

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ

**Агашков Кирило Сергійович**

УДК 612.812:611.813.14

**Клітинні й мережеві механізми обробки  
ноцицептивних сигналів у спинному мозку та їх генно-  
інженерне модулювання як засіб терапії хронічного  
больового синдрому**

14.03.04 – Патологічна фізіологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі сенсорної сигналізації Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

**Науковий керівник:**

доктор біологічних наук, професор

**Войтенко Нана Володимирівна**

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України,  
завідувач відділу сенсорної сигналізації.

**Офіційні опоненти:**

доктор медичних наук, професор

**Соловйов Анатолій Іванович**

Інститут фармакології та токсикології НАМН України,  
завідувач відділу фармакології клітинних сигнальних систем та експериментальної терапії.

доктор медичних наук

**Білошицький Вадим Васильович**

Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України,  
заступник директора з наукової роботи.

Захист відбудеться «22» вересня 2020 р. о 14<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ-24, вул. Богомольця, 4

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України та на сайті:  
[http://biph.kiev.ua/en/Specialized\\_Scientific\\_Council](http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council) .

Автореферат розісланий «20» серпня 2020 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої  
вченої ради ,



к. б. н. Любанова О.П.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

### *Актуальність проблеми*

Біль, як фізіологічний, так і патологічний, є важливою клінічною проблемою (Danilov et al., 2020; Goesling et al., 2018; Nylands-White et al., 2017; Schug et al., 2016). Принципи обробки больових сигналів за фізіологічних умов поки що недостатньо вивченими, а, отже, їх дослідження є важливою задачею для сучасної медицини. У формуванні відчуття болю беруть участь як нейрони периферичної нервової системи (ПНС), так і нейрони багатьох структур ЦНС. Первинна обробка больової інформації від рецепторного апарату тіла відбувається в дорзальному розі (ДР) спинного мозку (СМ). Серед великого різноманіття нервових клітин, які залучені в цей процес, можна окремо виділити так звані проєкційні нейрони (ПН), більшість з яких знаходиться у І пластини сірої речовини. Проєкційні нейрони пластини І СМ відіграють важливу роль в передачі ноцицептивних периферичних впливів від первинних аферентних волокон до супраспінальних центрів, відповідальних за формування відчуття болю. Висхідні гілки їх аксонів закінчуються в специфічних ядрах стовбуру мозку та таламусу (Al-Khater and Todd, 2009; Campos et al., 2018; Chiang et al., 2020; Gauriau and Bernard, 2002, 2004; Jansen and Giesler, 2015; Polgár et al., 2010; Todd, 2010a). Ці ядра в подальшому передають сигнал до ноцицептивних зон в мигдалеподібному тілі, гіпоталамусі та первинній соматосенсорній корі (Chiang et al., 2020; Gauriau and Bernard, 2002; Peirs and Seal, 2016; Schweinhardt and Bushnell, 2010). ПН пластини І дають початок аферентним шляхам передачі як емоційної, так і дискримінаційної складових болю.

Терміналі ПН пластини І локалізовані в латеральній парабрахіальній зоні довгастого мозку (Todd, 2010a), тобто ці клітини можна кваліфікувати як спіно-парабрахіальні нейрони (СПН). Електричні відповіді СПН на больову стимуляцію шкірних рецепторних полів широко вивчалась в умовах *in vivo* за допомогою позаклітинних відведень; це дало змогу виявити різні патерни такої активності (Allard, 2019; Andrew, 2009, 2010; Andrew and Craig, 2002; Bester et al., 2000). Проте, вказані роботи не були фокусовані на механізмах, які визначають різну специфіку характеристик вхідних та вихідних сигналів СПН. Крім того, досі було невідомим як СПН (головні генератори вихідного сигналу нейронної мережі СМ) кодують больові сигнали. Така інформація важлива для подальшого розуміння базисних фізіологічних механізмів ноцицепції та патогенезу больових синдромів.

Патологічний (хронічний) біль є однією з найпоширеніших причин звернень за медичною допомогою. Щонайменше 40% людей в розвинених країнах стикаються з проблемою хронічного болю (Breivik et al., 2013). Вказувалось, що у США кількість людей, які страждають у тій або іншій мірі від хронічного болю різного генезу, перевищує 20% (Dahlhamer et al., 2018). Хронічний біль знаходиться в першій десятці станів, які значно порушують якість життя пацієнтів (Vos et al., 2017). 60.4 % опитаних людей в Україні, відповідно до міжнародного діагностичного інтерв'ю CID1 2.0 (n = 1720), стикались з хронічним болем (Xu et al., 2019) Таким чином, хронічний біль є дуже значною клінічною та соціальною проблемою. При цьому слід визначити,

що розробка ефективних терапевтичних підходів до його лікування відбувається досить повільно.

Недостатня ефективність фармакотерапії хронічного болю підкреслює важливість пошуку та розробки нових підходів до терапії даного стану. В цьому аспекті може виявитись перспективною терапія з використанням генної інженерії, оскільки при цьому можна орієнтуватися на конкретні тканиноспецифічні механізми хронічного болю (Guedon et al., 2015). Одним з головних чинників розвитку та підтримання хронічного болю є зменшення загального гальмівного тону в ноцицептивних мережах загалом, та у нейронній мережі ДР СМ зокрема (Zeilhofer et al., 2012). З урахуванням сказаного, відновлення рівня гальмівного тону нейронних мереж ДР СМ за допомогою генної терапії може бути досить перспективним напрямком.

Отже, розкриття основних клітинних механізмів обробки ноцицептивних сигналів нейронами ДР СМ є високо актуальним в аспекті розробки терапевтичних підходів терапії хронічного болю.

### ***Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами***

Дисертаційна робота виконана відповідно до загального плану науково-дослідних робіт відділу сенсорної сигналізації Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в рамках науково-дослідних робіт «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014 – 2018; номер державної реєстрації — 0113U007273); «Розробка новітніх знеболюючих засобів на основі інгібіторів кальційпроникних АМРА-рецепторів» (2015 – 2019; номер державної реєстрації – 0115U003632); «Біофізичні та молекулярно-генетичні механізми регуляції фізіологічних та патологічних процесів» (2017 – 2021; номер державної реєстрації – 0116U004470) та «Функціональні характеристики нейронів СМ та їх зміни при різноманітних патологіях та травмах» (2019 - 2023; номер державної реєстрації – 0118U007346).

### ***Мета дослідження***

Мета даної роботи полягала у визначенні специфічних клітинних та мережевих механізмів обробки ноцицептивних сигналів в дорзальному розі (ДР) спинного мозку (СМ), а також у пошуку та обґрунтуванні новітнього генноінженерного підходу для терапії хронічного больового синдрому.

### ***Завдання дослідження***

Згідно з цією метою були поставлені наступні завдання:

1. Виявити різні типи спіно-парабрахіальних нейронів (СПН) відповідно характеристикам їхньої імпульсної активності, викликаного стимуляцією первинних аферентів.

2. Встановити кількісні та якісні характеристики активності аферентних входів до СПН різних типів.

3. Оцінити вплив нейронної мережі ДР на активність СПН, викликану стимуляцією первинних аферентів.

4. Оцінити участь нейронної мережі у функціонуванні проекційних нейронів пластини I в умовах індукції хронічного болю.

5. Дослідити зміни функціонування нейронної мережі пластини I ДР СМ мишей після субпіальних уведень аденоасоційованих вірусних конструктів, що містять фермент глутаматдекарбоксілазу (AAV9-UBI-GAD65) та везикулярний транспортер ГАМК (AAV9-UBI-VGAT).

6. Дослідити ефективність субпіального введення AAV9-UBI-GAD65 і AAV9-UBI-VGAT на перебіг експериментального нейропатичного больового синдрому.

*Об'єкт досліджень:* збуджуюча та гальмівна синаптична активність у мережі нейронів поверхневих пластин ДР; прояви хронічного больового синдрому, в експериментах на тваринах (щурах та мишах).

*Предмет досліджень:* клітинні й мережеві механізми обробки ноцицептивних сигналів у СМ та їх зміни при хронічному больовому синдромі; новий підхід у терапії цього синдрому.

### ***Наукова новизна***

В даній роботі вперше показано, що популяція СПН пластини I ДР СМ є гетерогенною, і різних клітинних типів що виконують принципово різну фізіологічну роль в передачі ноцицептивних сигналів. Вперше виявлено, що різні типи СПН розрізняються за кількістю синаптичних входів від первинних аферентів. Встановлено, що більшість СПН є селективними детекторами больового сигналу, які генерують лише один ПД у відповідь на стимуляцію високопорогових первинних аферентів. В той же час лише 19% клітин усієї популяції СПН є інтеграторами активності локальних ноцицептивних мереж, робота яких залежить від процесів, пов'язаних зі збудженням NMDA-рецепторів. Ці нейрони підсилюють та інтегрують ноцицептивні сигнали, поступово кодуєючи їх інтенсивність шляхом збільшення кількості ПД, що генеруються. Показано, що зміни збудливості СПН за рахунок посиленої активності ноцицептивних мереж ДР корелюють з больовою поведінкою тварин в моделі хронічного запального болю. Вперше доведено, що субпіальне введення вірусних конструктів AAV9-UBI-GAD65/VGAT ефективно збільшує гальмівний тону в нейронній мережі ДР СМ. Субпіальне введення AAV9-UBI-GAD65 і AAV9-UBI-VGAT забезпечує довготривалий антиноцицептивний ефект в моделі хронічного нейропатичного болю у мишей. Таким чином, в роботі вперше показано, що різні механізми обробки сигналів дозволяють нейронам СПН пластини I відігравати різні ролі в організації ноцицепції. Також в даній роботі вперше використано феномен перемикання збуджуючого фенотипу нейронів ДР СМ на переважно гальмівний за допомогою новітнього підходу, який базується на субпіальному введенні певних вірусних векторів. Це дає потенційну можливість розглядати використання перспективи даного підходу для терапії хронічного болю.

### ***Теоретичне та практичне значення роботи***

Результати, отримані в роботі, мають як фундаментальне, так і практичне значення. Визначення принципів функціонування СПН пластини I ДР СМ дозволило виявити гетерогенність популяції цих нейронів та показати, що переважна більшість СПН є детекторами больового сигналу, які отримують входи від первинних ноцицепторів та передають до супраспінальних структур поодинокі ПД, в той час як біля однієї п'ятої усієї популяції цих нейронів можуть кодувати інтенсивність больового стимулу

кількістю генерованих ПД. Ці дані помітно покращують як наше розуміння механізмів кодування та інтеграції ноцицептивних сигналів на рівні СМ, так і загальне розуміння клітинних процесів, які лежать в основі формування стану фізіологічного болю.

Практична цінність даної роботи полягає у встановленні того факту, що субпіальне введення вірусних конструктів, які викликають гіперекспресію ГАМК-синтезуючого ферменту GAD65 та везикулярного транспортеру ГАМК VGAT, призводить до зменшення загальної збудливості мережі поверхневих пластин ДР завдяки збільшенню загального гальмівного тону. Результати поведінкових дослідів, які демонструють явне зниження больової чутливості, дозволяють обґрунтувати проведення преклінічних експериментальних досліджень можливості використання генно-інженерного підходу для терапії хронічного больового синдрому.

### ***Особистий внесок здобувача***

Здобувачем були сформульовані задачі дослідження; разом зі співавторами були сплановані та розроблені експериментальні протоколи. Всі поведінкові тести, детекція збуджуючих та гальмівних синаптичних струмів, статистична обробка та узагальнення результатів проведені автором самостійно.

Аналіз кількісних результатів електрофізіологічних експериментів та оформлення публікацій були проведені разом із співавтором опублікованих робіт співробітником інституту ім. О. О. Богомольця НАН України кандидатом біологічних наук В.В. Кротовим.

