

Indukowana aksofomią plastyczność neuronów czuciowych zaopatrujących zwój kreskowy doogonowy świni

AGNIESZKA BOSSOWSKA, CEZARY SKOBOWIAT, SŁAWOMIR GONKOWSKI,
JOANNA WOJTKIEWICZ, MARIUSZ MAJEWSKI

Zespół Fizjologii Klinicznej Katedry Morfologii Funkcjonalnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM,
ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

Bossowska A., Skobowiat C., Gonkowski S., Wojtkiewicz J., Majewski M.

Axotomy-induced plasticity of sensory neurons supplying porcine caudal mesenteric ganglions

Summary

The aim of the study was to establish whether the dorsal root ganglion neurons supplying the porcine CaMG contain SP and/or CGRP and, additionally, which changes in the expression pattern of these peptides may be induced by a mechanical injury applied to the processes of the above neurons. The study was carried out on consecutive frozen serial sections of DRG taken from 12 eight-week old pigs, in which the neuronal tracer Fast Blue (FB) had been injected three weeks previously into the right CaMG. Six animals were then randomly chosen for ipsilateral ganglionectomy. Eventual changes in the chemical phenotypes of the injured cells were studied a week later using routine double-immunofluorescence labeling. FB⁺ neurons contained SP and CGRP (32% and 42%, respectively). The vast majority of SP- and CGRP-IR afferent cells belonged to the class of medium-sized (64% and 59%, respectively) and small neurons (32% and 37%, respectively). A co-localization of SP and CGRP was observed in 22% of FB⁺ neurons. The resection of CaMG resulted in a dramatic increase in the number of FB⁺ cells containing SP (55%) and a statistically significant decrease in the number of CGRP-IR neurons associated with CaMG (29%). These results suggest that sensory neurons associated with porcine CaMG contain SP and CGRP and that a re-section of CaMG is able to induce profound changes in the expression pattern of the studied peptides, implying deep mechanical injury-induced adaptative changes in the studied afferent neurons.

Keywords: substance P, calcitonin gene-related peptide

Zwój kreskowy doogonowy (CaMG) stanowi jedno z najważniejszych centrów decyzyjnych obwodowego układu nerwowego, włączonych w kontrolę funkcji trzewi jamy brzusznej i jamy miednicy. Wyniki wielu badań morfologicznych i fizjologicznych przeprowadzonych w ostatnich latach wskazują, że CaMG otrzymuje i integruje impulsy nerwowe docierające z wielu różnych źródeł (19). Zdecydowana większość neuronów tego zwoju przynależy do typu tzw. neuronów integracyjnych, podlegając nie tylko wpływowi projekcji nerwowej z terenu jelit, lecz jednocześnie wpływowi przedzwojowych neuronów współczulnych oraz neuronów czuciowych zwojów rdzeniowych (DRG) (19). Obecność czuciowych włókien nerwowych w CaMG opisano przed wielu laty. Włókna te stanowią znaczną część wewnątrzwojowych terminali nerwowych i pełnią ważną rolę w koordynowaniu oraz integrowaniu odruchów obwodowych regulowanych przez neurony zwojowe (5). Wiele wspomnianych

włókien stanowią dendryty (lub też ich kolaterale) przebiegające przez zwój od receptorów zlokalizowanych w narządach do neuronów czuciowych (NC) położonych w DRG (5). U świnki morskiej i szczura większość aferentnych włókien nerwowych obecnych w CaMG zawiera substancję P (SP) i/lub peptyd kodowany genem kalcytoniny (CGRP) (23, 28), kluczowe „neuropeptydy czuciowe” neuronów DRG u różnych gatunków zwierząt, w tym także u świni (15). Obecnie znana jest dystrybucja NC związanych z CaMG u świnki morskiej (8), kota (16), szczura (12) oraz u świni (3). Neurony te u świnki morskiej, szczura i kota zawierały SP (5, 12); brak jest jednak danych odnośnie do obecności w nich CGRP.

