

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^{-1}) электрическим раздражением дорсальных мышц шеи (*тт. trapezius-splenius*). По сравнению с контролем или ложной стимуляцией, усталостные сокращения мышц вызывали значительное увеличение экспрессии *c-fos* инспираторально в сегментах C1–C4 и контрапатерально в центральном (Ce) и медиальном ядрах миндалины, паравентрикулярном ядре гипоталамуса (Pa) и вентролатеральном отделе околоводопроводного 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 ($5,8 \pm 0,9$; $13,1 \pm 0,9$ и $11,1 \pm 0,7$, соответственно). Сравнение среднего числа нейронов Фос-ир в различных зонах головного мозга выявило следующую последовательность: Pa > VLPAG > Ce ($447,7 \pm 23,5$; $196,3 \pm 12,7$; $104,6 \pm 12,3$ 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, порушеннем 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-мигдалікоподібного тіла

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 Аδ і С [4]. Однак у стані тривалого і глибокого м'язового або вісцерального болю подальший розвиток антиноцицепції і серцево-судинних реакцій (зниження симпатичного тонусу) пояснюють активацією NO-сінтазовмісних (НАДФН-діафоразо-позитивних (НАДФН-д(+))-нейронів паравентрикулярного ядра гіпоталамуса (Ра) та вентролатеральної зони навколоводопровідної сірії речовини (VLPAG) [37].

Метою нашого дослідження було вивчити зміни активації нейронів спинного та головного мозку щурів у відповідь на тривале скорочення дорсальних м'язів ший, які викликані прямим електричним подразненням. Ale 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 ін tactні тварини (n=4); до 2-ї – тварини з псевдостимуляцією коли електроди були введені у м'язи ший, але електричну стимуляцію не проводили (n=4); до 3-ї групи – тварини, яким проводили унілатеральну (праворуч) електричну стимуляцію м'язів ший (*m. trapezius* і *m. splenius*) (n=4). Усі експерименти було виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/EEC).

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⁻¹ і тривалістю стимуляції та відпочинку по 500 мс. Було використано 30 стимуляційних сеансів, що складалися 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 ший 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 інtrakардіально через

висхідну аорту спочатку сольовим фосфатним буфером (СФБ), який містив 0,2 % нітрату 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 (C1–C8) 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 мікротомі були зроблені зрізи (40 мкм завтовшки), які збиралі у лунки з СФБ для подальшого імуногістохімічного та гістохімічного пофарбування.

Фос-імуногістохімія. Виявлення Фос-ір-ядер (міченіх нейронів) проводили за допомогою стандартної авідин-біотин-пероксидазної методики з використанням поліклональних кролячих антитіл, спрямованих проти ядерного білка ц-Фос („Onco-gene Research”, Ab-5, США) і комерційного набору (ABC; „Vector”, PK 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 °C 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 β-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 (Ce), медіальному (Me), базальному (B), базолатеральному (BL), базомедіальному (BM) і кортикалальному (Co) ядрах мигдалеподібного тіла, в

агранулярній інсулярній (AIP) і грушоподібній (Pir) корі, опорному ядрі термінального тяжа (BSTLD), безіменній субстанції (SID), гіпоталамусі, блакитній плямі (LC), парабрахіальному ядрі (LPB/MPB) та навколоводопровідній сірій речовині (PAG) білатерально у зрізах головного мозку на рівнях від -0,26 до -10,6 мм за атласом [31] та у сегментах C1–C8 (шарах 1–10 сірої речовини спинного мозку). Щоб отримати середню кількість ± 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 C1–C8 (< 3 на зріз). Однак у наркотизованих щурів із псевдоствимуляцією (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 псевдоствимуляцією. Статистично достовірне збільшення числа Фос-ір-клітин спостерігалося в шарах 1, 4 та 5 сегментів C1–C4. Однак на рівнях C5–C8 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 іпсолатеральному боці. Невелику кількість міченіх 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 шурів НАДФН-д(+)-нейрони, які характеризуються специфічним блакитним пофарбу-