Визначення мети дослідження, планування експериментальних робіт, обговорення результатів експериментів та формулювання висновків досліджень проводилося за участі наукового керівника доктора біологічних наук, професора Н.В. Войтенко, а також доктора біологічних наук професора П. В. Білана.

### ***Апробація результатів дисертації***

Основні положення роботи доповідались на двох щорічних конференціях Американського товариства нейронаук (США, Вашингтон, 2017; Чикаго, 2019), на VI конгресі українського товариства нейронаук (Україна, Київ, 2014), на VIII міжнародному симпозіумі з експериментальної та клінічної нейробіології (Словаччина, Кошице, 2017), VII конгресі Українського товариства нейронаук (Україна, Київ, 2017), конференції Польського товариства нейронаук (Польща, Варшава, 2017), III Київському міжнародному симпозіумі з фізіології гладеньких м'язів, біофізики та фармакології (Україна, Київ, 2017), XI Форумі Федерації Європейських Товариств Нейронаук (Німеччина, Берлін, 2018), а також на семінарах сектора нейронаук Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

### ***Публікації***

За матеріалами дисертації опубліковано 10 друкованих робіт: 2 статті у міжнародних наукових журналах (один з яких входить до першого квартилю (Q1) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank) та 8 тез доповідей на українських та міжнародних наукових конференціях.

## **Структура та обсяг дисертації**

Дисертація складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, основної частини (огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу результатів та їх обговорення), висновків та списку використаних джерел (209 найменувань). Робота викладена на 146 сторінках машинописного тексту та проілюстрована 24 рисунками.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

### **Матеріали та методи дослідження**

В розділі описані методичні підходи, використані при проведенні досліджень. В даній роботі для експериментів використовували самців щурів лінії Вістар (Р 20-28).

**Експериментальні моделі.** Периферичне запалення викликали за допомогою підшкірної ін'єкції повного ад'юванту Фройнда (ПАФ, Sigma Aldrich, США) у задню кінцівку (50 мкл ПАФ в пропорції 1:1 з 0,9 % розчином NaCl). Травму периферичного нерва забезпечували накладанням напівлігатури на сідничний нерв. Індукцію гальмівного нейромедіаторного фенотипу в поверхневих пластинах СМ здійснювали шляхом субпіального введення вірусних конструктів AAV9- UBC-GFP, GAD65, та VGAT ( $5,3 \cdot 10^{12}$  гк/мл,  $1,5 \cdot 10^{12}$  гк/мл та  $3,3 \cdot 10^{12}$  гк/мл відповідно; загальний об'єм 3,0 мл; University of California, США ) методика була детально описана раніше (Tadokoro et al., 2017).

**Больові поведінкові тести.** Для визначення наявності хронічного больового синдрому у піддослідних тварин, а також для дослідження впливу введення відповідних вірусних конструктів проводили больові поведінкові тести. Зміни периферичної чутливості у відповідь на термічну стимуляцію оцінювали методом Харгрівса (Hargreaves et al., 1988). Для дослідження больової чутливості тварин у відповідь на механічну стимуляцію застосовували подразнення філаментами фон Фрея (Freu, 1896).

**Електрофізіологічні експерименти.** Електрофізіологічні дослідження проводили на інтактних препаратах СМ, котрі отримували способом, описаним раніше (Agashkov et al., 2019; Krotov et al., 2019; Safronov et al., 2007). Препарат люмбо-сакрального відділу СМ переміщували до експериментальної камери, котру перфузували зі швидкістю 1,5-2,0 мл/хв насиченим карбогеном розчином Кребса, який мав наступний склад (ммоль/л): NaCl – 125, NaHCO<sub>3</sub> - 26, KCl – 2,5, MgCl<sub>2</sub> – 1,0, CaCl<sub>2</sub> – 2,0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -1,25, глюкоза – 10 (рН 7,4, осмолярність 310-315 мОсм). Нейрони ДР візуалізували за допомогою мікроскопу Olympus VX50WI (Olympus, Японія) з водноімерсійним об'єктивом (×60). Петч-піпетки мали опір 34 МОМ при заповненні внутрішньоклітинним розчином наступного складу (ммоль/л): калію глюконат – 133, NaCl – 5,0, MgCl<sub>2</sub> – 0,5, Mg-АТФ – 2,0, Na-GTP – 0,5, NERES – 10 та EGTA – 0,5 (рН 7,2; осмолярність 290 мОсм). Відведення трансмембранних струмів та подачу командних паштовхів струму здійснювали за допомогою підсилювача MultiClamp 700В (Molecular Devices, США) та ЦАП/АЦП (Molecular Devices, США), що контролювався програмою pClamp 9.2 (Molecular Devices, США). Для реєстрації ЗПСС потенціал на клітинній мембрані підтримували на рівні –70 мВ; при реєстрації

ГПСС потенціал дорівнював  $-30$  мВ. Реєстрацію сГПСС проводили при  $-30$  мВ за присутності в розчині блокатору гліцинергічної передачі стрихніну ( $2,0$  мкмоль/л).

**Аналіз постсинаптичних струмів.** Постсинаптичні струми реєстрували з використанням програми MiniAnalysis (Synaptosoft, США). Аналізували лише ті зразки, у котрих базова лінія струму не змінювалась, а середньоквадратичне значення шуму не перевищувало  $3,0$  пА при фіксації потенціалу на рівні  $-70$  мВ та  $4,0$ – $4,5$  пА при фіксації на рівні  $-30$  мВ. Детектування проводилося в основному в ручному режимі підбору оптимальних параметрів детекції. У разі невисоких частот синаптичних подій та низьких рівнів середньоквадратичного шуму детектування проводили в автоматичному режимі, після чого здійснювали контрольну перевірку на наявність хибнопозитивних подій.

Спонтанні та мініатюрні ЗПСС (мЗПСС) та спонтанні ГПСС (сГПСС) аналізували за частотою (загальна кількість зареєстрованих подій, поділена на тривалість реєстрації), інтервалом між подіями (часовим проміжком між двома сусідніми піками), амплітудою, інтегральною величиною (площею) постсинаптичного струму та кінетикою його спаду. При аналізі сЗПСС та мЗПСС час спаду вимірювався програмою автоматично та визначався як часовий проміжок між піком синаптичної події та часом, за який величина струму зменшувалася до  $37\%$  його амплітуди. Час спаду сГПСС характеризували часовою константою моноекспоненційної апроксимації постсинаптичного струму.

**Статистична обробка результатів дослідження.** Для визначення нормальності розподілів числових даних усі набори останніх аналізували із застосуванням тесту Шапіро-Уїлка. Якщо вибірки були розподілені за Гаусом, то вони характеризувалися середніми значеннями  $\pm$  похибка середнього, та їх порівнювали між собою за допомогою «двоххвостового» парного або непарного t-тесту Стюдента. Більшість розподілів числових даних не відповідали критерію нормальності; тому для них наводили лише медіанне значення вибірок, а достовірність між групових відмінностей порівнювали за допомогою непараметричних тестів Манна-Уїтні та Колмогорова-Смірнова. В даній роботі проводили: а) аналіз загальних вибірок конкретного параметру для усіх збуджуючих або гальмівних синаптичних подій в усіх клітинах а) достовірність різниці між функціями ймовірності визначали за тестом Колмогорова-Смірнова; б) аналіз медіанних значень параметрів по клітинах (статистичну достовірність визначали за тестом Манна-Уїтні). Різницю порівнюваних величин вважали достовірною, якщо ймовірність нульової гіпотези була меншою  $5\%$  ( $p < 0,05$ ). У всіх випадках наводилося також значення числа експериментів ( $n$ ); це дорівнювало кількості клітин.

### ***Результати дослідження та їх обговорення***

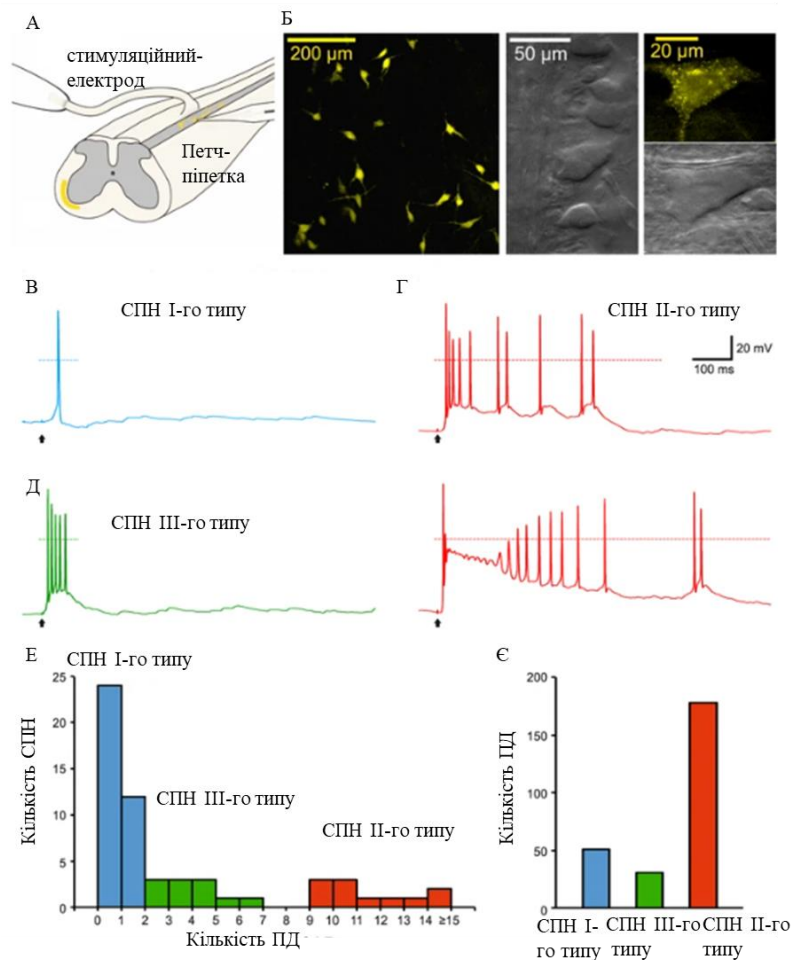
#### ***Різні типи проєкційних нейронів пластини I ДР СМ.***

Для patch-clamp вимірювань використовувались лише ретроградно мічені Флуороголд СПН пластини I як було описано раніше (Todd, 2010b). Котрі були візуалізовані шляхом використання комбінації флуоресцентного зображення та техніки бічного інфрачервоного світлодіодного освітлення (Рис. 1 А- Б)

В залежності від характеристик генерації ПД у відповідь на стимуляцію дорзального корінця (ДК) супрамаксимальним стимулом ( $1$  мс,  $140$  мкА,  $0,1$  Гц) СПН



були поділені на три типи (Рис. 1 В-Є). Найбільша група ( $n = 36$ ) складалася з нейронів, які у відповідь на таке подразнення генерували в середньому лише один ПД. Такі нейрони були об'єднували в групу з низьким рівнем ПД-активності, викликаній інтенсивною стимуляцією первинних аферентів. Надалі ці нейрони називатимуться СПН I-го типу. Другий тип СПН ( $n = 11$ ) принципово відрізнявся від першого тим, що відповідні клітини генерували в таких умовах від 10 до 20 ПД. Ці нейрони об'єднували у групу з високим рівнем ПД-активності, викликаній стимуляцією первинних аферентів (надалі СПН II-го типу).



