

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

## Посилення *c-fos*-експресії у спинному мозку, ініційоване сигналами стомлених скелетних м'язів

*Иммуногистохимические исследования экспрессии онкогена c-fos в поясничных и шейных отделах спинного мозга после усталостной стимуляции триглавой мышцы голени (m. gastrocnemius-soleus) или мышц шеи (m. trapezius и m. splenius) были проведены на анестезированных хлоралгидратом (400 мг/кг) крысах. Паттерны распределения Fos-иммунореактивных нейронов в сером веществе спинного мозга сегментов L4 и L5, а также C2 и C3 были однотипными. Наибольшее количество меченых клеток было зарегистрировано в дорсальном роге в первом, четвертом и пятом слоях серого вещества, т.е. зонах окончаний немиелинизированных высокопороговых мышечных афферентов групп III и IV. Предполагается, что высвобождение и накопление метаболитов, зависящих от усталости, в мышце вызывает активацию таких афферентов, а сигналы, поступающие в спинной мозг от усталой мышцы, активируют пресинаптический механизм торможения передачи информации от мышечных веретен к мотонейронам, что приводит к уменьшению интенсивности моторного контроля. Этот механизм является существенным для ограничения силы сокращения мышц и предотвращения повреждения мышц при чрезмерной физической нагрузке.*

### ВСТУП

Скелетні м'язи мають великі енергетичні резерви для здійснення тривалих скорочень, але надмірні фізичні навантаження призводять до зменшення сили скорочень і розвитку втоми. Існує декілька припущень щодо механізмів, задіяних у розвитку м'язової втоми. Їх можна розділити на периферійні, які пов'язані з м'язовою тканиною, та центральні механізми – за участю центральної нервової системи.

Професор Серков П. М. у 1949 р. [1] у порівняльних дослідженнях показав, що значне зменшення сили скорочень усього м'яза настає раніше, ніж окремого волокна. У цьому разі функція всього м'яза повністю відновлювалася після закінчення подразнень. Він довів, що стомлення м'яза не супроводжується повним виснаженням енергетичних речовин, а відбувається внаслідок накопичення у ньому шкідливих

продуктів обміну речовин. Пізніше було з'ясовано, що вивільнення та накопичення у м'язі таких нейропептидів, як речовина Р, кальцитонінгензв'язаний пептид, соматостатин, брадикінін, а також іонів  $K^+$  та  $H^+$ , оксиду азоту, зміни рН тощо [4, 10] мають велике значення у збудженні “вільних” нервових закінчень, розташованих у міжклітинній рідині [3]. Такий периферійний механізм відіграє важливу роль також і у розвитку втоми в цілому організмі [14]. Однак ще Сеченов І. М. припускав ключову роль центральної нервової системи у розвитку втоми м'язів [2]. Сучасні дослідження свідчать про те, що сигнали, які генеруються у немієлінізованих “вільних” закінченнях, надходять у ЦНС, інформуючи нервову систему про інтенсивність стомлення, та зумовлюють генерацію відповідних захисних реакцій [6, 17]. Нещодавно було встановлено, що інформація, яка надходила до спинного мозку при стом-

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

ленні м'язів, викликала посилення пресинаптичного гальмування Ia-аферентів і зменшення активності мотонейронів [12].

В останні роки центральні процеси, причетні до розвитку втоми, досліджуються за допомогою імуногістохімічних методів. Особливо ефективними для реєстрації активованих нейронів, задіяних у виконанні різних фізіологічних процесів, є виявлення *c-Fos* білка – продукту активації раннього онкогена *c-fos* [5, 7, 11].

Метою нашої роботи було порівняльне вивчення пошарового розподілу спінальних нейронів, активованих при стомлювальній стимуляції м'язів нижньої кінцівки та шиї, що виконують статичні та фазні скорочення відповідно.

## МЕТОДИКА

Усі експерименти проведено згідно з Європейською директивою ради громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС). Досліджували наркотизованих хлоралгідратом („Sigma”, США, 400 мг/кг, внутрішньо-очеревино) інтактних щурів і тварин після прямого електричного стомлювального подразнення триголового м'яза литки (mm. gastrocnemius-soleus) або м'язів шиї (m. trapezius та m. splenius). Така стимуляція викликала спад початкової м'язової активності до 30 %. Через 2 год після початку подразнення м'язів проводили перфузію тварин з наступним виділенням шийних (C1–C8) і поперекових (L1–L7) відділів спинного мозку. Для кріопротекції виділені сегменти витримували протягом 48 год при + 4 °C у 30%-му розчині сахарози. Фронтальні зрізи спинного мозку (40 мкм завтовшки) збирали у лунки для подальшого імуногістохімічного фарбування. Виявлення Фос-імунореактивних (Фос-ір)-ядер проводили за допомогою стандартної авідин-біотин-пероксидазної методики з використанням поліклональних кролячих антитіл, спрямованих проти ядерного білка