Ze względu na to, że znaczenie świni jako zwierzęcia laboratoryjnego ciągle wzrasta, istotne wydaje się poznanie kodowania chemicznego NC, wysyłających swoje kolaterale do CaMG, zarówno w stanach fizjologicznych, jak i po uszkodzeniu integralności neuronów DRG.

Material i metody

Badania przeprowadzono na 12 niedojrzałych płciowo loszkach rasy wielka biała polska w wieku około 8 tygodni. Podzielono je na dwie grupy: GK – zwierzęta kontrolne ($n = 6$) i GA – zwierzęta, którym usunięto prawe CaMG ($n = 6$). Wszystkie zwierzęta poddano zabiegom zaakceptowanym przez Lokalną Komisję Etyczną. Zwierzęta wprowadzono w stan głębokiej narkozy chirurgicznej z zastosowaniem pentobarbitalu sodu (Vetbutal, Biowet, Polska; 25 mg/kg, i.v.) i poddano zabiegowi laparotomii pośrodkowej w celu iniekcji znacznika neuronalnego Fast Blue (FB) (10 μ l 5% wodnej zawiesiny) do prawego CaMG. Po upływie 21 dni zwierzęta grupy GA poddano powtórnej laparotomii, w trakcie której dokonano usunięcia prawego CaMG. Po upływie tygodnia wszystkie zwierzęta poddano eutanazji oraz perfuzji transkardialnej przy użyciu 4% paraformaldehydu (pH 7,4). Badanie wzorów kodowania chemicznego neuronów DRG (neuromery Th_6 do Cq_1) przeprowadzono na 10 μ m skrawkach mrożeniowych przy użyciu rutynowej techniki pojedynczych i podwójnych barwień immunofluorescencyjnych, wykorzystując różnogatunkowe przeciwciała pierwotne, rozpoznające jako antygeny SP i CGRP. Kompleks antygen–przeciwciało uwiadczniano przy pomocy wtórnych przeciwciał znakowanych FITC i CY3. Neurony czuciowe związane z CaMG świni liczono w co czwartym skrawku (tylko komórki zawierające widoczne jądro). Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ standardowy błąd średniej (SEM).

Wyniki i omówienie

NC związane z CaMG świni obecne były w obu stronnych DRG neuromerów od Th_{15} do L_5 . Zdecydowana większość komórek FB^+ zgrupowana była na terenie dwu par DRG: L_2 i L_3 , stanowiąc prawie 90% populacji neuronów związanych z CaMG świni (3). W związku z tym wyniki dotyczące kodowania chemicznego komórek FB^+ oparto wyłącznie na badaniach zwojów L_2 i L_3 , traktując zawarte w nich neurony FB^+ jako populację 100%.

SP obecna była w $37,8 \pm 0,9\%$ wstecznie wyznakowanych NC. Największą liczbę komórek SP-IR stanowiły neurony średniej wielkości ($64,2 \pm 4,6\%$; średnica 40–80 μ m), w mniejszej liczbie występowały komórki małe ($31,9 \pm 3,6\%$; średnica 10–40 μ m), zaś neurony duże, o średnicy powyżej 80 μ m, stanowiły tylko niewielki procent ($3,8 \pm 2,1$). Neurony FB^+ zawierające CGRP stanowiły $41,8 \pm 0,8\%$ całej populacji komórek DRG. W przeważającej liczbie były to komórki średniej wielkości ($59,1 \pm 4,7\%$). W mniejszej liczbie występowały neurony małe ($36,8 \pm 4,1\%$), a komórki duże obserwowano sporadycznie ($4,0 \pm 1,6\%$). Komórki $SP^+/CGRP^+$ stanowiły około 22

