

# Zmeny v aktivite syntázy oxidu dusnatého v mieche po ligácii koreňov cauda equina v experimente

## Changes in the Nitric Oxide Synthase Activity in the Spinal Cord after Multiple Cauda Equina Constrictions in the Experiment

### Souhrn

Oxid dusnatý (NO) je známý ako signálna molekula, ktorá hrá dôležitú úlohu v patofyziológii mnohých neurodegeneratívnych ochorení. Málo sa však vie o úlohe NO v patogenéze cauda equina syndrómu. V práci sme sledovali aktivitu kalciovo-závislej syntázy oxidu dusnatého (NOS) v Th1–Th12, L1–L3 a L4–L7 segmentoch miechy, rozdelenej na dorzálnu, mediálnu a prednú časť a neuronovú NOS imunoreaktivitu (nNOS-IR) v L4–L7 segmentoch po chirurgicky navodenej mnohonásobnej konstrikcii cauda equina (MCEC) u psa a po preživaní experimentálnych zvierat po dobu 2 a 5 dní. Signifikantné zvýšenie kalciovo-závislej NOS aktivity bolo zaznamenané v zadnej časti torakálnych a horných lumbálnych segmentov 2 dni po MCEC, kým na piaty deň enzýmová aktivita v zadnej časti vyššie uvedených miechových segmentov sa významne znížila. Nevýrazné rozdiely sa zaznamenali v zadnej časti L4–L6 segmentov. V mediálnej časti L4–L7 segmentov odobranej 2 dni po MCEC, bola kalciovo-závislá NOS aktivita zvýšená len prechodne; hodnota sa vrátila takmer na úroveň kontroly piaty deň po konstrikcii. 2 dni trvajúca MCEC nespôsobila zmeny v enzýmovej aktivite v mediálnej časti torakálnych a horných lumbálnych segmentov. Signifikantné rozdiely sa zaznamenali len 5 dní po MCEC. Vplyv MCEC na kalciovo-závislú NOS aktivitu vo ventrálnej časti torakálnych, horných a dolných lumbálnych segmentov bol podobný, pričom sa zistilo významné zvýšenie enzýmovej aktivity v sledovaných segmentoch avšak s výnimkou jej zníženia v horných lumbálnych segmentoch 5 dní po konstrikcii. Zvýšenie kalciovo-závislej NOS aktivity v dolných lumbálnych segmentoch korelovalo so zvýšeným počtom NOS-IR neurónov lokalizovaných v laminae VIII a IX a so zvýšenou expresiou NOS-IR axónov vo ventrolaterálnom povrazci.

### Abstract

Nitric oxide (NO) is known as a signalling molecule playing an important role in the pathophysiology of many neurodegenerative disorders. However, little is known about the role of NO in the pathogenesis of cauda equina syndrome. In the present study we investigated calcium-dependent nitric oxide synthase (NOS) activity in the Th1–Th12, L1–L3 and L4–L7 spinal cord segments divided into dorsal, medial and ventral parts and, neuronal NOS immunoreactivity (nNOS-IR) in L4–L7 segments after surgically-induced multiple cauda equina constrictions (MCEC) in the dog and after survival of experimental animals for 2 and 5 days. A significant increase of calcium-dependent NOS activity was noted in the dorsal part of thoracic and upper lumbar segments 2 days after MCEC. However, at 5th day the enzyme activity in the dorsal part of both above mentioned spinal cord segments was significantly decreased. No significant changes were noted in the dorsal part of L4–L6 segments. In the medial part of L4–L7 segments taken 2 days after MCEC, calcium-dependent NOS activity was only transiently enhanced; the value returned nearly to control level within 5 post-constriction days. MCEC, lasting for 2 days did not caused changes in enzyme activity in medial part of thoracic and upper lumbar segments. Significant differences were noted only 5 days after MCEC. The effect of MCEC on calcium-dependent NOS activity in the ventral part of thoracic, upper and lower lumbar segments was similar, showing a significant increase of enzyme activity in all segments studied, except for its decrease in the upper lumbar segments 5 days after postconstriction. The increase of calcium-dependent NOS activity in the lower lumbar segments correlates with increased number of NOS-IR neurons located in laminae VIII and IX and enhanced expression of NOS-IR axons in the ventrolateral column.

Podporené VEGA grantom 2/3217/23, 2/5134/25 a APVV grantom 51-01-3002.

J. Kafka<sup>1</sup>, N. Lukáčová<sup>2</sup>,  
D. Čížková<sup>2</sup>, J. Maršala<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Neurochirurgická klinika FNLP,  
Rastislavova 43, Košice

<sup>2</sup> Neurobiologický ústav SAV,  
Šoltésovej 4, Košice



MUDr. Jozef Kafka  
Neurochirurgická klinika FNLP  
Rastislavova 43, 041 90 Košice  
e-mail: jozef.kafka@fnlp.sk