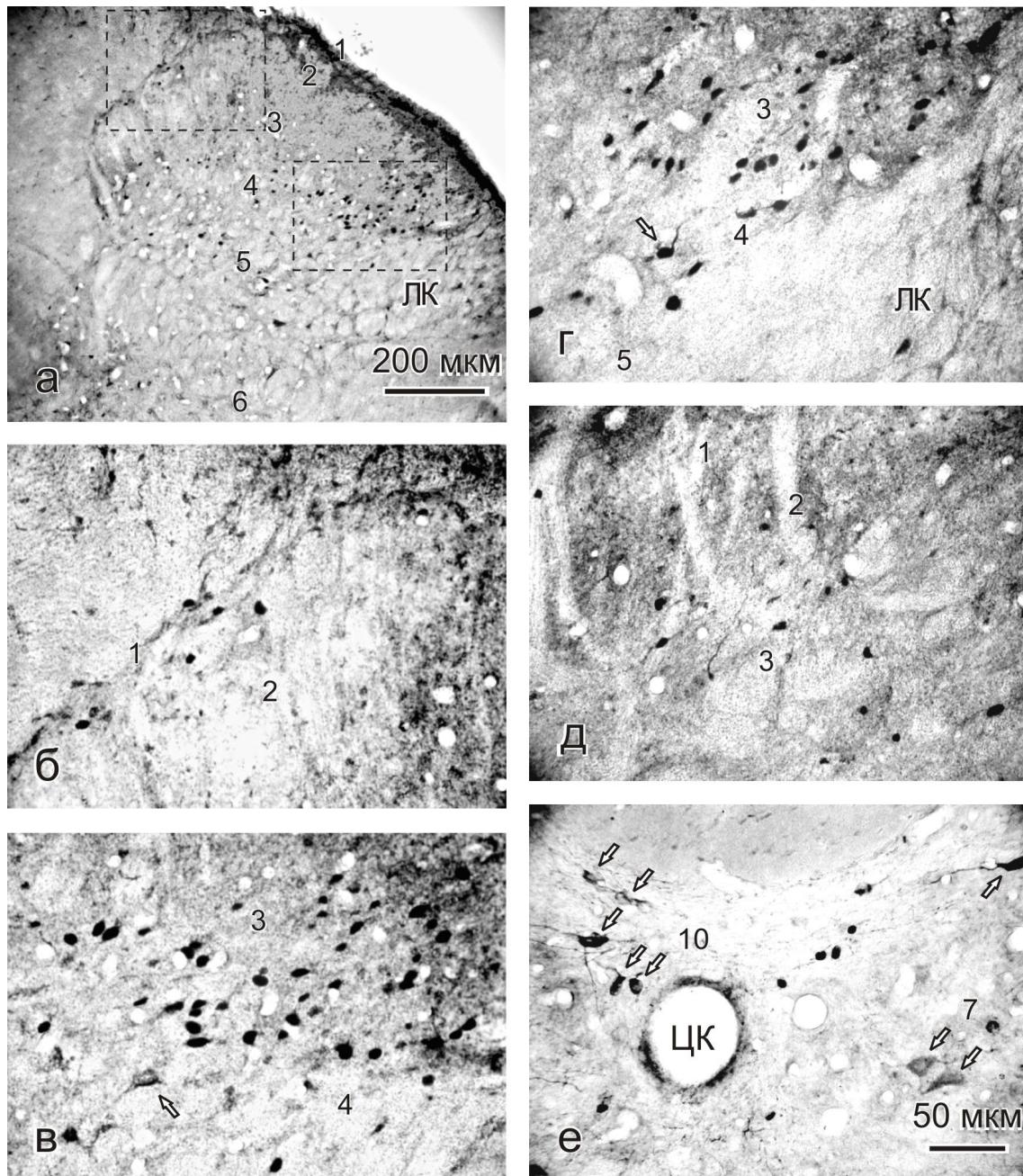


Рис. 1. Фос-імуноактивні (Фос-ір) ядра та НАДФН-діафоразо-позитивні нейрони на зразках другого (а–в) та третього (г–е) сегментів спинного мозку шура після стомлюючої стимуляції м'язів шиї: а – розподіл міченіх клітин у шарах (1–6); б, в – мічені нейрони у шарах 1 і 2 та 3 і 4 сірої речовини другого шийного 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 соми 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 C1–C3 невеликої кількості поліформних Фос-ір-ядер (можливо, ядер мікроглії) розміром менше ніж 5 мкм у діаметрі в зонах скупчення мічених нейронів.

