

## Expression of peptidergic and nitrergic structures in dorsal root ganglia of the rabbit

Rybarova S, Kluchova D, Kocisova M, Schmidtova K, Lovasova K

### Dôkaz prítomnosti peptidergických a nitrergických štruktúr v spinálnych gangliách kráľika

#### Abstract

Rybarova S, Kluchova D, Kocisova M, Schmidtova K, Lovasova K:

Expression of peptidergic and nitrergic structures in dorsal root ganglia of the rabbit

Bratisl Lek Listy 2000; 101 (5): 280–287

In this study we have demonstrated the presence of neuropeptide substance P and non-peptide neurotransmitter NO (nitric oxide) in the dorsal root ganglia of rabbit.

NADPH-diaphorase histochemical staining was used for the detection of NO and immunohistochemical method for the detection of substance P. A particular number of dorsal root ganglion (DRG) cells were stained by SP and NADPH-d reaction. The presence of SP and NADPH-diaphorase positive cells varied depending upon spinal level of DRGs. Positively stained neurons were only small or medium-sized. Cells of large diameter profiles showed no staining. Substance P immunoreactive cells were stained brown and dark brown, the intensity of NADPH-d staining varied from light to very dark blue. In some DRGs cells, there was a very significant neuronal co-localization of immunoreactivity for SP and reactivity for NADPH-d. In summary, DRG cells appear to express diaphorase and substance P activity, and some of them contain both neurotransmitters. Recent studies analysing the participation of NO in the regulation of SP release in the spinal cord suggest, that the DRGs neurons may display a close interaction between NO and SP. (Fig. 14, Ref. 39.)

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

Neuropeptid substancia P (SP) sa už dávno považuje za hlavného NANC (neadrenergického a necholínergického) prenášača zmyslových odpovedí (Pernow, 1983). Túto myšlienku podporila neskoršia izolácia a určenie poradia aminokyselín v jej vzorci

Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Safarikensis University, Kosice. rybarova@central.medic.upjs.sk

Address for correspondence: S. Rybarova, VD, PhD, Dpt of Anatomy LF UJPS, Srobarova 2, SK-040 01 Kosice, Slovakia.  
Phone: +421.95.6228 866

#### Abstrakt

Rybárová S., Kluchová D., Kočišová M., Schmidtová K., Lovasová K.:

Dôkaz prítomnosti peptidergických a nitrergických štruktúr v spinálnych gangliách kráľika

Bratisl. lek. Listy, 101, 2000, č. 5, s. 280–287

Autori sa zamerali na sledovanie prítomnosti neuropeptidu substancie P (SP) a nepeptidového neurotransmitera NO (oxidu dusíka) v spinálnych gangliách kráľika. Na dôkaz oxidu dusíka použili jednoduchú NADPH-diaforázovú histochemickú metódu. Substanciu P dokazovali na tých istých rezoch imunohistochemickým dofarbením pomocou špecifickej primárnej protilátky. Spinálne gangliá na všetkých úrovniach miechy vykazovali SP a NADPH-d pozitivitu, no v rôznej koncentrácii. Ďalej zistili, že pri oboch neurotransmiteroch reagovali pozitívne výlučne malé a stredné bunky. NADPH-d pozitívne bunky sa farbili jasnomodro až tmavomodro, kým SP reagujúce bunky boli hnedé až tmavo hnedé. Ani jedna veľká bunka nevykazovala SP alebo NADPH-d pozitivitu. Veľmi zaujímavo sa javili bunky sfarbené do sivofialova, pri ktorých autori predpokladajú, že ide o kolokalizáciu SP a NADPH-d. V spinálnych gangliách kráľika sa teda vyskytujú bunky pozitívne samostatne na SP, samostatne na NADPH-d, ale aj bunky obsahujúce oba tieto neurotransmitery. Skutočnosť, že sa SP a NADPH-d, dva úplne odlišné neurotransmitterové systémy vyskytujú buď samostatne alebo spolu v tých istých bunkách, svedčí pravdepodobne aj o ich funkčných interakciách v bunkách spinálnych ganglií. Podľa dnes už známych poznatkov o regulácii uvoľňovania SP prostredníctvom donorov NO v mieche, sa dá uvažovať o ich podobnom vzájomnom pôsobení aj v bunkách spinálnych ganglií. (Obr. 14, lit. 39.)

**Kľúčové slová:** substancia P, NADPH-d, spinálne gangliá, kráľik.

(Chang a spol., 1971), ako aj dôkaz prítomnosti SP v zmyslových neurónoch (Hokfelt a spol., 1975). Dnes však už vieme, že existuje oveľa viac neuropeptidov, ktoré spĺňajú tieto požiadavky, a teda tiež patria do skupiny NANC mediátorov. V posledných rokoch

Ústav anatómie Lekárskej fakulty Univerzity P.J. Šafárika v Košiciach

Adresa: MVDr. S. Rybárová, CSC., Ústav anatómie LF UPJŠ, Šrobárova 2, 040 01 Košice.

bolo vyklonovaných viacero druhov patriacich medzi tachykiníny, ktorých hlavným predstaviteľom je substancia P. Boli umelo syntetizované aj receptory pre tieto tachykiníny — NK-receptory (Nakanishi, 1991). Vysokoučinné receptorové antagonisy blokujú účinky exogénnej SP. Tieto malé molekuly nepeptidovej povahy sú prelomom vo výskume neurotransmisie a môžu v mnohých prípadoch na rozdiel od peptidov prechádzať cez hematoencefalickú bariéru.

Pritomnosť neuropeptidov varíruje v závislosti od rôznych podmienok, ako sú endogénne zmeny, zmeny po experimentálnych zásahoch, počas užívania liekov alebo pri patofyziologických stavoch. Peptidy sú všeobecne produkované ribozómami a ich konečné rozmiestnenie závisí od syntézy v bunkových telách, odkiaľ sa axonálnym transportom dopravujú do terminálnych oblastí (Hokfelt a spol., 1994). Na druhej strane hladina klasických neurotransmiterov je relatívne konštantná aj za premenlivých podmienok, čo je spôsobené lokálnou syntézou v nervových zakončeníach a mechanizmus, ktorý kontroluje dopyt a dodávku neurotransmiterov v blízkosti miesta uvoľnenia.

