

# НАДФН-діафоразна активність у вентральному розі спинного мозку котів при гострому м'язовому запаленні

<sup>1</sup>О.П. Маньківська, <sup>1</sup>А.В. Мазниченко, <sup>1</sup>Н.О. Пількевич, <sup>1</sup>В.О. Майський,  
<sup>2</sup>О.В. Власенко, <sup>2</sup>О.В. Довгань

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; <sup>2</sup>Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України; e-mail: elma4@ukr.net

*Метою нашого дослідження було виявлення змін НАДФН-діафоразної (НАДФН-д) активності в поперековому відділі (L6/L7) спинного мозку у котів з унілатеральним гострим запаленням тт. gastrocnemius-soleus, викликаним внутрішньом'язовими ін'єкціями карагінану. Ефект однобічного запалення цього м'яза проявлявся в зростанні кількості НАДФН-д-реактивних нейронів як з іпси-, так і з контралатерального боків спинного мозку у проміжній (VII шар;  $17,62 \pm 2,7$  та  $20,67 \pm 3,3$ ) та медіальній (VIII шар;  $7,3 \pm 1,9$  та  $6,0 \pm 2,1$  відповідно) зонах вентральних рогів. Реєстрували також зниження кількості активованих клітин на іпсилатеральному боці в межах «ділянки навколо центрального каналу» (X шар). Виявлено посилення НАДФН-д реактивності в вентральних рогах з обох боків спинного мозку котів при унілатеральному м'язовому запаленні, а також наведення такої реактивності (контралатерально) в великих мультиполярних нейронах, локалізованих у дорсальній частині проміжної сірої речовини. Передбачається, що при гострому м'язовому запаленні пластичні зміни в різних пластинах дорсальних і вентральних рогів активують процеси розгальмування внаслідок збільшення кількості НАДФН-д-реактивних нейронів у глибоких шарах сірої речовини вентральних рогів спинного мозку.*

*Ключові слова:* спинний мозок; НАДФН-д-реактивні нейрони; м'язове запалення; карагінан; коти.

## ВСТУП

Запалення м'язів – міозит, часто виникає при їх травматичному пошкодженні і завжди супроводжується болем. Водночас м'язовий біль призводить до значної модуляції моторних реакцій [1-3]. У наших попередніх працях було показано, що при унілатеральному запаленні триголового м'яза литки у котів, викликаного внутрішньом'язовою інфільтрацією запального агента карагінану, виникають помітні зміни рівнів Fos-імунореактивності у поперекових сегментах спинного мозку, а електрична стимуляція нервів м'язів литки призводить до зростання амплітуди моносинаптичних рефлекторних розрядів і збудження флексорів та екстензорів [2].

НАДФН-діафоразна активність у спинному мозку щурів і котів певною мірою відображає активність синтази оксиду азоту (NO-синтази) [4, 5]. При гострому м'язовому запаленні у котів нами зареєстровано помітне зниження такої реактивності у поверхневих шарах дорсального рогу на іпсилатеральному боці сегментів L6/L7 спинного мозку [3]. Великий інтерес представляє той факт, що популяція спінальних НАДФН-д-реактивних нейронів у щурів здатна забезпечувати подвійну реакцію – збільшення або зменшення їх числа у сірій речовині спинного мозку за таких умов [2, 3, 6–9]. Проте даних щодо впливу гострого унілатерального запалення м'язів на рівень НАДФН-діафоразної активності у

© О.П. Маньківська, А.В. Мазниченко, Н.О. Пількевич, В.О. Майський, О.В. Власенко, О.В. Довгань

зонах типової локалізації клітин Реншоу (VII та VIII шари вентрального рогу) у спинному мозку котів [11, 12] недостатньо.