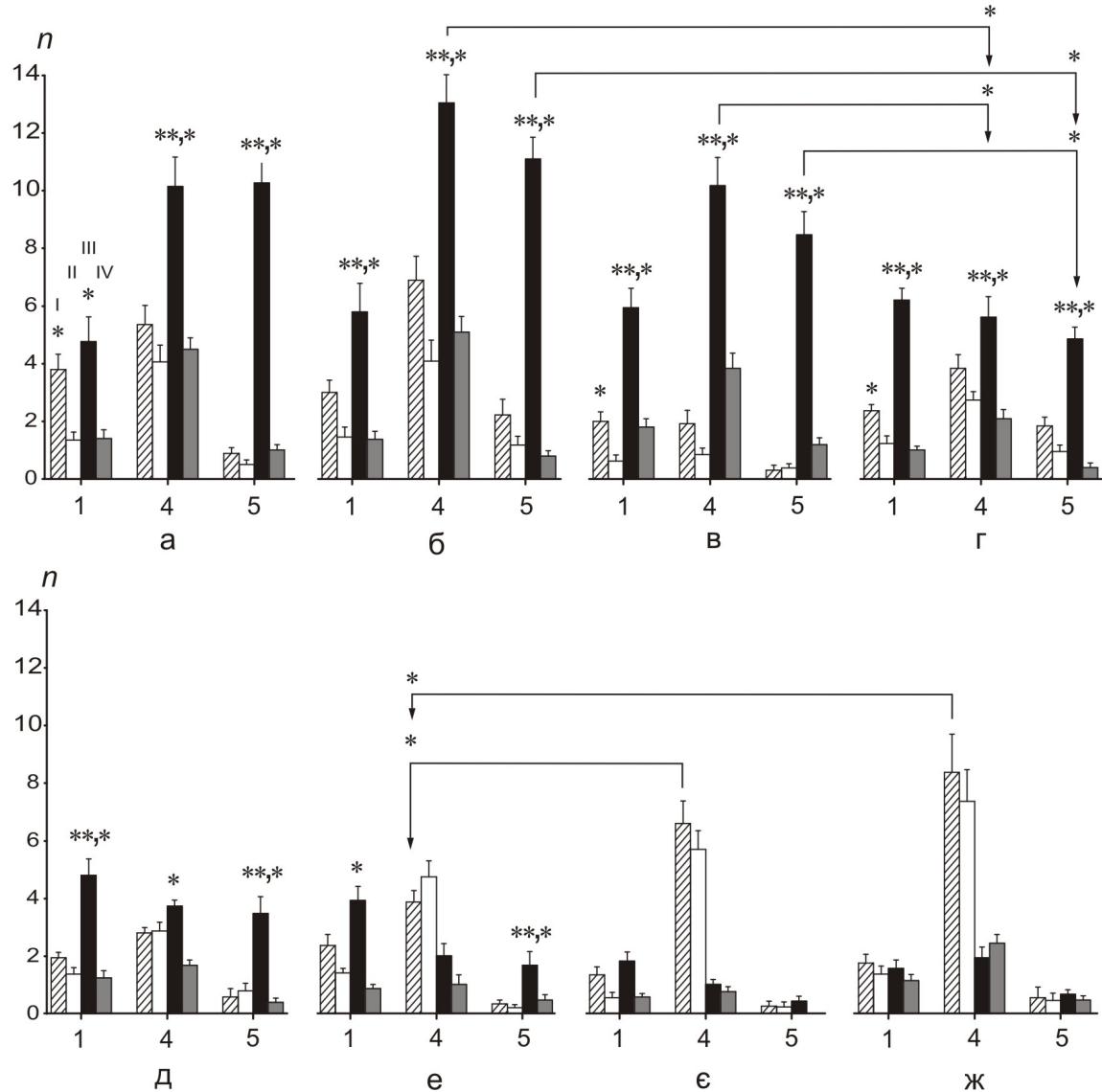


Рис. 2. Кількісний аналіз розподілу Фос-імуноактивних нейронів у шарах 1, 4 і 5 шийних сегментів спинного мозку щура: а–ж – середня кількість (n) ± похибка Фос-імуноактивних нейронів на зріз у сегментах C1–C8 відповідно. I, II – іпси- та контралатеральні боки сегментів у тварин 2-ї групи після псевдостимуляції, 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 контралатеральними 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 іпсолатеральними 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 контраполатеральному боці стовбура мозку. Слід зазначити, що ця структура є важливою мішенню для висхідних проекцій

