

NITRERGIC STRUCTURES IN RABBIT DORSAL ROOT GANGLIA

RYBAROVA S, KLUCHOVA D, SCHMIDTOVA K, LOVASOVA K

NITRERGICKÉ ŠTRUKTÚRY V SPINÁLNYCH GANGLIÁCH KRÁLIKA

Abstract

Rybarova S, Kluchova D, Schmidtova K, Lovasova K:
Nitrergic structures in rabbit dorsal root ganglia
Bratisl Lek Listy 1999; 100 (10): 537–540

Nitrergic structures in normal rabbit dorsal root ganglia (DRG) were demonstrated in this study. Histochemical reaction for detection of NADPH-d activity was used indicating, the presence of nitric oxide synthase (NOS). Diaphorase activity was found mostly in small ganglion cells. The cells defined as intermediate in size were stained less frequently, and no big cell expressed diaphorase activity. The intensity of staining varied from light blue and violet to very dark. The highest number of reactive cells was detected in the sacral DRG. Neurons expressed very low concentration of diaphorase activity in cervical, thoracic and lumbar DRGs. These findings suggest, that NADPH-diaphorase activity demonstrate a distinctive distribution depending upon spinal level. (Fig. 5, Ref. 31.)

Key words: NADPH-d, rabbit, dorsal root ganglia.

Oxid dusíka (NO) je nepeptidový neurotransmitter, ktorý pôsobí priamo na nervových zakončeníach, kde reguluje synaptický prenos (Sanders a Ward, 1992). Pre syntézu NO je nevyhnutná prítomnosť enzýmu NOS — syntáza oxidu dusíka, na ktorej dôkaz sa okrem ekonomicky veľmi náročných imunohistochemických metód používa aj jednoduchá NADPH-d histochemická metóda. NADPH-d (redukovaný nikotínamidadeninukleotidfosfát-diaforáza) je enzým, ktorý dokazuje prítomnosť NOS. NO je syntetizovaný počas dopytu z L-arginínu enzýmom — syntáza oxidu dusíka (Bredt a Snyder, 1992). Neuvoľňuje sa vezikulami a exocytózou, ale voľne difunduje do okolitých tkanív, pričom má vo všeobecnosti vysoký prienik membránami (Kiechle a spol., 1993).

Enzým NOS je aktivovaný Ca^{2+} , a teda syntéza NO závisí aj od intracelulárnej koncentrácie Ca^{2+} . Neuronálna NOS (Bredt a spol., 1990; Bredt a Snyder, 1990, 1992) sa nachádza v CNS v nadbytku. NO je produkovaný postsynapticky ako odpoveď na zvýšenie intracelulárneho Ca^{2+} (Garthwaite, 1991).

Institute of Anatomy, Medical Faculty, Safarikensis University, Kosice.
rybarova@central.medic.upjs.sk

Address for correspondence: S. Rybarova, MVD, PhD, Institute of Anatomy, LF UPJS, Srobarova 2, SK-040 01 Kosice, Slovakia.
Phone: +421.95.622 8866

Abstrakt

Rybárová S., Kluchová D., Schmidtová K., Lovasová K.:
Nitrergické štruktúry v spinálnych gangliách kráľika
Bratisl. lek. Listy, 100, 1999, č. 10, s. 537–540

Nitrergické štruktúry v spinálnych gangliách kráľika sme dokázali pomocou histochemickej reakcie na dôkaz NADPH-d aktivity podľa Scherer-Singlera. NADPH-diaforázová aktivita je markerom syntázy oxidu dusíka (NOS — nitric oxide synthase), ktorá je potrebná pre syntézu oxidu dusíka (NO). NADPH-d pozitivitu sme zaznamenali predovšetkým v malých bunkách spinálnych ganglií. Menej často sa pozitívne farbili stredné bunky, kým veľké bunky nepreukazovali diaforázovú aktivitu ani v jednom prípade. Pozitívne reagujúce bunky sa farbili svetlomodrofialovo až výrazne tmavomodro. Najväčšia akumulácia reagujúcich buniek sa pozorovala v krížových gangliách. V krčných, hrudníkových a driekových gangliách sme pozorovali len ojedinele sa vyskytujúce NADPH-d reagujúce bunky. Tieto výsledky dokazujú, že NADPH-d pozitívne neuróny sa nachádzajú v spinálnych gangliách všetkých úrovni miechy, ale v odlišných koncentráciách. (Obr. 5, lit. 31.)

