

О.Г. Родинський, О.Г. Зінов'єва, О.В. Мозгунов, О.С. Трушенко

Активність інтернейронних пулів спинного мозку за умов експериментального цукрового діабету

На щурах лінії Вістар з експериментальним цукровим діабетом (ЦД) і інтактних тваринах аналізували поріг, хронаксію, параметри потенціалу дорсальної поверхні (ПДП) спинного мозку (СМ). Виявлено зниження порога збудження на 41,4 % ($P < 0,05$), збільшення хронаксії на 9,5 % ($P < 0,01$), зростання амплітуди N_3 -компонента на 15,8 % ($P < 0,05$), збільшення тривалості аферентного піку на 4,5 % ($P < 0,05$) і N_2 -компонента на 10,9 % ($P < 0,01$). Зроблено висновок про те, що метаболічні зміни в умовах ЦД призводять до модифікації в активності аферентних шляхів і інтернейронного пулу СМ.

Ключові слова: цукровий діабет, інтернейронний пул, потенціал дорсальної поверхні спинного мозку.

ВСТУП

Проблема наслідків діабетичної невропатії (ДН), яка є одним з головних ускладнень цукрового діабету (ЦД), нині не втрачає свого значення, незважаючи на велику кількість досліджень [3, 9, 10]. Одним із симптомів ДН є невропатичний біль [14], який проявляється у вигляді алодинії чи гіперестезії, що дуже погіршує якість життя таких хворих [12, 14]. При цьому головна роль у розвитку больових відчуттів належить ураженню периферичних сенсорних волокон і дорсальних рогів спинного мозку (СМ) [14].

Розвиток невропатичного болю пов'язують з підсиленням вхідного ноцицептивного потоку чи нейрональної гіперактивності [12, 16]. Експериментально доведено, що вже на ранніх термінах (від 3 тиж до 12 міс тривалості гіперглікемії) від початку захворювання прогресує зниження швидкості проведення збудження та зміна амплітуди потенціалів дії різних типів волокон, що входять у дорсальний корінець СМ [14, 20, 23]. Суперечливі дані щодо змін електрофізіологічних показників СМ у дослідженнях з різною тривалістю захворювання на ЦД спонукали нас до більш детального вивчення процесів

збудження, які проходять у СМ тварин з експериментальним ЦД на ранніх строках розвитку гіперглікемії (1 міс). Такий підхід ґрунтується на тому, що у наших попередніх дослідженнях [3] за заданих умов було підтверджено наявність достовірних змін у периферичних структурах, зокрема нервово-м'язовому апараті.

Для аналізу вказаних процесів нами було обрано метод реєстрації потенціалу дорсальної поверхні (ПДП) СМ, оскільки це показник, який відображує активність роботи інтернейронів СМ у відповідь на подразнення аферентних волокон, зокрема активність пре- та постсинаптичних сегментарних і несегментарних нейронів СМ [5].

МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на 28 статевозрілих щурах лінії Вістар віком 6–8 міс, масою 180–240 г. ЦД моделювали одноразовим інтраперитонеальним введенням алоксану моногідрату («Sigma», США) у дозі 170 мг/кг після голодування тварин протягом доби при вільному доступі до води. Контроль вмісту глюкози крові проводили на 10-ту добу за допомогою глюкометра One Touch

