

О.Г. Родинський, О.Г. Зінов'єва, О.С. Трушенко, М.Я. Качан

## Викликана активність аферентних волокон дорсального корінця спинного мозку білих щурів за умов експериментального цукрового діабету

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», E-mail: zinovevael@mail.ru

*Аналізували функціональний стан дорсальних корінців спинного мозку в умовах експериментального цукрового діабету (ЦД), а саме показники потенціалу дії (ПД): поріг, хронаксію та динаміку збудливості та рефрактерності дорсального корінця. Виявлено вірогідне підвищення порогу збудження у 1,5 раза у порівнянні з контрольною групою тварин та зниження амплітуди ПД на 21,7 %. Спостерігали підвищення відповіді на 2-й стимул при нанесенні парних стимулів на сідничний нерв у тварин з експериментальним ЦД. При нанесенні стимулів зростаючої інтенсивності вірогідно знижувалась амплітуда ПД у тварин експериментальної групи. Було зроблено висновок про те, що гіперглікемія вносить корективи у процеси збудливості та рефрактерності у аферентних волокнах спинного мозку.*

*Ключові слова: цукровий діабет; діабетична невропатія; дорсальний корінець спинного мозку.*

### ВСТУП

Підвищення захворюваності на цукровий діабет (ЦД), яке спостерігається у багатьох країнах світу, закономірно викликає збільшення його ускладнень, одним з найпоширеніших серед яких є діабетична невропатія. Ушкодження різних ділянок нервової системи за умов ЦД залишається дискусійним питанням, оскільки існує багато протиріч серед наукових даних, що вказують на специфічне пошкодження тієї чи іншої ланки нервової системи за умов гіперглікемії – одні дослідники вважають найбільш вираженими ураження периферичних нервових волокон [1, 2], інші – спинного мозку [3, 4], а дехто – взагалі центральних структур, наприклад таламуса [5].

У наших попередніх дослідженнях [6] було встановлено, що в умовах експериментального ЦД суттєво знижується поріг виникнення потенціалу дорсальної поверхні спинного мозку та збільшується його тривалість. Але нез'ясованими залишаються питання щодо змін аферентних входів при ЦД, стан яких значною

© О.Г. Родинський, О.Г. Зінов'єва, О.С. Трушенко, М.Я. Качан

мірою може впливати на вищевказані показники та модулювати їх активність. Це ланка відіграє чи не найбільшу роль у формуванні патологічної імпульсації [7, 8], яка призводить до виникнення комплексу симптомів діабетичної невропатії, таких, як алодінія, спонтанний біль, парестезії тощо. Це спонукало нас більш детально проаналізувати стан аферентної ланки рефлекторної дуги спинного мозку за допомогою вивчення потенціалу дії (ПД), який реєстрували з дорсального корінця.

Метою нашої роботи було дослідження показників збудливості аферентних волокон дорсального корінця у відповідь на стимуляцію сідничного нерва, що виникають у проксимальних відділах дорсальних корінців за умов експериментального ЦД через один місяць від початку його моделювання.

### МЕТОДИКА

Експерименти були проведені на 28 білих статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар

масою 200–250 г, яких було розділено на 2 групи: контрольну і дослідну – тварини з експериментальним ЦД.

ЦД моделювали одноразовим інтраперитонеальним введенням алоксану моногідрату («Sigma», США) у дозі 170 мг/кг після добової депривації їжі при збереженому доступі до води [6]. Контроль вмісту глюкози крові проводили на 10-ту добу за допомогою глюкометра One Touch Ultra. У гострий експеримент тварин брали на 30-ту добу відтворення ЦД зі вмістом глюкози крові вищим за 15 ммоль/л.