Prijato k recenzii: 24. 1. 2007

Prijato do tisku: 6. 3. 2007

### Klíčová slova

syndróm caudae equinae – syntáza oxidu dusnatého – miecha – pes

### Key words

cauda equina syndrome – nitric oxide synthase – spinal cord – dog

## Úvod

Cauda equina označuje zväzok intradurálnych nervových koreňov začínajúcich na konci miechy v lumbálnej časti spinálneho kanála; tieto nervové korene (lumbálne a sakrálne) zabezpečujú senzitivnu a motorickú inerváciu dolných končatín a orgánov umiestnených v panvickej oblasti [1]. Pri ich poškodení z rôznych príčin, najčastejšie v dôsledku kompresie (vysunutá medzistavcová platnička, stenóza spinálneho kanála, nádor alebo úlomky zlomenín) dochádza k rozvoju syndrómu cauda equina (CES), ktorý sa klinicky prejavuje v závislosti od miesta, množstva postihnutých koreňov, resp. stupňa ich poškodenia bolesťami lumbosakrálnej chrbtice, jednostrannými, častejšie však obojstrannými radikulárnymi bolesťami dolných končatín, perianálnymi a perigenitálnymi poruchami citlivosti vnútornej plochy oboch stehien, t.j. typu jazdeckých nohavíc, vymiznutím reflexov (análneho, RŠA, RMpL), motorickým oslabením dolných končatín, prípadne paraplégiou a poruchami sfinkterov a sexuálnych funkcií. Strata vôľového ovládania funkcie sfinkterov neprináša len zdravotné riziká, ale výrazne obmedzuje aj pracovné a spoločenské uplatnenie. Keďže reverzibilita tohto nepriaznivého stavu závisí od včasného uvoľnenia mechanického tlaku, je CES indikáciou k urgentnej neurochirurgickej operácii. Experimentálne práce ukázali, že kritický čas pre trvalé ischemické poškodenie periférnych nervov je kratší ako 6 hodín [2]. Pri pokusoch s CES na opiciach sa dosiahlo výrazné zlepšenie len v prípade, ak bola dekompresia uskutočnená do 4 hodín [3]; takýto čas je v klinickej praxi prakticky nedosiahnuteľný. Urgentná operácia, uskutočnená u pacientov s inkompletným CES ihneď po ich transporte na špecializované pracovisko výrazne zlepšuje prognózu ochorenia [4,5] a bráni rozvoju kompletného CES, kým u pacientov s kompletným CES nebol zaznamenaný rozdiel vo výsledkoch medzi urgentnou a odloženou operáciou.

V posledných rokoch sa veľká pozornosť venuje skúmaniu úlohy NO pri rozvoji niektorých neurologických poškodení a symptómov, súvisiacich s intenzifikovaním reflexnej aktivity, ktorá sa zaznamenáva pri rozvoji spasticity a hyperreflexie [1,6–8]. Účasť tejto jednoduchej, ale biologicky veľmi aktívnej molekuly sa dokázala aj na prenose

somatosenzitívnych a viscerálnych (pravdepodobne bolestivých) signálov, a tiež v autonomickej spinálnej dráhe regulujúcich viscerálnu motilitu [9]. Pretože ide o molekulu s krátkym polčasom života, jej prítomnosť v nervovom tkanive sa dokazuje nepriamo, t.j. histochemickým dôkazom nikotinamidnukleotidfosfát diaforázovej (NADPHd) pozitivity a imunohistochemickou vizualizáciou NOS imunoreaktívnych nervových profilov. Hlavnou úlohou NO je aktivácia rozpustnej guanylátcyklázy (sGC), produkcia cyklického guanozín monofosfátu (cGMP) a následná aktivácia cGMP závislých procesov. Za patologických stavov, napríklad pri stimulácii nociceptívnych impulzov, prípadne počas ischemie kedy sa zvyšuje uvoľňovanie glutamátu a iných neuroaktívnych substancií, dochádza k aktivácii (N-metyl-D-aspartátových) NMDA receptorov, k influxu intracelulárneho vápnika, aktivácii NOS a následne k zvýšenej syntéze NO. Aktivácia spinálnych NMDA receptorov, napríklad prostredníctvom tvorby NO môže indukovať zvýšenú citlivosť na bolestivé podnety [10,11]. V mieche sú zmeny v aktivite NOS opísané prevažne po experimentálne navodených léziách, ako je ligatúra, axotómia a elektrická stimulácia periférnych nervov [12–14]. Zistilo sa, že axotómia ischiadického nervu spôsobuje zmeny v odpovedi NOS pozitívnych neurónov na úrovni L4–L6 segmentov [15,16], v axónoch v rozsahu L3, Th10 a C3 segmentov a v neuropile nucleus gracilis [17] čo dokazuje, že NOS je po periférnom poškodení syntetizovaná de novo v bunkách príslušných spinálnych ganglií [15,18,19] a axónami dráhy zadných miechových povrazcov sa transportuje až do terminálneho jadra v predĺženej mieche [17]. Tieto zistenia naznačujú, že NO predstavuje neuromodulátor, ktorý výrazne odpovedá nielen na akútne a chronicky vyvolané bolestivé podnety [10,11], ale zároveň sa podieľa aj na prenose signálov v niektorých dlhých vodivých systémoch [20–23].

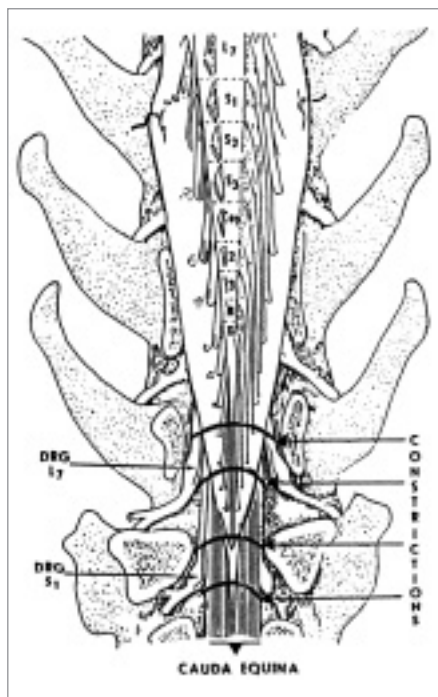
Za účelom sledovania zmien vznikajúcich po poškodení koreňov CE bolo vytvorených viacero experimentálnych modelov, predovšetkým u psov, ošípaných a potkanov. Analýzy, ktoré boli uskutočnené na ich základe ukázali, že mechanická stimulácia koreňov spôsobila anatomické a funkčné zmeny po-