© О.Г. Родинський, О.Г. Зінов'єва, О.В. Мозгунов, О.С. Трушенко

Ultra. Для подальших досліджень відбирали тварин зі значеннями цього показника понад 15 ммоль/л. Тваринам контрольної групи одноразово вводили 0,1 мл 0,9%-го розчину NaCl. У гострий експеримент тварин брали на 30-ту добу після відтворення ЦД. Під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг) виконували ламінектомію та розтин твердої мозкової оболонки. Після цього перерізуали СМ на рівні Th₁₂-L₁ і заливали вазеліновою олією. Тварину витримували 3 год при температурному режимі 36–37 °С. Далі на центральну частину корінця L₅ накладали біполярні подразнювальні електроди, стимулювали цей відрізок прямокутними імпульсами тривалістю 0,3 мс та силою від 1 до 5 порогів (П), також використовували методику нанесення парних стимулів на дорсальний корінець СМ з інтервалом від 2 до 1000 мс. ПДП СМ відводили за допомогою монополярного кулькового срібного електрода у фокусі максимальної активності, референтний електрод при цьому розміщували на м'язах нижньої кінцівки [2]. Для подразнення використовували стандартну електрофізіологічну апаратуру, ПДП записували за допомогою аналого-цифрового перетворювача та персонального комп'ютера. Досліджували такі параметри ПДП: поріг, хронаксія, тривалість латентного періоду (ЛП), тривалість аферентного піку (АП), тривалості N₁, N₂, N₃-компонентів та Р-хвилі, загальну тривалість ПДП, а також амплітуди АП та N₁, N₂, N₃-компонентів і Р-хвилі відповідно.

Для обробки результатів використовували наступні методи варіаційної статистики:

розрахунок показників наочності у відсотках, середню арифметичну (М) та похибку середньої (m). Оцінку достовірності проводили за допомогою методів непараметричної статистики (критерій Манна–Уїтні). Зміни показників вважали достовірними при P<0,05. Експерименти з лабораторними тваринами відповідали етичним вимогам Європейської конвенції з використання хребетних тварин для експериментів. Евтаназію тварин по закінченні експерименту проводили введенням летальної дози тіопенталу натрію.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні порога виникнення ПДП СМ було встановлено, що за умов експериментального ЦД його значення зменшилося на 41,4 % (P<0,05, таблиця). Хронаксія ПДП СМ також відрізнялася від показників інтактної групи та була більшою на 9,5 % (P<0,01). З іншого боку, латентний період і тривалість ПДП суттєво не змінилися.

При характеристиці ПДП за умов супрамаксимальної стимуляції дорсального корінця СМ при розвитку ЦД (рис. 1) варто зазначити, що зміни амплітуди компонентів ПДП були різноспрямованими. Так, у порівнянні з інтактною групою амплітуда АП практично не змінилася, амплітуда N₁ і N₂-компонентів зменшилася на 6,8 % і 7,3 % відповідно, а N₃-компонента, навпаки, збільшилася на 15,8 % (P<0,05). Амплітуда Р-хвилі зменшилася на 23,2 %.

За експериментальних умов тривалість компонентів ПДП також змінювалася по-різ-

Зміни основних показників потенціалу дорсальної поверхні спинного мозку тварин з експериментальним цукровим діабетом у порівнянні з інтактними тваринами

Показник	Інтактна група	Цукровий діабет
Поріг, мВ	1,78 ± 0,07 (n = 14)	1,03 ± 0,25 (n = 12) *
Хронаксія, мкс	98,13 ± 3,89 (n = 16)	107,5 ± 4,75 (n = 12) **
Латентний період, мс	0,253 ± 0,018 (n = 16)	0,243 ± 0,014 (n = 12)
Тривалість потенціалу дорсальної поверхні, мс	16,09 ± 0,77 (n = 16)	15,81 ± 0,96 (n = 12)

* P < 0,05, **P < 0,01 – достовірність порівняно з контролем.