Мета нашої роботи – оцінити рівень НАДФН-діафоразної активності інтернейронів у зонах типової локалізації клітин Реншоу у різних шарах вентрального рогу поперекових сегментів L6/L7 спинного мозку котів за умови розвитку унілатерального гострого міозиту *mm. gastrocnemius-soleus*.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на 7 дорослих котах масою 2,5–4,5 кг, які були поділені на 2 групи: до I контрольної групи ввійшли інтактні тварини (n=3); до II дослідної групи – тварини, яким внутрішньом'язово вводили карагінан у *mm. gastrocnemius-soleus* (n=4). Тварин дослідної групи легко наркотизували ефірно-галотановою газовою сумішшю. Гостре м'язове запалення у них викликали інфільтрацією у *mm. gastrocnemius-soleus* 2 %-го розчину карагінану («Sigma», США). Запальний/больовий подразник вводили через тонку металеву голку у три головки цього м'яза лівої задньої кінцівки (три ін'єкції по 0,5 мл). Всі експериментальні процедури проводилися згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС), а також у повній відповідності до Закону України від 21.02.2006, № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Котів обох груп під глибоким наркозом (пентобарбітал натрію, 90 мг/кг, «Sigma», США, внутрішньоочеревинно) перфузували інтракардіально через висхідну аорту спочатку сольовим фосфатним буфером, який містив 0,2 % нітриту натрію та 25000 од/л гепарину; потім продовжували перфузію 4 %-им параформальдегідом, розчиненим у 0,1 моль/л фосфатного буферу (ФБ; рН 7,4). Поперекове потовщення спинного мозку (сегменти L6 і L7) кожної тварини швидко виділяли та додатково фіксували протягом

12 год, надалі для кріопротекції витримували 48 год при 4 °С в 30 %-му розчині сахарози у ФБ. На заморожуючому мікротомі були зроблені зрізи вказаних сегментів спинного мозку товщиною 40 мкм. Для гістохімічного забарвлення НАДФН-д-реактивних нейронів зрізи витримували 3 год при 37 °С у 0,1 моль/л ФБ (рН 7,4), який містив 0,3 % детергенту (Triton X-100, «Sigma», США), 0,2 мг/мл нітроблакитного тетразолію («Sigma», США) та 0,5 мг/мл редукованого β-НАДФН («Sigma», США) [5]. Для інтенсифікації гістохімічного забарвлення NO-генеруючих нейронів, відростків і аксонних терміналей, у барвний розчин було додано динатрієву сіль яблучної кислоти (1,2 мг/мл, «Sigma», США) [13]. Підрахунок мічених нейронів у вентральному розі в окремих фронтальних зрізах поперекового потовщення спинного мозку проводили під світловим мікроскопом при збільшеннях у 100 та 250 разів, а їх локалізацію визначали за атласом спинного мозку kota [14]. НАДФН-д-реактивні нейрони ідентифікували у зрізах мозку за блакитним забарвленням їх цитоплазми.

Середню кількість НАДФН-д-реактивних інтернейронів ± стандартна похибка середнього (на зріз) в окремих шарах сірої речовини спинного мозку (VII, VIII та X) підраховували у 10–15 зрізах сегментів L6/L7 кожної тварини обох груп як з іпси-, так і з контралатерального боків спинного мозку. Порівнювали середні кількості забарвлених клітин у різних шарах вентрального рогу тварин за допомогою двопараметричного статистичного дисперсійного аналізу варіацій (ANOVA). Якщо міжгрупові відмінності були знайдені (P<0,05), застосовували апостеріорний критерій Ньюмена-Кейлса.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин контрольної групи у шарах VII та VIII сірої речовини вентрального рогу реєстрували тільки невелику кількість НАДФН-д-реактивних нейронів (2–7 акти-

вованих нейронів на зріз), а у шарі X близько 10 таких клітин. У котів дослідної групи через 4 год після внутрішньом'язових ін'єкцій карагінану і розвитку гострого унілатерального м'язового запалення було зареєстровано вірогідне збільшення (відносно контролю) кількості активованих нейронів у VII та VIII шарах вентрального рогу з обох боків мозку. Максимальне значення цього показника було у проміжній сірій речовині (VII шарі) як на іпси-, так і на контралатеральному боках спинного мозку ( $17,62 \pm 2,7$  та  $20,67 \pm 3,3$  відповідно). У меншій кількості НАДФН-др-нейрони були виявлені з обох боків мозку у шарі VIII ( $7,3 \pm 1,9$  та  $6,0 \pm 2,1$ ) та «ділянці навколо центрального каналу» (шар X;  $5,3 \pm 2,1$  та  $12,6 \pm 4,1$  відповідно). М'язове запалення також призводило до незначного іпсилатерального (відносно боку запалення м'яза) зниження рівня НАДФН-д-реактивності нейронів, локалізованих у сірій речовині вентрального рогу сегментів L6/L7 (рис. 1). Відмітимо збільшення частки інтенсивно забарвлених (з високим рівнем