Під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг) проводили розтин м'язів тканин та ламінектомію, скляними гачками розтинали тверду мозкову оболонку та виділяли дорсальний корінець сегменту L<sub>5</sub> спинного мозку. Сідничний нерв відпрепарували на стегні та перев'язували біля входу в м'яз. Викликану активність дорсального корінця відводили від його пересічених проксимальних відрізків при стимуляції сідничного нерва на іпсилатеральному боці імпульсами тривалістю 0,3 мс та силою від 1 до 5 порогів (П), за потреби використовували плавне підвищення сили стимулу на 0,1 П. Аналізували показники ПД дорсального корінця, а саме поріг, хронаксію, латентний період, амплітуду та тривалість ПД, динаміку збудливості, а також явище рефрактерності при нанесенні на сідничний нерв парних стимулів з інтервалом від 2 до 20 мс [9].

Усі досліди з тваринами проводилися відповідно до норм біомедичної етики, евтаназію здійснювали за допомогою введення летальної дози тіопенталу натрію.

Обробку отриманих результатів проводили за допомогою стандартних методів варіаційної статистики. Для оцінки вірогідності використовували *t* критерій Стьюдента та критерій Манна-Уїтні. Зміни визнавали статистично вірогідними при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз порогу виникнення сумарного ПД волокон дорсального корінця показав, що у

тварин з експериментальним ЦД спостерігається його підвищення у 1,5 раза у порівнянні з контролем ( $P < 0,001$ , таблиця). Показники контрольної групи в цьому та наступних дослідах прийняті за 100 %. Хронаксія ПД дорсального корінця у порівнянні з контролем зменшилася на 12,4% ( $P \geq 0,056$ ).

Підвищення порогу виникнення ПД дорсального корінця в умовах гіперглікемії вказує на порушення адекватного функціонування нервової системи в результаті неферментативного глікозилювання білків, активації поліолового шляху окиснення глюкози до сорбітолу і фруктози, які накопичуються у нервових клітинах та викликають їх пошкодження через осмотичний стрес [10–12]. Це, в першу чергу, стосується периферичних відділів нервової системи та призводить до виникнення дистальної форми сенсорної діабетичної невропатії [13].

Слід відмітити, що у наших попередніх дослідженнях було підтверджено наявність ознак невропатії у периферичному нервово-м'язовому апараті вже наприкінці першого місяця від початку захворювання [14], які проявлялись у вигляді зниження збудливості і проведення нервового імпульсу у цій структурі. У наступних дослідженнях [6] нами було виявлене підвищення активності нейронів задніх рогів спинного мозку. Таким чином ці дані являють собою особливий інтерес з точки зору виявлення локалізації послідовності переходу пригнічення активності нервових провідників у стан їх підвищеної збудливості. Тож ланкою, яка відповідає за цей процес, ймовірно, є самі аферентні нерви та їх спінальні ганглії.

За умов ЦД латентний період і загальна тривалість ПД дорсального корінця при застосуванні супрамаксимальної стимуляції (5 П) практично не змінювалися ( $P > 0,05$ ). При цьому спостерігалось зниження амплітуди на 21,7 % ( $P < 0,05$ , рис. 1).

При аналізі збудливості дорсального корінця у динаміці ми спостерігали повільне наростання амплітуди ПД, як і в контрольній групі, але відповідь на таку стимуляцію у

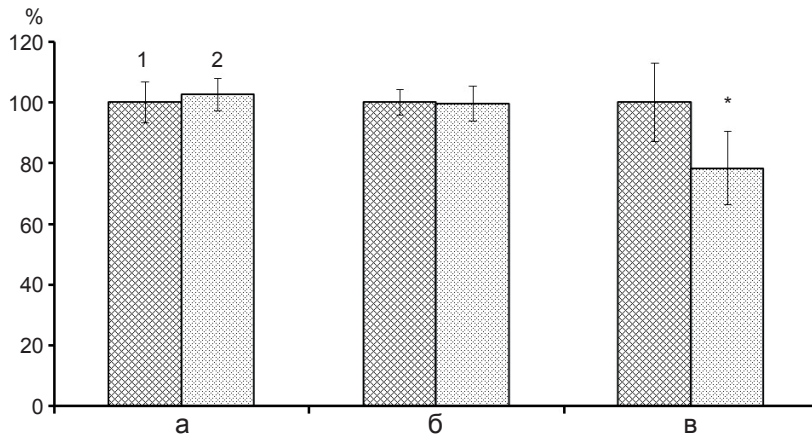


Рис. 1. Параметри потенціалу дії дорсальних корінців спинного мозку ( $L_5$ ) спинного мозку: середні показники латентного періоду (а), тривалості (б) та амплітуди (в); 1 — інтактні тварини, 2 — тварини з експериментальним цукровим діабетом. \*  $P < 0,05$  — вірогідність порівняно з контролем