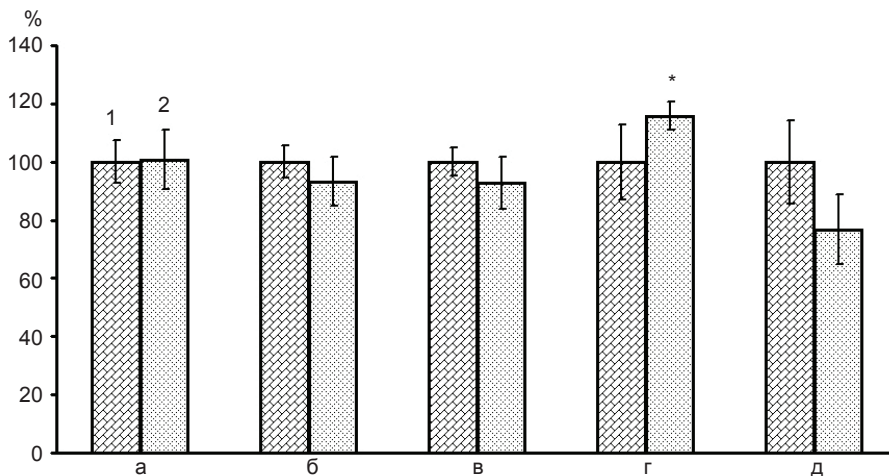


Рис. 1. Амплітуди аферентного піку (а), N_1 - (б), N_2 - (в) і N_3 -компонента (г) та Р-хвилі (д) потенціалу дорсальної поверхні спинного мозку (n = 12): 1 – інтактні тварини, 2 – тварини з експериментальним цукровим діабетом. * $P < 0,05$

ному (рис. 2). У порівнянні з інтактною групою тривалість АП збільшилася на 4,5 % ($P < 0,05$), N_1 - і N_3 -компонента зменшилася на 7,2 і 16,2 %, N_2 -компонента збільшилася на 10,9 % ($P < 0,01$), а тривалість Р-хвилі практично не змінилася.

Для з'ясування змін деполяризації первинних аферентів СМ внаслідок процесів пресинаптичного гальмування в умовах експериментального ЦД було використано метод парної стимуляції [2]. При цьому на часовому проміжку від 4 по 8 мс ми дійсно спостерігали пригнічення N_1 -компонента,

яке було більш виражене у групі тварин з експериментальним ЦД ($P > 0,05$).

Слід відмітити зниження порога виникнення ПДП за експериментальних умов. За даними деяких дослідників [8, 19], дорсальні роги СМ відіграють важливу роль у підсиленні больової чутливості, адже сприймають полімодальну аферентацію, а гіперчутливість нейронів цих структур, в свою чергу, може викликати додатковий, підсилений, потік інформації, що сприяє виникненню алодії та гіперестезії за умов ЦД. Інші автори відзначають підвищену базальну активність

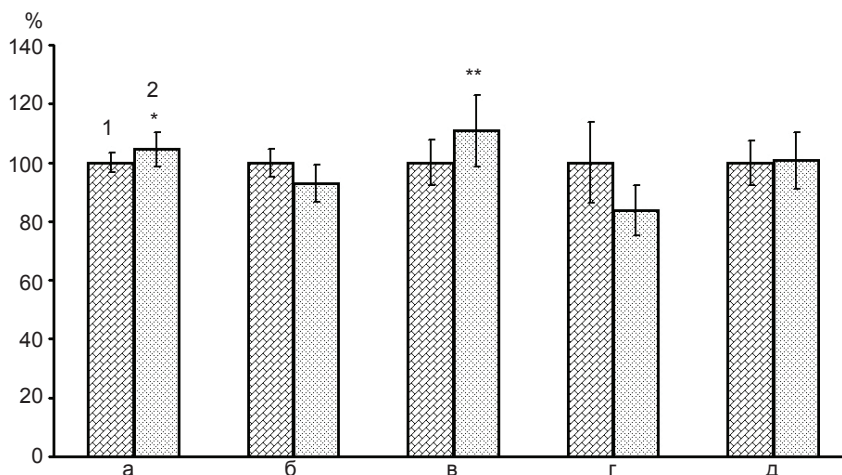


Рис. 2. Загальна тривалість аферентного піку (а), N_1 - (б), N_2 - (в), N_3 -компонента (г) та Р-хвилі (д) потенціалу дорсальної поверхні спинного мозку (n = 12): 1 – інтактні тварини, 2 – тварини з експериментальним цукровим діабетом. * $P < 0,05$ та ** $P < 0,01$ – достовірність порівняно з контролем

нейронів дорсальних рогів СМ при ЦД [15]. Тож у таких умовах нейрони завчасно готові до сприйняття та передачі як больових, так і небольових стимулів, що сприймаються як больові – як у випадку з алодинією [12, 15]. Дослідники вказують на значну роль натрієвих каналів нейронів дорсальних рогів СМ, експресія яких за умов ЦД підвищується та збільшується вхідний потік Na^+ всередину клітини, що, в свою чергу, призводить до зниження порога збудження [10, 15]. Деякі автори вказують на роль кальцієвих каналів як важливих підсилювачів сигналів у первинних сенсорних нейронах через збільшення потоку Ca^{2+} через них, що може призводити до підвищення їхньої збудливості [14].