*c-Fos* („Oncogene Research”, Ab-5, США) і комерційного набору (ABC; „Vector”, PK 4001, США) [11, 19]. Підрахунок Фос-ір-ядер нейронів у зрізах спинного мозку проводили під мікроскопом, а їх локалізацію визначали за атласом [18]. Мічені нейрони ідентифікували за темно-коричневим забарвленням їх ядер. Щоб отримати середню кількість  $\pm$  стандартна похибка середнього Фос-ір-нейронів, використовували близько 8–12 зафарбованих зрізів від досліджуваних сегментів спинного мозку кожної тварини. Порівнювали середні кількості зафарбованих клітин за допомогою двопараметричного дисперсійного аналізу (ANOVA). Різниця вважалася достовірною при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Кількість Фос-ір-ядер (мічених нейронів) у спинному мозку контрольних тварин була незначною (1–2 клітини на зріз), однак після стомлення м'язів вона значно збільшувалася. На рис. 1 видно Фос-ір-ядра після односторонньої прямої стимуляції литкових (рис. 1, а, в) або шийних (рис. 1, б, г, д) м'язів. Найбільш інтенсивну *c-fos*-експресію відмічали в поперекових (L4 і L5) і шийних (C2 і C3) сегментах. Імунореактивні клітини реєстрували головним чином на іпсилатеральному боці сегментів (рис. 2). Мічені нейрони переважно були локалізовані в дорсальній частині сірої речовини і невелика їх кількість у вентральному розі сегментів. Треба відмітити значне скупчення Фос-ір-нейронів у першому, четвертому та п'ятому шарах поперекових ( $21,0 \pm 2,4$ ,  $13,2 \pm 1,0$  та  $43,7 \pm 1,9$  відповідно,  $P < 0,05$ ) і шийних сегментів ( $5,78 \pm 0,9$ ,  $13,05 \pm 0,9$  та  $11,1 \pm 0,7$ , відповідно,  $P < 0,05$ ). Просторовий розподіл мічених клітин у зазначених шарах був не однаковим. Відмічалася помітне скупчення Фос-ір-ядер у центральній частині першого, четвертого та латеральної ретикулярної зони п'ятого шару.

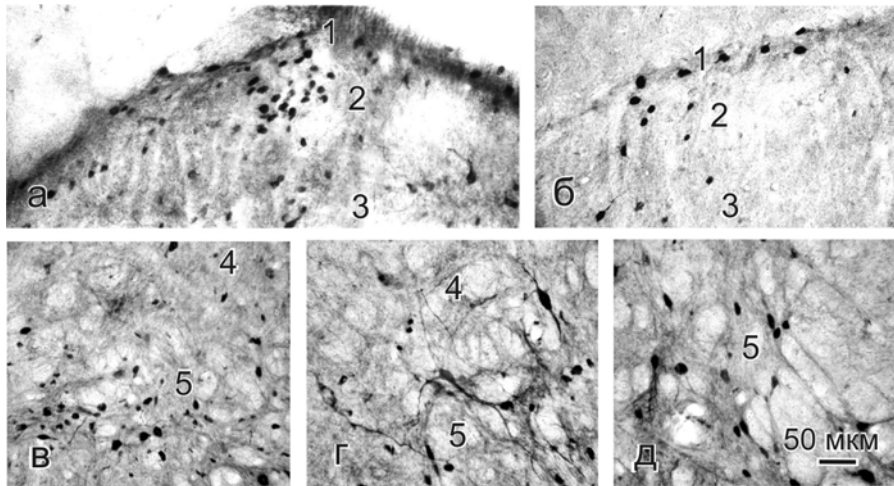


Рис. 1. Фос-імунореактивні (Фос-ір) нейрони на зрізах (40 мкм) четвертого поперекового L4 (а, в) і третього шийного C3 (б, г та д) сегментів спинного мозку щура після стомлювальної електричної стимуляції триголового м'яза литки (*mm. gastrocnemius-soleus*) та м'язів шиї (*m. trapezius* та *m. splenius*) відповідно: а, б – мічені клітини у 1-му – 3-му шарах; в–д – мічені нейрони у 4-му і 5-му шарах сірої речовини спинного мозку