тварин з експериментальним ЦД була менш виражена та проявлялася у вигляді її достовірного зменшення (рис. 2).

Зниження амплітуди ПД дорсального корінця при супермаксимальній стимуляції та при застосуванні подразників зростаючої інтенсивності свідчать про зниження збудливості на цьому відрізку рефлекторної дуги. В основі можуть лежати пригнічення роботи  $Na^+K^+$ -помпи та інтрааксональне накопичення  $Na^+$  [10, 15], за рахунок чого знижується концентраційний градієнт іонів і, як наслідок, зменшення амплітуди вхідного натрієвого струму, від якого залежить амплітуда генерованого ПД.

При аналізі динаміки фаз рефрактерності

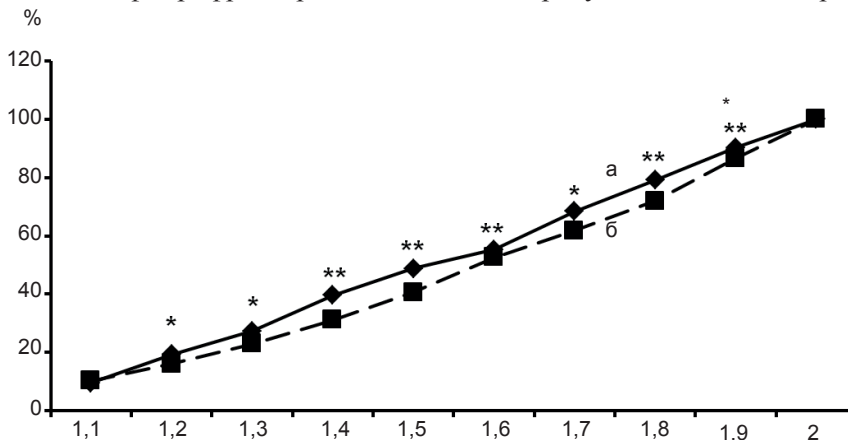


Рис. 2. Динаміка збудливості дорсальних корінців ( $L_5$ ) спинного мозку при нанесенні на сідничний нерв стимулів зростаючої інтенсивності у інтактних тварин (а) і тварин з цукровим діабетом (б).

\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  — вірогідність порівняно з контролем

за допомогою методу парних подразнень спостерігалось підвищення відповіді на другий стимул у тварин з ЦД (рис. 3). Варто зазначити, що відновлення амплітуди починалось вже з проміжку між стимулами у 2 мс і становило до 31,0 % від амплітуди 1-го ПД, чого майже не спостерігалось у тварин контрольної групи, де на цьому ж інтервалі така картина спостерігалась лише у кількох випадках, стабільне її підвищення починалось лише з 3-ї мілісекунди міжстимульного інтервалу.

Знайдене нами раннє відновлення відповіді на парну стимуляцію у тварин з ЦД потребує особливої уваги. Це відбувається, вочевидь, за рахунок зменшення тривалості фази

абсолютної рефрактерності. Останнє може свідчити про те, що нейрони задніх корінців спинного мозку в умовах гіперглікемії мають підвищену базальну активність, що сприяє підсилению передачі нервових імпульсів [5].