Збільшення хронаксії, що спостерігалось у наших дослідженнях, опосередковано характеризує стан натрієвих каналів. Відомо, що функціонування нервової тканини відповідає закону сили-тривалості, при цьому зниження порога виникнення ПДП збігається з даними інших авторів [10], які описують збільшення експресії цих каналів при ЦД. Треба зазначити, що подібні зміни хронаксії не підтверджуються жодним із проаналізованих нами літературних джерел, та, ймовірно, вказують на збільшення кількості інактивованих натрієвих каналів або ж на зміни їх біофізичних властивостей, і тому потребують подальших досліджень.

При аналізі параметрів ПДП СМ нами було застосовано супрамаксимальну силу подразнення (5 П), якої достатньо для активації всіх низькопорогових аферентів [2]. За умов означеної сили стимуляції спостерігалось максимальне насичення ПДП, подальше збільшення інтенсивності подразнення не викликало підвищення амплітуди потенціалу.

Нами виявлено, що за умов експериментального ЦД достовірно ($P < 0,05$) збільшувалася амплітуда тільки у N_3 -компонента, який є постсинаптичним і віддзеркалює активність несементарних інтернейронів [5]. Експериментальний ЦД супроводжується підвищенням амплітуди збуджувальних постсинаптич-

них потенціалів, викликаних з дорсального корінця СМ [12], що пов'язують з підвищенням глутаматергічного входу у дорсальних рогах СМ через підвищення експресії mGluR5 – метаболотропних глутаматних рецепторів 5-го типу у первинних аферентах, що, в свою чергу, сприяє підсиленню ноцицептивної передачі при діабетичній невропатії [12, 13].

Як відомо, АП – це компонент, що відображає сумарну хвилю збудження низькопорогових первинних аферентів [2, 6]. Встановлене нами збільшення тривалості АП, вочевидь, пов'язане з тим, що при ЦД більш за інші параметри зменшується швидкість проведення як у периферичному апараті, так і в центральних структурах [7, 9, 11]. Останнє пов'язано із залученням і немієлінізованих нервових волокон, і мієлінізованих, а також сенсорних провідників різних типів від різноманітних рецепторів [1, 4, 17, 20, 21].

Важливим є те, що дані щодо термінів захворювання лабораторних тварин, протягом яких відбуваються вищевказані зміни, неоднозначні та варіюють від кількох тижнів до місяців [20]. У дослідженнях *in vitro* [13] показано, що гіперосмолярні розчини глюкози знижують швидкість проведення як по волокнах А-типу, так і по С-типу (за умов гіперглікемії, спричиненої ЦД, спостерігається підвищення осмолярності плазми крові). Причиною такого зниження швидкості проведення може бути демієлінізація нервових волокон, яка виявляється при морфологічних дослідженнях при ЦД не лише в периферичних, але й у центральних структурах [18].

Деякі автори відзначають, що головним чинником вищевказаних змін є оксидативний стрес, який впливає на всі тканини організму, зокрема структури СМ [17, 22], і може викликати мієлопатію, яка маніфестує переважно як сенсорна невропатія, що, в свою чергу, проявляється вже на ранніх етапах захворювання.

Що стосується збільшення тривалості N_2 -компонента, який відображає постсинаптичну активність сегментарних інтернейро-

нів, то в її основі, вочевидь, також лежать вищевказані механізми.

Відсутність достовірних відмінностей у відновленні N_1 -компонента при парному подразненні може свідчити про те, що метаболічні перетворення при ЦД не викликають змін пресинаптичного гальмування [2, 5].