Substancia P sa syntetizuje v spinálnych gangliách, odkiaľ sa axonálnym tokom transportuje do dorzálnych rohov miechy a do nervových zakončení periférneho nervového systému, kde sa aj uskladňuje. V mieche je lokalizovaná predovšetkým v jej dorzálnych rohoch, preto sa predpokladá, že tu má dôležitú úlohu pri nociceptnej transmisii (Schneider a spol., 1988; Sluka a spol., 1992).

Oxid dusíka (NO) je nepeptidový neurotransmitter, ktorý pôsobí priamo na nervových zakončeníach, kde reguluje synaptický prenos (Sanders a spol., 1992). Pre syntézu NO je nevyhnutná prítomnosť enzýmu NOS — syntáza oxidu dusíka, na dôkaz ktorej sa okrem ekonomicky veľmi náročných imunohistochemických metód používa aj jednoduchá NADPH-d histochemická metóda. NADPH-d (redukovaný nikotínamidadenínukleotidfosfát — diaforáza) je enzým, ktorý dokazuje prítomnosť NOS.

NO je syntetizovaný počas dopytu z L-arginínu enzýmom — syntáza oxidu dusíka (Bredt a Snyder, 1992). NO sa neuvoľňuje vezikulami a exocytózou, ale voľne difunduje do okolitých tkanív, pričom má vo všeobecnosti vysoký prienik membránami (Kiechle a Malinsky, 1993).

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

Dnes je známych niekoľko foriem NOS. Inducibilná forma NOS je prítomná v makrofágoch, ktoré za podmienok dopytu môžu produkovať veľké množstvá NOS. 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 králiky oboch pohlaví v počte  $n=4$ , hmotnosti 2500—3000 g. Zvieratám sme v tiopentalovej narkóze cez lavú srdcovú komoru prepláchli cievny systém fyziologickým roztokom. 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.

### *Dôkaz substancie P pomocou nepriamej enzymatickej imunohistochemie*

Jednotlivé spinálne gangliá sme po odobratí uložili do Zamboniho fixatívu a postfixovali 24 h pri izbovej teplote (možno ponechať tkanivo vo fixačnom roztoku až 7 dní a potom ho ďalej spracúvať).

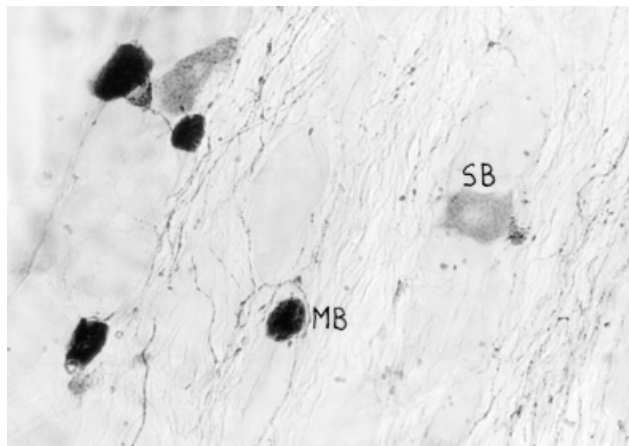
Gangliá sme premiestnili do roztoku 20 % sacharózy na 24 h, potom narezali na zmrazovacom mikrotóme rezy s hrúbkou 35—40  $\mu\text{m}$ . Za účelom inhibície endogénnej peroxidázovej aktivity sme rezy inkubovali v roztoku 0,3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  v PBS počas 30 minút. Nasledovalo prepláchnutie v PBS s 0,2 % Triton X-100, 3x5 min. Zablokovanie nešpecifickej reaktivity pozadia sme dosiahli inkubáciou rezov v 4 % kozom sére počas 2 h, alebo pre urýchlenie metódy v termostate pri 37 °C počas 30 minút. Bez opláchnutia sme na rezy navrstvili nariedenú primárnu protilátku (potkania anti-SP, Serva, Germany) a rezy sme ponechali cez noc v chladničke pri 4 °C. Nasledovalo prepláchnutie v PBS + Triton X-100, 3x5 minút. Rezy sme inkubovali s biotinylovanou sekundárnou protilátkou (Sigma), nariedenou v roztoku PBS Triton v pomere 1:50, počas 2—3 h, inkubáciu možno opäť urýchliť v termostate. Po uplynutí tejto doby sme rezy prepláchli v základnom tlmivom roztoku — PBS + Triton 3x5 minút, a na ne navrstvili komplex streptavidín — peroxidáza (Sigma) na 60 minút v riedení 1:50. Po opláchnutí 2x5 min v oplachovacom roztoku sme pridali 5 mg DAB do 10 ml PBS a tesne pred použitím sme k tomuto roztoku pridali ešte 71  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Podľa rýchlosti nástupu farebnej reakcie sme ponechali pôsobiť tento roztok 2—5 minút. Nasledovalo 15—20 min premytia rezov v základnom tlmivom roztoku (PBS + Triton). Konečná fáza predstavovala natiahnutie rezov na sklíčka a ich ponechanie voľnému usušeniu cez noc pri izbovej teplote. Po odvodnení a zamontovaní sme preparáty prezerali a vyhodnocovali vo svetelnom mikroskope (Nikon).