Kľúčové slová: NADPH-d, králik, spinálne gangliá.

Dnes je známych niekoľko foriem NOS. Inducibilná forma NOS je prítomná v makrofágoch, ktoré za podmienok dopytu môžu produkovať veľké množstvá NO. Konštitutívna forma NOS sa nachádza v endotelových bunkách (Mayer a spol., 1989; Busse a Mulsch, 1990) a v neuronálnych bunkách (Bredt a spol., 1990). Okrem Ca^{2+} tento enzým závisí aj od kalmodulínu a NADPH (Palmer a Moncada, 1989).

Materiál a metódy

V experimentoch sme použili kráľiky oboch pohlaví (n=4, s hmotnosťou 2500–3000 g). Zvieratám sme v tiopentalovej narkóze perfundovali fyziologickým roztokom cievný systém cez lavu srdcovú komoru. Nasledovala perfúzia 4 % paraformaldehydom s 0,1 % glutaraldehydom v 0,1 M fosfátovom tlmivom roztoku, pH 7,4. Roztoky boli čerstvo pripravené tesne pred použitím.

Ústav anatómie Lekárskej fakulty Univerzity P.J. Šafárika v Košiciach
Adresa: MVDr. S. Rybárová, CSc., Ústav anatómie LF UPJS, Šrobárova 2, 040 01 Košice.

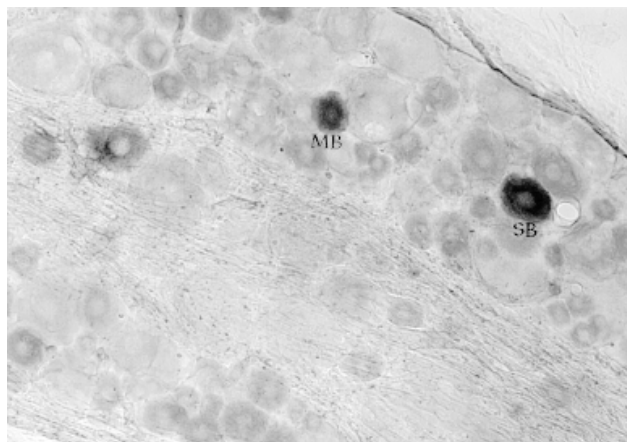


Fig. 1. Transverse section through the cervical DRG (C5). Small proportion of neurons were stained in cervical DRG. MB — small cell, SB — intermediate cell.

Obr. 1. Priechý rez krčným spinálnym gangliom (C5). Ojedinele výrazne sa farbiace NADPH-d pozitívne neuróny. MB — malá bunka, SB — stredná bunka.

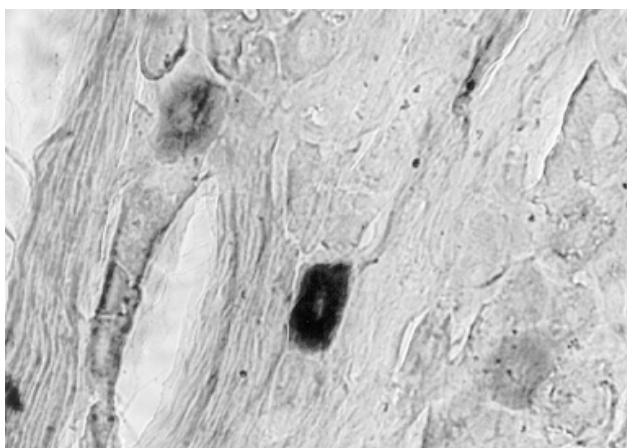


Fig. 2. Dark staining of diaphorase positive neuron (Th4).