**Рис. 1. Характеристики генерації викликаних ПД в різних групах СПН.** А) Експериментальний дизайн (зображено препарат СМ, стимуляційний електрод та петч-піпетку). Б) Конфокальні зображення (Z-стек, 30 мкм з кроком 3 мкм) мічених поперекових СПН Флуороголдом. нейрони пластини I у ex-vivo препараті СМ з використанням косоного інфрачервоного світлодіодного освітлення та епіфлюоресцентні, а також інфрачервоні світлодіодні зображення ретроградно мічених СПН. В-Д) Приклади імпульсних відповідей на супрамаксимальну стимуляцію (1,0 мс, 140 мкА) ДК СМ СПН різних типів. Час стимуляції зазначено стрілкою. Е) Загальна кількість ПД Є) Розподіл СПН за кількістю ПД у відповідях СПН різних типів, при супрамаксимальній стимуляції ДК.

Останній тип СПН включав у себе клітини ( $n = 11$ ) з проміжним рівнем генерації ПД у вказаних умовах (надалі СПН III-го типу), від 3 до 6 ПД у відповідь на супрамаксимальну стимуляцію ДК. Таким чином, можна стверджувати, що популяція досліджених СПН є істотно гетерогенною. СПН проявляють різні вихідні

характеристики, а тому, ймовірно, відіграють різну роль в передачі ноцицептивних сигналів.

### ***Залежність вихідного сигналу від інтенсивності ноцицептивного стимулу у СПН різних типів.***

Для визначення залежності між інтенсивністю стимуляції та характером вихідного сигналу були використані наступні протоколи стимуляції; для активації А-волокон тривалість стимулу складала 50 мкс, а інтенсивність стимуляції поступово зростала від 0 до 140 мА з кроком 10 мА; для активації С-волокон тривалість стимулу складала 1,0 мс, а інтенсивність була аналогічною. Реєстрували кількість генерованих ПД в залежності від сили та тривалості струму, які змінювалися таким чином, щоб послідовно активувати спочатку Ад-, а потім С-волокна.

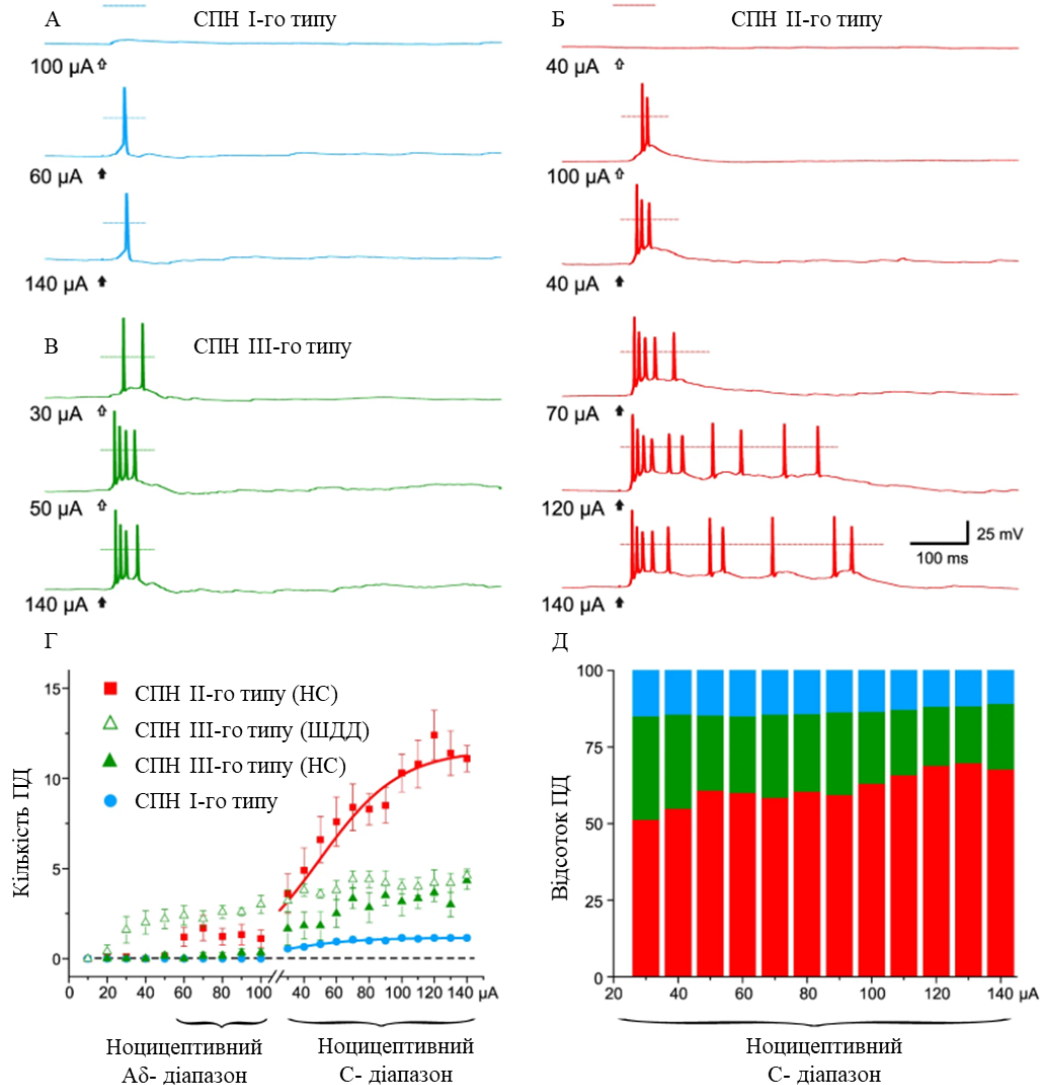
СПН І-го типу мали порогові значення в ноцицептивному діапазоні С-волокон (1,0 мс, 30-70  $\mu$ А) та не генерували звичайно більше одного, а рідше двох ПД навіть на супрамаксимальний стимул (у середньому  $1,15 \pm 0,04$  ПД,  $n = 36$ ; Рис. 2 А). Таким чином, СПН І-го типу відповідали на поодинокий високопороговий аферентний стимул за принципом «все або нічого».

СПН ІІ-го типу починали генерувати ПД при ноцицептивній стимуляції Ад-діапазону (50 мкс, 60-70 мкА; 5 з 11 нейронів). Кількість генерованих ними ПД у відповідь на стимуляцію в діапазоні С-волокон в подальшому зростала (Рис. 2 Б). Отже, СПН ІІ-го типу за своїми характеристиками відповідали таким, котрі обробляють ноцицептивний сигнал в широкому діапазоні кодування.

На відміну СПН від перших двох типів клітини ІІІ-го типу не були винятково ноцицептивноспецифічними, а демонстрували варіабельні характеристики входу-виходу. Більшість із цих нейронів починали генерувати імпульсну відповідь у вигляді поодиноких ПД або їх короткої групи у відповідь на неbolьвий ( $\leq 50$  мкА, 50 мкс; 5 з 11 клітин) або больвий ( $\geq 50$  мкА, 50 мкс; 3 з 11 клітин) стимул в діапазоні Ад-волокон. Чотири з цих нейронів генерували коротку пачку ПД у відповідь на Ад-стимуляцію, проте їх відповідь суттєво не змінювалася зі збільшенням інтенсивності до С-діапазону. Це означає, що ці нейрони вибірково обробляють інформацію від Ад-аферентів. (Рис. 2 В). Інші нейрони цієї групи ( $n=7$ ), відповідали на неbolьвову стимуляцію Ад-діапазону, та демонстрували поступове збільшення кількості ПД у відповідь на подразнення в діапазоні С-волокон ( $4,4 \pm 0,4$  ПД при супрамаксимальному стимулі 150 мкА, 1,0 мс). Для СПН І-го типу залежність була простою та в діапазоні для С-волокон добре описувалася функцією Больцмана ( $R^2 = 0.99$ ), досягаючи насичення при значенні, близькому до ініціації одного ПД ( $1,15 \pm 0,04$ ,  $t$ -критерій = 28,02,  $p < 0,001$ ; Рис. 2). Таким чином, для деяких СПН ІІІ-го типу ( $n=5$ ) був властивий широкий динамічний діапазон (Andrew, 2010), тоді як інші клітини ( $n=6$ ) були подібні до ноцицептивноспецифічних нейронів (Andrew, 2009; Bester et al., 2000). Зважаючи на різноманітність характеристик входу-виходу, детальний аналіз відповідей СПН ІІІ-го типу не проводився.

Функційна різниця між групами СПН І-го та ІІ-го типів стала більш очевидною при порівнянні графіків характеристик їх відповідей на аферентну стимуляцію (Рис. 2). Таким чином, СПН І-го типу, швидше за все, виконують роль простих передавачів ноцицептивного сигналу від С-волокон до супраспінальних структур.

Характеристики СПН II-го типу демонструють явне локальне насичення в діапазоні для Аδ- волокон (в межах 70-100 мкА), яке супроводжується наростання в ноцицептивному С-діапазоні (Рис. 2 Г-Д). Це збільшення також добре апроксимується за допомогою функції Больцмана ( $R^2 = 0,98$ ), та відповідна функція виходить на насичення при  $11,6 \pm 0,7$  ПД ( $t$ -критерій = 16,99,  $p < 0,001$ ).



**Рис. 2.** Характеристики входного та вихідного сигналів СПН різних типів. А-В) Відповіді на аферентну стимуляцію ДК в групі СПН різних типів. Інтенсивність стимулу вказана біля відповідного запису; порожні та заповнені стрілки означають стимуляції 50 мкс та 1,0 мс відповідно. Г) Характеристики входного та вихідного сигналів СПН при стимуляції ДК. Кожна точка відповідає середній кількості ПД, що викликаються в нейронах кожного типу при заданій інтенсивності стимуляції ДК (ШДД – широкий динамічний діапазон у СПН III-го типу; НС – ноцицептивно-специфічні СПН -III-го типу). Д) Відносний внесок різних популяцій СПН у загальну кількість ПД, що генеруються всією сукупністю СПН, в діапазоні для С-волокон (1,0 мс). СПН I-го типу – синій колір, СПН II-го типу – червоний колір, СПН III-го типу – зелений колір.

Отже, СПН II-го типу можуть підсилювати ефекти ноцицептивного входу від Аδ-волокон, генеруючи коротку групу ПД, та конвертувати дію входу від С-волокон у збільшення кількості генерованих ПД. Така ситуація визначає різну функціональну роль у популяції СПН. У фізіологічному аспекті СПН I-го типу передають сигнали

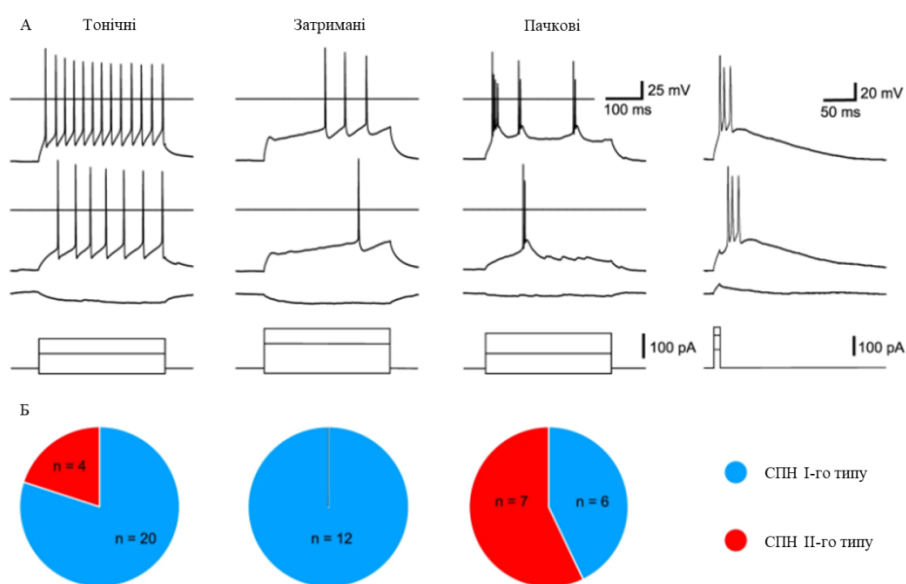
від ноцицептивних С- волокон, в той час як СПН II-го типу підсилюють дію входу від Ад- волокон та кодуєть інтенсивність дії входу С- волокон.