### *Histochemický dôkaz NADPH-d – modifikovaná metóda podľa Scherera-Singlera (1983)*

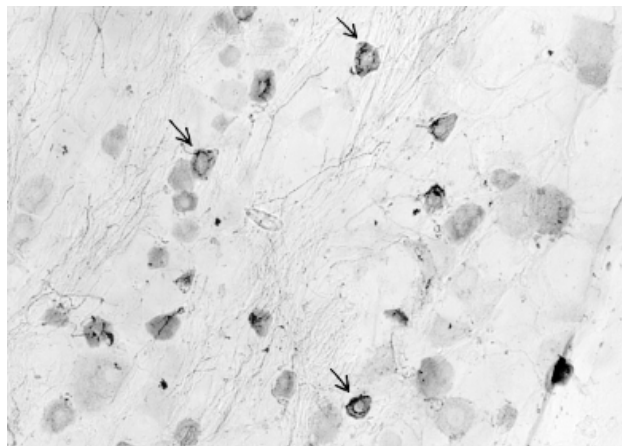
Odobraté tkanivo sme umiestnili do perfúzneho fixatívu na 3—4 h. Nasledovala inkubácia tkaniva v 20 % sacharóze v tom istom tlmivom roztoku cez noc, s následným narezaním tkanivových rezov s hrúbkou 45  $\mu\text{m}$  na zmrazovacom mikrotóme. Rezy sme inkubovali 1 h pri 37 °C v roztoku 1,5 mM nitroblue tetrazólia (NBT, Sigma Chemicals, N-6876), 1,0 mM beta-nikotínamidadenínukleotidfosfátu (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 8,0. Tkanivové rezy sme prepierali v 0,1 M fosfátovom tlmivom roztoku (pH 7,4), montovali na sklíčka a ponechali voľnému usušeniu cez noc. Po pokrytí rezov Entellanom sme preparáty prezerali a vyhodnocovali vo svetelnom mikroskope (Nikon).

### *Metóda dvojakeho farbenia, NADPH-d histochemická reakcia s následnou substanciou P imunoreakciou*

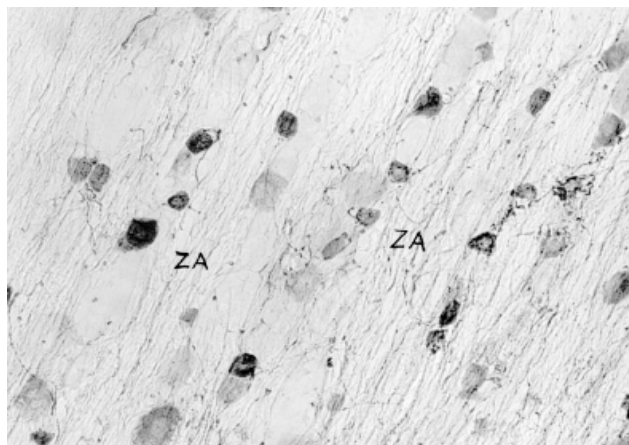
Po ofarbení tkanivových rezov na NADPH-d diaforázu sme ich opláchli 3x5 min vo fosfátovom tlmivom roztoku a následne ich dofarbovali imunohistochemickou reakciou na substanciu P.



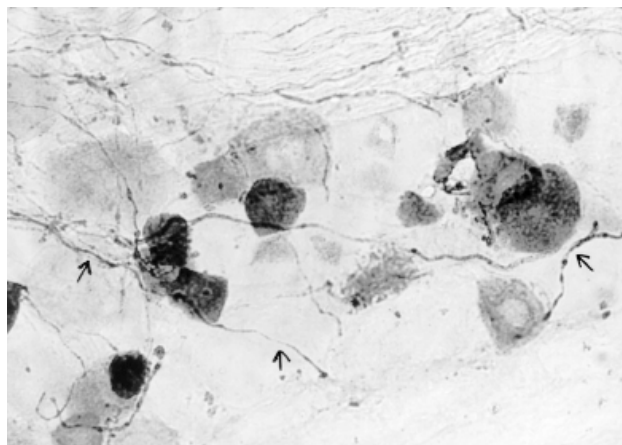
**Fig. 1.** Strong dark brown SP positivity of small cells, and lighter medium-sized cells on the transverse section of the cervical DRG (C2), MB — small cell, SB — medium-sized cell.  
**Obr. 1.** Výrazne tmavohnedo sa farbiace malé a svetlejšie stredné SP pozitívne bunky na priečnom reze krčným spinálnym gangliom (C2), MB — malá bunka, SB — stredná bunka.



**Fig. 2.** Large amounts of SP immunoreactive cells with light nuclei (C6) (arrows).  
**Obr. 2.** SP imunoreaktívne bunky v hustom zastúpení s jasne presvetlenými jadrami (C6) (šípky).



**Fig. 3.** Axons — branches extending from ganglion cells form fascicles which run longitudinally through the ganglion (S1) (axons fascicles — ZA).  
**Obr. 3.** Výbežky gangliových buniek — axóny, vytvárajú zväzky prebiehajúce longitudinálne gangliom (S1) (zväzky axónov — ZA).



**Fig. 4.** Detail of SP immunoreactive axons forming dense plexuses (S1) (arrows).  
**Obr. 4.** Detailný pohľad na výbežky gangliových buniek SP pozitívnych, ktoré vytvárajú husté splete (S1) (šípky).

Touto metódou sme vizualizovali NADPH-d, SP, ako aj kolo-kalizované NADPH-d + SP gangliové bunky.

### Výsledky

#### *Prítomnosť substancie P v bunkách spinálnych ganglií — imuno-pozitivita*

Prítomnosť substancie P sme sledovali v spinálnych gangliách na všetkých úrovniach miechy. Spinálne gangliá sme si rozdelili do štyroch skupín: krčné, hrudníkové, driekové a krížové. Z troch základných typov buniek, ktoré sa vyskytujú v spinálnych gan-

gliách (malé, stredné a veľké), reagovali SP pozitívne väčšinou malé bunky a bunky strednej veľkosti. Tieto bunky sa farbili hne-do až tmavohnedo (obr. 1). Ani jedna veľká bunka nepreukazovala SP pozitivitu. Malé bunky boli najčastejšie tmavohnedo sfarbené, kým stredné bunky sa farbili oveľa svetlejšie. Veľmi často sme pri malých aj stredných reagujúcich bunkách pozorovali výrazne presvetlené jadrá (obr. 2). Ostatná cytoplazma sa farbila rovnomerne. Reagujúce bunky boli difúzne rozptýlené po celom reze. Na niektorých rezoch sme však zaznamenali usporiadanie buniek do stĺpcov, ktoré boli oddelené pásmi jednotlivo prebiehajúcich vlákien — axónov, častejšie boli tieto vlákna usporiadané do hrubých zväz-

