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

Телька Марія Василівна

УДК 577.352.54:611.891.3:615.217.22

Зміни електричної активності культивованих нейронів ганглія трійчастого нерва при норадренергічній модуляції кальцієвих струмів

03.00.02 – Біофізика

АВТОРЕФЕРАТ

Дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі фізіології нейронних мереж Інституту фізіології

ім. О. О. Богомольця НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Федулова Світлана Анатоліївна
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
зав. лабораторії синаптичної передачі

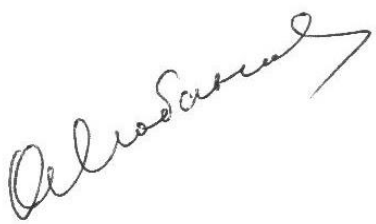
Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор, академік НАН України
Скок Марина Володимирівна
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
головний науковий співробітник

Кандидат біологічних наук
Ноздренко Дмитро Миколайович
Київський національний університет ім. Тараса Шевченка,
Навчально-науковий центр «Інститут Біології та медицини», НДЛ фізико-хімічної біології, старший науковий співробітник

Захист дисертації відбудеться *«17» листопада 2020 р. о 12:00* на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.0 при Інституті фізіології імені О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ-24, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України та на сайті інституту:
http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council

Автореферат розісланий *«15» жовтня 2020 р*.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук  О.П. Любанова

Підписано до друку 09.10.2020 Папір офс. 80г/м2. Прінт Бокс

Фіз.-друк. Арк. 1.5 Ум. Друк. Арк. 1.5 обл.-вид.арк,092

Авт.арк 0.9. №1030/16

Надруковано в друкарні ФОП Вигнан О.С. Тираж 100 пр

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Первинна сенсорна інформація надходить з периферії до центральної нервової системи псевдоуніполярними нейронами, соми яких утворюють сенсорні ганглії: ганглії дорсальних корінців (ГДК) (проводять імпульси від шкірних покривів тіла, епітеліальних тканин, м'язів, кісток та суглобів, входять до складу периферичних нервів) та ганглії трійчастого нерва (ГТН) (передають сенсорну інформацію від механорецепторів, ноцицепторів та терморецепторів голови та шиї, рогівки ока, епітелію носової та ротової порожнин і входять до складу V пари черепних нервів). Соми сенсорних нейронів мають адренергічні рецептори (АР), що відіграють важливу роль у модуляції сенсорних сигналів у нормі та за умов патологічних станів, які підтримуються симпатичною нервовою системою (аллодінія та/або гіпералгезія). При порушеннях периферичних нервів запускаються процеси проростання постгангліонарних симпатичних волокон, які утворюють кошикоподібні структури (арборизації) навколо сом сенсорних нейронів [McLachlan, Janig et al. 1993, Ramer, Thompson et al. 1999, Garcia-Poblete, Fernandez-Garcia et al. 2003]. Норадреналін (НА) вивільнюється з симпатичних волокон і активує АР нейронів сенсорних гангліїв. Це зумовлює модуляцію електричної активності, опосередковану впливом на потенціалкеровані іонні канали [Marchetti, Carbone et al. 1986, Shen, North et al. 1992, Chen, Michaelis et al. 1996, Honma, Yamakage et al. 1999]. Сучасні уявлення про адренергічну модуляцію електричної активності первинних аферентів базуються на даних, отриманих на клітинах ГДК, тоді як нейрони ГТН у цьому аспекті залишаються недослідженими. Також слід відзначити, що патологічні зміни у системі трійчастого нерва мають морфологічні та фізіологічні відмінності у порівнянні з такими у периферичних [Tal and Devor 1992, Bongenhielm, Boissonade et al. 1999]. Вплив НА на електричну активність нейронів ГТН за умов культивування може бути *in vitro* моделлю симпатичного впливу на передачу сенсорного сигналу на рівні первинних аферентів.