stihnutých koreňov, ale zároveň navodila anterogradne i retrogradne zmeny v mieche [24–27]. Za účelom sledovania ich rozsahu a intenzity po akútnej a chronickej kompresii koreňov CE bol v predchádzajúcich experimentoch použitý model viacnásobnej, chirurgicky navodenej konstriktie koreňov CE u psa [25]. Podráždenie koreňov caudae equinae v dôsledku ich ligácie na úrovni L7–Co5 segmentov po dobu 2 dní navodilo včasné zmeny v NOS aktivite v bielej hmote segmentov miechy, ktorých korene priamo podliehali ligácii alebo boli lokalizované v tesnej blízkosti poškodenia. Piaty deň po navodení chirurgického zásahu bola aktivita NOS ovplyvnená výraznejšie. Zmeny sa zaznamenali v sivej hmote sakrálnych segmentov, ale aj v segmentoch vzdialených od epicentra poškodenia [1,28–30]. Cieľom našej práce bolo zistiť vplyv konstriktie CE na zmeny v NOS aktivite a nNOS imunoreaktivite v dorzálnnej, mediálnej a ventrálnej časti torakálnej a lumbálnej miechy a tým prispieť k prehĺbeniu poznatkov o patogenéze CES.

## Materiál a metódy

### Experimentálny protokol

V experimente sme použili 18 dospelých psov oboch pohlaví o hmotnosti 5–8 kg. Experiment bol schválený Etickou komisiou pri Neurobiologickom ústave SAV v Košiciach na základe protokolov, vypracovaných v súlade so Zákomom na ochranu zvierat SR č. 15/1995 Z.z. Zvieratá boli uvedené do celkovej anestézy ketamínom a xylazínom podaným intramuskulárne (100 mg/kg a 15 mg/kg hmotnosti zvierat), intubované endotracheálnymi kanylami, uložené do polohy na brucho a napojené na anesteziologický aparát (Anemat N8, Chirana, ČR), ktorým sa zabezpečila mechanická ventilácia. Anestéza bola počas operácie udržiavaná zmesou kyslíka s prímiesou 1–2 % Narcotanu. Vychádzajúc z poznatkov anatómie psa, laminektómii sme uskutočnili na úrovni 6 a 7 lumbálneho stavca a po odstránení žltého väzu sme obnažili durálny vak s koreňmi CE. Konstriktiu koreňov CE sme navodili naložením štyroch silonových ligatúr okolo durálneho vaku bez jeho otvorenia, a to približne vo vzdialenosti 2 mm od seba na úrovni siedmeho driekového stavca (obr. 1). MCEC zahŕňala

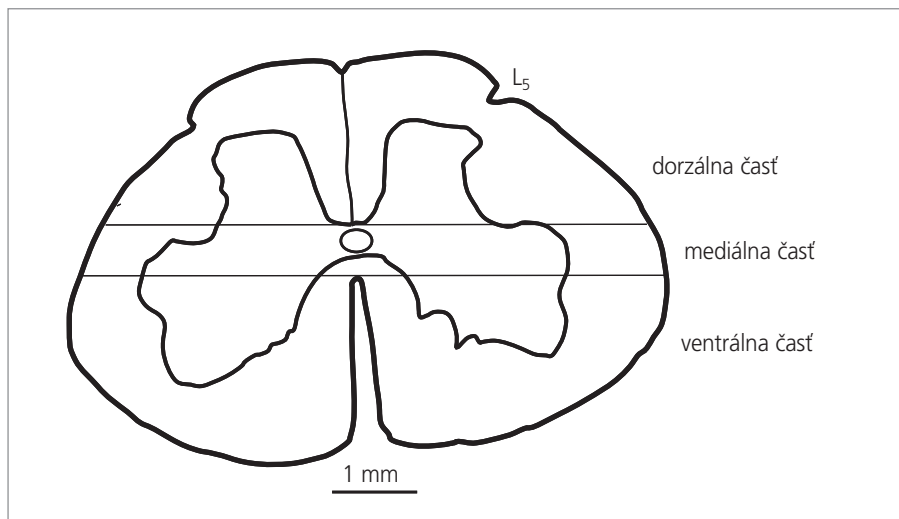


Obr. 1. Schematický náčrt modelu MCEC u psa (pozn.: pes má 7 lumbálnych stavcov).

v sebe protrahovanú konstrikcii výbežkov buniek dorzálnych spinálnych ganglií L7, S1–S3 a Co1–Co5 spoločne s ventrálnymi koreňmi rovnakých segmentov. Po operáčnom zákroku zvieratá preživali 2 alebo 5 dní. Kontrolné zvieratá ( $n = 6$ ) a zvieratá prežívajúce 2 dni ( $n = 6$ ) a 5 dní ( $n = 6$ ) po navodení konstrikcii CE boli rozdelené do dvoch podskupín, t.j. na imunohistochemickú detekciu NOS a pre stavovanie katalytickej NOS aktivity. Neurologické poškodenie experimentálnych zvierat sme sledovali denne po chirurgicky navodenej MCEC.

#### Stanovenie aktivity $\text{Ca}^{2+}$ -závislej syntázy oxidu dusnatého

Pre rádiometrické stanovenie aktivity  $\text{Ca}^{2+}$ -závislej syntázy oxidu dusnatého bola miecha psa zmrazená v tekutom dusíku. Torakálne a lumbálne segmenty boli nakrájané na 600  $\mu\text{m}$  rezy a rozdelené na ventrálnu, mediálnu a dorzálnu časť (obr. 2). Aktivita sledovaného enzýmu bola stanovená konverziou  $[^3\text{H}]$ -arginínu na  $[^3\text{H}]$ -citrulín, t.j. v reakcii, ktorá katalyzuje tvorbu oxidu dusnatého [31]. Vzorky z jednotlivých častí miechy boli homogenizované v 10mM Tris-HCl pufri, pH = 7,4 a ich homogenáty



Obr. 2. Schematický náčrt dolnej lumbálnej miechy (L5), ktorý zobrazuje delenie miechy na dorzálnu, mediálnu a ventrálnu časť.