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

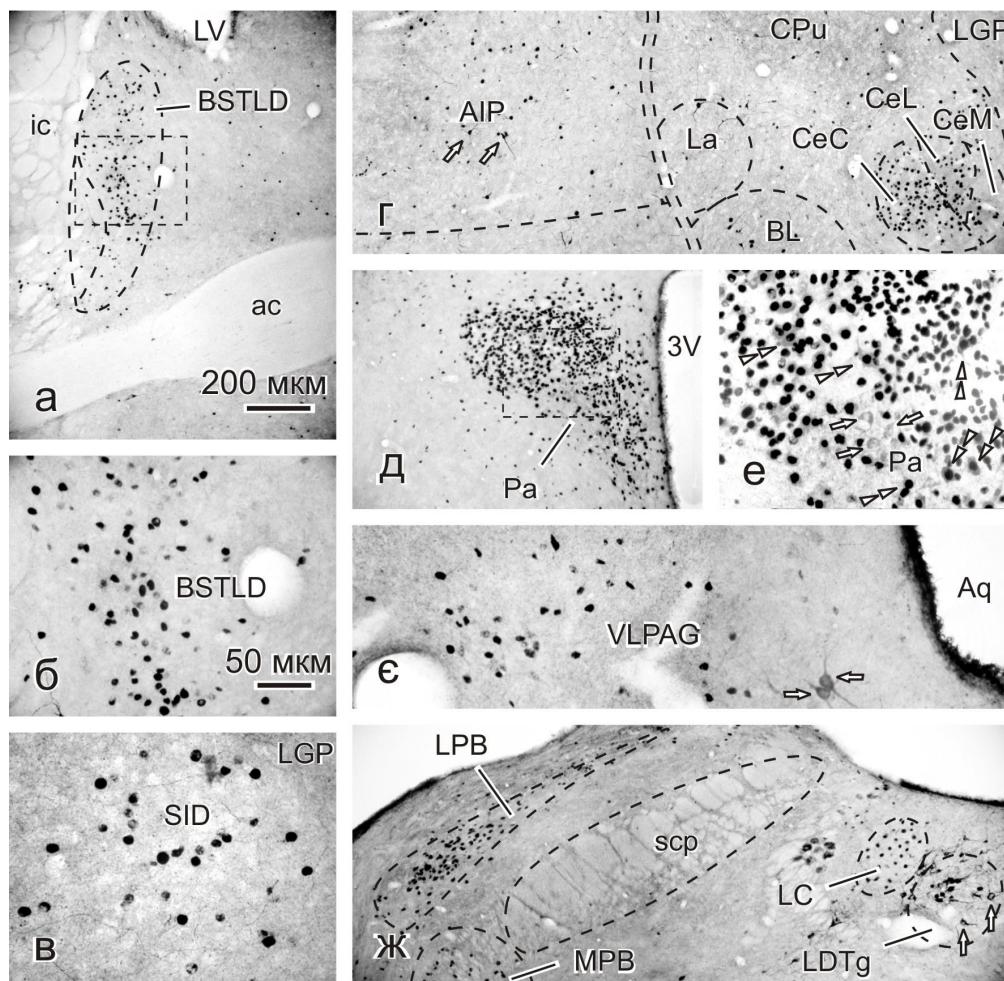


Рис. 3. Фос-імуноактивні ядра та НАДФН-діафоразо-позитивні нейрони на зрізах ядер головного мозку на контраполатеральному боці після стомлюючої стимуляції м'язів ший у щура: а–в – підкоркових, г – мигдалика, д та е – гіпоталамуса, е – навколоводопровідної сірої речовини, ж – моста. Білі стрілки вказують на НАДФН-д(+)нейрони, подвійні – на подвійно мічені клітини. Структури головного мозку: ас – передня комісура; АІР – агранулярна інсулярна кора; Аq – водопровідний канал; ВЛ – базолатеральне ядро мигдалеподібного тіла; ВСТЛД – опорне ядро термінального тяжа; СРу – хвостате ядро; СеС – центральне капсулярне під’ядро; СеЛ – центральне латеральне під’ядро; СеМ – центральне медіальне під’ядро; іс – внутрішня капсула; ЛА – латеральне ядро мигдалеподібного тіла; ЛС – блакитна пляма; ЛДТг – латеродорсальне ядро покришки; ЛГР – блідий шар, латеральна частина; ЛРВ – латеральне парабрахіальне ядро; ЛВ – латеральний шлуночок; МРВ – медіальне парабрахіальне ядро; Ра – паравентрикулярне ядро гіпоталамуса; Рір – піриформна кора; скр – верхня ніжка мозочку; ВЛПАГ – навколоводопровідна 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 і – 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 контраполатеральних 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/іpsi); $P < 0,05$) 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 контраполатеральному боці мозку, або між 2-ю та 3-ю групами тварин не зареєстровано. Значне збільшення Фос-імуноактивності відмічалося 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