НАДФН-д реактивності) нейронів (більше ніж 70 %) на контралатеральному боці мозку відносно частки слабо забарвлених нейронів (менше ніж 30 %) в усіх досліджуваних шарах спинного мозку тварин з внутрішньом'язовими ін'єкціями карагінану (див. рис. 1). У тварин контрольної групи медіальні та латеральні моторні ядра (шар IX) не містили в собі НАДФН-д-реактивних нейронів (інтернейронів або мотонейронів). Однак у котів дослідної групи на контралатеральному боці спинного мозку реєструвалися поодинокі мічені фузіформні і мультиполярні інтернейрони малих розмірів (діаметром менше 15 мкм), які розташовувалися у нижній частині медіальних моторних ядер.

Просторовий розподіл мічених нейронів є дуже нерівномірним як у дорсовентральному, так і медіолатеральному напрямках (рис. 2). Максимальне їх скупчення спостерігалось у дорсальній частині шару X на контралатеральному боці спинного мозку. Відмітимо, що не всі виявлені нейрони мали однаковий ступінь забарвлення. У вентральній ділянці

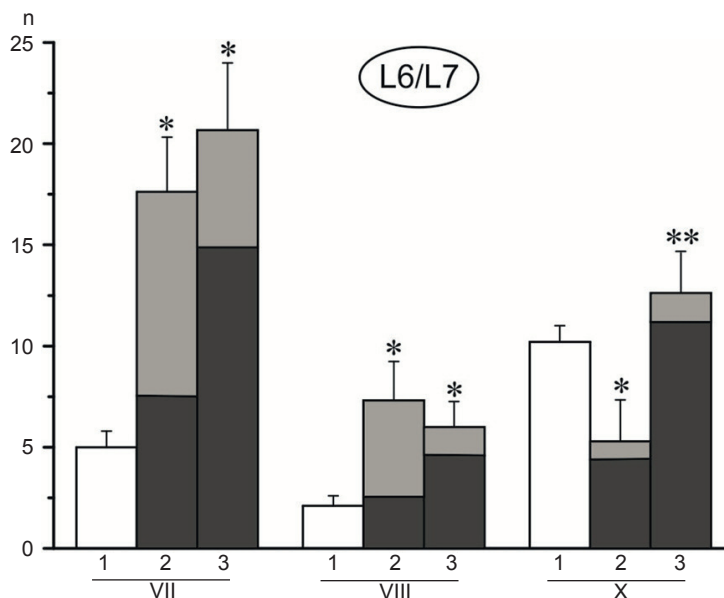


Рис. 1. Середня кількість НАДФН-д-реактивних нейронів у VII, VIII та X шарах вентрального рогу сегментів L6/L7 контрольних тварин (1) та котів з м'язовими ін'єкціями карагінану з іпси- (2) та контралатерального (3) боків спинного мозку. \* $P \leq 0,05$  – вірогідність кількості мічених нейронів у котів дослідної групи відносно контролю; \*\* $P \leq 0,05$  – вірогідність у котів дослідної групи між іпси- та контралатеральними боками спинного мозку. Темно-сірі і світло-сірі частки стовпчиків – нейрони з високим і низьким рівнем НАДФН-д реактивності, відповідно



шару VII на контралатеральному боці мозку реєструвалося велике скупчення слабо-забарвлених мультиполярних і фузіформних клітин малих розмірів. За морфологічними

ознаками (форма та розмір) і за місцем розташування можна припустити, що такі нейрони є гальмівними клітинами Реншоу (див. рис. 2, г). Цікавою знахідкою було ви-