(200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) boli inkubované v reakčnej zmesi (10  $\mu\text{M}$   $[^3\text{H}]$ -L-arginín (1  $\mu\text{Ci}$ ), 1 mM NADPH, 1  $\mu\text{M}$  kalmolulín v 50 mM HEPES pufri, pH = 7,4, ktorý obsahoval 1m M ditiotritol, 1 mM EDTA, 2 mM  $\text{CaCl}_2$  a 15  $\mu\text{M}$  tetrahydrobiopterín) pri teplote 37  $^\circ\text{C}$  po dobu 45 min. Reakcia bola zastavená 100 mM HEPES, pH = 5,5, ktorý obsahoval 10 mM EDTA. Vzorky boli delené afinitnou chromatografiou na  $\text{Na}^+$ -výmennej kolóne (Dowex AG, 50W-X8), centrifugované a merané na spektrofotometri (Beckman LS-3801). Výsledky sú vyjadrené v mol/min/mg bielkovín.

#### Imunohistochemické zobrazenie syntázy oxidu dusnatého

Kontrolné zvieratá a zvieratá, ktorým bola navodená konstrikcii CE na dobu 5 dní ( $n = 3$ ) boli anestetizované (pentobarbital, 50mg/kg, i.p.) a transkardiálne prepláchnuté 4% paraformaldehydrom. Odobratá lumbálna miecha bola rozdelená na L4, L5 a L6 segmenty, ktoré boli ponorené vo fixatíve na 4 hodiny a uskladnené cez noc pri 4  $^\circ\text{C}$  v 20% roztoku sacharózy. Nasledujúci deň bolo tkanivo zmrazené v petrolétere na  $-50$   $^\circ\text{C}$  a nakrájané na zmrazovacom mikrotóme na 30  $\mu\text{m}$  rezy. Rezy boli umiestnené v komôrkach a inkubované pri izbovej teplote (3h) v 0,1M fosfátovom pufri (PBS), pH = 7,4, ktorý obsahoval 5% králičie sérum, 0,2 % Triton X100 a 0,2% hovädzí sérum albumín. Následne boli rezy inkubo-

vané s primárnou protilátkou (polyclonal sheep anti-nNOS antibody) riedenou s 0,1M PBS v pomere 1:1500 cez noc pri 4  $^\circ\text{C}$ . Primárna protilátka bola získaná ako dar od Dr. Emsona [32]. Po premytí v PBS boli rezy inkubované s biotinylizovanou sekundárnou protilátkou (anti-sheep; Vector Laboratories, Burlingame, CA), riedenou v pomere 1 : 200 po dobu 2 h a s avidín-biotín peroxidázovým roztokom (Vectastain Elite ABC peroxidázový kit; Vector Laboratories, USA, PK-6102) po dobu 1 h. Neurónová NOS bola vizualizovaná pomocou 0,05 DAB v 0,058 M Tris pufri, ktorý obsahoval 0,001 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Rezy boli dôkladne premyté v Tris-fosfátovom pufri a natiiahnuté na sklíčka s navrstvenou želatínou. Sklíčka boli vysušené, dehydratované vzostupnou alkoholovou radou (50,70,90,100%), prejasnené v xyléne a následne zamontované v Depex [33].