Таким чином, слід вважати, що внесок активності СПН II-го типу ( $n = 11$ ) до загальної кількості ПД, які генеруються усією популяцією СПН ( $n = 58$ ) в діапазоні дії С- волокон є більшим за 50% (Рис. 2 Д). Це підтверджує важливість цієї нечисленної групи нейронів для організації передачі ноцицептивних впливів. Цікаво, що відносний внесок СПН II-го типу в інтегральний вихідний сигнал поступово збільшувався при збільшенні сили стимуляції у ноцицептивному С-діапазоні (нахил кривої,  $1,44 \pm 0,19\%$  на 10 мкА,  $R_2 = 0,86$ ; Рис. 2 Г).

В подальших експериментах ми докладніше дослідили механізми, які лежать в основі відмінностей імпульсної активності СПН I-го та II-го типу.

**Відмінності електричної активності СПН I-го та II-го типів при внутрішньоклітинній стимуляції.**

Для визначення специфіки електричної активності СПН I-го та II-го типів були визначені пасивні параметри цих клітин та їх відповіді на ін'єкцію струму через «петч-піпетку». Протокол був наступним: клітина знаходилась в конфігурації «ціла клітина», ін'єкцію струму тривалістю 500 мс проводили через «петч-піпетку»; інтенсивність першого стимулу складала  $-25$  пА, а інтенсивність наступних стимулів були  $+25$  пА.



**Рис. 3. Патерни генерації ПД у відповідь на ін'єкцію струму в СПН I-го та СПН II-го типу через петч-піпетку.** А) Типи активності клітин при ін'єкції в клітину струму (тривалість стимулу 500 мс). У СПН з пачковою активністю пачки ПД також викликалися за принципом «все або нічого» при короткій (10 мс) з тривалості стимулу (праворуч). В) Діаграми, що показують кількість СПН I-го та II-го типів серед тонічних, «затриманих» та клітин з пачковим патернами електричної активності у відповідь на внутрішньоклітинну стимуляцію.

Середні значення потенціалів спокою мембрани та входні опори у СПН I-го типу ( $-58 \pm 1$  мВ та  $0,73 \pm 0,08$  гОМ,  $n = 36$ ) та СПН II-го типу ( $-59 \pm 1$  мВ,  $n = 11$ ,  $p = 0,48$ ; та  $0,73 \pm 0,20$  гОМ,  $n = 11$ ,  $p = 0,1$ ) суттєво не розрізнялися. Проте середня ємність мембрани у СПН II-го типу, ніж у СПН I-го типу ( $93 \pm 13$  пФ проти  $63 \pm 5$  пФ,  $p <$

0,05) була значно більшою. СПН I-го типу генерували тонічний ( $n = 20$ ), затриманий ( $n = 12$ ) і пачковий (два та більше ПД,  $n = 6$ ) патерни ПД у відповідь на ін'єкцію струму через петч-піпетку. У той же час СПН II-го типу генерували лише тонічний ( $n = 4$ ) і пачковий патерни ( $n = 7$ ; Рис. 3). В нейронах з пачковим патерном генерації пачки ПД, які склалися від 2 до 4 ПД в умовах коротких ін'єкцій струму (Рис. 3 справа) або спонтанної синаптичної активності (не показано), також викликалися за принципом «все або нічого». Статистичні тести виявили значну різницю між патернами генерації ПД СПН I-го та II-го типів ( $p < 0,01$ , точний тест Фішера). СПН II-го типу формували значно більшу частку нейронів з пачковим патерном генерації ПД (майже в чотири рази;  $p < 0,01$ , точний тест Фішера з поправкою Бонферонні). Ці нейрони також генерували пачки ПД і у відповідь на стимуляцію аферентів. Таким чином, специфіка електричної активності генерованої, у відповідь на внутрішньоклітинну стимуляцію, являє собою один із механізмів, що відповідає за генерацію більшої кількості ПД, що викликаються в СПН II-го типу, в умовах стимуляції первинних аферентів. Крім того, властивість генерувати пачки ПД у відповідь на слабкий стимул за принципом «все або нічого» дозволяє СПН II-го типу підсилювати ефекти ноцицептивного А $\delta$ -входу.

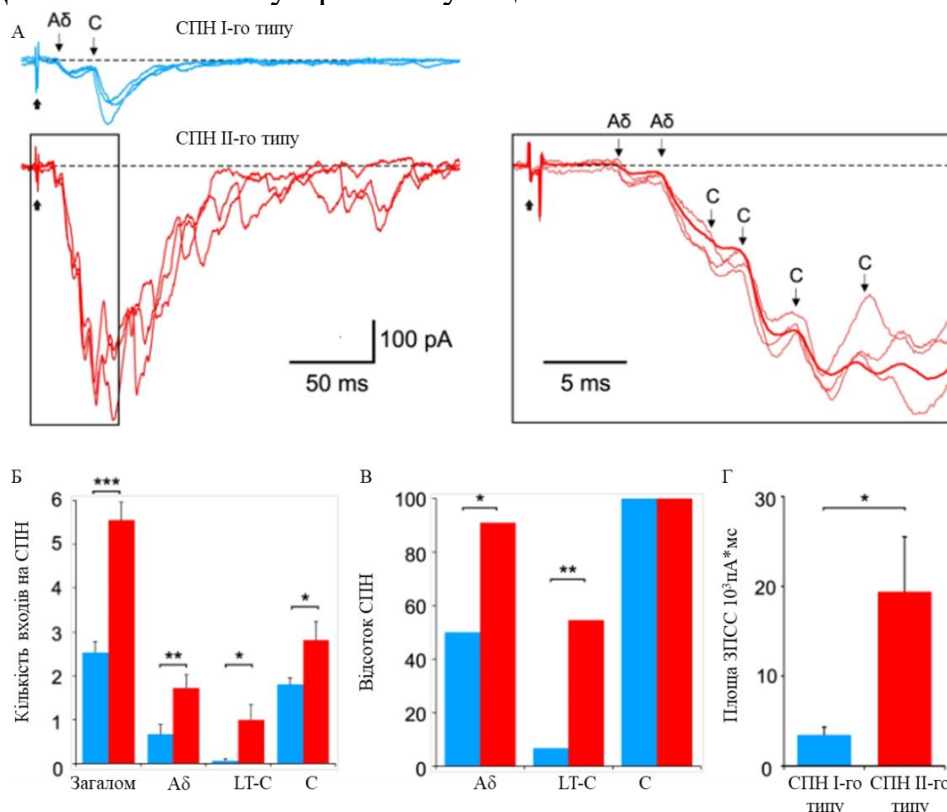
#### ***Різниця аферентних входів до СПН I-го та II-го типу.***

Для встановлення кількості аферентних входів були проведені записи в режимі фіксації потенціалу при потенціалі на мембрані – 70 мВ, та при супрамаксимальній стимуляції ДК (1,0 мс, 140 мА). Критерієм моносинаптичності була низька варіабельність латентності дії аферентного входу (не більше 1,0 мс). Тип волокон визначався шляхом визначення швидкості проведення, затримка відповіді для А $\delta$  більше 0,5 м/с, а для С менше 0,5 м/с. Аналіз СПН, за результатами усіх експериментальних протоколів (СПН I-го типу  $n = 30$ ; СПН II-го типу  $n = 11$ ), виявив чітку різницю в організації їх аферентних входів. Кількість усіх моносинаптичних входів на нейрони в популяції СПН II-го типу була в 2,2 рази більшою, ніж у СПН I-го типу ( $p < 0,001$ ; Рис. 4). СПН II-го типу отримували більшу кількість прямих входів від А $\delta$ -волокон (в 2,6 рази,  $p < 0,01$ ), від низькопорогових С-волокон (у 5,1 рази,  $p < 0,05$ ), а також від високопорогових С-волокон (1,6 разів,  $p < 0,05$ ; Рис. 4 Б-В).

Ми також виявили значну різницю між відносною кількістю СПН, які отримують входи кожного типу (Рис. 4 В). Хоча всі СПН у нашому випадку мали моносинаптичні контакти безпосередньо з С-волокнами, значно більша частка СПН II-го типу отримувала моносинаптичні входи від А $\delta$ -волокон (90,9% проти 46,7% для СПН I-го типу,  $p < 0,05$ , точний тест Фішера).

Крім того, більше половини СПН II-го типу (54,5%) отримувало щонайменше один вхід від низькопорогових С-волокон, тоді як СПН I-го типу майже не демонстрували наявності таких входів (6,7%,  $p < 0,01$ , точний тест Фішера). Для оцінки сили дії первинних аферентних (як моно-, так і полісинаптичних) входів ми проаналізували основні компоненти ЗПСС. При супрамаксимальній стимуляції С-волокон входи до СПН II-го типу зумовлювали в 5,5 разів сильніший ефект, ніж до СПН I-го типу (Рис. Г;  $p < 0,05$ ). Оскільки різниця в силі дії була значно більшою, ніж різниця середніх кількостей прямих входів до нейронів (у 2,2 рази), можна припустити, що СПН II-го типу також отримували більш потужні полісинаптичні входи.

Таким чином, СПН II-го типу отримують більшу кількість прямих входів від ноцицептивних волокон, а загальний постсинаптичний струм в цих клітинах, викликаний стимуляцією ДК є значно сильнішим, ніж у СПН I-го типу. Крім того, більша кількість А $\delta$ -входів і поширеність притаманного нейронам пачкового патерну ПД-активності є двома факторами, що лежать в основі здатності СПН II-го типу розряджатися в ноцицептивному діапазоні стимуляції А $\delta$ -волокон, в якому СПН I-го типу не генерують ПД. Крім того, поєднання потужного аферентного входу та пачкового характеру імпульсної активності може пояснити ефективну початкову генерацію ПД в СПН II-го типу при стимуляції С-волокон.



**Рис. 4. Ефекти активації моносинаптичних аферентних входів до СПН.** (А) Моносинаптичні ЗПСС (позначені стрілками), опосередковані А $\delta$ - та С- аферентами, у СПН I-го та II-го типів. Виділено три окремі записи, накладені на середні значення усіх 14 записів. Група СПН II-го типу отримує потужніший інтегральний вхід з більш численними моносинаптичними компонентами. Підтримуючий потенціал,  $-70$  мВ. Стимуляція корінця,  $1,0$  мс,  $140$  мкА. Б) Діаграма на якій показана середня кількість прямих входів до СПН I-го типу (синій) та СПН II-го типу (червоний). В) Відносна кількість, %, СПН I-го типу (синій) та СПН II-го типу (червоний), які отримують прямі аферентні входи від А $\delta$ -, С- волокна та низькопорогові С- (LT-C) волокон. Г) Потужність первинного аферентного входу, обчислена згідно з інтегралом викликаних ЗПСС. Позначки \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### Інтеграція мережевої активності СПН i-го та II-го типів.