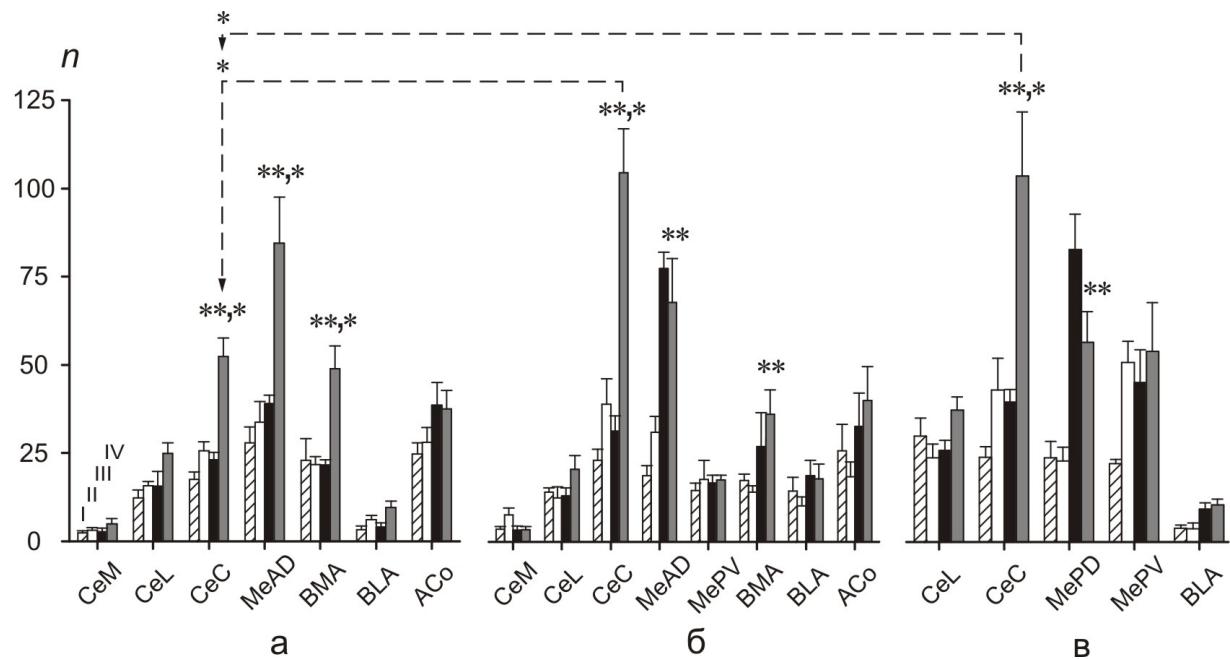


Рис. 4. Гістограми розподілу середнього числа (n) ± похибка Фос-імуноактивних нейронів на зріз у різних під'ядрах мигдалеподібного тіла: а, б, в – на рівнях -2,12, -2,56, -3,14 від брегми відповідно. I, II – іпси- та контраполатеральні боки зрізів головного мозку тварин після псевдостимуляції, III, IV – після стомлюючої стимуляції відповідно. Під'ядра: ACo – переднє кортикалне; 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 міченіх нейронів в окремому під'ядрі на контраполатеральному 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 \rightarrow Pa \rightarrow VLPAG (див. рис. 3,д,е,ж та таблицю). Відомо, що основними ростральними підкірковими структурами для висхідних "ноцицептивних" проекцій 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 Фос-ірнійонів, головним чином на контралатеральному боці мозку (див. рис. 3,а–в, таблиця), а Фос-ір-ядра були переміщені з поодинокими НАДФН-д(+) -клітинами. Встановлено, що у щурів контрольної групи рівень експресії *c-fos* у більшості ядер гіпоталамуса та у навколоводопровідній сірій речовині був дуже низьким, за винятком супрахіазматичного ядра (див. таблицю). Однак після псевдо- та стомлювальної стимуляції м'язів шиї Фос-імунореактивність у цих підрозділах переднього та середнього мозку різко підвищувалась, особливо на контралатеральному