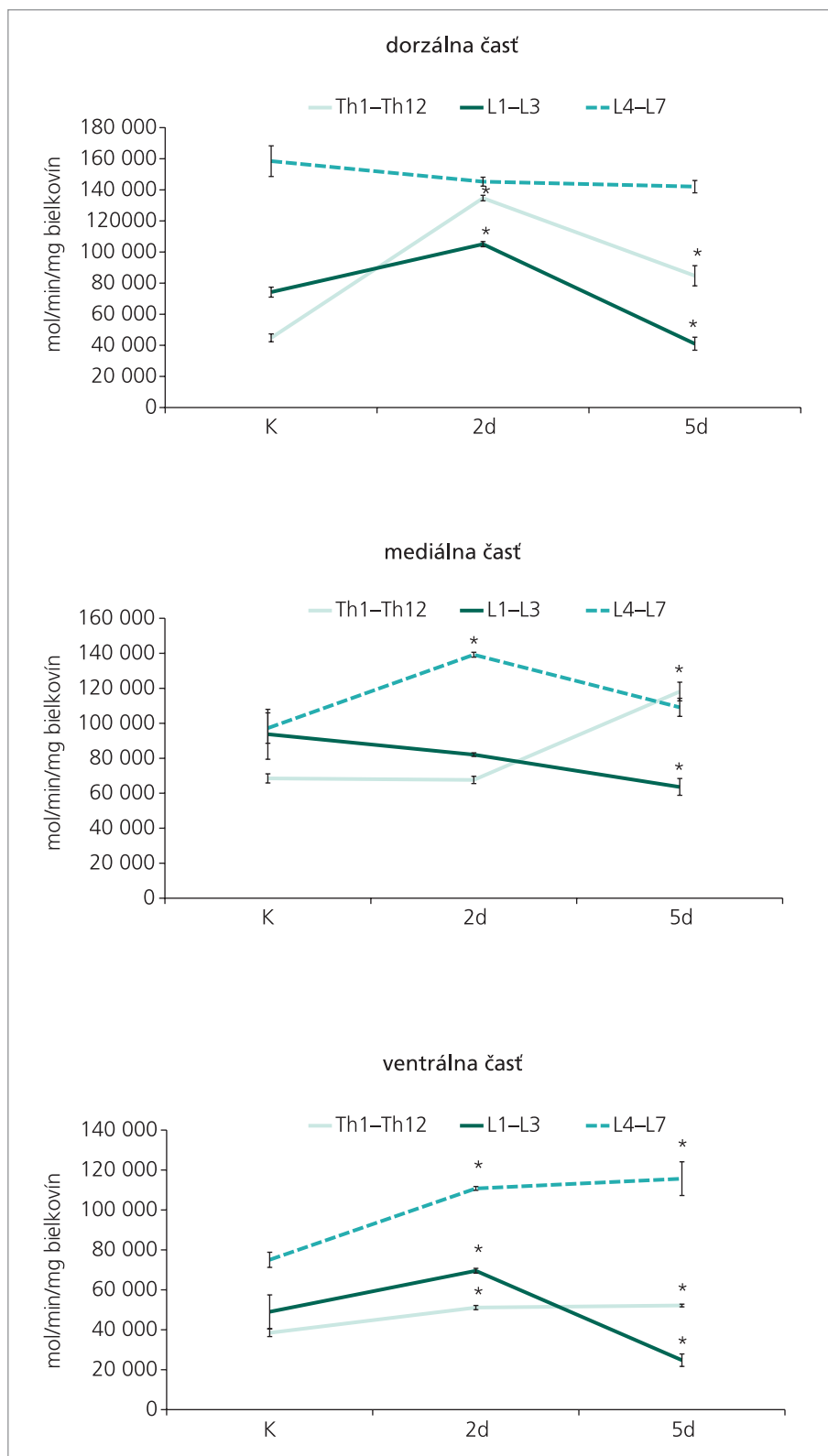
#### Použitie štatistické metódy

Pre štatistické spracovanie získaných experimentálnych údajov bol použitý ANOVA test a Tukey-Kramerov test. Výsledky predstavujú aritmetický priemer + SEM.

#### Výsledky

Štvornásobná ligácia centrálnych výbežkov buniek spinálnych ganglií a predných koreňov na úrovni L7-Co5 segmentov navodila regionálne a časovo-závislé zmeny v aktivite syntázy oxidu dusnatého. V dorzálnych časti

## ZMENY V AKTIVITE SYNTÁZY OXIDU DUSNATÉHO V MIECHE PO LIGÁCIÍ KOREŇOV CAUDA EQUINA V EXPERIMENTE



Obr. 3. Aktivita kalciovo-závislej syntázy oxidu dusnatého, zaznamenaná v dorzálnej (A), mediálnej (B) a ventrálnej (C) časti torakálnych (Th1–Th13), horných lumbálnych (L1–L3) a dolných lumbálnych (L4–L7) segmentov miechy u kontroly a 2 a 5 dní po navodení 4-násobnej konstriktie cauda equina. Výsledky sú vyjadrené v mol/min/mg bielkovín, predstavujú aritmetický priemer ( $n = 3$ )  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$  v porovnaní s kontrolou.

torakálnych a horných lumbálnych segmentov miechy sa dva dni po ligácii CE zaznamenalo signifikantné zvýšenie katalytickej NOS aktivity. Aktivita sledovaného enzýmu bola výrazne znížená piaty deň po navodení chirurgického zásahu, avšak pokles pod bazálne hodnoty sa zaznamenal iba v L1–L3 segmentoch. Nevýrazné zmeny v aktivite NOS boli pozorované v dorzálnej časti L4–L7 segmentov, a to v oboch postkonstriktčných časoch (obr. 3A).

Menej výrazná odpoveď v NOS aktivite bola zaznamenaná 2 dni po ligácii CE v mediálnej časti miechy, kde enzýmová aktivita výrazne vzrástla iba v dolných lumbálnych segmentoch. Ligácia CE navodená experimentálnym zvieratám po dobu 5 dní spôsobila extrémny nárast NOS aktivity v Th1–Th12 segmentoch a naopak, navodila signifikantné zníženie aktivity sledovaného enzýmu v L1–L3 a L4–L7 segmentoch (obr. 3B).

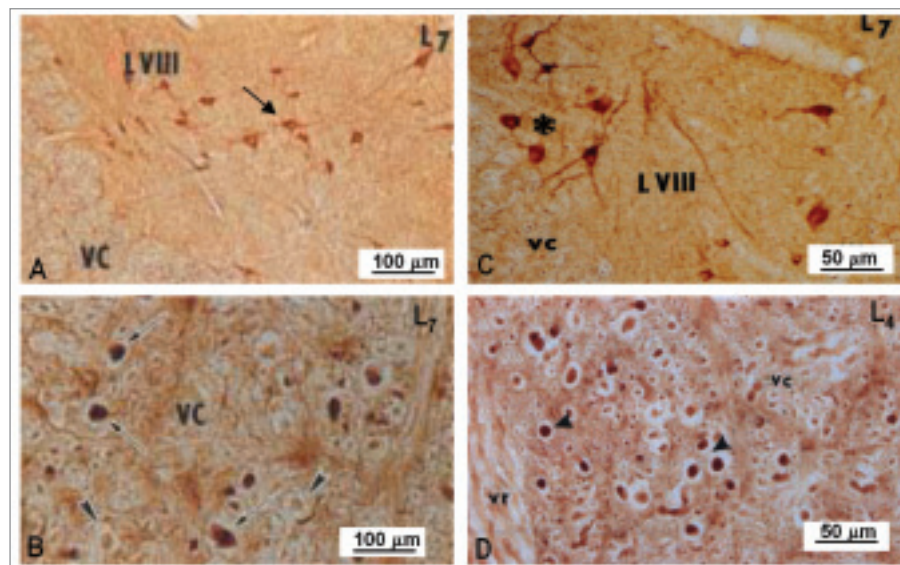
Rovnaký priebeh zmien v aktivite NOS bol pozorovaný vo ventrálnej časti sledovaných segmentov miechy dva dni po ligácii CE. Ukázalo sa, že dráždenie koreňov CE po dobu 2 dní spôsobuje v torakálnych, horných a dolných lumbálnych segmentoch signifikantné zvýšenie NOS aktivity, a toto zvýšenie v Th1–Th12 a L4–L7 segmentoch výrazne vzrástá aj piaty deň po ligácii (obr. 3C). V L1–L3 segmentoch miechy sa zaznamenal signifikantný nárast v aktivite NOS iba v štádiu krátkodobého prežívania. Dráždenie CE u experimentálnych zvierat po dobu 5 dní navodilo v L1–L3 segmentoch signifikantný pokles enzýmovej aktivity (obr. 3C). Zvýšenie NOS aktivity v L4–L7 segmentoch koreluje s výraznými zmenami zaznamenanými v imunohistochemickej reakcii NOS. Kým nNOS-IR neuróny lokalizované vo ventrálnom rohu vykazovali u kontrolných zvierat iba slabú imunohistochemickú reakciu, 5 dní po navodení konstriktie CE, bola nNOS-IR zvýšená v populácii neurónov, ktoré lemujú dorzomedialný okraj ventrálneho povrazca (obr. 4). Mnohé nNOS-IR neuróny lokalizované v laminae VIII a IX v segmentoch dolnej lumbálnej miechy vykazovali intenzívnu dendritickú nNOS imunopozitivitu. Tieto zmeny boli doprevádzané výraznou expresiou nNOS-IR v axónoch, ktoré sa rozprestierajú pozdĺž ventrálneho povrazca (obr. 4).