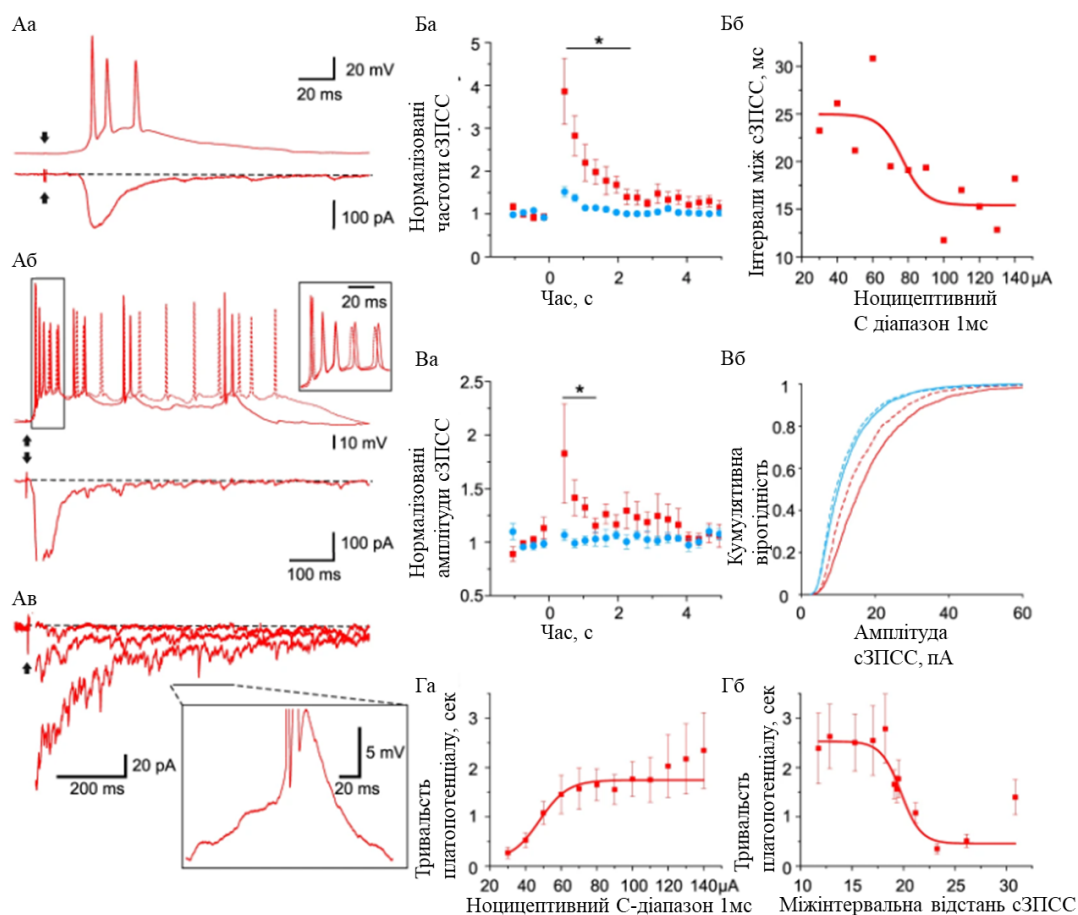
На відміну від СПН I-го типу, у СПН II-го типу продовжували спостерігатись ЗПСС протягом сотень мілісекунд після приходу аферентного стимулу. У наступних експериментах ми вивчали клітинні та мережеві механізми, що лежать в основі «пізньої» електричної активності, яка спостерігається вже після завершення

основного компонента дії аферентного входу. При слабких надпорогових стимулах (10-30 мкА вище порогового значення) моно- та полісинаптичні ЗПСС в СПН II-го типу викликали початкову генерацію декількох ПД, що нагадує характерний патерн генерації імпульсної активності цих нейронів (Рис. 4, 5 Аа).

При сильніших стимуляціях початкова генерація ПД (Рис. 5 Аб) супроводжувалась плато-потенціалом та супутньою пізньою фазою генерації ПД (Рис. 5 Ав, режим фіксованого струму, запис). Остання продовжувалась після припинення основного компонента дії аферентного входу (Рис. 5 Ав). Кількісний аналіз показав, що пізня фаза генерації ПД забезпечує значний внесок у загальний вихідний сигнал СПН II-го типу (в середньому  $7,6 \pm 2,0$  ПД проти  $5,2 \pm 1,5$  ПД; співвідношення початкової та пізньої фаз генерації ПД при супрамаксимальній аферентній стимуляції).

Дослідження синаптичних струмів в режимі фіксації потенціалу виявило наявність невеликого (5-50 pA) повільно спадаючого (від сотень мілісекунд до секунд) вхідного струму та численних спонтанних ЗПСС (сЗПСС). У СПН II-го типу, що мають середній вхідний опір  $0,73 \pm 0,20$  ГОм, цей повільно спадаючий струм був достатнім для створення плато-потенціалу, який міг деполяризувати клітину на 20 мВ (Рис. 5 Ав). Під час плато-потенціалу сЗПСС викликали генерацію випадкових ПД (Рис. 5 Аб, вставка), чого майже не спостерігалось при потенціалі спокою ( $6,4 \text{ с}^{-1}$  під час плато проти  $0,4 \text{ с}^{-1}$  при мембранному потенціалі спокою,  $p < 0,001$ ). Щоб краще зрозуміти внесок спонтанних синаптичних подій у фазі пізньої генерації ПД, ми проаналізували такі події в межах часової рамки від 0,3 до 5,0 с після стимуляції ДК, тобто вже після завершення моносинаптичного та основного полісинаптичного компонентів дії аферентного входу. У СПН II-го типу частота сЗПСС на початку вказаного часового вікна зростала в середньому в  $3,9 \pm 0,8$  рази ( $n = 7$ ,  $p < 0,05$ ) і поверталася до базового рівня протягом 2 с (Рис. 5 Ба). Цей ефект був специфічним для СПН II-го типу, а в СПН I-го типу він був вельми незначним. Середні інтервали між подіями в СПН II-го типу зменшувалися з інтенсивністю стимуляції ( $R^2 = 0,66$  для функції Больцмана, нижня межа:  $24,95 \pm 2,22$  мс,  $t$ -значення = 11,24,  $p < 0,001$ ; верхня межа:  $15,41 \pm 1,77$  мс,  $t$ -значення = 8,72,  $p < 0,001$ ; Рис. 5 Бб). Це вказує на поступову активізацію внутрішніх нейронних мереж ДР, орієнтованих на згадану вище популяцію СПН.

Крім того, ми спостерігали тимчасове збільшення амплітуди сЗПСС в СПН II-го типу, але не в СПН I-го типу, протягом першої секунди часового інтервалу, що вказує на ПД-залежну дію цього фасилітаційного механізму (Рис. 5 Ва). Специфічне збільшення частоти високо амплітудних сЗПСС, викликане ревербераційною мережевою активністю, сприяло посиленню пізньої фази ПД-активності в СПН II-го типу. Такі спостереження означають, що СПН II-го типу, очевидно, інтегрують активність специфічних нейронних мереж ДР, що відповідають за пізню фазу викликаного ПД-генерації в цих нейронах. Ці дані також свідчать про те, що зростання спонтанної мережевої активності синхронізоване з генерацією власного плато-потенціалу для збільшення активності у СПН II-го типу. По-перше, плато-потенціал та збільшення частоти й амплітуди



**Рис. 5. Різні механізми обробки сигналу СПН пластини I ДР.** *Aa) Відповідь СПН II-го типу на слабку стимуляцію (50 мкс, 70 мкА) ДК, що викликає початковий ЗПСС з декількома ПД. Аб) Відповідь СПН II-го типу на сильну стимуляцію (1,0 мс, 140 мкА) викликає початковий ЗПСС з подальшим плато-потенціалом та пізньою електричною активністю. Два накладені записи демонструють, що ПД в початковій фазі фіксовані за часом (вставка), тоді як ПД в межах пізньої фази генеруються рандомізовано під час плато-потенціалу. Відмітимо, що електрична активність тривала і після того, як основний компонент дії аферентного входу припинився (запис в режимі фіксації потенціалу). Ав) Записи в режимі фіксації потенціалу при збільшенні сили стимулу виявляють появу повільно спадаючого вхідного струму та численних сЗПСС. Дорсальний корінець стимулювався струмом, що збільшувалася (20 мкА, 40 мкА та 80 мкА, 1,0 мс. Вставка ПД, зареєстрований у тому самому нейроні в режимі фіксації струму, викликаний сумарним сЗПСС під час плато-потенціалу.) Часовий інтервал позначено лінією. Ба) Зміни частоти сЗПСС у СПН I-го типу (синій колір) та СПН II-го типу (червоний колір) після стимуляції ДК при супрамаксимальній стимуляції С-волокон. Бб) інтервал між сЗПСС у СПН II-го типу, залежний від сили стимуляції ДК. Ва) Розподіл у часі амплітуд сЗПСС у СПН I-го типу (синій) та СПН II-го типу (червоний) після стимуляції корінця. Вб) Тимчасове збільшення амплітуди сЗПСС в СПН II-го типу, але не в СПН I-го типу, протягом перших 0,9 с після стимуляції. Га) Тривалість плато-потенціалу в залежності від сили стимулу. Гб) Відношення між тривалістю плато-потенціалу та між інтервалами сЗПСС.*

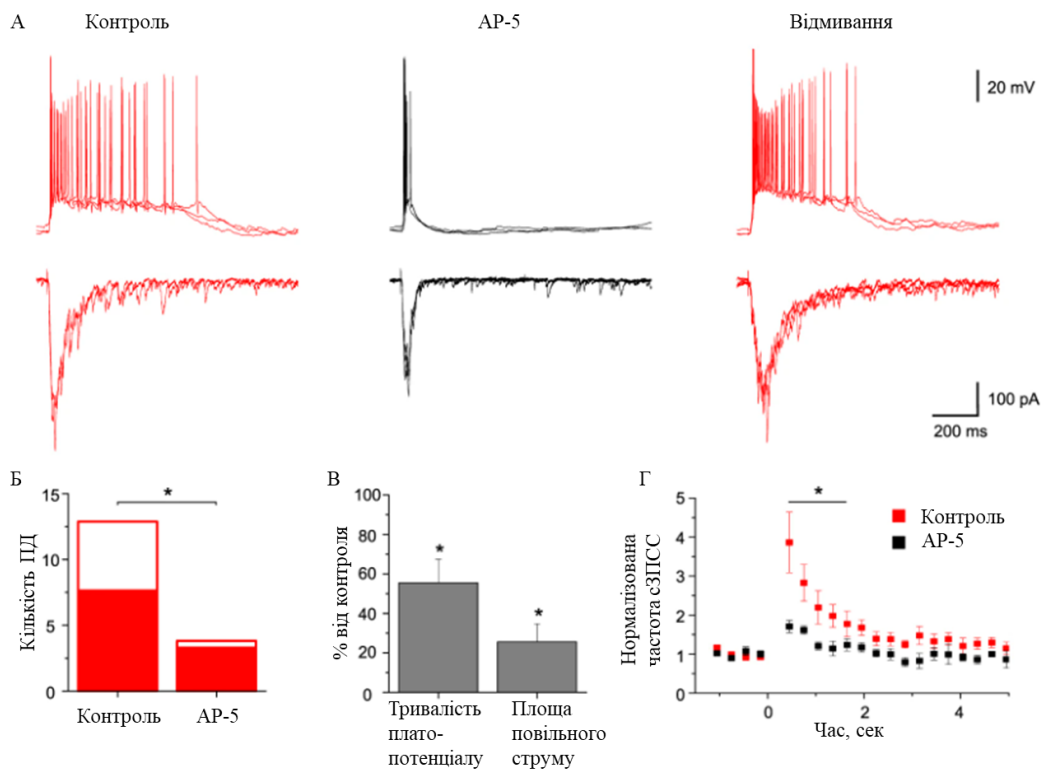
сЗПСС відбувалися в межах подібних часових рамок (Рис. 5 Ба, в та 5 Ва). ). По-друге, тривалість плато-потенціалу також збільшувалась із силою стимуляції ( $R^2 = 0,98$  для функції Больцмана; верхня межа:  $1,74 \pm 0,08$  с,  $t$ -значення = 22,68,  $p < 0,001$ ;



Рис. 5 Гв). По-третє, збільшення тривалості плато-потенціалу корелює зі зменшенням інтервалів між подіями спонтанної активності (коефіцієнт кореляції Спірмена,  $r = 0,81$ ,  $p < 0,001$ ; Рис. 5 Гб). Таким чином, плато-потенціал створював "вікно" для різкого (16-кратного) збільшення ймовірності виникнення спонтанних синаптичних подій до досягнення порогу виникнення ПД. Таким чином, пізня фаза генерації ПД зумовлюється плато-потенціалом та активізацією локальної нейронної мережі (Agashkov et al., 2019). Ці фактори посилюються з інтенсивністю стимуляції, що призводить до збільшення ймовірності виникнення ПД.