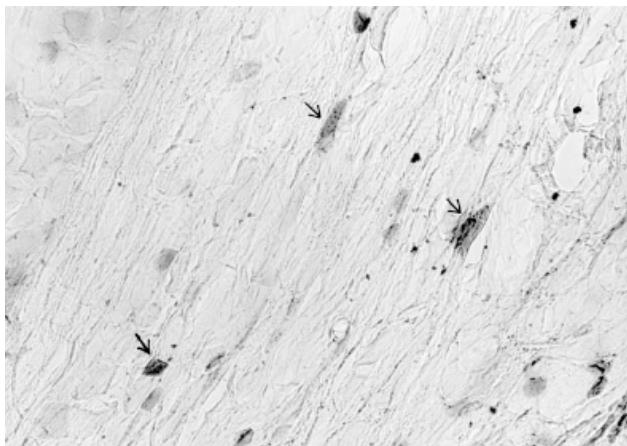


Fig. 5. Relatively low concentration of SP reactivity in thoracic DRG (Th12) (arrows).

Obr. 5. Relatívne nízka koncentrácia SP pozitívy v hrudníkových spinálnych gangliách (Th12) (šípky).

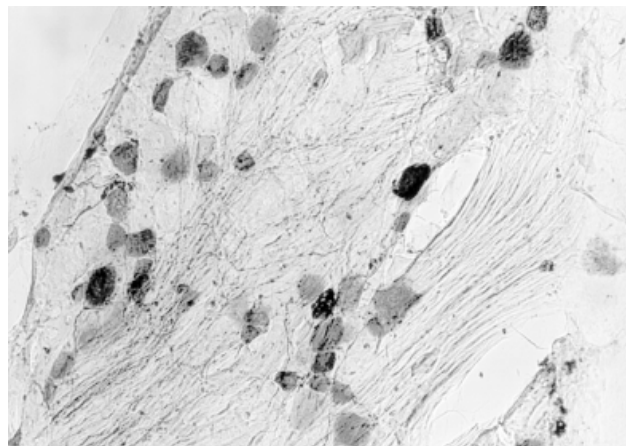


Fig. 6. Dense accumulation of SP reactivity in lumbar DRG (L3).

Obr. 6. Hustá akumulácia SP buniek v lumbálnych gangliách (L3).

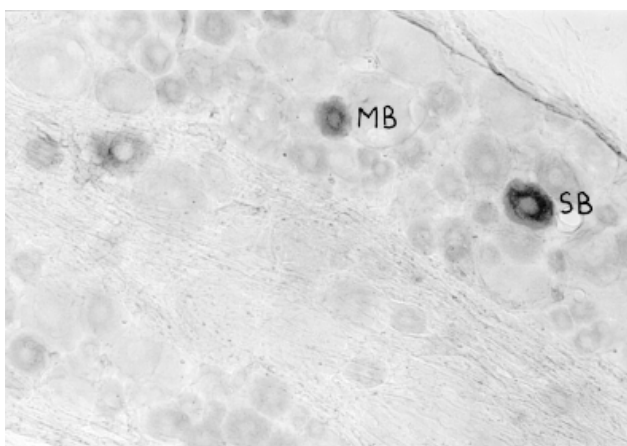
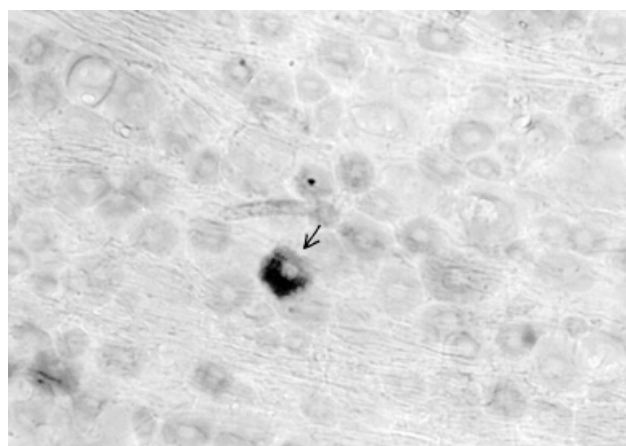


Fig. 7, 8. The transverse section through the cervical DRG (dorsal root ganglion) displays (C5) clearly stained small and medium-sized NADPH-diaphorase positive cells. MB — small cell, SB — medium-sized cell.

Obr. 7, 8. Na priečnom reze krčným spinálnym gangliom (C5) sú jasne znázornené malá a stredná NADPH-d pozitívna bunka. MB — malá bunka, SB — stredná bunka.



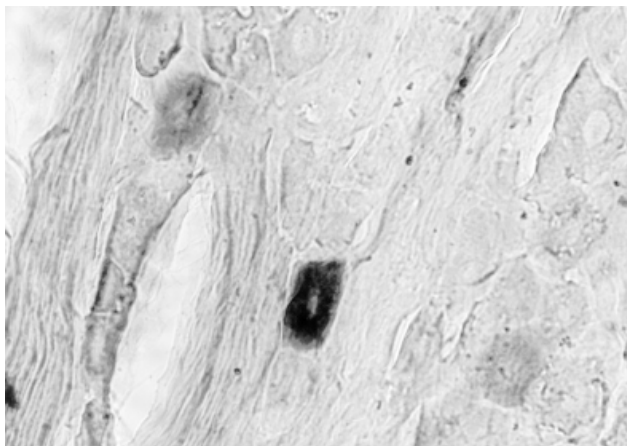
kov (obr. 3). Tieto axóny boli rôznej dĺžky a vystupovali z tiel pozitívnych malých a stredných buniek. Prebiehali priamo, alebo stočene a boli aj výrazne SP pozitívne (obr. 4).