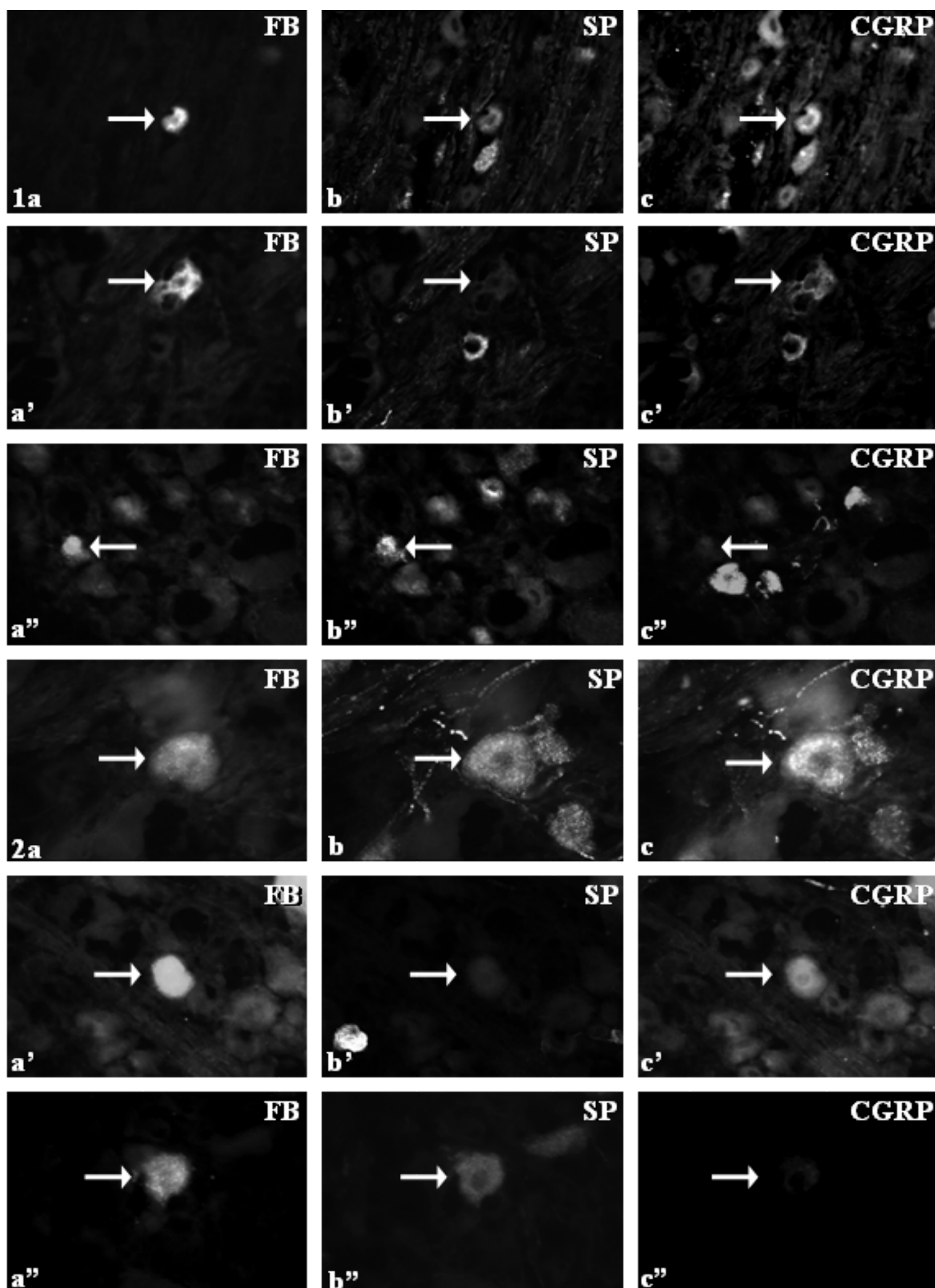
$\pm 2,5\%$ całkowitej populacji wyznakowanych NC, komórki $SP^+/CGRP^-$ – $15,1 \pm 0,2\%$, natomiast perikaryony $SP^-/CGRP^+$ – $20,7 \pm 2,7\%$. Około 42% neuronów FB^+ nie zawierało żadnej z badanych substancji.