Після зв'язування НА з АР активується G-білок, субодиниці якого (Gα та Gβγ) запускають каскади внутрішньоклітинних процесів. Модуляція електричної активності може здійснюватися як внаслідок прямого Gβγ впливу на іонні канали, так і з залученням вторинних посередників (цАМФ, РКС) [Dolphin 2003, Strock and Diverse-Pierluissi 2004, Tedford and Zamponi 2006]. Головною мішенню адренергічного впливу в нейронах є потенціалкеровані кальцієві канали (ПКК). У нейронах сенсорних гангліїв ПКК не лише беруть участь у кальцієвій сигналізації, а й відіграють модулюючу роль у формуванні потенціалу дії (ПД). Активація АР викликає конформаційні зміни ПКК, які

можуть відбуватися за рахунок різних внутрішньоклітинних процесів [Strock and Diverse-Pierluissi 2004]. Характеристики модулюючого впливу НА на ПКК в нейронах ГТН залишалися недослідженими.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках наукових проектів Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України «Клітинні механізми реалізації функціональних особливостей нейронів центральної та периферичної нервових систем ссавців» (державний реєстраційний номер теми: 0113U007274) і «Участь хемо- та потенціалкерованих каналів у зміні внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} центральних та периферичних нейронів в умовах наявності синаптичних зв'язків» (державний реєстраційний номер теми: 0108U003919).

Метою дослідження було визначення механізмів впливу норадреналіну на електричну активність культивованих нейронів ГТН.

Завдання дослідження:

1. охарактеризувати вплив НА на електрофізіологічні показники культивованих нейронів ГТН;
2. визначити НА-індуковані зміни у характеристиках струмів через ПКК;
3. ідентифікувати типи ПКК, задіяні у норадренергічній модуляції кальцієвих струмів нейронів ГТН;
4. визначити роль α_2-АР у НА-індукованій модуляції струмів через ПКК.

Об'єкт дослідження: викликана електрична активність та струми через потенціалкеровані кальцієві канали культивованих нейронів ГТН.

Предмет дослідження: параметри норадренергічної модуляція викликаної електричної активності та струмів через ПКК нейронів ГТН під впливом НА.

Методи дослідження: культивування дисоційованих нейронів ГТН; реєстрація електричної активності та іонних струмів від окремих нейронів при фіксації струму/потенціалу в конфігурації "ціла клітина"; локальна перфузія для аплікації фармакологічно активних речовин; статистичний аналіз отриманих результатів.

Наукова новизна. У дисертаційній роботі досліджена і охарактеризована норадренергічна модуляція електрофізіологічних характеристик та струмів через ПКК культивованих нейронів ГТН. Вперше показано, що вплив НА на електричну активність нейронів ГТН реалізується внаслідок взаємодії АР з високопороговими ПКК та іонними канали, що

активуються гіперполяризацією. Вперше на нейронах ГТН показано два відмінні за електрофізіологічними характеристиками типи адренергічної модуляції струмів через ПКК нейронів ГТН. Кількісно визначено середній внесок ПКК різних типів у сумарний струм нейронів ГТН при дії НА. Отримані експериментальні дані доповнюють уявлення про механізми адренергічної модуляції сенсорних нейронів, які відіграють важливу роль у нормі та за умовах нейропатичних станів, у яких залучена симпатична нервова система.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів. Дослідження НА-індукованих змін в характеристиках викликаної електричної активності та кальцієвих струмів нейронів ГТН мають фундаментальне значення, оскільки розширюють уявлення про модуляторні взаємодії між різними відділами периферичної нервової системи. Практичне значення отриманих результатів зумовлено роллю симпато-сенсорних взаємодій в розвитку нейропатичних станів. Виявлено, що в нейронах ГТН НА-індуковані зміни електричної активності обумовлені впливом на кальцієві канали та канали, що активуються гіперполяризацією. Показано, що модуляторний вплив на ПКК–лише частково, на відміну від ГДК реалізується завдяки активації α_2-АР. Виявлено два електрофізіологічно відмінні типи впливу НА на ПКК, які розрізняються дією на кінетику струму. Ці результати доповнюють уявлення про вплив симпатичної нервової системи на передачу сенсорного сигналу в системі трійчастого нерва та можуть бути використані у неврологічній клінічній практиці при застосуванні антагоністів ПКК та адренолітиків/адреноміметиків. Отримані дані також можуть бути використані при викладанні курсів біофізики, фізіології та патофізіології.