Použitou metódou sme zaznamenali pomerne výrazné rozdiely v kvantite pozitívnych buniek v jednotlivých skupinách ganglií. Najväčšiu hustotu reagujúcich buniek sme videli v krčných gangliách (C1—C7) (obr. 2), ganglion C8 už ukazovalo ubúdanie pozitívy, ktoré pokračovalo v rozsahu všetkých hrudníkových, vrátane horných driekových ganglií (C8-L2) (obr. 5). Pozitíva v týchto gangliách sa odlišovala aj kvalitatívne, pretože takmer výlučne reagovali svetlohnedým sfarbením len bunky strednej veľkosti, u ktorých sme nevideli bunkové výbežky (obr. 5). Malé tmavé bunky sme v týchto gangliách nepozorovali takmer vôbec. Nárast poziti-

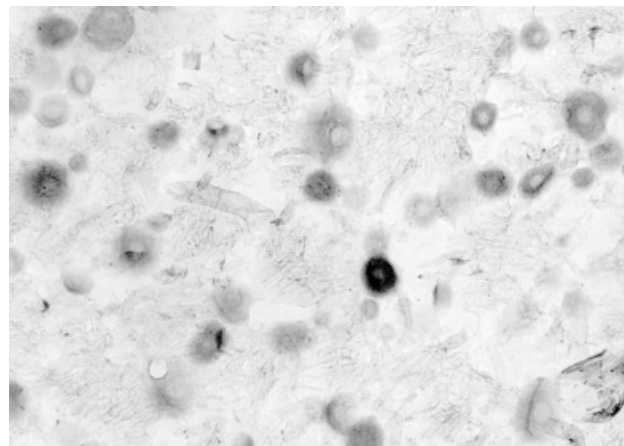
vity sme opäť zaznamenali v dolných driekových a krížových gangliách (L3-S4), kde sme videli okrem stredných svetlých aj mnoho malých tmavých buniek s početnými výbežkami (obr. 6).

#### *Prítomnosť NADPH-diaforázy v bunkách spinálnych ganglií – histochemická reakcia*

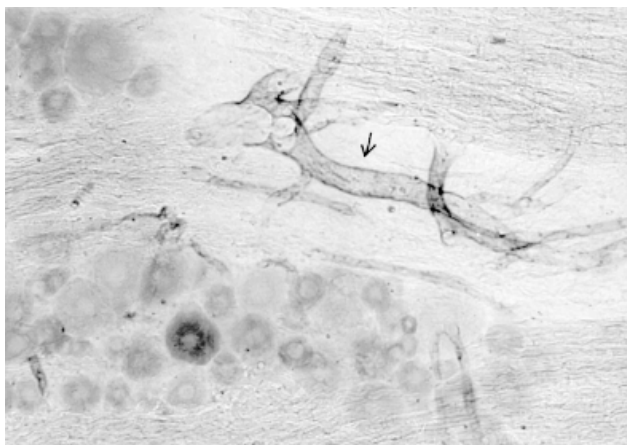
Podobne ako pri substancii P sme aj diaforázovú aktivitu buniek sledovali vo všetkých štyroch skupinách spinálnych ganglií. Už pri prvom pozorovaní rezov v mikroskope sme si všimli výrazný rozdiel v množstve NADPH-d pozitívnych buniek v porovnaní s počtom SP buniek. Diaforázovo reagujúcich buniek bolo vo všetkých štyroch skupinách ganglií oveľa menej. NADPH-diaforázovú aktivitu sme zaznamenali pri SP najčastejšie v malých



**Fig. 9. Dark staining of diaphorase positive neuron in the thoracic DRG (Th4).**  
**Obr. 9. Tmavo, výrazne diaforázovo sa farbiaci neurón hrudníkového ganglia (Th4).**



**Fig. 10. Dense accumulation of small and medium-sized NADPH-diaforase positive cells in the sacral DRG (S2).**  
**Obr. 10. Hustá populácia malých a stredných NADPH-d reagujúcich buniek v krížovom gangliu (S2).**



**Fig. 11. On the transverse section we can clearly follow the diaphorase-positive blood vessels due to strong NADPH-d positivity of their endothelial cells (C6) (arrow).**  
**Obr. 11. Na transverzálnom reze sledujeme jasne diaforázovo pozitívne krvné cievy. Diaforázova pozitivita ciev je spôsobená endotelovými bunkami, ktoré sú NADPH-d reagujúce (C6) (šípka).**

bunkách, menej často v bunkách strednej veľkosti. Kladná reakcia malých buniek sa prejavila tmavomodrým sfarbením, stredné bunky boli svetlomodré až svetlofialové. V rámci jednotlivých rezov boli reagujúce bunky rozptýlené po celom reze. Vo všetkých skupinách ganglií mali NADPH-d bunky výrazne svetlejšie jadrá. Cytoplazma bola tmavšia a rovnomerne sfarbená.

V krčných spinálnych gangliách sa nachádzali len ojedinelé NADPH-d pozitívne bunky (obr. 7, 8). Podobný obraz výskytu pozitívnych buniek sme videli aj v hrudníkových a driekových gangliách (obr. 9). Výraznejšiu zmenu sme pozorovali len v krížových gangliách, kde boli diaforázovo pozitívne bunky prítomné

v oveľa väčšom počte, zastúpené populáciou hlavne malých tmavomodro sa farbiacich buniek (obr. 10).

Pri NADPH-d pozitívnych bunkách sme na rozdiel od SP imunoreaktívnych buniek nepozorovali axóny, alebo sa farbili len veľmi slabou.

Metódou NADPH-d sa nám však veľmi jasne modro farbili endotelové bunky ciev, ktoré výrazne kontúrovali ich priebeh (obr. 11). Pri porovnávaní SP a NADPH-d pozitivity sme dostali veľmi podobný kvalitatívny obraz distribúcie týchto dvoch neurotransmiterov. Väčšie rozdiely sme pozorovali v počte reagujúcich SP a NADPH-d buniek v rámci jednotlivých skupín spinálnych ganglií, ako aj v celkovej vyššej koncentrácii SP pozitívnych buniek v porovnaní s výskytom NADPH diaforázovo reagujúcich buniek vo všetkých skupinách spinálnych ganglií.