### *NMDA рецептор - залежна обробка ноцицептивних сигналів в СПН II-го типу*

NMDA-рецептори експресуються в синапсах між первинними аферентами та нейронами ДР. Вони відіграють важливу роль у полісинаптичному вході до цих нейронів (Dahlhaus et al., 2005; Deng et al., 2019).



**Рис. 6. Вплив блокатора рецепторів NMDA на збудливість СПН II-го типу.** А) AP-5 у концентрації 40 мкМ оборотно пригнічує пізню фазу генерації ПД в СПН I-го типу. Б) Вплив AP-5 на кількість ПД, згенерованих під час початкової фази (темна частина стовпчика) та під час пізньої фази (біла частина стовпчика). В) Вплив AP-5 на тривалість плато-потенціалу та величина повільно спадаючого входного струму (обчислена як площа). Г) Зміна частот сІПСС, викликаних стимуляцією ДК.

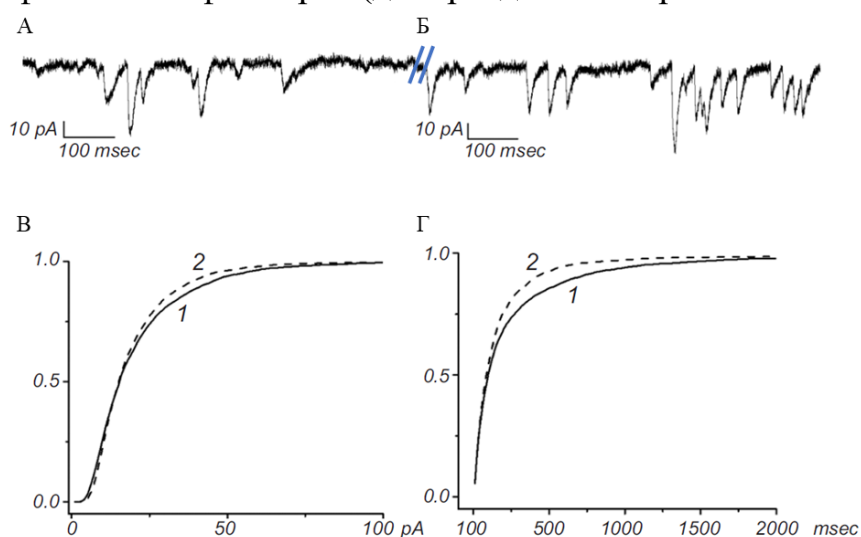
Щоб вивчити, чи залежать вищеописані зміни у СПН II-го типу від рецепторів NMDA, ми проаналізували ефекти аплікації їх специфічного блокатора AP-5. Застосування блокатора зворотньо пригнічувало пізню фазу генерації ПД ( $0,5 \pm 0,5$  ПД в умовах AP-5 проти  $5,2 \pm 1,5$  ПД в контролі,  $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ; Рис. 6 А). У той же час як початкові групи ПД зазнали меншого впливу ( $3,3 \pm 1,5$  ПД в умовах AP-5 проти

$7,6 \pm 2,0$  ПД у контролі,  $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ; Рис. 6 Б). Ми спостерігали також значне зменшення плато-потенціалу (до  $55 \pm 12\%$ ,  $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ) та пригнічення повільно спадаючого струму, який опосередковує це плато (до  $25 \pm 9\%$ ,  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ; Рис. 6 В). Крім того, індуковане стимулюванням збільшення частоти сЗПСС істотно пригнічувалось блокатором NMDA-рецепторів ( $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ; Рис. 6 Г) через інгібування активності локальної нейронної мережі, орієнтованої на СПН II-го типу.

Таким чином можна зробити висновок, що процеси, які залежать від NMDA-рецепторів, зумовлюють значний внесок в пізню фазу генерації ПД та відіграють важливу роль у обробці сигналу, генерованого СПН II-го типу.

### **Обробка мережевого сигналу СПН пластини I ДР СМ в умовах хронічного запального болю.**

Для визначення змін в обробці мережевого сигналу СПН пластини I ДР СМ була використана модель хронічного запального болю у шурів. Запалення викликали шляхом підшкірної ін'єкції 100 мкл суспензії ПАФ (CFA, "Sigma", США; олійно-сольова емульсія 1:1) у праву задню кінцівку шура. Електрофізіологічні дослідження проводили через добу після ін'єкцій ПАФ. Розвиток запалення та ноцицептивної гіперчутливості підтверджували поведінковим тестом Харгрівса та тестуванням з використанням філаментів фон Фрея (див. розділ «Матеріали та методи»).



**Рис. 7. Характеристики спонтанних ЗПСС у проекційних нейронах пластини I.** Репрезентативні записи сЗПСС у контролі А) та за наявності периферичного хронічного запалення Б). Кумулятивна вірогідність для загального розподілу амплітуд В.) Кумулятивна вірогідність для загального розподілу міжінтервальних інтервалів Г). 1 та 2 контрольна група та група тварин з індукованим хронічним запальним болем відповідно.

Записи сЗПСС в СПН пластини I ДР СМ були проведені у контрольних тваринах (кількість клітин  $n=9$ ; загальна кількість аналізованих сЗПСС  $n=2547$ ) та у тварин з індукованим хронічним запальним болем ( $n=9$  та  $n=2700$  відповідно, Рис. 7 А, Б). Амплітуди сЗПСС в обох експериментальних групах характеризувалися досить високою варіабельністю. Відповідні розподіли в обох групах були різко правоасиметричними. Вони включали в себе значну кількість низьких значень (до 25–30 пА); істотно менша кількість струмів мали значно вищі амплітуди (Рис. 7). У

зв'язку з тим, що такі розподіли в обох групах вірогідно відрізнялися від нормального, були розраховані медіанні значення амплітуд спонтанних струмів.

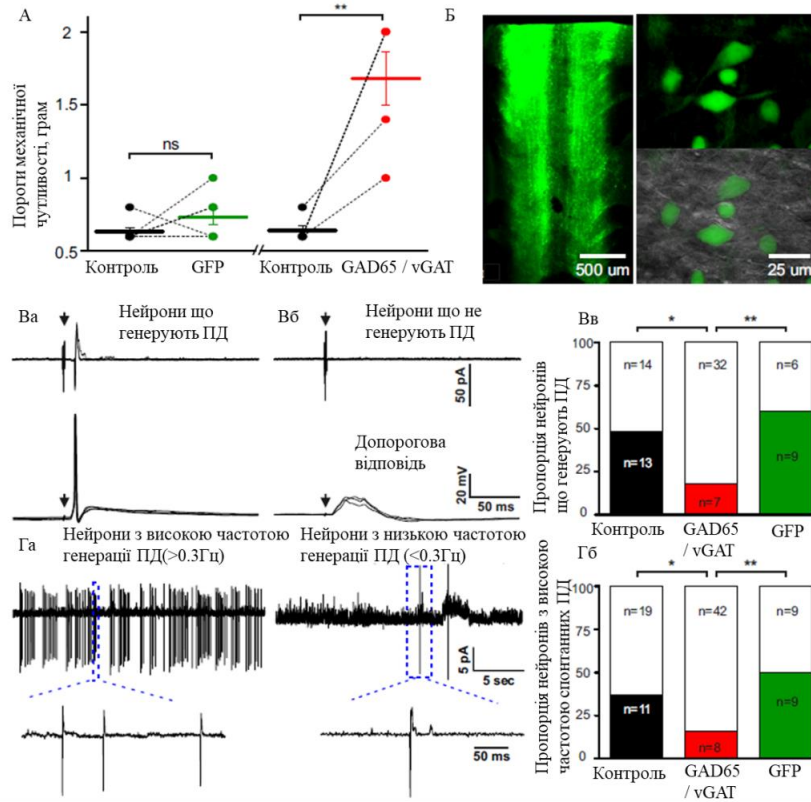
Ці величини характеризувалися широкою дисперсією (крайні значення розрізнялися більше ніж на порядок). У контрольній групі середнє значення медіан розподілу амплітуд складало  $15,40 \pm 1,94$ , а в групі з індукованим периферичним запаленням –  $16,55 \pm 1,93$  пА. Отже, середні значення медіан амплітуд струмів були досить близькими одне до одного (згідно з  $t$ -тестом для незалежних вибірок різниця невірогідна,  $p = 0.68$ ).

Розподіли інтервалів між аналізованими синаптичними подіями в обох групах були різко правоасиметричними, і їх форма наближалася до такої у розподілу Пуассона (Рис. 7 А-Б). Середні значення медіан таких розподілів у контрольній групі та групі із запаленням дорівнювали  $141,18 \pm 40,70$  та  $95,85 \pm 17,23$  мс відповідно. Іншими словами, медіана розподілу інтервалів між сЗПСС у шурів із запаленням тканин стопи була майже в півтора рази меншими, ніж у контрольних тварин, а частота спонтанних синаптичних подій – відповідно значно вищою. Ця переконлива різниця, проте, виявилася статистично невірогідною ( $p = 0,17$ ). Очевидною причиною подібної ситуації були велика дисперсія вимірюваних значень і відносно обмежена кількість проаналізованих вибірок.

Отже, частота сЗПСС у СПН пластини I ДР в ізолюваному препараті поперекового відділу СМ щура в разі розвитку хронічного периферичного запалення значно перевищує відповідну величину, виміряну в контрольних тваринах. Очевидно, що в умовах хронічного запалення стопи істотно змінюється загальний фоновий збуджуючий тон нейронної мережі ДР СМ, що призводить до більшої збудливості СПН пластини I ДР СМ. Кінцевим ефектом таких є істотне полегшення передачі ноцицептивної інформації до супраспінальних структур. Така гіперзбудливість нейронних мереж ДР взагалі та проєкційних нейронів пластини I зокрема може забезпечувати помітний внесок у розвиток гіпералгезії при хронічних больових станах і полегшувати генерацію емоції болю.

### ***Зниження збудливості нейронної мережі ДР після субпіальної доставки вірусних конструктів AAV9-GAD65 та AAV9-VGAT***

Для того, щоб зрозуміти, як доставка вірусних конструктів співвідноситься з ноцицептивною поведінкою, ми оцінили механічну чутливість тварин. Парне тестування філаментами фон Фрея проводили за добу перед субпіальними ін'єкціями конструктів та за добу до електрофізіологічних експериментів. Самці мишей лінії FVB були розділені на дві групи. Перша група включала в себе псевдооперованих шурів, яким субпіально ввели AAV9-UBC-GFP ( $1,6 \cdot 10^{13}$  гк/мл; 3,0 мл;  $n = 6$ ), а друга група тварин субпіально отримала AAV9-UBC-GFP, GAD65, та VGAT ( $5,3 \cdot 10^{12}$  гк/мл,  $1,5 \cdot 10^{12}$  гк/мл та  $3,3 \cdot 10^{12}$  гк/мл, відповідно; загальний об'єм 3,0 мл;  $n = 6$ ). Через 2 тижні з моменту ін'єкції результати показали, що GFP / GAD65 / VGAT-інфекція призвела до збільшення ноцицептивних механічних порогів в 2,5 рази ( $0,64 \pm 0,03$  г до проти  $1,68 \pm 0,18$  г після ін'єкції GFP / GAD65 / VGAT,  $n = 5$ ,  $p < 0,01$ , парний  $t$ -тест, Рис. 8 А).