Obr. 2. Tmavo, diaforázovopozitívne sa farbiaci neurón pri väčšom zväčšení (Th4).

Histochemický dôkaz NADPH-d

Odobraté tkanivo sme umiestnili do perfúzneho fixatíva na 3–4 h. Nasledovala inkubácia tkaniva v 30 % sacharóze vo fosfátovom tlmivom roztoku cez noc, s následným narezaním tkanivových rezov s hrúbkou 45 μ m na zmrazovacom mikrotóme. Na znázornenie NADPH-d aktivity sme použili histochemickú reakciu modifikovanú podľa Scherer-Singlera (1983). Rezy sme inkubovali 1 h pri 37 °C v roztoku 1,5 mM nitroblue tetrazólia (NBT, Sigma Chemicals, N-6876), 1,0 mM B-nikotínamidadenín dinukleotidfosfátu (NADPH, Sigma Chemicals, N-1630), 10,0 mM monosódiummalátu (Malic acid, Sigma Chemicals, M-1125), 0,5 % Tritonu X-100 rozpusteného v 0,1 M fosfátovom tlmivom roztoku, pH 7,4. Tkanivové rezy sme prepierali v 0,1 M fosfátovom

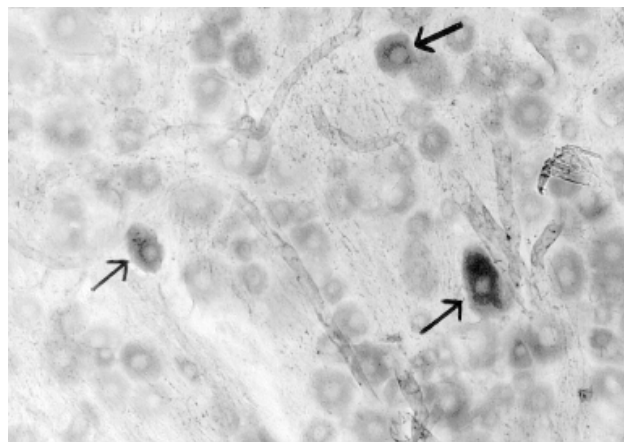


Fig. 3. Photomicrographs of NADPH-diaphorase staining in the lumbar DRG (arrow) (L4). Most of the cells are unstained — NADPH-diaphorase negative.

Obr. 3. Prierez driekovým spinálnym gangliom — L4. Ojedinele sa vyskytujúce tmavé — NADPH-d pozitívne neuróny (šípky) v porovnaní s veľkou prevahou svetlých, negatívnych buniek.

tlmivom roztoku (pH 7,4), montovali na sklíčka a ponechali voľne sa sušiť do rána. Po pokrytí rezov entellanom sme preparáty prezerali a vyhodnocovali vo svetelnom mikroskope.

Výsledky

Prítomnosť NADPH-d sme sledovali v bunkách spinálnych ganglií na všetkých úrovniach miechy. Spinálne gangliá sme si rozdělili podľa lokalizácie do štyroch skupín: krčné, hrudníkové, driekové a krížové. Všetky uvedené skupiny sme hodnotili jednotlivo. NADPH-d pozitivitu sme zaznamenali najčastejšie v malých tmavých bunkách, menej často v bunkách strednej veľkosti. Ani jedna veľká bunka neprekazovala diaforázovú aktivitu. Pozitívne reagujúce malé bunky sa farbili tmavomodro, stredné boli svetlejšie modré až fialové. V rámci jednotlivých rezov reagujúce bunky boli rozptýlené po celom reze.