#### *Kolokalizácia substancie P a NADPH-diaforázy v bunkách spinálnych ganglií*

Časť tkanivových rezov sme farbili dvojako. Ako prvú sme použili metódu dôkazu NADPH diaforázy, potom nasledovalo imunohistochemické dofarbovanie tých istých rezov na substanciu P.

Po takomto spracovaní rezov sme v histologickom obraze pozorovali populáciu trojako sfarbených buniek, modro, hnedo a zvlášť nás upútali bunky sfarbené sivofialovo. Z hľadiska veľkosti patrili všetky tieto bunky do skupiny malých a stredných buniek. Modré bunky boli NADPH-diaforázovo pozitívne, hnedo sa sfarbovali substanciu P imunoreagujúce. K týmto dvom skupinám buniek pristúpili nové, sivofialovo sa farbiace, ktoré sme označili ako bunky obsahujúce NADPH-d aj SP, teda kolokalizované (obr. 12, 13). Opäť sme pri všetkých troch typoch buniek pozorovali výrazne svetlejšie jadrá (obr. 14). Kolokalizované bunky sa vyskytovali buď samostatne alebo v tesnej blízkosti so SP a NADPH-d pozitívnymi bunkami. Farebná odlišnosť bola v týchto prípadoch veľmi nápadná.

Nepozorovali sme však žiadne výrazné rozdiely v počte kolokalizovaných buniek v jednotlivých skupinách ganglií. Výskyt týchto buniek bol celkovo pomerne nízky.

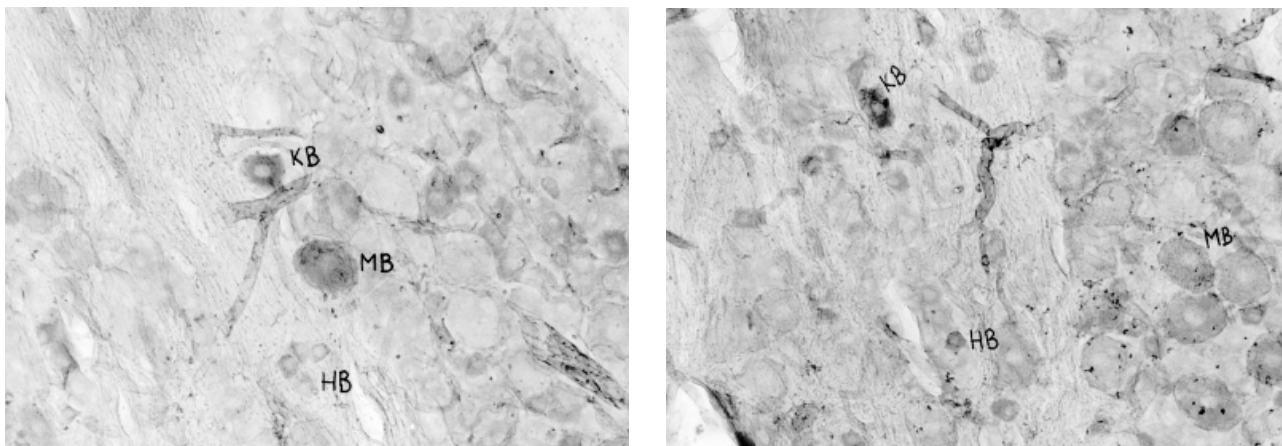


Fig. 12, 13. We have used double labelling to detect SP, NADPH-d and corresponding cells (SP and NADPH-d). SP positive cells are brown (HB), NADPH-diaphorase staining is blue (MB). Colocalization of SP immunoreactivity and NADPH-d positivity in the same cell body (KB). Clear NADPH-diaphorase activity of blood vessels.

Obr. 12, 13. Dvojakým farbením tkanivových rezov sme dostali populáciu buniek SP pozitívnych (SP-bunky), NADPH-d reagujúcich (NADPH-d bunky) a kolokalizovaných (SP plus NADPH-d). SP pozitívne bunky sa farbja hnedo (HB), NADPH-d sú modré (MB), kolokalizovaná bunka je modrohnedá až fialová (KB). Jasne sa znázorňujú aj diaforázovo pozitívne steny ciev.

Záverom môžeme konštatovať, že niektoré bunky spinálnych ganglií vykazujú NADPH-d pozitivitu, iné obsahujú substanciu P a poslednú skupinu predstavujú kolokalizované bunky obsahujúce oba tieto neurotransmitery.

### Diskusia

Bunková populácia spinálnych ganglií je heterogénna, to znamená, že v každom gangliu sú zastúpené veľké, stredné a malé bunky. Počty buniek medzi jednotlivými gangliami varujú, pričom existujú značné rozdiely medzi zodpovedajúcimi gangliami alebo skupinami ganglií na oboch stranách tela (Ygge a spol., 1981). Hrudníkové gangliá obsahujú zreteľne menej buniek ako krčné a driekové gangliá.

Viaceri autori sa zaoberali stanovením kritérií pre rozdelenie bunkovej populácie spinálnych ganglií. U kráľika sa dodnes používa rozdelenie buniek podľa veľkosti, ktoré vypracoval roku 1943 Hydnén. Bunky rozdelil do troch základných typov: a) malé neuróny s priemerom 30  $\mu\text{m}$ , b) stredné neuróny dosahujúce priemer 40  $\mu\text{m}$  a c) veľké bunky s priemerom 60  $\mu\text{m}$ . Neskôr boli bunky spinálnych ganglií všeobecne rozdelené na dva základné typy: 1. veľké svetlé bunky (typ A) a 2. malé tmavé bunky (typ B) (Scharf, 1958; Andres, 1961). Tieto dva typy buniek možno odlišiť na základe vývojových, histochemických, ako aj ultraštruktúrnych zvláštností. Hlavné rozdiely v ultraštruktúre medzi uvedenými typmi sú v usporiadaní granulovaného endoplazmatického retikula, Golgiho komplexu a ribozómov.