V obidvoch experimentálnych skupinách (konstrikcia navodená po dobu 2 a 5 dní) bola zaznamenaná náhla motorická a senzitivná dysfunkcia, kombinovaná s akútnou urinálnou dysfunkciou. Konstrikcia caudae equinae navodená po dobu 2 dní spôsobila čiastočné neurologické poškodenie charakterizované paraparézou dolných končatín. Plne vyvinutá paraplégia a strata citlivosti sa zaznamenali u experimentálnych zvierat piaty deň po konstrikcii caudae equinae.

### Diskusia

Hoci neuropatogenéza polyradikulárnej symptomatológie CES bola v priebehu dvoch desaťročí študovaná veľmi intenzívne [34, 35], doterajšie analýzy, získané po mechanickej stimulácii caudae equinae u rôznych experimentálnych modelov, poskytli prevažne funkčné a neuropatologické zmeny postihnutých koreňov [1]. Nami použitý model konstrikcie CE [22], ktorý vyvoláva príznaky porovnateľné s rozvojom syndrómu CE u ľudí, sme použili na monitorovanie zmien v aktivite a expresii NOS v dorzálnnej, mediálnej a ventrálnej časti miechy 2 a 5 dní po navodení 4-násobnej ligácie lumbosakrálnych koreňov (L7–Co5) u psa. Z analýzy katalytickej aktivity NOS vyplýva, že 4násobná ligácia CE spôsobuje signifikantné zvýšenie NOS aktivity v zadnej časti horných lumbálnych a torakálnych segmentov už 2 dni po konstrikcii, zatiaľ čo v zadnej časti dolných lumbálnych segmentov sa signifikantné zmeny nezaznamenali ani v štádiu dlhodobého prežívania. Mechanizmus, akým ligácia koreňov CE ovplyvňuje enzymovú aktivitu v zadných povrazcoch bielej hmoty, ktoré tvoria súčasť nami analyzovanej zadnej časti, nie je doposiaľ objasnený. Predpokladáme, že kontinuálne dráždenie senzitivných koreňov caudae equinae stimuluje glutamátom determinovanú aktiváciu NMDA receptorov v malých a stredných bunkách spinálnych ganglií lumbosakrálnych segmentov a podobne ako po ligácii a axotómii periférnych nervov, podmieňuje v nich zvýšenú tvorbu NOS, ktorá sa transportuje centrálnymi výbežkami buniek spinálnych ganglií až do zadného rohu miechy [36]. Časť nNOS-IR axónov sa po vstupe do miechy vertikalizuje a v zostave vlákien fasciculus gracilis lokalizovaných v zadnom povrazci prechádza do nucleus gracilis v pre-



Obr. 4. Obrázok, znázorňujúci nNOS-imunoreaktivitu vo ventrálnej časti dolnej lumbálnej miechy u kontroly (A,B) a 5 dní po navodení 4-násobnej konstrikcie cauda equina (C,D). A – dorzomediálna časť ventrálneho rohu a dorzálna časť ventrálneho povrazca v segmente L7, ktorá znázorňuje nNOS-IR v telách neurónov (hviezdička), lokalizovaných v lamina VIII, vc – ventrálny povrazec. B – hrubé nNOS-IR axóny (šípka) a nNOS-IR axóny (hroty) vo ventrálnom povrazci v tesnej blízkosti ventrálneho rohu, vc – ventrálny povrazec. C – výrazná nNOS imunopozitivita v neurónoch (hviezdička) umiestnených v dorzomediálnej časti ventrálneho rohu v segmente L7, vc – ventrálny povrazec. D – hrubé nNOS-IR axóny (hroty) vo ventrálnom povrazci v L4 segmente, vc – ventrálny povrazec, vr – ventrálny koreň.

dĺžnej miechy [17]. Na modeli axotómie ischiadického nervu u kráľíka sa kombináciou biochemických a imunohistochemických prístupov zaznamenalo, že nNOS je transportovaná centripetálne a rozhodujúcou mierou ovplyvňuje NADPHd pozitivitu v neuropile zadného rohu a v axónoch, lokalizovaných v mediálnej časti zadného povrazca [17]. Štvornásobná ligácia centrálnych výbežkov buniek spinálnych ganglií na úrovni L7–Co5 segmentov, navodená po dobu 5 dní spôsobila výrazné zníženie NOS aktivity v zadnej časti horných lumbálnych a torakálnych segmentov. Rozdiely zaznamenané v NOS aktivite po dlhšie trvajúcej ligácii CE môžu odrážať rozdielnu odpoveď nNOS-IR neurónov lokalizovaných v povrchových a hlbokých vrstvách zadného rohu postihnutých segmentov miechy a v segmentoch, ktoré sú umiestnené rostrálne od miesta poškodenia, ako aj rôznu intenzitu imunohistochemického zobrazenia nNOS v neuropile. Naše výsledky ukazujú, že zmeny v NOS aktivite prebiehajú v senzitivnej oblasti miechy po ligácii CE mimoriadne intenzívne

a pokrývajú pomerne rozsiahlu časť miechy, a to nielen jej lumbálne segmenty.