V spinálnych gangliách krčnej časti miechy sa nachádzali len ojedinelé NADPH-d pozitívne bunky. Väčšina buniek bola negatívna (obr. 1). Podobný obraz pozitivitu sme zaznamenali v hrudníkových (obr. 2) a driekových gangliách (obr. 3). Najväčšiu hustotu pozitívne reagujúcich buniek sme zaznamenali v krížových gangliách (obr. 4), kde bunky vytvárali husté akumulácie v rozsahu celého rezu. Z hľadiska veľkosti buniek boli najčastejšie zastúpené malé tmavé bunky. Diaforázovopozitívne bunky mali výrazne presvetlené jadrá vo všetkých skupinách ganglií (obr. 5).

NADPH-diaforázová aktivita neurónov v spinálnych gangliách kráľika je pomerne slabo zastúpená v oblasti krčnej, hrudníkovej a driekovej. Od uvedených skupín sa výrazne odlišovali krížové gangliá, kde sme pozorovali početné zoskupenia prevažne malých, diaforázovopozitívnych buniek. Tieto bunky boli rozptýlené pomerne rovnomerne po celom reze.

Pri hodnotení našich výsledkov môžeme konštatovať, že u kráľika sa NADPH-diaforázová aktivita v krčných, hrudníkových a driekových spinálnych gangliách výrazne kvantitatívne odlišuje od diaforázovej aktivity v krížových gangliách.

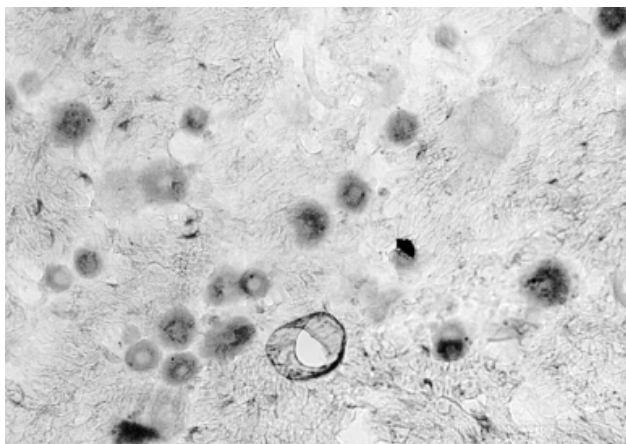


Fig. 4. Sacral dorsal root ganglion cells (S2). Dense accumulation of small to medium sized diaphorase-positive cells.

Obr. 4. Spinálne ganglion na úrovni S2. Hustá akumulácia diaforázovopozitívne reagujúcich buniek malej a strednej veľkosti.

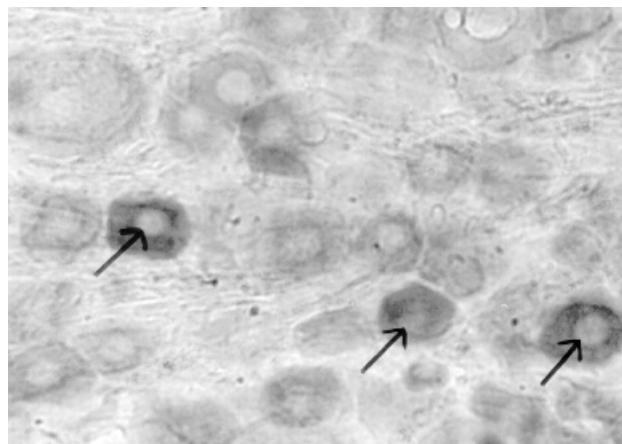


Fig. 5. At all levels of DRGs, the light nuclei of NADPH-d-positive cells were detected.

Obr. 5. Pri väčšom zväčšení môžeme pozorovať výrazne presvetlené jadrá všetkých diaforázovo reagujúcich neurónov (šípky) (Th8).