Особистий внесок здобувача. Особисто здобувачем були виконані приготування первинної культури дисоційованних нейронів ГТН, електрофізологічні дослідження та обробка отриманих результатів. Розробка плану дисертаційної роботи та аналіз отриманих результатів проводилися здобувачем за участі наукового керівника та співавторів публікацій.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на наступних наукових конференціях: FENS Regional Meeting (10-13 липня 2019 р., Белград Сербія); XX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка (27-30 травня 2019 р., Київ, Україна**);** VII Конгрес Українського Товариства Нейронаук (7-11 червня 2017 р., Київ, Україна); International neuroscience graduate summer workshop and practical training "Gazi-EgeBINGSS" in honor of Prof. Gonul O. Peker **(** 25-29 червня 2018 р., Анкара, Туреччина); VI Конгрес Українського товариства нейронаук

(4-8 червня 2014 р., Київ, Україна); , II International Symposium “Molecular Mechanisms of Synaptic transmission regulation” in memory of Prof. Vladimir Skok (6-9 October 2012 p., Kyiv, Ukraine) VIII Національний конгрес патофізіологів України присвячений 120-річчю Одеської патофізологічної школи (13-15 травня 2020 р., Одеса Україна).

Публікації. Результати дисертаційної роботи викладені у 11 публікаціях: 5 статей у рекомендованих ДАК України фахових журналах та 7 тез доповідей наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, результатів та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел зі 213 найменувань. Робота викладена на 123 сторінках, проілюстрована 48 рисунками та 3 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літературних даних складається з 5 розділів, у яких висвітлено основні відомості щодо характеристик адренергічної модуляції електричної активності та потенціалзалежних струмів нейронів центральної та периферичної нервових систем, кардіоміоцитів тощо. Наведено відомості про роль адренергічної модуляції в нормі та при патологічних станах.

У розділі **матеріали та методи** описані методичні підходи, які використані при виконанні роботи. Всі експерименти були проведені із дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях. Біоетичний комітет Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України розглянув та схвалив протоколи всіх експериментальних процедур із використанням лабораторних тварин.

Приготування первинної культури нейронів ГТН. Всі використані в роботі реактиви, якщо не зазначено інше, були вироблені фірмою «Sigma» (США). Ганглії виділяли з однодобових щурів лінії Вістар обох статей та переносили в розчин, що містив буфер HEPES, мінімальне середовище Ігла та антибіотики. Наступними етапами приготування первинної культури дисоційованих клітин ГТН були ферментативна обробка 0,2%-м розчином пронази та механічна дисоціація. Клітини інкубувалися при 37^0 С у повітряно-газовому середовищі (вміст CO_2 5%), розчин для культивування містив мінімальне середовище Ігла з додаванням 10% кінської сироватки («Gibco»,

США), 6 мкг/мл інсуліну та антибіотиків. Проліферацію гліальних клітин зупиняли додаванням на другу добу культивування цитозин-A-D-арабино-фуранозиду (ARA-C, 7 мкмоль/л), заміну розчину на нормальний здійснювали на наступну добу. Електрофізіологічні дослідження проводили на 10-15 день культивування.

Електрофізіологічні дослідження. Для реєстрації викликаної електричної активності та струмів через ПКК у нейронах ГТН застосовували метод «петч-клемп» в конфігурації «ціла клітина» в режимі фіксації потенціалу або струму. Відведення проводили з використанням підсилювача Axopatch-1D («Axon Instruments», США), на якому встановлювали полосу пропускання на рівні 5 кГц. Сигнали оцифровували і записували на диск комп'ютера для подальшого аналізу за допомогою аналогово-цифрового перетворювача DigiData 1322A та програмного пакета pClamp 9.0 («Axon Instrumets», США) з частотою оцифровки 10 кГц. Мембранний потенціал спокою визначали одразу після прориву мембрани до початку стимуляції. Протягом досліду його підтримували на рівні -50 мВ, пропускаючи через клітину необхідний струм. Генерацію електричної активності реєстрували у відповідь на серії тестових імпульсів вхідного струму прямокутної форми тривалістю 1 або 2 с з інкрементом 10 пА.