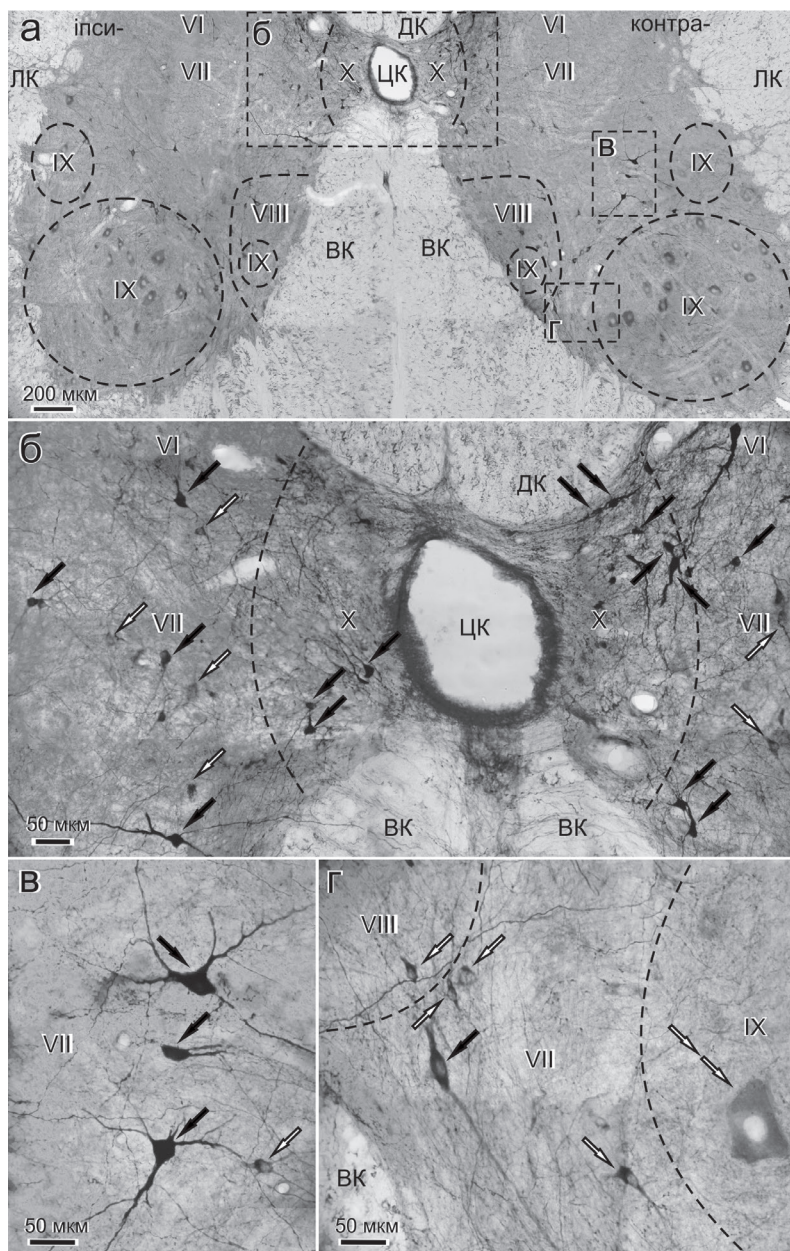


Рис. 2. Мікрофотографії НАДФН-д-реактивних нейронів у фронтальному зрізі вентральних рогів поперекового сегменту L7 спинного мозку кота з м'язовою ін'єкцією карагілану. Зони локалізації позитивних нейронів зі слабкою діафоразною реактивністю (білі стрілки) та високою діафоразною реактивністю (чорні стрілки) у шарах VII – X вентрального рогу позначені на (а) пунктирними лініями і представлені при великому збільшенні. На (б) – позитивні нейрони в дорсальній частині X шару; на (в) – позитивні нейрони в VII шарі; на (г) – типові фузіформні «Реншоу-подібні» клітини (білі стрілки) зі слабкою діафоразною активністю та мотонейрон великого розміру (подвійна біла стрілка). VI – X – шари сірої речовини спинного мозку; ВК, ДК, ЛК – вентральний, дорсальний та латеральний канатики спинного мозку; ЦК – центральний канал

явлення мультиполярних нейронів великих розмірів (25–50 мкм у діаметрі) у дорсальній частині шару VII з обох боків спинного мозку досліджуваних сегментів (див. рис. 2, а, в). Була знайдена різниця в білатеральному розподілі таких великих мультиполярних нейронів з вірогідним перевищенням їх кількості на контралатеральному боці мозку (рис. 3, а, б). У цих клітин вторинні розгалуження дендритів по всьому їх подовженні мали намистоподібні потовщення, що може бути структурною основою для передачі сигналу NO на інші інтернейрони дорсальної частини сірої речовини, які локалізовані у зоні розгалуження дендритів таких клітин. Слід зазначити і контралатеральне домінування в локалізації інтенсивно забарвлених «Реншоу-подібних» клітин та інших інтернейронів у проміжній сірій речовині та медіальній

зоні шару VIII спинного мозку тварин з унілатеральним м'язовим запаленням (див. рис. 3, в).