Anatomické dôkazy svedčia o tom, že malé bunky majú nemyelinizované axóny, kým myelinizované axóny pochádzajú z veľkých buniek (Scharf, 1958). Z funkčného hľadiska sa predpokladá, že malé bunky predstavujú viscerálne aferentné neuróny, a teda sú špecificky nociceptívne (Knyihár, 1971).

Primárne aferentné neuróny sú chemicky heterogénne. Obsahujú rôzne kombinácie neuropeptidov, aminokyselín, enzýmov, nukleotidov a iných látok.

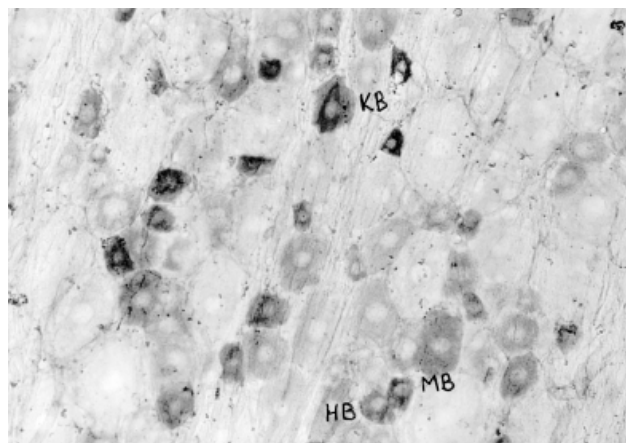


Fig. 14. The light nuclei were seen in SP (HB), NADPH-d (MB) and colocalized (KB) positive cells.

Obr. 14. SP (HB), NADPH-d (MB) a kolokalizované bunky (KB) s vysvetlenými jadrami.

Výsledky, ktoré prezentujeme v tejto práci, dokazujú, že v populácii buniek spinálnych ganglií kráľika sa nachádzajú bunky substancie P imunoreaktívne, NADPH-d (NO) pozitívne aj kolokalizované, ktoré obsahujú oba detegované neurotransmitery.

Substancia P a L-glutamát sa považujú za základné mediátory v spinálnych gangliách. Substancia P je prítomná v centrálnych výbežkoch axónov gangliových buniek mnohých druhov. Takahashi a Otsuka (1975) pozorovali po preťatí zadných miechových koreňov pokles hladiny SP v zadných miechových rohoch, ako aj jej hromadenie v telách gangliových buniek u mačky. K poklesu SP dochádza aj po poškodení periférneho nervu. Podľa viacerých autorov sa SP tvorí v malých bunkách spinálnych ganglií (Chan-

Palay a Palay, 1977). Tento názor potvrdzuje zistenie, že pri numerickom úbytku malých buniek dochádza k výraznému poklesu hladiny SP (Scaravilli, 1983). V malých neurónoch sa okrem SP dokázala prítomnosť aj ďalších neuropeptidov, ako somatostatínu, calcitonínu (CGRP), cholecystokinínu, galanínu aj vazoaktívneho intestinálneho polypeptidu. Substancia P a CGRP sa považujú za excitačné nociceptívne mediátory. Prítomnosť SP sa imunohistochemicky dokázala v 20 % malých gangliových buniek, pričom počet týchto buniek sa mení v závislosti od rôznej segmentálnej úrovne (Ferčáková, 1997).

Usudzuje sa, že peptidy v bunkách spinálnych ganglií okrem funkcie mediátora môžu mať úlohu aj pri trofickej odpovedi na poškodenie (Hokfelt a spol., 1987).

Ďalší dokázaný nepeptidový neurotransmitter NO (oxid dusíka) sa tvorí v cytoplazme neurónov pomocou NOS (NO syntáza) a difunduje do satelitových buniek. Táto látka môže pôsobiť aj ako mediátor viscerálnych reflexných dráh u potkana a mačky (Aimi a spol., 1991; Vizzard a spol., 1994).

Zaujímavým sa javí aj zistenie autorov Wettsa a Vaughna (1993), ktorí sledovali prítomnosť NADPH-d v spinálnych gangliách potkanov počas vývoja. Väčšina buniek, ktoré preukazujú pred narodením diaforázovú aktivitu, ju po narodení strácajú (Aimi a spol., 1991; McNeil a spol., 1992 a, b; Papka a McNeil, 1992; Vizzard a spol., 1993). Možno že tieto neuróny nezanikajú, ale migrujú na iné miesta. Náhrada stratených neurónov novými, NADPH-d negatívnymi, sa nezistila ani preto, lebo ako migrácia buniek neurálnej lišty do spinálnych ganglií, tak aj neuronálna proliferácia sú ukončené pred obdobím straty diaforázovej aktivity (Serbedzija a spol., 1990; Lawson a spol., 1974). Prefatie n. ischiadicus spôsobuje výrazné zvýšenie tvorby NOS v bunkách zodpovedajúcich spinálnych ganglií, čo naznačuje účasť NO vo funkcii gangliových buniek v mieste poškodenia po lézii periférnych nervov (Ferčáková, 1997). Vo väčšine týchto neurónov sa imunohistochemicky dokázala aj prítomnosť SP. Skutočnosť, že sa tieto dva úplne odlišné neurotransmitery vyskytujú spoločne v bunkách spinálnych ganglií, svedčí pravdepodobne aj o ich funkčných interakciách. Je všeobecne známe, že hladina SP v mieche je výrazne zvýšená počas hyperalgézie. Tento neuropeptid je teda zrejme zodpovedný spoločne s ďalšími za prenos nociceptívnych podnetov na úrovni CNS.