При відведенні електричної активності використовували зовнішньоклітинний розчин наступного складу (у ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 3, $MgCl_2$ – 2, $CaCl_2$ – 2, глюкоза – 10, HEPES – 10; pH 7,4 (доведено NaOH). Петч-піпетки для електрофізіологічного відведення заповнювали внутрішньоклітинним розчином, до складу якого входили (ммоль/л.): глюконат калію – 155, EGTA – 10, $MgCl_2$ – 2, HEPES – 10; pH 7,3 (доведено KOH).

Параметри ПД (поріг генерації, амплітуда, тривалість) визначали з реєстрації з поодиноким імпульсом. Якщо при стимуляції нейрона одразу ж виникала серія ПД, то враховували параметри першого з них. У якості порогу ПД обирали значення мембранного потенціалу, при якому похідна сигналу перевищувала рівень шуму на 2 стандартних відхилення. Амплітуду ПД визначали як різницю між порогом та максимальним значенням потенціалу. За тривалість фази спаду ПД брали проміжок часу, за який потенціал зменшувався від 90 до 10 % від максимального значення. Амплітуду слідової гіперполяризації обчислювали як різницю між мінімальним значенням потенціалу та порогом виникнення відповідного ПД.

Для реєстрації струмів через ПКК петч-піпетки заповнювали внутрішньоклітинним розчином (ммоль/л): цезій ацетат – 90, CsCl – 20, TEA-

Cl – 20, $MgCl_2$ – 2, Na_2ATP – 3, NaADP – 0.5, NaGTP – 0.5, EGTA – 10, HEPES – 20; pH 7,3 (доводили CsOH). Зовнішньоклітинний розчин містив (ммоль/л) : холін хлорид – 140, $MgCl_2$ – 4, $BaCl_2$ – 2, TEA-Cl – 20, 4-амінопіридин – 3, глюкоза – 10, HEPES – 20; pH 7,4 (доведено CsOH). Електричний опір електродів (внутрішній діаметр кінчика 1–1,5 мкм) становив 4–5 МОм. Ємність піпетки компенсували після отримання гігаомного контакту. Під час експерименту постійно здійснювали контроль струму витоку, допустимі значення якого становили до 100 пА та ємнісні струми, які впродовж реєстрації мали залишатися без змін. Для визначення вольт-амперних характеристик інтегральних кальцієвих струмів клітини деполяризували від підримуванного потенціалу -100 мВ, після якого командний потенціал змінювався з інкрементом 5 мВ до рівня 35 мВ. Серії експериментів для оцінки параметрів високопорогових кальцієвих струмів проводили на реєстраціях, у яких струм викликався деполяризацією від -70 мВ до 0 мВ тривалістю 500 мс. Інтервал між реєстраціями складав 30 с. Для визначення параметрів потенціалзалежних струмів через ПКК в якості переносника заряду використовували барій, тривалість командного імпульсу при цьому зменшували до 100–150 мс. Аплікацію НА та відповідних блокаторів проводили за допомогою методу швидкої локальної суперфузії [Veselovsky, Engert et al. 1996].

Статистична обробка даних: кількісні параметри електричної активності, кальцієвих струмів визначались за допомогою програмного пакета Clampfit 9.2 (Axon Instruments, США). Подальшу обробку і представлення результатів, включаючи статистичний аналіз, проводили з використанням пакета Origin8Pro (OriginLab, США).