Zabieg ganglionektomii wpłynął znacząco na zmianę ekspresji badanych neuropeptydów. Zaobserwowano znaczący wzrost liczby neuronów FB^+ zawierających SP ($54,3 \pm 1,5\%$) oraz statystycznie istotny ($p < 0,05$) spadek liczby komórek CGRP-IR ($28,8 \pm 1,2\%$). Neurony FB^+ zawierające wyłącznie SP ($33,5 \pm 0,6\%$) stanowiły zdecydowanie większą podpopulację komórek w porównaniu do grupy GK, z kolei podpopulacja neuronów $SP^-/CGRP^+$ uległa znacznemu zmniejszeniu ($7,8 \pm 0,0$) i różniła się statystycznie istotnie ($p < 0,05$) od wyników uzyskanych w grupie GK. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie zarówno w liczebności podpopulacji komórek $SP^+/CGRP^+$ ($20,7 \pm 0,9\%$), jak i $SP^-/CGRP^-$ ($38,0 \pm 1,5\%$) pomiędzy badanymi grupami.

W niniejszych badaniach stwierdzono, że SP i CGRP występowały w NC związanych z CaMG świni (odpowiednio 38% i 42%). U świnki morskiej obecność SP wykazano w komórkach DRG L_2 i L_3 (6), tych samych zwojach zaopatrujących CaMG świni. Podobnie u szczura i kota, SP obecna była w neuronach uczestniczących w czuciowym zaopatrzeniu CaMG (11). Wykazano także, że u różnych gatunków ssaków na terenie CaMG występują włókna CGRP-IR, w części pochodzące z DRG (1). Ponad połowę (odpowiednio około 64% i 59%) SP- i/lub CGRP-IR NC związanych z CaMG świni stanowiły komórki średniej wielkości. Odmienne wyniki uzyskano u świnki morskiej, u której przeważająca liczba NC zaopatrujących CaMG to komórki małe (4). U szczura, kota i psa komórki DRG zawierające SP lub CGRP były także w większości małe (2, 9, 17, 21). W niniejszych badaniach wykazano, że SP i CGRP współwystępowały w około 22% NC związanych z CaMG, co zgadza się z wynikami uzyskanymi u innych gatunków zwierząt (10, 13, 25). U świnki morskiej stwierdzono, że wewnątrz-zwojowe włókna SP-IR obecne w CaMG reprezentują w większości kolaterale włókien aferentnych (5, 20), a SP uwalniana z tych zakończeń może indukować zmiany w potencjale błonowym neuronów zwojowych (5) związane z procesem powolnej, niecholinergicznnej depolaryzacji (7). Z kolei CGRP obecny w neuronach DRG szczura wywołuje odwracalną depolaryzację błony neuronu oraz podnosi aktywność synaptyczną i powstawanie spontanicznego potencjału błonowego (24). CGRP współwystępując z SP, zwiększa uwalnianie jej z terminali czuciowych rogów grzbietowych rdzenia kręgowego (22) oraz wydłuża działa-

Ryc. 1. Wyznakowane wstecznie komórki DRG, których dendryty obecne były na terenie CaMG świni. Grupa kontrolna. Komórki FB^+ (a, a', a'') zawierały równocześnie SP (b) i CGRP (c), wyłącznie CGRP (c') lub też jedynie SP (b'')

Ryc. 2. Wyznakowane wstecznie komórki DRG, których dendryty obecne były na terenie CaMG świni. Zwierzęta poddane zabiegowi ganglionektomii. W wyznakowanych wstecznie komórkach DRG (a, a', a'') stwierdzono współwystępowanie SP (b) i CGRP (c), obserwowano komórki zawierające jedynie CGRP oraz komórki immunoreaktywne wyłącznie dla SP (b'')



nie SP w obrębie przestrzeni synaptycznej poprzez blokowanie endopeptydazy przeprowadzającej degradację SP (18). Być może, SP i CGRP obecne w NC związanych z CaMG u świni pełnią podobną funkcję.