боці. Дуже велику середню кількість Фос-ірнійонів було зареєстровано у вентролатеральній зоні навколоводопровідної сірої речовини, а також у паравентрикулярному (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 Фос 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 Фос-імунореактивних нейронів (на зріз) у різних структурах головного мозку щурів у контролі, з псевдоствимуліацією
та з 30-хвилинною стомлювальною стимуляцією м'язів шиї (M \pm n, n = 4)

Група тварин	Структури головного мозку					
	Опорне ядро термінального тяжа, латеральне (BSTLD), -0,26 MM	Безіменна субстанція, дорсальна частина (SID), -1,3 MM	Паравентрикулярне ядро гіпоталамуса (Pa)	Вентральне ядро гіпоталамуса (VMH), -3,14 MM	Навколоводопровідне ядро відносно речовини, ветроплатеральні надчійника (VLPAG)-8,72 MM	Парабрахіальне ядро (PB), -9,30 MM
Контроль	3,0 \pm 0,6	1,5 \pm 0,5	32,2 \pm 4,3	81,8 \pm 11,1	32,8 \pm 1,8	20,1 \pm 1,6
Псевдоствимуліація	40,8 \pm 5,1	16,2 \pm 2,0	154,0 \pm 25,1	245,9 \pm 26,2	56,6 \pm 8,6	20,5 \pm 1,8
Іпси-контра-	70,7 \pm 12,5*,**	26,1 \pm 2,9*	288,2 \pm 40,1*,***	447,7 \pm 23,5*	101,4 \pm 15,2*	37,5 \pm 5,4*
Стомлювальна стимуліація	25,7 \pm 3,6	21,5 \pm 2,5	78,0 \pm 7,5	471,8 \pm 43,1	132,4 \pm 12,4	23,5 \pm 5,5
Іpsi-контра-	42,6 \pm 7,1*	30,0 \pm 3,4*	153,2 \pm 19,7*	705,5 \pm 70,5*,***	211,0 \pm 25,5*,***	41,6 \pm 9,9*