**Рис. 8. Зміни збудливості нейронної мережі ДР після субпіальної доставки вірусних конструктів AAV9-GAD65 та AAV9-VGAT.** А) Зліва: механічні пороги у окремих мишей до і після GFP-інфекції ( $n = 6$ , деякі точки та лінії перекриваються). Праворуч: механічні пороги у окремих мишей до та після GFP / GAD65 / VGAT-інфекції ( $n = 5$ , деякі точки та лінії перекриваються). Б) Репрезентативні зображення *ex-vivo* препарату СМ мишей, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT. Ва) Репрезентативні записи викликаних відповідей, отриманих від контрольних мишей, Вб) інфікованих GFP / GAD65 / VGAT. Нейрони, що генерують ПД, та нейрони, що не генерують ПД, відведених у режимі «Cell-attached» (верхній ряд) та в конфігурації «ціла клітина» у режимі фіксації струмів (нижній ряд). Стрілками вказані на артефакти стимуляції. Вв) Пропорція нейронів, що генерують ПД (темні стовпчики) та нейронів, які не генерують ПД (білі стовпчики) у контрольних, GFP / GAD65 / VGAT-інфікованих та GFP-інфікованих мишей. Га) Репрезентативні записи від нейронів з високою частотою генерації ПД (ліворуч, GFP-інфіковані миші) та з низькою частотою їх генерації (праворуч, GFP/GAD65/VGAT інфіковані миші), зареєстровані у конфігурації «cell-attached». Гб) Пропорції нейронів з високою частотою генерації ПД (темні стовпчики) та нейронів з низькою частотою генерації ПД (білі стовпчики) у контрольних, GFP / GAD65 / VGAT-інфікованих та GFP-інфікованих мишей.

У той же час не було виявлено значущої різниці після GFP-інфекції ( $n = 6$ ,  $p = 0,3$ , парний t-тест, Рис. 8 А). Обидві групи мишей, як GFP-інфіковані ( $p = 0,5$ , дані не показані), так і GFP / GAD65 / VGAT інфіковані ( $p = 0,5$ , дані не показані) показали майже однакові механічні пороги для лівих і правих задніх кінцівок. Даний факт вказує на те, що а) субпіальна ін'єкція не зумовлює нейропатичних змін; б) ін'єкції вірусних конструктів спричиняють стійке інфікування обох половин СМ, що також можна чітко спостерігати на конфокальних та епіфлуоресцентних знімках *ex-vivo* препаратів СМ (Рис. 8 Б).

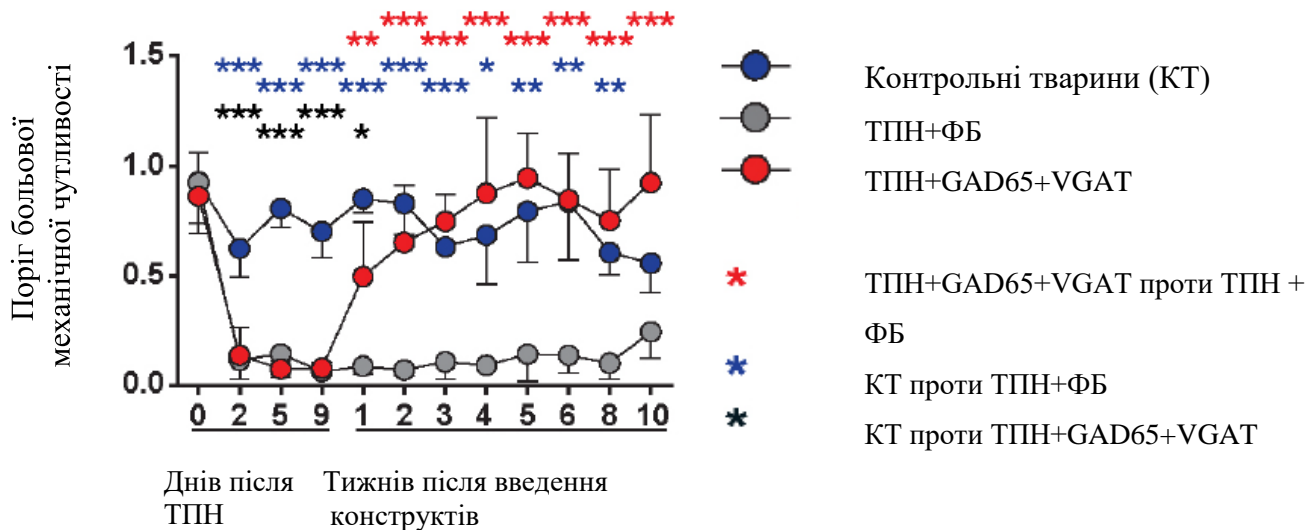
Надмірне вивільнення ГАМК внаслідок гіперекспресії GAD65 / VGAT може зменшити частоту генерації ПД у поверхневих нейронах ДР у відповідь на ноцицептивні подразнення, призводячи таким чином до зниження больового порогу. Це ми і спостерігали у поведінкових тестах. В наступних експериментах ми вивчили збудливість нейронних мереж ДР, які відповідають за обробку ноцицептивних сигналів. Для цих цілей ми використовували гостро ізольований препарат СМ миші. Тварини були поділені на три групи: перша інтактні тварини, в другій групі тваринам субпіально вводили AAV9-UBC-GFP ( $1,6 \cdot 10^{13}$  гк/мл; 3,0 мл;  $n = 6$ ), а третя група тварин отримувала комбінацію конструктів AAV9- UBC-GFP, GAD65, та VGAT ( $5,3 \cdot 10^{12}$  гк/мл,  $1,5 \cdot 10^{12}$  гк/мл та  $3,3 \cdot 10^{12}$  гк/мл, відповідно; загальний об'єм ін'єкції 3,0 мл;  $n = 6$ ). Через 23 тижні з декапітованих тварин отримували гостроізольований препарат СМ з ДК, який був використаний для проведення електрофізіологічних дослідів. Отримували відведення від з GFP позитивних нейронів пластини I (Рис. 8, Б) мишей, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT, щоб перевірити, чи поєднується зменшення механічної чутливості у цих тварин зі зниженням збудливості нейронів та мереж ДР. Відведення в режимі «cell-attached» від нейронів *ex-vivo* препараті СМ виявили що частота генерації ПД, спричинених стимуляцією ДК є помітно меншою у порівнянні з контролем. Супрамаксимальні стимули (1,0 мс, 150 мкА), які активують усі первинні аференти, включаючи ноцицептивні А $\delta$ - і С- волокна, індукували генерацію щонайменше одного ПД (Рис. 8 Ва) в 48% клітин у контрольних тварин і 60% клітин з GFP -інфікованих мишей ( $p = 0,5$ , точний тест Фішера, Рис. 8 Вв).

Аналогічна стимуляція, проте спричинювала генерацію ПД лише у 18% клітин мишей, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT ( $p < 0,05$  у порівнянні з контрольними тваринами,  $p < 0,01$  у порівнянні з GFP-інфікованими, точний тест Фішера, Рис. 8 Ва-Вв). Решта нейронів у відповідь на цю стимуляцію взагалі не генерувала викликаних ПД. Подальші записи в конфігурації «ціла клітина» у режимі фіксації струму показали, що кожен нейрон у всіх трьох експериментальних групах реагував на первинну аферентну стимуляцію, генеруючи збуджувальні постсинаптичні потенціали (ЗПСП). Відповіді у клітинах, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT, здебільшого були допороговими і не викликали генерації ПД (Рис. 8 Ва-Вв). GFP / GAD65 / VGAT-інфекція також зменшувала інтенсивність генерації спонтанних ПД порівняно з такою у контрольних та GFP-інфікованих мишей (Рис. 8 Га). Зокрема, частка нейронів із високою частотою генерації ПД ( $> 0,3$  Гц) у мишей, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT, була майже втричі нижчою порівняно з такою у контрольних та GFP інфікованих тварин (16% проти 37%;  $p = 0,056$  та 50%;  $p < 0,01$ ; для контрольних та GFP-інфікованих мишей відповідно (точний тест Фішера, Рис. 8 Гб).

Таким чином, гіперекспресія GAD65 / VGAT зменшує як викликану, так і спонтанну імпульсну активність, знижуючи загальну збудливість мереж пластини I ДР СМ, в кінцевому рахунку зменшуючи чутливість до больової механічної стимуляції.

***Використання конструктів AAV9-UBI-GAD65 / VGAT для терапії хронічного нейропатичного болю в моделі пошкодження периферичного нерва у мишей***

Нейропатичний біль був зумовлений шляхом частковою перев'язкою сідничного нерва (травма периферичного нерва, ТПН), з використанням шовного матеріалу проліну (6,0). Після накладання лігатури на сідничний нерв наявність хронічного болю визначали за допомогою тестів фон Фрея.



**Рис. 9** Зміни порогів механічної больової чутливості.

Зміни порогів больової механічної чутливості вимірювали з використанням методики тестування фон Фрея. Визначали потенційний антиноцицептивний ефект субпіальної доставки конструктів AAV9-UBI-GAD65 + AAV9-UBI-VGAT у ДР СМ. \* -  $p < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ . Прогресуюча поява терапевтичного ефекту корелює з часом трансгенної експресії та триває як мінімум 10 тижнів після введення вірусних конструктів.

Через 9 днів після перев'язки сідничного нерва тваринам, у яких спостерігалось підвищення больової чутливості, проводили іпсилатеральну субпіальну ін'єкцію суміші конструктів AAV9-UBI-GAD65 + AAV9-UBI-VGAT (співвідношення 1:1, 0,5 мкл; 1,1 мкл;  $1,1 \cdot 10^{12}$  гк/мл і  $2,5 \cdot 10^{12}$  гк/мл відповідно) або ін'єкцію фосфатного буферу (ФБ) у тому же об'ємі. На 710 добу після проведення ін'єкцій AAV9-UBI-GAD65 + AAV9-UBI-VGAT виявилось, що відбулась нормалізація больових порогів механічної чутливості порівняно із псевдооперованими тваринами, (Рис. 9).

Цей ефект зберігався протягом тривалого часу і був все ще присутнім через 13 місяців після введення вірусних конструктів. Аналіз рухових характеристик тварин з використанням тесту «відкрите поле» показав значне зменшення загальної дистанції локомоції у тварин з нейропатичним болем, які отримували в якості лікування фосфатний буфер, порівняно з контрольними тваринами. Показники ж моторної функції у тварин, яким субпіально вводили AAV9-UBI-GAD65 + AAV9-UBI-VGAT, були подібні до тих, які демонстрували контрольні тварини без проявів хронічного нейропатичного болю.

Ці дані свідчать, що іпсилатеральна селективна доставка генів GAD65 / VGAT у ДР СМ за допомогою субпіальних ін'єкцій є високоефективним прийомом для терапії больових проявів в моделі хронічного нейропатичного болю у мишей. Часовий проміжок полегшення больового синдрому відповідає часу експресії білків, які кодуються заданими вірусними векторами, причому ефект є довготривалим.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі відповідно до поставлених цілей і завдань були визначені специфічні механізми обробки ноцицептивних сигналів в нейронах дорзального рогу (ДР) спинного мозку (СМ) та запропонована перспективна стратегія терапії хронічного болю.

1. По кількості генерованих потенціалів дії (ПД) що виникають у відповідь на супрамаксимальну стимуляцію первинних аферентів вивчені спіно-парабрахіальні нейрони (СПН) пластини I розділяються на три типи. Перший та другий типи СПН є ноцицептивноспецифічними. У відповідь на ноцицептивну стимуляцію різної інтенсивності більшість СПН I-го типу генерують лише поодинокі ПД і є, таким чином, детекторами больового сигналу в СМ. В той же час СПН II-го типу генерують більшу кількість ПД при збільшенні інтенсивності ноцицептивного стимулу кодуючи таким чином його силу. СПН III-го типу не є ноцицептивноспецифічними.