У попередніх дослідженнях [2, 3] із виявлення у спинному мозку котів нейронів із Fos-імунореактивністю було знайдено, що за умов розвитку міозиту у центральній зоні сірої речовини вентрального рогу сегментів L6/L7 забарвлені на Fos ядра великих нейронів були перемішані із веретено- та паличкоподібними ядрами клітин малого розміру (понад 5 мкм). Такі клітини є глієподібними, очевидно, мікроглія та астроцити. Розповсюдження активності цих клітин у шарах вентрального рогу (VII, VIII та X), а також, частково, і в моторні ядра (шар IX) при розвитку болю та різкої активації нейронів у верхніх шарах дорсального рогу, може розглядатися як один з елементів повторної нейронної

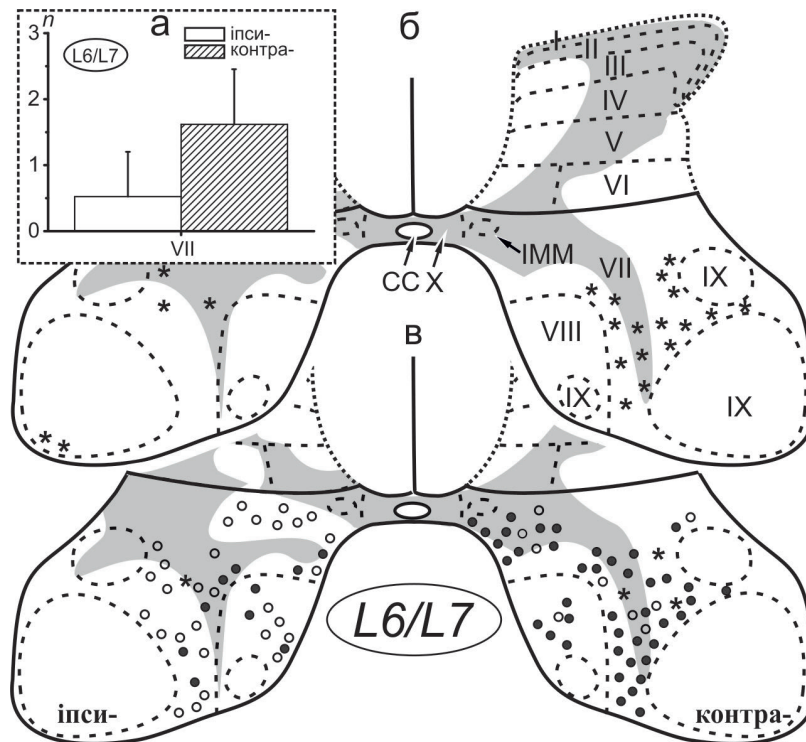


Рис. 3. Середня кількість великих мультиполярних НАДФН-д-реактивних нейронів у спинному мозку котів під час розвитку гострого м'язового запалення в одиночному зрізі (а) та схема ламінарного розподілу таких нейронів (б; зірочки; загальна кількість клітин у 10 зрізах мозку); схема пошарового розподілу інтенсивно забарвлених (чорні кружечки), слабо забарвлених (білі кружечки) інтернейронів і великих мультиполярних нейронів (зірочки) у VII та VIII шарах вентрального рогу (в; загальна кількість клітин у 2 зрізах мозку)

активації у спинному мозку під час розвитку гострого або хронічного міозиту [3, 15 – 17]. Треба також зазначити, що глія *per se* і глія – нейронна сигналізація беруть участь у підвищенні ноцицептивної передачі у спинному мозку [18]. У нашому дослідженні виявлено контралатеральне збільшення НАДФН-д реактивності у проміжній сірі речовині вентрального рогу сегментів L6/L7. У цій зоні зареєстровані інтернейрони та великі мультиполярні нейрони, що свідчить про пластичні зміни у сірій речовині вентрального рогу котів при розвитку гострого м'язового запалення [9].