W licznych badaniach stwierdzono, że u szczura w wyniku aksotomii dochodzi do znaczącego spadku liczby neuronów zarówno SP-, jak i CGRP-IR w zwojach DRG (13). Zjawisko to związane jest z brakiem NGF, który w normalnych warunkach transportowany jest z tkanek obwodowych do neuronów czuciowych (14) i wpływa na zwiększenie syntezy SP i CGRP w neuronach DRG (27). Stwierdzono także, że spadek liczby neuronów SP- i CGRP-IR w zwojach DRG spowodowany aksotomią, związany jest z degeneracją komórek nerwowych w DRG (26). W wyniku ganglionektomii u świni doszło do znaczącego wzrostu liczby neuronów SP-IR oraz spadku liczby komórek aferentnych zawierających CGRP. Prowadząc obserwacje dotyczące zmian ekspresji różnych neuropeptydów w zwojach DRG pod wpływem obwodowej aksotomii stwierdzono, że neuropeptydy, których ekspresja ulega znacznemu zmniejszeniu w wyniku uszkodzenia nerwów obwodowych, głównie uczestniczą w przekazywaniu informacji czuciowej, zaś neuropeptydy, których ekspresja w neuronach DRG wyraźnie wzrasta, uczestniczą w procesach przeżycia i regeneracji neuronów (13). Na tej podstawie możemy stwierdzić, że SP, której ekspresja znacząco wzrosła w neuronach związanych z CaMG w wyniku usunięcia zwoju, nie tylko uczestniczy w przekazywaniu oraz modulacji informacji czuciowych na jego terenie, ale także może być włączona w liczne mechanizmy związane z regeneracją i zwiększeniem możliwości przeżycia neuronów. Z kolei ekspresja CGRP w wyznakowanych wstecznie komórkach nerwowych znacząco spadła w wyniku ganglionektomii, co może sugerować, że neuropeptyd ten głównie uczestniczy w przekazywaniu oraz modulacji informacji czuciowej na terenie CaMG.