2. Ноцицептивні СПН I-го та II-го типів розрізняються за патерном аферентних входів, який вони отримують. СПН II-го типу отримують більше моносинаптичних входів (насамперед від С-волокон), ніж СПН I-го типу; у них генерується значно більший інтегральний струм через мембрану у відповідь на супрамаксимальну стимуляцію первинних аферентів.

3. На відміну від СПН I-го типу, СПН II-го типу інтегрують викликану стимуляцією первинних аферентів мережеву активність за рахунок виникнення тривалої деполаризації їх плазматичної мембрани. Цей процес є NMDA-рецептор залежним.

4. Хронічний біль зумовлює більшу амплітуду та частоту спонтанних збуджуючих постсинаптичних струмів у СПН, що може призводити до посилення передачі ноцицептивних сигналів від СМ до супраспинальних структур.

5. Посилена експресія ферменту глутаматдекарбоксилази та везикулярного ГАМК транспортеру у збуджуючих нейронах ДР за допомогою субпіальних ін'єкцій відповідних вірусних конструктів, тобто в використанні генноінженерного підходу, призводить до збільшення гальмівного тону ноцицептивної мережі ДР СМ, та зменшує вірогідність генерації ПД у відповідь на ноцицептивний стимул.

6. Субпіальна доставка генів GAD65 та VGAT забезпечує виражений довготривалий антиноцицептивний ефект у тварин з моделлю експериментального хронічного болю завдяки збільшенню загального гальмівного тону в мережі пластини I СМ. Таким чином, це може бути потенційним терапевтичним підходом до терапії больових синдромів.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

За матеріалами дисертації опубліковано 10 друкованих робіт: 2 статті у міжнародних наукових журналах (одна з яких входить до першого квартилю (Q1) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank) та 9 тез доповідей на наукових конференціях.

**Agashkov K.**, Krotov V., Krasniakova M., Shevchuk D., Andrianov Y., Zabenko Y., Safronov BV, Voitenko N, Belan P. (2019) *Distinct mechanisms of signal processing by lamina I spino-parabrachial neurons*. Scientific Reports, 17;9(1):19231. PMID: 31848358 (Q1).

Shevchuk DP, **Agashkov KS**, Bilan PV, Voitenko NV. (2017) *Spontaneous Synaptic Activity in Projection Neurons of Lamina I of the Isolated Rat Lumbar Spinal Cord: Effect of Peripheral Inflammation*. Neurophysiology, Vol. 49, No. 4, 301-304.

**Agashkov K.**, Krotov V., Krasniakova M., Shevchuk D., Safronov B., Belan P., Voitenko N. *New approaches in studies of molecular mechanisms of spinal cord neuronal signaling*. 8th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology, 18-21 June, 2017, Kosice, Slovakia

**Agashkov K.**, Krotov V., Krasniakova M., Safronov B., Voitenko V., Belan P. *Subpopulation of C-fiber-activated lamina I projection neurons with unique input-output characteristics for NMDAR-dependent nociceptive coding*, Polish Society for Neuroscience Meeting, 28-31 August 2017, Warsaw, Poland

**Agashkov K.**, Krotov V., Rula H., Krasniakova M., Shevchuk O., Liashenko A., Safronov B., Voitenko N., Belan P. *Specific C-fiber-activated lamina I projection neurons as major contributor of acute nociceptive transmission*. III International School in Biomedical Sciences “Cell Function in Health and Disease”, Kyiv-Lutsk, Ukraine, 17-22 September 2017

**Agashkov K.**, Krotov V., Krasniakova M., Safronov B., Voitenko V., Belan P. *Encoding of acute nociception by specific population of lamina I projection neurons*, Neuroscience 2017, 11-15 November 2017, Washington DC, USA

Krotov V., **Agashkov K.**, Krasniakova M., Safronov B.V., Voitenko N., Belan P. *Lamina I projection neuron outputs in physiological and neuropathic pain conditions*. 11<sup>th</sup> FENS Forum for Neuroscience, 7-11 July 2018, Berlin, Germany

Voitenko N., **Agashkov K.**, Krotov V., Krasniakova M., Zabenko Y., Safronov B., Belan P. *Spinal lamina I projection neurons play distinct roles in nociception*. Society for Neuroscience meeting 2018, 3-7 November 2018, San Diego, USA

**Агашков К.**, Кротов В., Тадогоро Т., Платошин О., Мерсала М., Білан, П. (2020). *Зміни активності нейронів спинного мозку викликані генною терапією*. XVIII всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених; теоретичні і прикладні проблеми фізики, математики та інформатики; матеріали конференції с. 12–14., 12-13 травня 2020, Київ, Україна.



## АНОТАЦІЯ

### *Агашков К.С. Клітинні й мережеві механізми обробки ноцицептивних сигналів у спинному мозку та їх генно-інженерне модулювання як засіб терапії хронічного больового синдрому. – Рукопис*

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

Дисертація присвячена дослідженню функціонування мережі нейронів дорзального рогу (ДР) спинного мозку (СМ) та їх внеску в обробку та передачу ноцицептивного сигналу до супраспінальних структур. В роботі вперше була встановлена роль різних типів спіно-парабрахіальних нейронів (СПН) I-ої пластини ДР в передачі специфічної ноцицептивної інформації та виявлено молекулярні та клітинні механізми, що лежать в основі цієї специфічності. СПН I-ої пластини СМ відіграють ключову роль в обробці больових сигналів та є майже виключною групою клітин, що передають ці сигнали зі спинного до головного мозку. В даній роботі, для визначення молекулярних та клітинних механізмів, які беруть участь у спряженні вхідних та вихідних сигналів у СПН щурів, був використаний новий цілісний препарат СМ, який дозволяє проводити досліди з непошкодженими клітинами та забезпечує цілісність мережевих зв'язків у ДР. Нами було встановлено, що більшість СПН отримують невелику кількість прямих ноцицептивних входів від С-волокон та генерують один потенціал дії (ПД) у відповідь на супрамаксимальний аферентний стимул, таким чином виконують роль простого передавача сигналів від первинних аферентів. Однак, 69% всіх потенціалів дії, індукованих аферентною стимуляцією СПН, генеруються порівняно невеликою фракцією (19%) нейронів. Ці нейрони отримують велику кількість прямих входів від А $\delta$  та С-волокон, генерують потужні групи ПД у відповідь на стимуляцію первинних аферентів, та ефективно інтегрують локальну мережеву активність за допомогою NMDA-залежних механізмів. Ми встановили, що вони підсилюють та інтегрують ноцицептивний вхідний сигнал, кодуючи його інтенсивність шляхом збільшення кількості згенерованих ПД. В цій роботі ми також використовували субпіальну доставку вірусних векторів, які несуть гени глутаматдекарбоксілази та везикулярного транспортеру ГАМК в ДР СМ мишей. При цьому локальні збуджуючі нейрони, що були заражені даними вірусами, починали синтезувати та виділяти гальмівний медіатор ГАМК. На клітинному рівні, у нейронах ДР було показано загальне збільшення гальмівної синаптичної активності та зменшення вірогідності виникнення потенціалів дії у відповідь на стимуляцію дорзальних корінців. Введення вірусних конструктів у СМ мишей з пошкодженим сідничним нервом, призводило до повного зникнення нейропатичного болю при відсутності побічних ефектів. Таким чином, в роботі були встановлені важливі клітинні механізми, що приймають участь у обробці ноцицептивних сигналів у ДР СМ та апробовано новітній терапевтичний підхід, що може бути використаний в терапії хронічного болю.

**Ключові слова:** спинний мозок, проєкційні нейрони дорзального рогу, збуджуючі та гальмівні постсинаптичні струми, хронічний біль.

## SUMMARY

*Agashkov K.S. Cellular and network mechanisms of nociceptive signal processing in the spinal cord and genetically engineered modification as a novel tool for a treatment of neuropathic pain syndrome.. - Manuscript*

A dissertation submitted to acquire the degree of Candidate of Science in Medicine (PhD), specialty – 14.03.04 – Pathological Physiology – Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to the study of the functioning of the neuronal networks of the dorsal horn of the spinal cord and their contribution to the processing and transmission of nociceptive signals to supraspinal structures. For the first time, the role of different types of spino-parabrachial neurons (SPN) of the lamina I in the transmission of specific nociceptive information was established and the molecular and cellular mechanisms underlying this specificity were identified. Lamina I SPN's play a key role in the processing of pain signals and is an almost exclusive group of cells that transmit nociceptive signals from the spinal cord to the brain. Here, to identify the molecular and cellular mechanisms involved in the coupling of input and output signals in rat lamina I SPN, a novel whole spinal cord preparation was used, which allows experiments with intact cells and ensures the integrity of network connections in the dorsal corner. We found that most SPNs receive a small number of direct nociceptive inputs from C-fibers and generate one action potential in response to a saturating afferent stimulus, thus acting as a simple signal transmitter from the primary afferents. However, 69% of all action potentials induced by afferent stimulation in the entire population of SPN originate from a small fraction (19%) of neurons. These neurons receive a large number of direct inputs from A $\delta$  and C fibers, generate powerful bursts of AP's in response to stimulation of primary afferents, and effectively integrate local network activity through NMDA-dependent mechanisms. We have found that they amplify and integrate the nociceptive input signal, encoding its intensity by increasing the number of generated APs. In this work, we also used subpial delivery of viral vectors to the dorsal horn of the spinal cord of mice. These vectors are based on the use of capsids of adeno-associated viruses, which carry the genes glutamate decarboxylase and vesicular GABA transporter. Thus, local excitatory neurons that were infected with these viruses began to synthesize and secrete the inhibitory GABA transmitter. As a result of the introduction of high concentrations of viral constructs, there was a significant decrease in the pain mechanosensitivity of control mice. At the cellular level, dorsal horn neurons showed a general decrease in excitatory synaptic activity, an increase in inhibitory synaptic activity. The administration of viral constructs in the spinal cord of mice with damaged sciatic nerve, led to complete disappearance of neuropathic pain symptoms in the absence of side effects. Thus, we identified important mechanisms involved in the processing of nociceptive signals in the dorsal spinal cord and tested a novel therapeutic approach that can be used in the treatment of chronic neuropathic pain.

**Keywords:** spinal cord, dorsal horn projection neurons, excitatory and inhibitory postsynaptic currents, chronic pain.

**СПИСОК СКОРОЧЕНЬ**

AMPA -  $\alpha$ -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота  
ГАМК –  $\gamma$ -аміномасляна кислота  
ГДК – глутаматдекарбоксилаза  
ГПСС – гальмівний постсинаптичний струм  
ПН – проєкційні нейрони  
ДКГ – дорзально-корінцеві ганглії  
ДР – дорзальний ріг  
ДК – дорзальний корінець  
ЗПСС – збуджуючий постсинаптичний струм  
сЗПСС – спонтанний збуджуючий постсинаптичний струм  
сГПСС – спонтанний гальмівний постсинаптичний струм  
NMDA – N-метил-D-аспартат  
VGAT – везикулярний транспортер ГАМК  
ПД – потенціал дії  
ПНС – периферична нервова система  
ПП ДР – поверхневі пластини дорзального рогу  
СМ – спинний мозок  
СПН – спіно-парабрахіальні нейрони  
ЦНС – центральна нервова система  
GAD65 – глутаматдекарбоксилаза 65  
VGLUT2 – везикулярний транспортер глутамату

Підписано до друку 17.08.2020 р. Формат 60x90/16.  
Друк цифровий. Папір офісний. Гарнітура Таймс Нью Роман.  
Ум. др. арк. 1,1. Тираж 100. Зам. № 562

---

Надруковано ФОП «Черенок К.В.»  
Свідоцтво В02 №353856 від 25.09.2006 р.  
м. Київ, вул. Пушкінська, 45/2  
тел.: (044) 235-81-92, 228-45-05