Diskusia

Bunky spinálnych ganglií sú okrúhle alebo oválne a ich veľkosť je variabilná. Hydén (1943) na základe merania priemeru bunkových tiel rozdelil bunkovú populáciu spinálnych ganglií u kráľika na 3 typy: a) veľké neuróny s priemerom 60 μm , b) stredné neuróny dosahujú 40 μm , c) malé neuróny s priemerom 30 μm . Vo všeobecnosti sa však neuróny spinálnych ganglií delia na dva základné typy: typ A — veľké svetlé bunky, typ B — malé tmavé bunky (Scharf, 1958; Andres, 1961). Bunková populácia ganglií je heterogénna, to znamená, že v každom gangliu sú zastúpené veľké i malé bunky. Existujú značné rozdiely aj v počte buniek medzi zodpovedajúcimi gangliami alebo skupinami ganglií na oboch stranách tela (Ygge a spol., 1981). Hrudníkové gangliá obsahujú zreteľne menej buniek ako krčné alebo driekové gangliá. Výsledky morfológických a fyziologických štúdií ukázali, že veľkosť neurónov má vzťah k určitým typom receptorov. Hrubé myelinizované axóny A α a A β , ktoré predstavujú aferentné vlákna z kožných mechanoreceptorov a proprioreceptorov, patria veľkým neurónom (50 μm), kým tenké myelinizované A δ vlákna pochádzajú zo subpopulácie stredne veľkých neurónov (35—50 μm) a majú vzťah k chladovým receptorom a nervosvalovým vretienkam. Nemyelinizované axóny (vlákna C) odstupujú z malých tmavých buniek (30 μm) a predstavujú voľné nervové zakončenia v koži (Scharf, 1958). Tieto vlákna majú vzťah k percepcii teplotných a bolestivých podnetov. Z hľadiska funkčných rozdielov sa predpokladá, že malé bunky predstavujú viscerálne aferentné neuróny. Viacerí autori uvádzajú, že malé bunky spinálnych ganglií sú špecificky nociceptívne (Knyihár, 1971; Ohnishi a Dyck, 1974).

Našou metódou dôkazu NADPH-d sme zistili, že hlavne malé a potom stredné neuróny spinálnych ganglií preukazujú NADPH-d pozitivitu. Pozitívne bunky boli roztrúsené po celom gangliu a intenzita farbenia varírovala od svetlomodrej po modrofialovú až tmavomodrú. Ani v jednej veľkej bunke sme nepozorovali diaforázovú aktivitu. Kvantitatívnou analýzou sa zistilo, že aktivita NADPH-d je rozdielna v závislosti od jednotlivých úrovní miechy.

Pri porovnávaní výsledkov u kráľika, ktoré sme dosiahli my, a výsledkov autorov Aimi a spol. (1991) u potkana, sme zistili určité odlišnosti v obsahu NADPH-d pozitívnych buniek v jednotlivých skupinách ganglií. Kým u kráľika sme najhustejšiu koncentráciu diaforázovopositívnych buniek zistili práve v krížových gangliách, u potkana sa bunky v tých istých gangliách farbili pozitívne len ojedinele, tvorili asi 1 % celkovej populácie buniek. Uvedení autori udávali najvyššie hladiny NADPH-d reaktívnych buniek u potkana v rozsahu Th4—L1 (25 %), kým my sme v týchto gangliách zaznamenali len veľmi zriedkavo sa vyskytujúce pozitívne bunky. Niektoré rezy hrudníkových ganglií boli dokonca bez akéhokoľvek nálezu pozitivít. Obsah NADPH-d pozitívnych buniek v jednotlivých skupinách ganglií je teda u uvedených druhov zvierat odlišný.

Veľmi zaujímavé je aj zistenie Wettsa a Vaughna (1993), ktorí sledovali prítomnosť NADPH-d v spinálnych gangliách potkanov počas vývoja. Väčšina buniek, ktoré pred narodením preukazujú prítomnosť NADPH-d, strácajú túto diaforázovú aktivitu po narodení. Len malé zvyšky buniek si zachovávajú uvedenú aktivitu počas celého života (Aimi a spol., 1991; McNeil a spol., 1992 a, b; Papka a McNeil, 1992; Vizzard a spol., 1993). Je možné, že tieto neuróny nezanikajú, ale migrujú na iné miesta. Náhrada stratených neurónov novými, NADPH-d negatívnymi sa nezistila zrejme aj preto, lebo migrácia buniek neurálnej lišty do spinálnych ganglií, ako aj neuronálna proliferácia sú ukončené pred obdobím straty diaforázovej aktivity (Serbedzija a spol., 1990; Lawson a spol., 1974).