K zmene, ktorá sa zaznamenala v aktivite NOS po ligácii CE vo ventrálnej a mediálnej časti dolných lumbálnych segmentov môže dochádzať v dôsledku zvýšenia nNOS-IR v neurónoch predných rohov (lamina VIII) a pericentrálnej oblasti (lamina X). Axóny týchto buniek sa vyskytujú vo veľkom počte v prednom povrazci v okolí sivej hmoty a pravdepodobne tvoria propriospinálnu dráhu, ktorá je lokalizovaná v mediálnej časti predného rohu, a ktorá za použitia NO ako neuromodulátora zabezpečuje intersegmentové prepojenia [20,28]. V mediálnej časti bočného povrazca dolných lumbálnych segmentov je zaznamenaná výrazná nNOS imunoreaktivita axónov, ktoré spájajú lumbálnu intumescenciu s neurónmi ventrálneho motorického jadra v C7–Th1 segmentoch [21,37], to je jadra, ktoré je charakterizované v našej experimentálnej práci [21]. Tieto zistenia naznačujú účasť NOS na patogenéze rozvoja syndrómu caudae equinae a poukazujú na skutočnosť, že

nNOS-IR senzitivne hotovosti v zadnom rohu a motorické hotovosti v dorzo-mediálnej časti predného rohu odpovedajú na konstrikciiu CE veľmi výrazne. Použitie modelu klinicky manifestného syndrómu cauda equina u psa poskytuje informácie o zmenách v NOS aktivite a nNOS-IR v senzitivnej a motorickej oblasti miechy počas akútnej fázy jeho rozvoja a poukazuje na to, že doba počas ktorej sú korene CE komprimované, výrazne ovplyvňuje neurologické poškodenie.

Terapeutické prístupy, aplikované za účelom zlepšenia prognózy tohto mimoriadne závažného ochorenia v čase od konstrikciiu až po chirurgicky navodenú dekompresiu, spočívajú v stimulácii obranných alebo blokácii deštruktívnych mechanizmov, teda v reparácii poškodeného nervového tkaniva alebo v minimalizovaní následkov už existujúceho poškodenia. Poškodené nervové tkanivo neregeneruje; výskum v oblasti kmeňových buniek síce naznačil sľubnú perspektívu, tá je však iba v začiatkoch. V počiatočnom štádiu je aj objasňovanie patogenezy CES vo vzťahu k NOS a k poškodeniu senzitivných a motorických dráh v mieche. Naše predchádzajúce experimentálne práce dokázali anterogradnu axonálnu degeneráciu všetkých sakrálnych a L7 dorzálnych nervových koreňov, retrogradnu degeneráciu motoneurónov v postihnutej oblasti a degeneráciu vlákien fasciculus gracilis vo všetkých torakálnych a cervikálnych segmentoch miechy po konstrikciiu MCEC u psa. Mechanická stimulácia takto postihnutých lumbosakrálnych koreňov zapríčinila anatomické a funkčné zmeny nielen v komprimovaných koreňoch, ale spôsobila výrazné zmeny aj v bielej a sivej hmote miechy [1,28–30]. Hľadanie príčin rozsiahlych zmien v NOS aktivite a nNOS-IR po experimentálne navodenej ligácii MCEC v mieche nás viedlo k záverom, že ventrálna časť miechy reaguje na zmeny v NOS aktivite a nNOS-IR po konstrikciiu koreňov kaudy výraznejšie ako jej dorzálna a mediálna časť.

