ) electrical stimulation of the dorsal neck muscles (*mm. trapezius and splenius*). In comparison to the control or sham-stimulated animals fatiguing stimulation induced significant increase in ipsilaterally in the C1–C4 spinal segments and the contralateral central (Ce), medial (Me) nuclei, paraventricular nucleus of hypothalamus (Pa) and ventrolateral periaqueductal gray (VLPAG). In spinal cord the highest mean number of Fos-immunoreactive (Fos-ir) neurons per section was found in layers 1, 4 and 5 ( $5.8 \pm 0.9$ ,  $13.1 \pm 0.9$  and  $11.1 \pm 0.7$ ,  $P < 0.05$ ) of the dorsal horn. The order of intensity of *c-fos* expression in different regions of the brain was as following sequence: Pa > VLPAG > Ce ( $447.7 \pm 23.5$ ,  $196.3 \pm 12.7$ ,  $104.6 \pm 12.3$ , respectively). About 50 % of double-labeled (Fos-ir and NADPH-diaphorase reactive) cells were found in Pa nucleus. Received data show that limbic structures, hypothalamus and VLPAG are involved in activation after neck muscle fatigue and might contribute to nociceptive processing and generation of the autonomic and affective components of the muscle pain.

*M.I. Pirogov National Medical University, Vinnitsa, Ukraine;*

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Майський В.О., Пілявський О.І., Мазниченко А.В. та ін. Центральні нейронні ланцюги рефлексу Бецольда–Яріша у щурів // Фізіол. журн. – 2005. – **51**, №2. – С. 24–38.
2. Bernard J.F., Bester H., Besson J.M. Involvement of the spino-parabrachio-amygdaloid and -hypothalamic pathways in the autonomic and affective emotional aspects of pain // Prog. Brain Res. – 1996. – **107**. – P. 243–255.
3. Burstein R., Potrebic S. Retrograde labeling of neurons in the spinal cord that project directly to the amygdala or the orbital cortex in the rat // J. Comp. Neurol. – 1993. – **335**. – P. 469–485.
4. Darques J.L., Jammes Y. Fatigue-induced changes in group IV muscle afferent activity: differences between high- and low-frequency electrically induced fatigues // Brain Res. – 1997. – **750**. – P. 147–154.
5. Ervilha U.F., Farina D., Arendt-Nielsen L., Graven-Nielsen T. Experimental muscle pain changes motor control strategies in dynamic contractions // Exp. Brain Res. – 2005. – **164**. – P. 215–224.
6. Gandevia S.C. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue // Physiol. Rev. – 2001. – **81**. – P. 1725–1789.
7. Gauriau, C., Bernard, J.F. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat // Exp. Physiol. – 2002. – **87**. – P. 251–258.
8. Giesler G.J., Katter J.T., Dado R.J. Direct spinal pathways to the limbic system for nociceptive information // Trends Neurosci. – 1994. – **17**. – P. 244–250.
9. Guimaraes F.S., Beijamini V., Moreira F.A. et al. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions // Neurosci. Biobehav. Rev. – 2005. – **29**. – P. 1313–1322.
10. Govsa F., Kayalioglu 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.
11. 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.
12. 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.
13. Jasmin L., Burkey A.R., Card J.P., Basbaum A.I. Transneuronal labeling of a nociceptive pathway, the spino-(trigemino-)parabrachio-amygdaloid, in the rat // J. Neurosci. – 1997. – **17**. – P. 3751–3765.
14. Kalezić I., Pilyavskii A.I., Maisky V.A. et al. Distinctive pattern of *c-fos* expression in the feline cervico-lumbar spinal cord after stimulation of vanilloid receptors in dorsal neck muscles // Neurosci. Lett. – 2004. – **364**. – P. 94–97.
15. Kaufman M.P., Iwamoto G.A., Longhurst J.C.,