На думку деяких дослідників можливі кілька механізмів розвитку діабетичної невротії. Наразі підкреслюється роль  $Ca^{2+}$  як основного предиктора виникнення її больових форм [16]. У цих дослідженнях

було виявлено, що за умов гіперглікемії знижується активність  $Ca^{2+}$ -АТФази, внаслідок чого порушується кінетика відновлення внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$  з тривалим залишковим підвищенням його концентрації у сенсорних нейронах. У зв'язку з цим було висунуте припущення, що такі механізми причетні до розвитку невротії при ЦД. Ці дані знаходять підтвердження у інших дослідженнях, в яких відводиться провідна роль

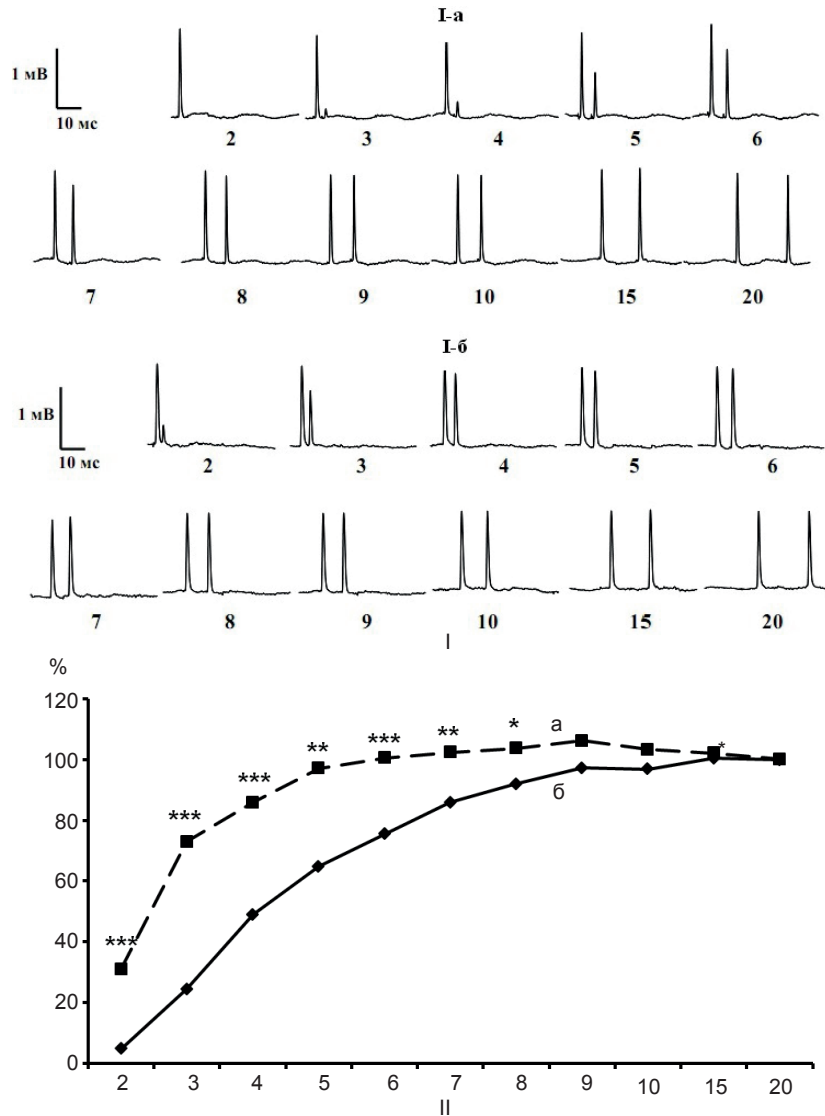


Рис. 3. Осцилограми викликаних відповідей дорсальних корінців спинного мозку (I) (I-а — інтактні тварини, I-б — тварини з експериментальним цукровим діабетом) та динаміка фаз рефрактерності при нанесенні парних стимулів на сідничний нерв (II)

\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  — вірогідність порівняно з контролем

**Зміни основних показників потенціалу дії дорсальних корінців спинного мозку тварин з експериментальним цукровим діабетом**

Показник	Контроль	Цукровий діабет
Поріг, мкА	10,95 ± 1,30 (n = 12)	17,20 ± 1,60 (n = 13) **
Хронаксія, мс	64,28 ± 3,24 (n = 14)	56,31 ± 3,22 (n = 13)
Латентний період, мс	0,74 ± 0,05 (n = 12)	0,76 ± 0,04 (n = 13)
Тривалість потенціалу дії дорсального корінця, мс	2,65 ± 0,11 (n = 12)	2,64 ± 0,15 (n = 13)
Амплітуда, мВ	1,80 ± 0,23 (n = 12)	1,41 ± 0,17 (n = 13) *

\*P<0,05, \*\*P<0,01 — вірогідність порівняно з контролем.