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

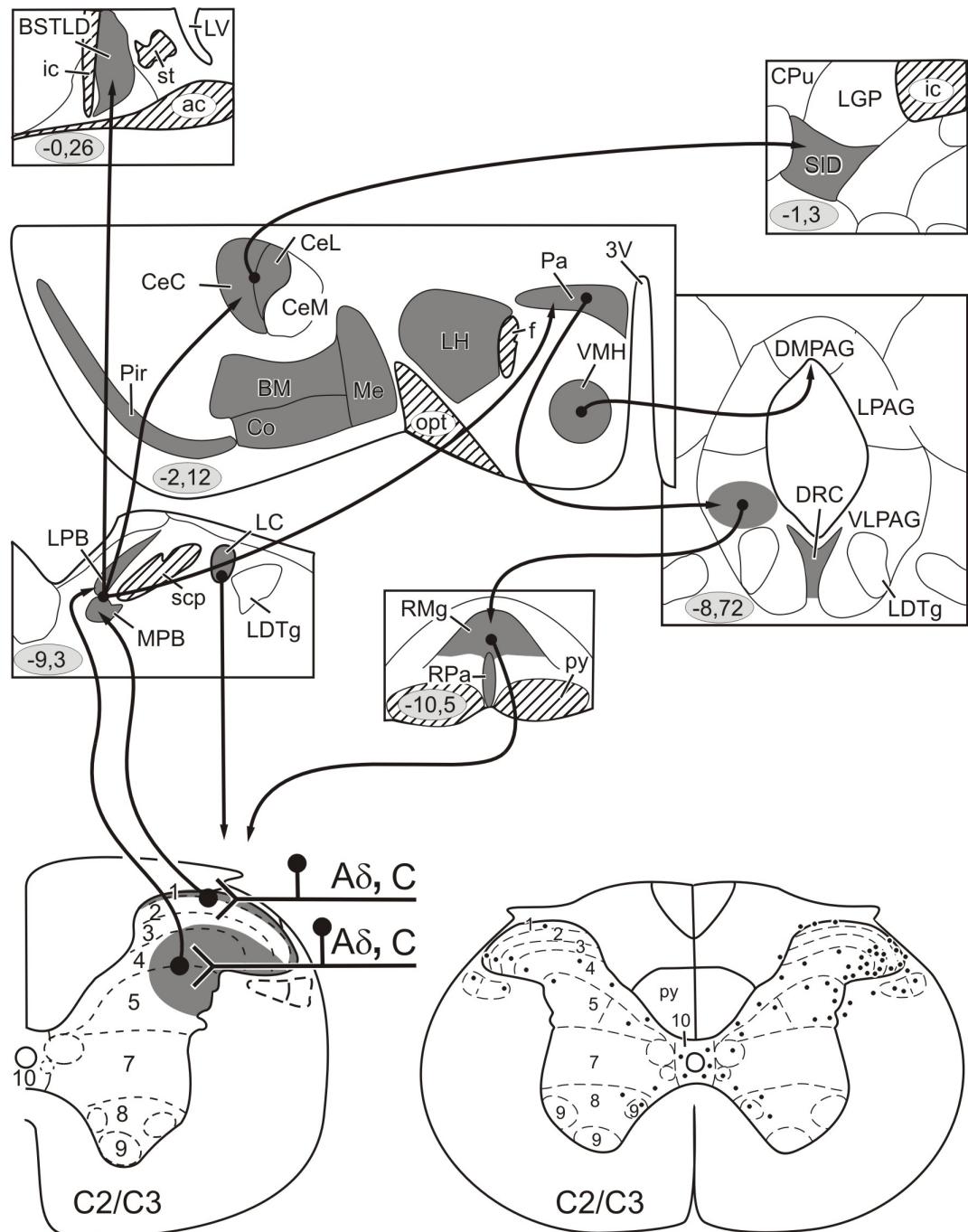


Рис. 5. Спіно-парабрахіально-лімбічний шлях і його проекційні мішені в мозку (позначені темно-сірим кольором), де виявлено підвищення експресії *c-fos* при односторонньому розвитку стомлення дорсальних м'язів ший у щура. Знизу праворуч – план зрізу спинного мозку на рівні другого/третього шийних сегментів з Фос-імунореактивними нейронами у шарах 1–10 сірої речовини. Провідні шляхи у мозку заштриховані. Рівні наведено за атласом [31]. А δ , С – високопорогові м'язові аференти. Структури: ВМ – базомедіальне ядро; Со – кортикалільне ядро; DMPAG – навколоводопровідна сіра речовина, дорсомедіальна частина; DRC – дорсальне ядро шва; f – склепіння; LH – гіпоталамус, латеральна частина; LPAG – навколоводопровідна сіра речовина, латеральна частина; Мe – медіальне ядро мигдалеподібного тіла; opt – оптичний тракт; py – пірамідний тракт; RMg – велике ядро шва; RPa – бліде 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 стомлюваної 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 monoсинаптических 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, навколоводопровідної 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-сінтазовмісними або НАДФН-д-реактивними. В останні роки в літературі підкреслюється важливе значення NO-сигналу і самих NO-сінтазовмісних 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 проекцій у вентролатеральну зону навколоводопровідної сірої речовини [30, 37]. У нашій роботі також встановлено, що число Фос-ір-нейронів підвищується у вентролатеральній зоні навколоводопровідної 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-кортиkalний 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 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 ± 0.9 , 13.1 ± 0.9 and 11.1 ± 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 ± 23.5 , 196.3 ± 12.7 , 104.6 ± 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 // Фізiol. 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-amgdaloid, in the rat // J. Neurosci. – 1997. – **17**. – P. 3751–3765.
14. Kalecic 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. Kruckoff 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-midbrain 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.