Доведено, що постульовані професором Серковим П. М. (1949) постактиваційні зміни в концентрації метаболітів у міжклітинній рідині в дослідженнях *in vitro*, є важливим чинником розвитку втоми [14]. Отримані нами результати демонструють,

що стомлювальна стимуляція м'язів шиї та нижньої кінцівки призводить до значного збільшення кількості Фос-ір-нейронів на іпсилатеральному боці відповідних сегментів спинного мозку. Фосімунореактивність рееструвалася в поверхневих шарах та

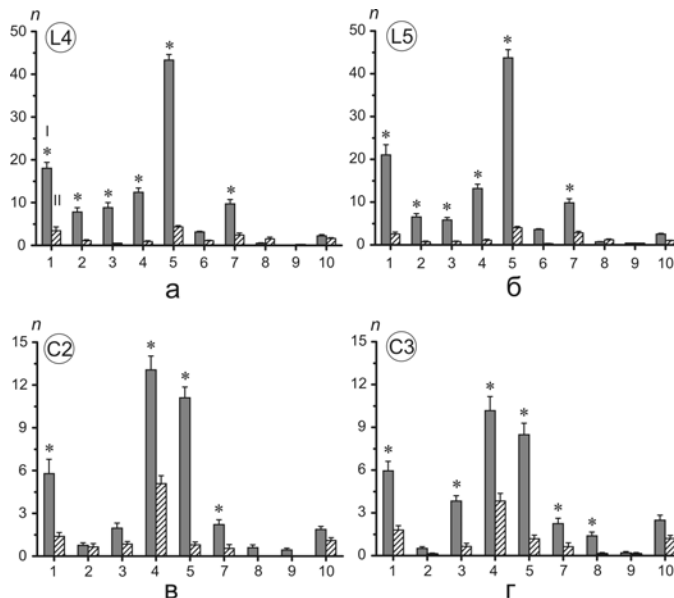


Рис. 2. Кількісний аналіз розподілу Фос-імунореактивних нейронів у шарах сірої речовини (1–10) спинного мозку щура: а, б та в, г – середня кількість (n) ± стандартна похибка середнього Фос-імунореактивних нейронів на зріз у поперекових сегментах L4 і L5 після електричної стимуляції триголового м'яза литки (*mm. gastrocnemius-soleus*) та шийних C2 і C3 після електричної стимуляції м'язів шиї (*m. trapezius* та *m. splenius*) відповідно. I, II – іпси- та контралатеральні боки сегментів. Зірочки, розташовані над колонками, означають достовірність різниці у кількості нейронів між іпси- і контралатеральним боком одного й того самого шару сірої речовини ( $P < 0,05$ )

шийці дорсального рога, в яких закінчуються високопорогові (ноцицептивні) шкірні та м'язові аференти [8, 9]. Велика скупченість активованих нейронів у першому та п'ятому шарах [19] після втоми м'язів збігається з розташуванням нейронів активованих капсаїцинчутливими м'язовими [20] та соматичними больовими аферентами [15, 21].

Таким чином, імуногістохімічні дослідження *c-fos*-експресії у поперекових і шийних сегментах спинного мозку після прямої стомлювальної стимуляції скелетних м'язів, що були проведені на анестезованих щурах, виявили однотипні патерни розподілу Фос-ір-нейронів у сірій речовині відповідних сегментів спинного мозку. Дані про розподіл активних нейронів свідчать про участь сегментарних механізмів у формуванні захисних реакцій у відповідь на сигналізацію від стомлених м'язів і відповідають змісту крилатого вислову "мудрість м'яза" [16]. Передбачається, що вивільнення та накопичення метаболітів залежних від втоми призводить до активації м'язових аферентів груп III та IV. Надходження у спинний мозок сигналів високопорогових м'язових аферентів активує пресинаптичний механізм гальмування передачі інформації від м'язових веретен і зумовлює зменшення частоти розряду мотонейронів [12, 13]. Цей механізм є істотним для обмеження сили скорочення м'язів та запобігання пошкодження м'язів при надмірному фізичному навантаженні.