Oxid dusíka, podľa štúdií z posledných rokov, má za určitých podmienok významnú úlohu pri vzniku hyperalgézie (Kitto a spol., 1992; Meller a spol., 1992). Tento názor podporujú výsledky Melleru a spol. (1992 b), ktoré dokazujú, že hyperalgézia, ktorá sa objaví počas periférnej neuropatie, závisí od produkcie NO v mieche. Otázkou teda zostáva, či NO podporuje hyperalgéziu na úrovni miechy tým, že zvyšuje uvoľňovanie peptidov (SP) v jej dorzálnych rohoch. Čiastočnou odpoveďou na tento zložitý problém sú výsledky Kamisakiho a spol. (1995), ktoré hovoria o možnej spolupráci medzi SP a NO v mieche, pričom NO môže priamo pôsobiť na nervové zakončenia obsahujúce SP a ovplyvniť jej zvýšené uvoľnenie, alebo za zmenených podmienok, naopak, zníženie produkcie SP. Ak vychádzame z poznatkov, ktoré svedčia o úzkom funkčnom prepojení spinálnych ganglií a sivej hmoty miechy a čiastočne už poznáme pôsobenie SP a NO v mieche, môžeme hádať tento model spolupôsobenia aplikovať aj na neuróny spinálnych ganglií. Potvrdenie tejto hypotézy si bude v budúcnosti vyžadovať ďalšie skúmanie.

## 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, s. 1–48.

**Bredt D.S., Hwang P.M., Snyder S.H.:** Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 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 calmoduline. *FEBS Lett.*, 265, 1990, s. 133–136.

**Ferčáková A.:** Morfológia senzitivných ganglií. Bratislava, Veda 1997, s. 1–93.

**Garthwaite J.:** Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.*, 14, 1991, s. 60–67.

**Hokfelt T., Kellerth J.O., Nilsson G., Pernow B.:** Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. *Brain Res.*, 100, 1975, s. 235–252.

**Hokfelt T., Wiesenfeld-Hallin Z., Villar M., Melander T.:** Increase of galanine-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy. *Neurosci. Lett.*, 83, 1987, s. 217–220.

**Hokfelt T., Zhang X., Wiesenfeld-Hallin Z.:** Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. *Trends Neurosci.*, 17, 1994, s. 22–30.

**Hydén H.:** Protein metabolism in the nerve cell during growth and function. *Acta Physiol. Scand.*, 17, 1943, s. 1–136.

**Chan-Palay V., Palay S.L.:** Ultrastructural identification of substance P cells and their processes in rat sensory ganglia and their terminals in the spinal cord by immunohistochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1977, s. 4050–4054.

**Chang M.M., Leeman S.E., Nial H.D.:** Amino acid sequence of substance P. *Nature*, 232, 1971, s. 86–87.

**Kamisaki Y., Nakamoto K., Wada K., Itoh T.:** Nitric oxide regulates substance P release from rat spinal cord synaptosomes. *J. Neurochem.*, 65, 1995, s. 2050–2056.

**Kiechle F.L., Maliski T.:** Nitric oxide biochemistry, pathophysiology, and detection. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 100, 1993, s. 567–573.

**Kitto K.F., Haley J.E., Wilcox G.L.:** Involvement of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. *Neurosci. Lett.*, 148, 1992, s. 1–5.

**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.

**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.
- McNeil D.L., Papka R.E., Harris C.H.:** CGRP immunoreactivity and NADPH-diaphorase in afferent nerves of the rat penis. *Peptides*, 13, 1992 a, s. 1239—1246.
- McNeil D.L., Traugh N.E. Jr., 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 b, s. 33—36.
- Meller S.T., Dykstra C., Gebhart G.F.:** Production of endogenous nitric oxide and activation of soluble guanylate cyclase and required for N-methyl-D-aspartate-produced facilitation of the nociceptive tail-flick reflex. *Europ. J. Pharmacol.*, 214, 1992a, s. 93—96.
- Meller S.T., Pechman P.S., Gebhart G.F., Maves T.J.:** Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in the model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience*, 50, 1992b, s. 7—10.
- Nakanishi S.:** Mammalian tachykinin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14, 1991, s. 123.
- 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, s. 224—228.
- Pernow B.:** Substance P. *Pharmacol. Rev.*, 35, 1983, s. 85—141.
- Sanders K.M., Ward S.M.:** Nitric oxide as a mediator of noncholinergic neurotransmission. *Amer. J. Physiol.*, 262, 1992, s. G379—G392.
- Scaravilli F.:** Reduced substance P in hereditary sensory neuropathy in the rat. *Brain Res.*, 263, 1983, s. 147—150.
- 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 labelling. *Development*, 108, 1990, s. 605—612.
- Scharf J.H.:** Sensible Ganglien. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. IV/3. Nervensystem III. Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer 1958.
- Scherer-Singler U., Vincent S.R., Kimura H., McGreen E.G.:** Demonstration of a unique population of neurons with NADPH diaphorase histochemistry. *J. Neurosci. Methods*, 8, 1993, s. 229—234.
- Schneider S.P., Perl E.R.:** Comparison of primary afferent glutamate excitation of neurons in the mammalian spinal dorsal horn. *J. Neurosci.*, 8, 1988, s. 2062—2073.
- Sluka K.A., Dougherty P.M., Sorkin L.S., Willis W.D., Westlund K.N.:** Neural changes in acute arthritis in monkeys. III. Changes in Substance P, Calcitonin gene-related peptide and glutamate in the dorsal horn of the spinal cord. *Brain Res. Rev.*, 17, 1992, s. 29—38.
- Takahashi T., Otsuka M.:** Regional distribution of substance P in the spinal cord and nerve roots of the cat and the effect of dorsal root section. *Brain Res.*, 87, 1975, I—II.
- 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.
- Vizzard M.A., Erdman S.L., Erickson V.L., Stewart R.J., Roppolo J.R., De Groat W.C.:** Localization of NADPH diaphorase in the lumbosacral spinal cord and dorsal root ganglia of the cat. *J. Comp. Neurol.*, 339, 1994, s. 62—75.
- 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 June 27, 1999.

Accepted April 7, 2000.