Вибірки перевірялися на нормальність розподілу за критерієм Шапіро - Уілка. Дані подані як середнє арифметичне ± стандартне відхилення, об’єм вибірки (n). Достовірність різниці середніх встановлювали з використанням парного t-тесту Ст’юдента. Статистичні гіпотези перевіряли на рівні значущості 0.05.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Поділ нейронів за характером викликаної електричної активності. Культивовані нейрони ГТН нейрони за характером відповіді на тривалу (1-2 с) деполяризацію були поділені на три групи: тонічні, адаптивні та з затриманою генерацією ПД (рис. 1). Тонічні нейрони (68%, n=52) генерували серію ПД протягом усього стимулу. Адаптивні нейрони, частка яких становила 28% (n=21), відповідали поодинокими ПД. У 4% (n=3) нейронів електрична активність характеризувалася затримкою генерації ПД на початку стимулу (Рис. 1). Такі пасивні електричні характеристики, такі як потенціал спокою та ємність мембрани клітин з різними типами імпульсної активності достовірно не відрізнялися і становили -44 ± 7 мВ (n=32) та 29 ± 6 пФ (n=32) відповідно. Нейрони з тонічною імпульсною активністю мали найвищий вхідний опір, середнє значення якого склало 1104 ± 20 МОм (n=16), для адаптивних та з затриманою генерацією клітин відповідні значення становили 746 ± 25 (n=13) та 716 ± 30 МОм (n=3) відповідно.

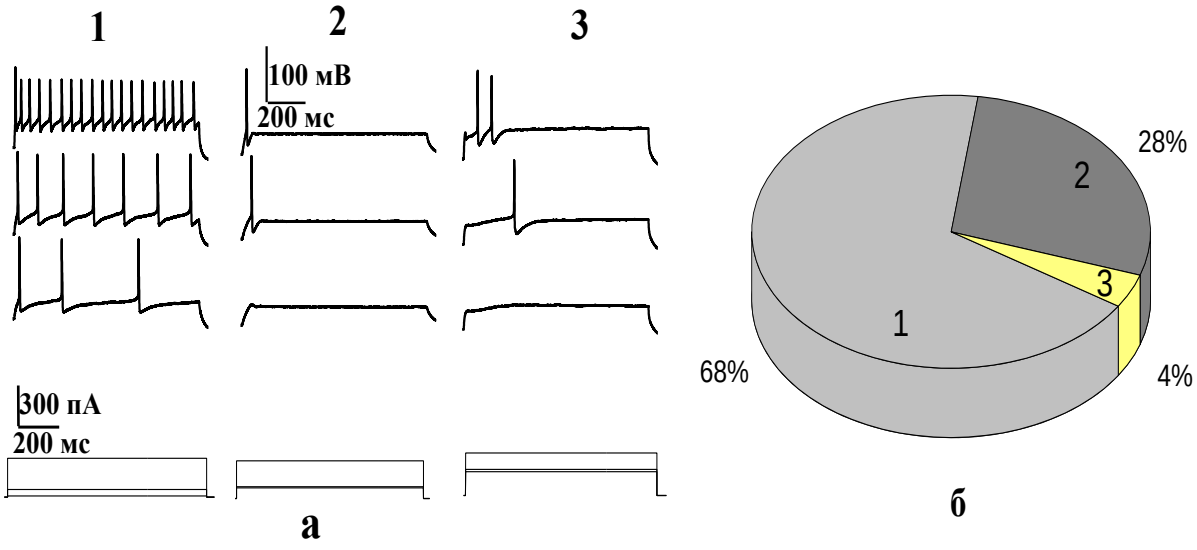


Рис.1 Типи викликаної електричної активності в культивованих нейронах ГТН. а – Репрезентативні відповіді нейронів ГТН на деполяризацію: тонічні (1), адаптивні (2) та нейрони з затриманою генерацією потенціалів дії (3). б – діаграма розподілу між нейронами з різними типами електричної активності.