У наших дослідженнях показано, що за умов експериментального ЦД відбуваються зміни у роботі нейронів дорсальних рогів СМ, що проявляється у зменшенні порога виникнення ПДП. Збільшення хронаксії ПДП свідчить про вірогідні зміни біофізичних якостей натрієвих каналів, а також потребує більш детального вивчення.

Таким чином, можна зробити висновок, що метаболічні перетворення при ЦД призводять до зниження порога збудження та порушень у функціонуванні аферентних провідників та інтернейронного пулу СМ.

А.Г. Родинский, Е.Г. Зиновьева, А.В. Мозгунов, А.С. Трушенко

АКТИВНОСТЬ ИНТЕРНЕЙРОННЫХ ПУЛОВ СПИННОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

На крысах линии Вистар с экспериментальным сахарным диабетом (СД) и интактных животных анализировали порог, хронаксию, параметры потенциала дорсальной поверхности (ПДП) спинного мозга (СМ). Выявлено снижение порога возбуждения на 41,4 % ($P < 0,05$), увеличение хронаксии – 9,5 % ($P < 0,01$), возрастание амплитуды N_3 -компонента – 15,8 % ($P < 0,05$), увеличение длительности афферентного пика – 4,5 % ($P < 0,05$) и N_2 -компонента – 10,9 % ($P < 0,01$). Сделан вывод о том, что метаболіческие изменения в условиях СД приводят к модификации в активности афферентных путей и интернейронного пула СМ. Ключевые слова: сахарный диабет, интернейронный пул, потенциал дорсальной поверхности спинного мозга.

O.G. Rodinsky, O.G. Zinovieva, O.V. Mozgunov, O.S. Trushenko

THE ACTIVITY OF THE INTERNEURON POOLS OF THE SPINAL CORD IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

We analyzed threshold, chronaxy and parameters of the potential of the dorsal surface (PDP) of the spinal cord (SC) in Wistar

rats with experimental diabetes mellitus (DM) and intact animals. We found a decrease in the excitation threshold by 41,4 % ($P < 0,05$), and an increase in chronaxia by 9,5 % ($P < 0,01$), an increase of the amplitude of the N_3 -component by 15,8 % ($P < 0,05$), and an increase in the duration of the afferent peak by 4,5 % ($P < 0,05$) and the N_2 -component by 10,9 % ($P < 0,01$) respectively. We conclude that the metabolic changes under DM lead to modification of activity of the afferent pathways and interneuron pool of SC.

Key words: diabetes mellitus, interneuronal pool, potential of the dorsal surface of the spinal cord.

Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Public Health

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Костюк Е.П., Булгакова Н.В., Василенко Д.А. Характеристики проведения по афферентным нервным волокнам у мышей со стрептозотоцининдуцированным и генетически детерминированным диабетом // *Нейрофизиология*. – 1996. – **28**, № 4/5. – С.173–178.
2. Макий Е.А., Неруш П.А., Родинский А.Г. Параметры потенциала дорсальной поверхности спинного мозга крыс при экспериментальном гипертиреозе // *Нейрофизиология*. – 2001. – **33**, № 4. – С. 279–285.
3. Родинський О.Г., Зинов'єва О.Г., Мозгунов О.В. Електрофізіологічний аналіз збудливості нервово-м'язового комплексу за умов експериментального цукрового діабету // *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія*. – 2012. – **59**, №3. – С.7–12.
4. Сивоус Г.И. Клиническая характеристика диабетической периферической полиневропатии у детей и подростков // *Врач*. – 2004. – №2. – С.43–45.
5. Флоров А.К. О происхождении потенциала дорсальной поверхности спинного мозга : Автореферат дисс. ...канд. биол. наук. – Днепропетровск, 1966. – 17 с.
6. Шугуров О.О., Шугуров О.О., Особливості відведення масових спинномозкових потенціалів поза спинним мозком // *Нейрофизиология*. – 1999. – **31**, №2. – С. 120–122.
7. Carsten R.E., Whalen L.R., Ishii D.N. Impairment of spinal cord conduction velocity in diabetic rats // *Diabetes*. – 1989. – **38**, №6. – P.730–736.
8. D'Mello R., Dickenson A. H. Spinal cord mechanisms of pain // *Brit. J. Anaesthesia*. – 2008. – 101, №1. – P. 8–16.
9. Kucera P., Goldenberg Z., Varsik P., Buranova D., Traubner P. Spinal cord lesions in diabetes mellitus. Somatosensory and motor evoked potentials and spinal conduction time in diabetes mellitus // *Neuroendocrinol. Let.* – 2005. – **26**, №2. – P.143–147.
10. Hong S., Morrow T.J., Paulson P.E., Isom L.L., Wiley J.W. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, №28. – P.29341–50.
11. Kennedy J.M., Zochodne D.V. The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent,