*Роботу виконано за підтримки гранту „Молекулярні основи функціонування геному (2007-2008)” НАН України.*

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

#### **POTENTIATION OF *c-fos* EXPRESSION IN THE SPINAL CORD INITIATED BY THE SIGNALS FROM FATIGUE SKELETAL MUSCLES**

Immunohistochemical studies of *c-fos* expression in the lumbar and neck segments of spinal cord after fatiguing stimulation of

the mm. gastrocnemius-soleus or m. trapezius and m. splenius, were carried out on the anaesthetized (chloral-hydrate 400 mg/kg, i.p.) rats. The patterns of the Fos-immunoreactive neurons distribution in the grey matter of spinal cord in the L4 and L5 segments, as well as the C2 and C3 were similar. The highest number of marked cells was registered in the dorsal horn in the first, fourth and fifth layers of grey matter, i.e. within the areas of termination of high-threshold muscle afferents of group III and IV. It is assumed, that the types of afferents could be activated by muscle fatigue-induced metabolites. The signals incoming to the spinal cord could be involved into the presynaptic inhibition of muscle spindle volleys than resulted in the impairment of motor output performance. This mechanism is substantial for limitation of the force of muscles contraction and prevention the injury of the muscles under the excessive physical loading.

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

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Серков Ф.Н. Утомление изолированного мышечного волокна // Физиол. журн. СССР – 1949. – XXXV, №1. – С. 53–63.
2. Сеченов И.М. К вопросу о влиянии раздражения чувствующих нервов на мышечную работу человека. – В кн. Сеченов И.М. Избр. Сочинения. – 1. – М., 1953.
3. Abrahams V.C. Group III and IV receptors of skeletal muscle // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1986. – 64. – P. 509–514.
4. Alberts B., Bray D., Lewis J. et al. (eds). Molecular biology of the cell, 3rd edn. – New York: Garland, 1994.
5. Coggeshall R.E. Fos, nociception and the dorsal horn // Prog. Neurobiol. – 2005. – 77. – P. 299–352.
6. Gandevia S.C. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue // Physiol. Rev. – 2001. – 81. – P. 1725–1789.
7. Herdegen T., Leah J.D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins // Brain Res. Brain Res. Rev. – 1998. – 28. – P. 370–490.
8. Hoheisel U., Mense S. Long-term changes in discharge behaviour of cat dorsal horn neurones following noxious stimulation of deep tissues // Pain. – 1989. – 36. – P. 239–247.
9. Hoheisel U., Mense S. Response behaviour of cat dorsal horn neurones receiving input from skeletal muscle and other deep somatic tissues // J. Physiol. – 1990. – 426. – P. 265–280.
10. Hokfelt T., Rehfeld J.F., Skirboll L. et al. Evidence for coexistence of dopamine and CCK in meso-limbic neurones // Nature. – 1980. – 285. – P. 476–478.
11. Hsu S.-M., Raine L., Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase tech-

- niques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures // *J. Histochem. Cytochem.* – 1981. – **29**. – P. 577–580.
12. Kalezic I., Bugaychenko L.A., Kostyukov A.I. et al. Fatigue-related depression of the feline monosynaptic gastrocnemius-soleus reflex // *J. Physiol. (Lond.)*. – 2004. – **556**. – P. 283–296.
  13. Kostyukov A.I., Bugaychenko L.A., Kalezic I. et al. Effects in feline gastrocnemius-soleus motoneurons induced by muscle fatigue // *Exp. Brain Res.* – 2005. – **163**. – P. 284–294.
  14. Kostyukov A.I., Kalezic I., Serenko S.G., et al. Spreading of fatigue-related effects from active to inactive parts in the medial gastrocnemius muscle of the cat // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2002. – **86**. – P. 295–307.
  15. Lanteri-Minet M., de Pommery J., Herdegen T. et al. Differential time course and spatial expression of Fos, Jun, and Krox-24 proteins in spinal cord of rats undergoing subacute or chronic somatic inflammation // *J. Comp. Neurol.* – 1993. – **333**. – P. 223–235.
  16. Marsden C.D., Meadows J.C., Merton P.A. “Muscular wisdom” that minimizes fatigue during prolonged effort in man: peak rates of motoneuron discharge and slowing of discharge during fatigue // *Adv. Neurol.* – 1983. – **39**. – P. 169–211.
  17. Mense S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain // *Pain.* – 1993. – **54**. – P. 241–289.
  18. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* – San Diego: Acad. Press, 1997.
  19. 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.
  20. Pilyavskii A.I., Maznychenko A.V., Maisky V.A. et al. Capsaicin-induced effects on *c-fos* expression and NADPH-diaphorase activity in the feline spinal cord // *Eur. J. Pharmacol.* – 2005. – **521**. – P. 70–78.
  21. Williams C.A., Loyd S.D., Hampton T.A., Hoover D.B. Expression of *c-fos*-like immunoreactivity in the feline brainstem in response to isometric muscle contraction and baroreceptor reflex changes in arterial pressure // *Brain Res.* – 2000. – **852**. – P. 424–435.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*  
*E-mail: pil@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до*  
*редакції 24.06.2008*