T-типу низькопорогових кальцієвих каналів, які і є важливими підсилювачами сигналів у сенсорних нейронах та сприяють розвитку клітинної гіперчутливості, а також виступають модуляторами хронічних і гострих больових сигналів [17].

Іншими вченими встановлено підвищення частоти ПД у нейронах дорсальнокорінцевих гангліїв [18, 19], які генеруються у відповідь на тривалу надпорогову механічну стимуляцію, що призводить до підвищення спонтанної активності цих нейронів. Такі зміни пов'язують з підвищенням експресії потенціалзалежних тетродотоксинчутливих і тетродотоксинрезистентних натрієвих каналів, а також підвищенням входу Na<sup>+</sup> через них. Тож припускають, що саме ці процеси можуть лежати в основі больової форми діабетичної невропатії. Саме ці канали вважають структурами, які визначають збудливість сенсорних нейронів і відіграють ключову роль у виникненні больових відчуттів, оскільки керують розрядами аферентних імпульсів через їх підсилення в умовах гіперглікемії та викликають тактильну алодінію чи спонтанний біль [7].

Таким чином можна підсумувати, що за умов тривалої гіперглікемії знижується збудливість аферентних провідників спинного мозку, які є сполучною ланкою між пригніченим периферичним апаратом і підвищено активним центральним. В умовах ЦД створюється основа для виникнення симптомів діабетичної невропатії через підсилення вхідного сигналу

до нейронів дорсальних рогів спинного мозку, що може лежати в основі виникнення алодінії, парестезій чи спонтанного болю.

**А.Г. Родинский, Е.Г. Зиновьева, А.С. Трушенко, М.Я. Качан**

**ВЫЗВАННАЯ АКТИВНОСТЬ АФФЕРЕНТНЫХ ВОЛОКОН СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА БЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА**

Анализировали функциональное состояние дорсальных корешков спинного мозга в условиях экспериментального сахарного диабета (СД), а именно показатели потенциала действия (ПД): порог, хронаксию и динамику возбудимости дорсального корешка. Выявлено достоверное повышение порога возбуждения в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой животных, снижение амплитуды ПД на 21,7 %. Наблюдали также достоверное повышение ответа на 2-й стимул при нанесении парных стимулов на седалищный нерв у животных с экспериментальным СД. При нанесении стимулов возрастающей интенсивности у этой группы животных было обнаружено достоверное снижение амплитуды ПД. Был сделан вывод о том, что гипергликемия вносит коррективы в процессы возбудимости и рефрактерности в афферентных волокнах спинного мозга. Ключевые слова: сахарный диабет; диабетическая невропатия; дорсальный корешок спинного мозга.

**A.G. Rodinsky, E.G. Zinov'eva, A.S. Trushenko, M.J. Kachan**

**THE EVOKED ACTIVITY OF THE DORSAL ROOT AFFERENT FIBRES OF THE SPINAL CORD OF WHITE RATS IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS**

We analyzed the functional status of the dorsal root of spinal cord in experimental diabetes mellitus (DM), for instance the

parameters of the action potential (AP): threshold, chronaxy and the dynamics of the dorsal root excitability. It was revealed the 1,5 times increase in threshold of excitation when compared to the control animals ( $P < 0,001$ ), the amplitude of AP decreased by 21,7% ( $P < 0,05$ ). It was also revealed a significant increase in response to the 2nd stimulus under applying the paired stimuli on the sciatic nerve in animals with experimental DM. Under applying the stimuli of increasing intensity there was found significant decrease in the amplitude of the AP in animals of the experimental group. It was concluded that hyperglycemia made changes to the processes of excitability and refractoriness in the afferent fibers of the spinal cord.