- timing, and possible mechanisms // *Brain*. – 2000. – **123**, №12. – P. 2118–2129.
12. Li J-Q, Chen S-R., Chen H., Cai Y.Q., Pan H.L. Regulation of increased glutamatergic input to spinal dorsal horn neurons by mGluR5 in diabetic neuropathic pain // *J. Neurochem*. – 2010. – **112**, №1. – P.162–172.
 13. Matsuka Y., Spigelman I. Hyperosmolar solutions selectively block action potentials in rat myelinated sensory fibers: implications for diabetic neuropathy // *J. Neurophysiol*. – 2004. – **91**, №6. – P.48–56.
 14. Messinger R.B., Naik A.K., Jagodic M.M., Nelson M.T., Lee W.Y., Choe W.J., Orestes P., Latham J.R., Todorovic S.M., Jevtovic-Todorovic V. In-vivo silencing of the Cav3.2 T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy // *Pain*. – 2009. – **145**, №1-2. – P.184–195.
 15. Morgado C., Tavares I. C-fos expression at the spinal dorsal horn of streptozotocin-induced diabetic rats. // *Diab. Metab. Res. Rev.* – 2007. – **23**, №8. – P.644–652.
 16. Pertovaara A., Wei H., Kalmari J., Ruotsalainen M. Pain behavior and response properties of spinal dorsal horn neurons following experimental diabetic neuropathy in the rat: modulation by nitecapone, a COMT inhibitor with antioxidant properties. // *Exp. Neurol*. – 2001. – **167**, №2. – P.425–434.
 17. Schmeichel A.M., Schmelzer J.D., Low P.A. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy // *Diabetes*. – 2003. – **52**, №12 – P.165–171.
 18. Selvarajah D., Wilkinson I.D., Emery C.J., Harris N.D., Shaw P.J., Witte D.R., Griffiths P.D., Tesfaye S. Early Involvement of the Spinal Cord in Diabetic Peripheral Neuropathy // *Diabet. Care*. – 2006. – **29**, №12. – P.2664 – 2669.
 19. Spruce M.C., Potter J., Coppini D.V. The pathogenesis and management of painful diabetic neuropathy: a review // *Diabet. Med*. – 2003 – **20**. – P.88–98.
 20. Terada M., Yasuda H., Kikkawa R., Koyama N., Yokota T., Shigeta Y. Electrophysiological study of dorsal column function in streptozocin-induced diabetic rats: comparison with 2,5-hexanedione intoxication // *J. Neurol. Sci*. – 1993. – **115**, №1. – P.58–66.
 21. Varsik P., Kucera P., Buranova D., Balaz M. Is the spinal cord lesion rare in diabetes mellitus? Somatosensory evoked potentials and central conduction time in diabetes mellitus // *Med. Sci. Monit*. – 2001. – **7**, №47. – P.712–715.
 22. Vincent A.M., Russell J.W., Low P., Feldman E.L. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy // *Endocrin. Rev.* – 2004. – **25**, №4. – P.612–628.
 23. Wang X-L., Zhang H-M., Chen S-R., Pan H.L. Altered synaptic input and GABAB receptor function in spinal superficial dorsal horn neurons in rats with diabetic neuropathy // *J. Physiol*. – 2007. – **579**, №3. – P. 849–861.

Дніпропетров. мед. академія МОЗ України
E-mail: zinovevael@mail.ru

Матеріал надійшов до редакції 18.03.2013