Piśmiennictwo

1. Alm P., Lundberg L. M.: Co-existence and origin of peptidergic and adrenergic nerves in the guinea pig uterus. Retrograde tracing and immunocytochemistry, effects of chemical sympathectomy, capsaicin treatment and pregnancy. *Cell Tissue Res.* 1988, 254, 517-530.
2. Bonfanti L., Bellardi S., Ghidella S., Gobetto A., Polak J. M., Merighi A.: Distribution of five peptides, three general neuroendocrine markers, and two synaptic-vesicle-associated proteins in the spinal cord and dorsal root ganglia of the adult and newborn dog: an immunocytochemical study. *Am. J. Anat.* 1991, 191, 154-166.
3. Bossowska A.: Distribution of primary afferent neurons associated with the porcine inferior mesenteric ganglion (IMG). *Folia Histochem. Cytobiol.* 2002, 40, 367-372.
4. Dalsgaard C. J., Elfvin L. G.: Structural studies on the connectivity of the inferior mesenteric ganglion of the guinea pig. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1982, 5, 265-278.
5. Dalsgaard C. J., Hökfelt T., Elfvin L. G., Skirboll L., Emson P.: Substance P-containing primary sensory neurons projecting to the inferior mesenteric ganglion: evidence from combined retrograde tracing and immunohistochemistry. *Neuroscience* 1982, 7, 647-654.
6. Dalsgaard C. J., Hökfelt T., Schultzberg M., Lundberg J. M., Terenius L., Dockray G. J., Goldstein M.: Origin of peptide-containing fibers in the inferior mesenteric ganglion of the guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide, cholecystokinin and bombesin. *Neuroscience* 1983, 9, 191-211.
7. Dun N. J., Jiang Z. G.: Non-cholinergic excitatory transmission in inferior mesenteric ganglia of the guinea-pig: possible mediation by substance P. *J. Physiol.* 1982, 325, 145-159.
8. Elfvin L. G., Dalsgaard C. J.: Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in afferent fibers of the inferior mesenteric ganglion of the guinea pig. Identification of the cells of origin in dorsal root ganglia. *Brain Res.* 1977, 126, 149-153.
9. Garry M. G., Miller K. E., Seybold V. S.: Lumbar dorsal root ganglia of the cat: a quantitative study of peptide immunoreactivity and cell size. *J. Comp. Neurol.* 1989, 284, 36-47.
10. Gibbins I. L., Furness J. B., Costa M.: Pathway-specific patterns of the co-existence of substance P, calcitonin gene-related peptide, cholecystokinin and dynorphin in neurons of the dorsal root ganglia of the guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 1987, 248, 417-437.
11. Hökfelt T., Elde R., Johansson O., Luft R., Nilsson G., Arimura A.: Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin-containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat. *Neuroscience* 1976, 1, 131-136.
12. Hökfelt T., Kellerth J. O., Nilsson G., Pernow B.: Substance P: Localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science* 1975, 190, 889-890.
13. Hökfelt T., Zhang X., Wiesenfeld-Hallin Z.: Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. *Trends Neurosci.* 1994, 17, 22-30.
14. Inaishi Y., Kashiwara Y., Sakaguchi M., Nawa H., Kuno M.: Cooperative regulation of calcitonin gene-related peptide levels in rat sensory neurons via their central and peripheral processes. *J. Neurosci.* 1992, 12, 518-524.
15. Kalczyk J., Scheuermann D. W., Pidsudko Z., Majewski M., Lakomy M., Timmermans J.-P.: Distribution, immunohistochemical characteristic and nerve pathways of primary sensory neurons supplying the porcine vas deferens. *Cell Tissue Res.* 2002, 310, 9-17.
16. Krier J., Schmalz P. F., Szurszewski J. H.: Central innervation of neurones in the inferior mesenteric ganglion and of the large intestine of the cat. *J. Physiol.* 1982, 332, 125-138.
17. Kruger L., Silverman J. D., Mantyh P., Sternini C., Brecha N. C.: Peripheral patterns of calcitonin gene-related peptide general somatic sensory innervation: cutaneous and deep terminations. *J. Comp. Neurol.* 1989, 280, 291-302.
18. Le Greves P., Nyberg F., Hökfelt T., Terenius L.: Calcitonin gene-related peptide is metabolized by an endopeptidase hydrolyzing substance P. *Regul. Pept.* 1989, 25, 277-286.
19. Majewski M.: Synaptogenesis and structure of the autonomic ganglia. *Folia Morphol.* 2000, 58, 65-99.
20. Matthews M. R., Cuellar A. C.: Substance P-immunoreactive peripheral branches of sensory neurons innervate guinea pig sympathetic neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1982, 79, 1668-1672.
21. McCarthy P. W., Lawson S. N.: Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with substance P-like immunoreactivity. *Neuroscience* 1989, 28, 745-753.
22. Oku R., Satoh M., Fujii N., Otaka A., Yajima H., Takagi H.: Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Res.* 1987, 403, 350-354.
23. Papka R. E., Thompson B. D., Schmidt H. H.: Identification of uterine-related sympathetic neurons in the rat inferior mesenteric ganglion: neurotransmitter content and afferent input. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1996, 59, 51-59.
24. Ryu P. D., Murase K., Gerber G., Randic M.: Actions of calcitonin gene-related peptide on rat sensory ganglion neurones. *Physiol. Bohemoslov.* 1988, 37, 259-265.
25. Supowit S. C., Ethridge R. T., Zhao H., Katki K. A., DiPette D. J.: Calcitonin gene-related peptide and substance P contribute to reduced blood pressure in sympathectomized rats. *Am. J. Physiol.* 2005, 289, H1169-H1175.
26. Tessler A., Himes B. T., Krieger N. R., Murray M., Goldberger M. E.: Sciatic nerve transection produces death of dorsal root ganglion cells and reversible loss of substance P in spinal cord. *Brain Res.* 1985, 332, 209-218.
27. Wong J., Oblinger M. M.: NGF rescues substance P expression but not neurofilament or tubulin gene expression in axotomized sensory neurons. *J. Neurosci.* 1991, 11, 543-552.
28. Zheng Z. L., Travagli R. A., Kreulen D. L.: Patterns of innervation of sympathetic vascular neurons by peptide-containing primary sensory fibers. *Brain Res.* 1999, 827, 113-121.

Adres autora: dr n. wet. Agnieszka Bossowska, ul. Oczapowskiego 13, Blok 105, pokój 016, 10-718 Olsztyn; e-mail: Agnieszka.Bossowska@uwm.edu.pl