Key words: diabetes mellitus, diabetic neuropathy, dorsal root of the spinal cord.

*SE «Dnipropetrovsk medical academy of Health Ministry of Ukraine»*

## REFERENCES

- Fahim MA, Hasan MY, Alshuaib WB. Early morphological remodeling of neuromuscular junction in a murine model of diabetes. *J Appl Physiol* 2000;89(6):2235-40.
- Matsuka Y, Spigelman I. Hyperosmolar solutions selectively block action potentials in rat myelinated sensory fibers: implications for diabetic neuropathy. *J Neurophysiol.* 2004;91(1):48-56.
- Spruce MC, Potter J, Coppini DV. The pathogenesis and management of painful diabetic neuropathy: a review. *Diabet Med.* 2003;20(2):88-98.
- Voitenko NV, Kruglikov IA, Kostyuk EP, Kostyuk PG. Effect of streptozotocin-induced diabetes on the activity of calcium channels in rat dorsal horn neurons. *Neuroscience.* 2000;95(2):519-24.
- Khan GM, Li DP, Chen SR, Pan HL. Role of Spinal Nitric Oxide in the Inhibitory Effect of [D-Pen2, D-Pen5]-Enkephalin on Ascending Dorsal Horn Neurons in Normal and Diabetic Rats. *J Pharmacol and Experim Therap.* 2002;303(3):1021-8.
- Rodyns'kyj OG, Zinov'jeva OG, Mozgunov OV, Trushenko OS. Activity of the interneuron pools of the spinal cord in experimental diabetes mellitus. *Fiziol Zh.* 2013;59(5):50-5. [Ukrainian].
- Devor M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J Pain.* 2006;7(1):3-12.
- D'Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth.* 2008;101(1):8-16.
- Makij EA, Nerush PA, Rodinskij AG, Mjakushko VA. Evoked activity of the afferent and efferent fibers of the rat sciatic nerve in experimental hyperthyroidism. *Neurophysiology.* 2002;34(1):51-9. [Russian].
- Kalinin AP, Rudakova IG, Kotov SV. [Diabetic neuropathy]. *Al'manah klinicheskoy mediciny.* 2001;4:95-107. [Russian].
- Cameron NE. The aetiology of neuropathy in experimental diabetes. *Br J Diab and Vascular Disease.* 2003;3(2):98-105.
- Goh SY, Cooper ME. The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1143-52.
- Sivous G. Clinical characteristics of diabetic peripheral polyneuropathy in children and adolescents. *Vrach.* 2004;2:43-5. [Russian].
- Rodyns'kyj OG, Zinov'eva OG, Mozgunov OV. Electrophysiological analysis of the excitability of the neuromuscular unit in experimental diabetes mellitus. *Eksperynta klin fiziol and biohim.* 2012;59(3):7-12. [Ukrainian].
- Vague P, Coste TC, Jannot MF, Raccach D, Tsimaratos M. C-peptide, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, and diabetes. *Experime Diab Res.* 2004;5(1):37-50.
- Shmigol' AV, Kostjuk EP. Mechanisms of formation of the calcium signals in primary sensory neurons of mice and their violations in experimental diabetes mellitus. *Neurophysiology.* 1995;27(5/6):331-41. [Russian].
- Messinger RB, Naik AK, Jagodic MM, Nelson MT, Lee WY, Choe WJ, et al. 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):184-95.
- Chattopadhyay M, Mata M, Fink DJ. Continuous  $\delta$ -Opioid Receptor Activation Reduces Neuronal Voltage-Gated Sodium Channel (NaV1.7) Levels through Activation of Protein Kinase C in Painful Diabetic Neuropathy. *J Neurosci.* 2008;28(26):6652-8.
- Hong S, Morrow TJ, Paulson PE, Isom LL, Wiley JW. 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.

*Матеріал надійшов до редакції 17.03.2014*