## Literatúra

- Orendáčová J, Čížková D, Kafka J, Lukáčová N, Maršala M, Šulla I et al. Cauda equina syndrome. *Prog Neurobiol* 2001; 64: 613–637.
- Dyck POJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge R (Eds). *Peripheral neuropathy*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders 1984.
- Stephenson GC, Gibson RM, Sonntag VKH. Who is to blame for the morbidity of acute cauda equina compression? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 388.
- Gleave JR, Macfarlane R. Cauda equina syndrome: what is the relationship between timing of surgery and outcome? *Br J Neurosurg* 2002; 16: 325–328.
- Hussain SA, Gullan RW, Chitnavis BP. Cauda equina syndrome: outcome and implications for management. *Br J Neurosurg* 2003; 17:164–167.
- Smyth MD, Peacock WJ. The surgical treatment of spasticity. *Muscle Nerve* 2000; 23: 153–163.
- Sheean G. The pathophysiology of spasticity. *Eur J Neurol* 9Suppl 2002; 1: 3–9.
- Lazorthes Y, Sol JC, Sallerin B, Verdier JC. The surgical management of spasticity. *Eur J Neurol* 2002; 9(Suppl 11): 35–41.
- Vizzard MA, Erickson K, de Groat WC. Localization of NADPH diaphorase in the thoracolumbar and sacrococcygeal spinal cord of the dog. *J Auton Nerv Syst* 1997; 64: 128–142.
- Meller ST, Cummings CP, Traub RJ, Gebhart GF. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. *Neuroscience* 1994; 60: 367–374.
- Wiertelak EP, Furness LE, Watkins LR, Maier SF. Illness-induced hyperalgesia is mediated by a spinal NMDA-nitric oxide cascade. *Brain Res* 1994; 664: 9–16.
- 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.
- Salter M, Strijbos PLJM, Neale S, Duffy C, Follenfant RL, Garthwaites J. The nitric-oxide-cyclic GMP pathway is required for nociceptive signalling at specific loci within the somatosensory pathway. *Neuroscience* 1996; 73: 649–655.
- Kaske A, Reinert A, Hoheisel U, Mense S. Nitric oxide synthase in rat dorsal horn neurons responds differentially to electrical stimulation of various afferent fibre populations. *Soc Neurosci* 1997; 23: 441.
- Verge VM, Xu Z, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt 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* 1992; 89: 11617–11621.
- Zhang X, Verge V, Wiesenfeld-Hallin Z, Ju G, Brecht D, Synder SH, Hökfelt T. Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 1993; 335: 563–575.
- Lukáčová N, Čížková D, Križanová O, Pavel J, Maršala M, Maršala J. Peripheral axotomy affects nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase and nitric oxide synthases in the spinal cord of the rabbit. *J Neurosci Res* 2003; 71: 300–313.
- Steel JH, Terenghi G, Chung JM, Na HS, Carlton SM, Polak JM. Increased nitric oxide synthase immunoreactivity in rat dorsal root ganglia in a neuropathic pain model. *Neurosci Lett* 1994; 169: 81–84.
- Choi Y, Raja SN, Moore LC, Tobin JR. Neuropathic pain in rats is associated with altered nitric oxide synthase activity in neural tissue. *J Neurol Sci* 1996; 138: 14–20.
- Maršala J, Lukáčová N, Čížková D, Kafka J, Katsube N, Kuchárová K et al. The case for the bulbospinal respiratory nitric oxide synthase-immunoreactive pathway in the dog. *Exp Neurol* 2002; 177: 115–132.
- Maršala J, Lukáčová N, Čížková D, Lukáč I, Kuchárová K, Maršala M. Premotor nitric oxide synthase immunoreactive pathway connecting lumbar segments with the ventral motor nucleus of the cervical enlargement in the dog. *J Chem Neuroanat* 2004; 27: 43–54.
- Maršala J, Lukáčová N, Šulla I, Wohlfahrt P, Maršala M. The evidence for nitric oxide synthase immunopositivity in the monosynaptic Ia-motoneuron pathway of the dog. *Exp Neurol* 2005; 195: 161–178.
- Maršala J, Lukáčová N, Kolesár D, Kuchárová K, Maršala M. Nitrergic proprioceptive afferents originating from quadriceps femoris muscle are related to monosynaptic Ia-motoneuron stretch reflex circuit in the dog. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26: 1385–1410.
- Olmaker K, Takahashi K, Rydevik B. Anatomy and compression-pathophysiology of the nerve roots of the lumbar spine. In: Anderson GBJ, MacNeill T (Eds). *Spinal Stenosis*. St. Louis: Mosby Year Book 1992: 77–90.

25. Maršala J, Šulla I, Jalč P, Orendáčová J. Multiple protracted cauda equina constrictions cause deep derangement in the lumbosacral spinal cord circuitry in the dog. *Neurosci Lett* 1995; 193: 97–100.
26. Cornefjord M, Olmarker K, Rydevik B, Nordborg C. Mechanical and biochemical injury of spinal nerve roots: a morphological and neurophysiological study. *Eur Spine J* 1996; 5: 187–192.
27. Yamaguchi K, Murakami M, Takahashi K, Moriya H, Tatsuoka H, Chiba T. Behavioral and morphologic studies of the chronically compressed cauda equina. Experimental model of lumbar spinal stenosis in the rat. *Spine* 1999; 24: 845–851.
28. Maršala J, Kafka J, Lukáčová N, Čížková D, Maršala M, Katsube N. Cauda equina syndrome and nitric oxide synthase immunoreactivity in the spinal cord of the dog. *Physiol Res* 2003; 52: 481–496.
29. Orendáčová J, Maršala M, Šulla I, Kafka J, Jalč P, Čížková D, Taira Y et al. Incipient cauda equina syndrome as a model of somatovisceral pain in dogs: spinal cord structures involved as revealed by the expression of c-fos and NADPH diaphorase activity. *Neuroscience* 2000; 95: 543–557.
30. Lukáčová N, Kafka J, Čížková D, Maršala M, Maršala J. The effect of cauda equina constriction on nitric oxide synthase activity. *Neurochem Res* 2004; 29: 429–439.
31. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682–685.
32. Herbison AE, Simonian SX, Norris PJ, Emson PC. Relationship of neuronal nitric oxide immunoreactivity to GnRH neurons in the ovariectomized and intact female rat. *J Neuroendocrinol* 1996; 8: 73–82.
33. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347: 768–770.
34. Iwamoto H, Kuwahara H, Matsuda H, Noriage A, Yamano Y. Production of chronic compression of the cauda equina in rats for use in studies of lumbar spinal canal stenosis. *Spine* 1995; 20: 2750–2757.
35. Sayegh FE, Kapetanos GA, Symeonides PP, Anogiannakis G, Madentzidis M. Functional outcome after experimental cauda equina compression. *J Bone Joint Surg* 1997; 79: 670–674.
36. Fiallos-Estrada CE, Kummer W, Mayer B, Bravo R, Zimmermann M, Herdegen 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* 1993; 150: 169–173.
37. Lukáčová N, Kolesárová M, Kuchárová K, Pavel J, Kolesár D, Radoňák J et al. The effect of a spinal cord hemisection on changes in nitric oxide synthase pools in the site of injury and in regions located far away from the injured site. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26: 1365–1383.

[www.urologickelisty.cz](http://www.urologickelisty.cz)