- Mitchell J.H. Effects of capsaicin and bradykinin on afferent fibers with ending in skeletal muscle // *Circulat. Res.* – 1982. – **50**. – P. 133–139.
16. Krukoff T.L. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions // *Brain Res. Rev.* – 1999. – **30**. – P. 52–65.
  17. Korotkov A., Radovanovic S., Ljubisavljevic M. et al. Comparison of brain activation after sustained non-fatiguing and fatiguing muscle contraction: a positron emission tomography study // *Exp. Brain Res.* – 2005. – **163**. – P. 65–74.
  18. Li J., Hand G.A., Potts J.T., Jere H. Mitchell Identification of hypothalamic vasopressin and oxytocin neurons activated during the exercise pressor reflex in cats // *Brain Res.* – 1997. – **752**. – P. 45–51.
  19. Liu J.Z., Shan Z.Y., Zhang L.D. et al. Human brain activation during sustained and intermittent submaximal fatigue muscle contractions: an fMRI study // *J. Neurophysiol.* – 2003. – **90**. – P. 300–312.
  20. Maisky V.A., Datsenko V.V., Moibenko A.A. et al. NO-generating neurons in the medullary cardiovascular centers of rodents and carnivores // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2003. – **136**. – P. 605–612.
  21. Maisky V.A., Pilyavskii A.I., Kalezic I. et al. NADPH-diaphorase activity and *c-fos* expression in medullary neurons after fatiguing stimulation of hindlimb muscles in the rat // *Auton. Neurosci.: Basic and Clinical.* – 2002. – **101**. – P. 1–12.
  22. Manning B.H., Martin W.J., Meng I.D. The rodent amygdala contributes to the production of cannabinoid-induced antinociception // *Neuroscience.* – 2003. – **120**. – P. 1157–1170.
  23. Millan M.J. Descending control of pain // *Prog. Neurobiol.* 2002. – **66**. – P. 355–474.
  24. Nakagawa T., Katsuya A., Tanimoto S. et al. Differential patterns of *c-fos* mRNA expression in the amygdaloid nuclei induced by chemical somatic and visceral noxious stimuli in rats // *Neurosci. Lett.* – 2003. – **344**. – P. 197–200.
  25. Neugebauer V., Li W. Processing of nociceptive mechanical and thermal information in central amygdala neurons with knee-joint input // *J. Neurophysiol.* – 2002. – **87**. – P. 103–112.
  26. Neugebauer V., Li W., Bird G.C., Han J.S. The amygdala and persistent pain // *Neuroscientist.* – 2004. – **10**. – P. 221–234.
  27. Newman H.M., Stevens R.T., Apkarian A.V. Direct spinal projections to limbic and striatal areas: anterograde transport studies from the upper cervical spinal cord and the cervical enlargement in squirrel monkey and rat // *J. Comp. Neurol.* – 1996. – **365**. – P. 640–658.
  28. Nogushi E., Ohsawa H., Kobayashi S. et al. The effect of electro-acupuncture stimulation on the muscle blood flow of the hindlimb in anaesthetised rats // *J. Auton. Nerv. Syst.* – 1999. – **75**. – P. 78–86.
  29. Okere C.O., Kaba H., Higuchi T. Importance of endogenous nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and amygdala in mediating the response to capsaicin // *J. Comp. Neurol.* – 2000. – **423**. – P. 670–686.
  30. Parry D.M., Semenenko F.M., Conley R.K., Lumb B.M. Noxious somatic inputs to hypothalamic-mid-brain projection neurones: a comparison of the columnar organisation of somatic and visceral inputs to the periaqueductal grey in the rat // *Exp. Physiol.* – 2002. – **87**. – P. 117–122.
  31. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* – San Diego: Acad. Press, 1997.
  32. 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.* – 1999. – **515**. – P. 599–607.
  33. 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.
  34. Price D.D. Central neural mechanisms that interrelate sensory and affective dimensions of pain // *Mol. Interv.* – 2002. – **2**. – P. 392–403.
  35. Rodella L., Rezzani R., Gioia M., Tredici G., Bianchi R. Expression of Fos immunoreactivity in the rat supraspinal regions following noxious visceral stimulation // *Brain Res. Bull.* – 1998. – **47**. – P. 357–366.
  36. Smith D.W., Day T.A. *c-fos* expression in hypothalamic neurosecretory and brainstem catecholamine cells following noxious somatic stimuli // *Neuroscience.* – 1994. – **58**. – P. 765–775.
  37. Snowball R.K., Semenenko F.M., Lumb B.M. Visceral inputs to neurons in the anterior hypothalamus including those that project to the periaqueductal gray: a functional anatomical and electrophysiological study // *Neuroscience.* – 2000. – **99**. – P. 351–361.
  38. Vincent S.R., Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain // *Neuroscience.* – 1992. – **46**. – P. 755–784.