Таким чином, отримані нами результати гістохімічних досліджень прямо свідчать про те, що гостре запалення *mm. gastrocnemius-soleus* у котів призводить до значного підвищення кількості НАДФН-д-реактивних нейронів у шарах VII і VIII вентрального рогу L6/L7-сегментів спинного мозку. Раніше було встановлено, що НАДФН-д-реактивні нейрони в усіх шарах вентрального рогу і зоні навколо центрального каналу є або ГАМК-, або гліцинергічними – тобто гальмівними [19]. Отже, виявлене нами збільшення кількості таких гальмівних нейронів у шарах вентрального рогу може відображати пластичні зміни у спинному мозку при гострому м'язовому запаленні. Представлені результати показують вірогідне збільшення кількості НАДФН-д-реактивних нейронів у VII і VIII шарах вентрального рогу та індукцію такої реактивності на контралатеральні великі (більше ніж 25 мкм у діаметрі) мультиполярні нейрони дорсальної частини проміжної зони сірої речовини за умов запалення м'язу кінцівки у котів. Можна припустити, що при гострому міозиті пластичні зміни у різних шарах дорсального і вентрального рогів активують процеси розгальмування внаслідок збільшення кількості гальмівних NO-генеруючих (НАДФН-д-реактивних) нейронів у глибоких шарах сірої речовини вентральних рогів спинного мозку котів.

*Автори роботи висловлюють щире подяку ст. наук. співр. Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України Пілявському О.І. за допомогу у проведенні експериментальної частини дослідження.*

**Е.П. Маньковская, А.В. Мазниченко,  
Н.А. Пилькевич, В.А. Майский, О.В. Власенко,  
А.В. Довгань**

### **НАДФН-ДИАФОРАЗНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ В ВЕНТРАЛЬНОМ РОГЕ СПИННОГО МОЗГА КОТОВ ПРИ ОСТРОМ МЫШЕЧНОМ ВОСПАЛЕНИИ**

Целью нашего исследования было изучение изменений НАДФН-диафоразной реактивности в поясничном отделе (L6/L7) спинного мозга у котов с односторонним острым воспалением *mm. gastrocnemius-soleus*, вызванного внутримышечным введением каррагинана. Эффект одностороннего мышечного воспаления выражался в достоверном росте количества НАДФН-д-реактивных нейронов как на ипси-, так и на контралатеральной сторонах спинного мозга кошек в промежуточной (VII слой;  $17,62 \pm 2,7$  и  $20,67 \pm 3,3$ ) и медиальной (VIII слой;  $7,3 \pm 1,9$  и  $6,0 \pm 2,1$  соответственно) зонах вентральных рогов. Регистрировали также заметное снижение количества реактивных клеток на ипсилатеральной стороне в пределах “области вокруг центрального канала” (X пластина). Выявлено повышение НАДФН-д-реактивности в вентральных рогах с обеих сторон спинного мозга кошек при одностороннем остром мышечном воспалении и также индукция такой реактивности (контралатерально) на крупные мультиполярные нейроны, локализованные в дорсальной части промежуточного серого вещества. Предполагается, что при остром миозите пластические изменения в различных пластинах дорсальных и вентральных рогов активируют процессы растормаживания за счет увеличения количества NOS-содержащих/НАДФН-д-реактивных нейронов в глубоких слоях серого вещества вентральных рогов спинного мозга.

Ключевые слова: спинной мозг; НАДФН-д-реактивные нейроны; мышечное воспаление; каррагинан; коты.

**Ye.P. Man'kovskaya<sup>1</sup>, A.V. Maznychenko<sup>1</sup>,  
N.O. Pil'kevych<sup>1</sup>, V.O. Maisky<sup>1</sup>, O.V. Vlasenko<sup>2</sup>,  
O.V. Dovgan<sup>2</sup>**

### **NADPH-DIAPHORASE REACTIVITY IN THE VENTRAL HORN OF THE FELINE SPINAL CORD DURING ACUTE MUSCLE INFLAMMATION**

The aim of this research was to reveal the changes in the NADPH-d reactivity in the lumbar spinal cord (L6/L7) of



cats with unilateral acute myositis of the *mm. gastrocnemius-soleus* after intramuscular injections of carrageenan. The effect of unilateral muscle inflammation was expressed in a significant increase in the number of NADPH-d-reactive neurons in ipsilateral and contralateral intermediate (lamina VII;  $17,62 \pm 2,7$  and  $20,67 \pm 3,3$ ) and medial (lamina VIII;  $7,3 \pm 1,9$  and  $6,0 \pm 2,1$  respectively) zones of the ventral horns. However, a clear decline of the reactive cells was recorded on the ipsilateral side within the area around the central canal (lamina X). An increase in the NADPH-d reactivity within the ventral horns on both sides on the spinal cord and the induction of such reactivity (contralaterally) in large multipolar neurons localized in the dorsal part of the intermediate zone were revealed in cats with unilateral acute muscle inflammation. It is hypothesized, that during acute myositis, plastic changes in different layers of the dorsaland ventral horns activate the processes of disinhibition due to an increase in the number of NOS-containing/NADPH-d-reactive neurons in the spinal gray matter.