2. НА-індукований вплив на потенціал спокою та ефект вхідного випрямлення. У 8 з 17 нейронів аплікація НА призводила до зміщення мембранного потенціалу до більш негативних значень на 8-10 мВ. При гіперполяризації мембрани від'ємними імпульсами струму тривалістю 1 та 2 с мембранний потенціал нейронів ГТН спершу досягав максимального по модулю значення (U_{peak}), після чого спостерігалася релаксація до стаціонарного значення (U_{steady}). Даний ефект в літературі називають вхідним випрямленням, тому що за «деполяризаційний вигин», який спостерігається при гіперполяризації мембрани відповідають іонні канали, що активуються гіперполяризацією [Pape 1996, Hogan and Poroli 2008, Momin et al 2008, Cho et al 2010]. Ці канали є потенціалзалежними і струмам, що протікають через них, властиве вхідне випрямлення [Hogan and Poroli 2008, Fu et al 1997, Bayliss 1994]. Ефект вхідного випрямлення оцінюється за коефіцієнтом вхідного випрямлення: $\eta = \frac{U_{peak} - U_{steady}}{U_{peak}} \bullet 100\%$ [Cabanes et. al 2002, Cho et al 2010]. Коефіцієнт η обчислювали для реєстрацій, у яких значення U_{peak} знаходилося в межах від -120 до -100 мВ. У більшості культивованих нейронів ГТН був зареєстрований цей ефект (Рис. 2 а, б), норадренергічний вплив на нього було проаналізовано за змінами η в контролі та при аплікації НА (Рис.2).

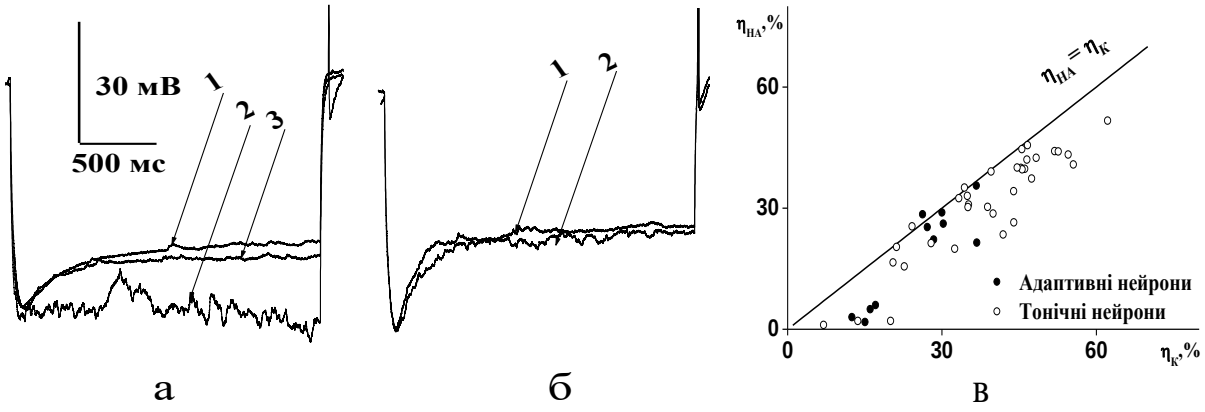


Рис.2 Вплив НА на ефект вхідного випрямлення в нейронах ГТН. Представлено зміни мембранного потенціалу при гіперполяризації мембрани двох різних нейронів ГТН з вираженими (а) та відсутніми (б) змінами при аплікації НА. 1 – контроль, 2 – при аплікації НА (100 мкмоль/л), 3 – відмив. в – діаграма розсіювання для значень коефіцієнта вхідного випрямлення (η), вісь абсцис – контроль ($\eta_К$), вісь ординат – при аплікації НА ($\eta_{НА}$). За відсутності у даного

нейрона НА-індукованих змін η відповідна точка діаграми розташована на прямій з одиничним коефіцієнтом нахилу ($\eta_{НА} = \eta_К$).