Aj keď väčšina neurónov spinálnych ganglií dospelého potkana je diaforázovonegatívnych, niektoré z týchto buniek akoby spätne získali diaforázovú aktivitu po určitom type poškodenia. Napr. po periférnom poškodení — transekcii n. ischiadicus dochádza v gangliách driekovej úrovne miechy k nárastu diaforázovej aktivity (Fiallos-Estrada a spol., 1993; Verge a spol., 1992). Príčina tohto javu dnes ešte nie je celkom známa, aj keď jedným z možných vysvetlení je dôležitá úloha NO pri regenerácii a v procese návratu normálnych funkcií buniek po poškodení.

Po unilaterálnej ligatúre L5 a L6 spinálnych nervov autori Steel a spol. (1994) pozorovali signifikantné zvýšenie imunoreaktivity

syntázy oxidu dusíka (NOS) v príslušných spinálnych gangliách. Z uvedeného vyplýva, že NO má dôležitú úlohu pri vzniku a pretrvávaní neuropatickej bolesti. Ako vyplýva z anatomických štúdií u človeka a potkana, NO spolupôsobí pri prenose aferentných impulzov v mieche (Terenghi a spol., 1993). Nezávisle od tejto funkcie Gorke a Pierau (1980) zistili, že aferentná elektrická aktivita je vedená do bunkových tiel spinálnych ganglií, kde aktivuje zásoby Ca^{2+} . Týmto spôsobom sa zvyšujú hladiny Ca^{2+} v bunke, následne sa aktivuje NOS a produkuje NO. Účinky NO nebudú zrejme obmedzené iba na neuróny, pretože tento plyn zvyšuje aj produkciu cGMP v satelitových bunkách spinálnych ganglií (Morris a spol., 1992). Keďže v spinálnych gangliách sa nedokázali synaptické spojenia (Lieberman, 1976), NO tu má zrejme úlohu sprostredkovateľa intercelulárnych komunikácií medzi neurónmi a satelitovými bunkami.