Key words: spinal cord; NADPH-d-reactive neurons; muscle inflammation; carrageenan; cats.

<sup>1</sup>O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv; <sup>2</sup>Pirogov National Medical University, MPH of Ukraine, Vinnitsa

## REFERENCES

1. Khalsa PS. Biomechanics of musculoskeletal pain: dynamics of the neuromatrix. *J Electromyogr Kinesiol.* 2004;14(1):109-20.
2. Schomburg ED, Steffens H, Maznychenko AV, Pilyavskii AI, Hellstrom F, Kostyukov AI, Maisky VA. Acute muscle inflammation enhances the monosynaptic reflex and *c-fos* expression in the feline spinal cord. *Eur J Pain.* 2007;11:579-86.
3. Steffens H, Schomburg ED, Maznychenko AV, Maisky VA, Kostyukov AI, Pilyavskii AI. Monosynaptic reflexes, *c-fos* expression, and NADPH-diaphorase activity in the cat spinal cord: changes induced by chronic muscle inflammation. *Нейрофізіологія/Neurophysiology.* 2007;39 (3):222-31.
4. Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience.* 1992;46(4):755-84.
5. Pun NJ, Pun SL, Wu SY, Forstermann U, Schmidt HW, Tsend LF. Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat, mouse, cat, and squirrel monkey spinal cord. *Neuroscience.* 1993;54:845-57.
6. Cirino G, Fiorucci S, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? *TRENDS in Pharmacol Sci.* 2003;24(2):91-5.
7. Callsen-Cencic P, Hoheisel U, Kaske A, Mense S, Tenschert S. The controversy about spinal neuronal nitric oxide synthase: under which conditions is it up- or down regulated? *Cell Tissue Res.* 1999;295(2):183-94.
8. Pilyavskii AI, Maznychenko AV, Maisky VA, Kostyukov AI, Windhorst U. Capsaicin-induced effects on *c-fos* expression and NADPH-diaphorase activity in the feline spinal cord. *Eur J Pharmacol.* 2005;521:70-8.
9. Hoheisel U, Kaske A, Reinert A, Mense S. Frequency-dependent expression of diaphorase staining and nNOS-immunoreactivity in rat dorsal horn neurons following C-fiber stimulation. *Neurosci Lett.* 1997;227(3):181-4.
10. Radhacrishnan R, Moore SA, Sluka KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic hyperalgesia in rats. *Pain.* 2003;104:567-77.
11. Carr PA, Alvarez FJ, Leman EA, Fyffe REW. Calbindin D28k expression in immunohistochemically identified Renshaw cells. *Neuroreport.* 1998;9:2657-61.
12. Jankowska E, Lindström S. Morphological identification of Renshaw cells. *Acta Physiol Scand.* 1971;81:428-30.
13. Maisky VA, Oleshko NN, Bazilyuk OV, Talanov SA, Sagach VF, Appenzeller O. Fos and nitric oxide synthase in rat brain with chronic mesostriatal dopamine deficiency: effects of nitroglycerin and hypoxia. *Parkinson Relat Dis.* 2002;8:261-70.
14. Brown AG. Organization of spinal cord. The anatomy and physiology of identified neurons. New York: Springer. 1981.
15. Harris JA. Using *c-fos* as a neural marker of pain. *Brain Res Bull.* 1998;45(1):1-8.
16. Wu J, Lin Q, McAdoo DJ, Willis WD. Nitric oxide contributes to central sensitization following intradermal injection of capsaicin. *Neuroreport.* 1998;9:589-92.
17. Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Spinal cord glia: new players in pain. *Pain.* 2001;93:201-5.
18. Clark AK, Gentry C, Bradbury EJ, McMahon SB, Malcangio M. Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. *Eur J Pain.* 2007;11:223-30.
19. Spike RC, Todd AJ, Johnston HM. Coexistence of NADPH diaphorase with GABA, glycine, and acetylcholine in rat spinal cord. *J Comp Neurol.* 1993;335:320-3.

Матеріал надійшов  
до редакції 14.05.2015