Literatúra

- Aimi Y., Fujimura M., Vincent S.R., Kimura H.:** Localization of NADPH-diaphorase-containing neurons in sensory ganglia of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 306, 1991, s. 382–392.
- Andres K.H.:** Untersuchungen über den Feinbau von Spinalganglien. *Z. Zellforsch.*, 55, 1961, 1–48.
- Bredt D.S., Hwang P.M., Snyder S.H.:** Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature (Lond.)*, 347, 1990, s. 768–770.
- Bredt D.S., Snyder S.H.:** Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, s. 682–685.
- Bredt D.S., Snyder S.H.:** Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8, 1992, s. 3–11.
- Busse R., Mulsch A.:** Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett.*, 265, 1990, s. 133–136.
- Fiallos-Estrada C.E., Kummer W., Mayer B., Bravo R., Zimmermann M., Herdege T.:** Long-lasting increase of nitric oxide synthase immunoreactivity, NADPH-diaphorase reaction and c-JUN co-expression in rat dorsal root ganglion neurons following sciatic nerve transection. *Neurosci. Lett.*, 150, 1993, s. 167–173.
- Garthwaite J.:** Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.*, 14, 1991, s. 60–67.
- Gorke K., Pierau F.K.:** Spike potentials and membrane properties of dorsal root ganglion cells in pigeons. *Pflugers Arch.*, 386, 1980, s. 21–28.
- Hydén H.:** Protein metabolism in the nerve cell during growth and function. *Acta Physiol. Scand.*, 17, 1943, s. 1–136.
- Kiechle F.L., Maliski T.:** Nitric oxide biochemistry, pathophysiology, and detection. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 100, 1993, s. 567–573.
- Knyihár E.:** Fluoride-resistant acid phosphatase system of nociceptive dorsal root afferents. *Experientia*, 27, 1971, s. 1205–1207.
- Lawson S.N., Caddy K.W.T., Biscoe T.J.:** Development of rat dorsal root ganglion neurons. Studies of cell birthdays and changes in mean cell diameter. *Cell Tiss. Res.*, 153, 1974, s. 399–413.
- Lieberman A.R.:** Sensory ganglia. S. 188–278. In: Landon D.N. (Ed.): *The Peripheral Nerve*. New York, Wiley 1976.
- Mayer B., Schmidt K., Humbert P., Bohme E.:** Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca^{2+} -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164, 1989, s. 678–685.
- McNeill D.L., Papka R.E., Harris C.H.:** CGRP immunoreactivity and NADPH-diaphorase in afferent nerves of the rat penis. *Peptides*, 13, 1992, s. 1239–1246.
- McNeil D.L., Traugh Jr. N.E., Vaidya A.M., Hua H.T., Papka R.E.:** Origin and distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons and fibers innervating the urinary bladder of the rat. *Neurosci. Lett.*, 147, 1992, s. 33–36.
- Morris R., Southam E., Braid D.J., Garthwaite J.:** Nitric oxide may act as a messenger between dorsal root ganglion neurons and their satellite cells. *Neurosci. Lett.*, 137, 1992, s. 29–32.
- Ohnishi A., Dyck P.J.:** Loss of small peripheral sensory neurons in Fabry disease. *Arch. Neurol.*, 31, 1974, s. 120–127.
- Palmer R.M.J., Moncada S.:** A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 158, 1989, s. 348–352.
- Papka R.E., McNeil D.L.:** Distribution of NADPH-diaphorase-positive nerves in the uterine cervix and neurons in dorsal root and paracervical ganglia of the female rat. *Neurosci. Lett.*, 147, 1992, 224–228.
- Sanders K.M., Ward S.M.:** Nitric oxide as a mediator of noncholinergic neurotransmission. *Amer. J. Physiol.*, 262, 1991, s. G379–G392.
- Scharf J.H.:** Sensible Ganglien. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Nervensystem III*. Berlin—Göttingen—Heidelberg, Springer 1958.
- Scherer-Singler U., Vincent S.R., Kimura H., McGreer E.G.:** Demonstration of a unique population of neurons with NADPH diaphorase histochemistry. *J. Neurosci. Methods*, 8, 1993, s. 229–234.
- Serbedzija G.N., Fraser S.E., Bronner-Fraser M.:** Pathways of trunk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital dye labeling. *Development*, 108, 1990, 605–612.
- Steel J.H., Terenghi G., Chung J.M., Na H.S., Carlton S.M., Polak J.M.:** Increased nitric oxide synthase immunoreactivity in rat dorsal root ganglia in a neuropathic pain model. *Neurosci. Lett.*, 169, 1994, s. 81–84.
- Terenghi G., Riveros-Moreno V., Hudson L.D., Ibrahim N.B.N., Polak J.M.:** Immunohistochemistry of nitric oxide synthase demonstrates immunoreactive neurons in spinal cord and dorsal root ganglia of man and rat. *J. Neurol. Sci.*, 118, 1993, s. 34–37.
- Verge V.M.K., Xu Z., Xu X.-J., Wiesenfeld-Hallin Z., Hokfelt T.:** Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1992, s. 11617–11621.
- Vizzard M.A., Erdman S.L., de Groat W.C.:** Localization of NADPH-diaphorase in pelvic afferent and efferent pathways of the rat. *Neurosci. Lett.*, 152, 1993, s. 72–76.
- Wetts R., Vaughn J.E.:** Transient expression of B-BADPH diaphorase in developing rat dorsal root ganglia neurons. *Develop. Brain Res.*, 76, 1993, s. 278–282.
- Ygge J., Alskogius H., Grant G.:** Asymmetries and symmetries in the number of thoracic dorsal root ganglion cells. *J. Comp. Neurol.*, 202, 1981, s. 365–372.

Received April 4, 1999.

Accepted September 10, 1999.