3. НА-індуковані зміни електричної активності нейронів ГТН

Більшість нейронів ГТН були чутливими до аплікації НА (71%, n=37 тонічних; 67%, n=14 адаптивних та всі клітини з затриманою генерацією, n=3). У 65% (n=24) тонічних, всіх адаптивних та у нейронів з затриманою генерацією при аплікації НА спостерігалося зменшення амплітуди та тривалості фази спаду ПД (Рис.3 б, в, г та Рис.4 а, в та г). У цих тонічних та з затриманою генерацією нейронах аплікація НА призводила, відповідно до зменшення частоти генерації (Рис.3 а та г) та затримки виникнення ПД (Рис. 4 б).

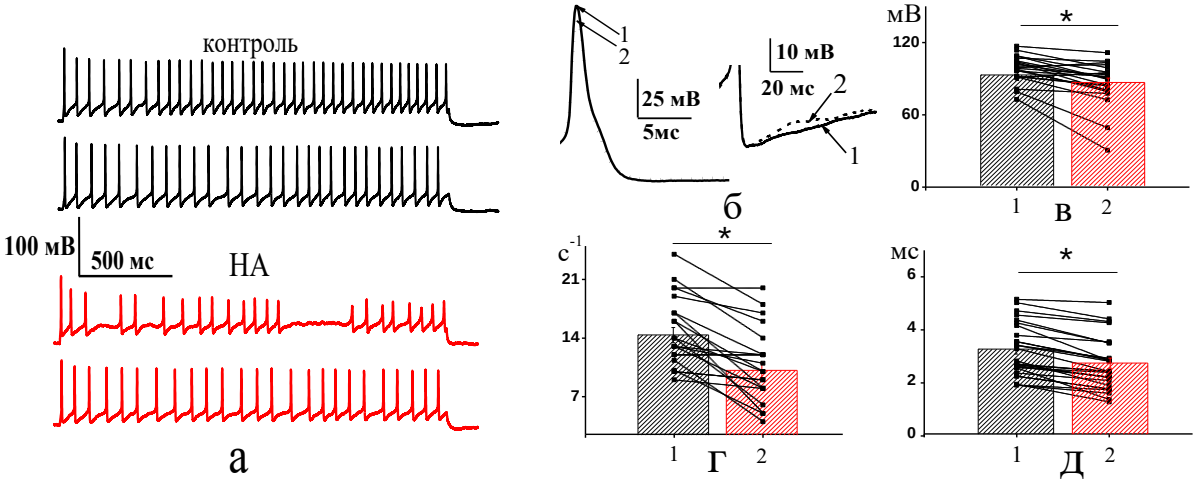


Рис.3 Зміни електрофізіологічних параметрів нейронів ГТН, які зберігали здатність до тонічної імпульсації при аплікації НА.

а – Репрезентативна відповідь тонічного нейрона ГТН на деполяризацію мембрани пороговим та максимальним імпульсом струму в контролі та при аплікації НА. б – реєстрації ПД та слідової гіперполяризації. Статистичне порівняння значень амплітуди (в), частоти генерації (г) та фази спаду ПД (д). 1 – контроль, 2 – при аплікації НА (100 мкмоль/л). На а та б представлені реєстрації від одного нейрона ГТН.

У меншій частині НА-чутливих тонічних нейронів (35%; n=13) при норадренергічній модуляції електричної активності зареєстровано припинення частотної генерації (Рис. 5 а). При таких змінах відбувалося зниження амплітуди ПД та слідової гіперполяризації (Рис.5 б, г).

4. НА-індукована модуляція струмів через ПКК. Дія НА призводила до дозо-залежного зменшення струму через ПКК, яке досягало стаціонарного значення через 20 с після початку аплікації. Вплив НА (25 мкмоль/л) не викликав ніяких змін при деполяризації мембрани від – 90 до -35 мВ і призводив до істотного пригнічення струмів при зміні потенціалу на мембрані від -90 до 0 мВ (Рис.6 а, б). Таким чином, модуляторний вплив НА здійснюється лише на високопорогові ПКК нейронів ГТН.

У 91% нейронів ефект НА призводив до пригнічення вхідного струму через високопорогові ПКК і лише 9% (n=9) клітин були нечутливими до дії цього катехоламіну.

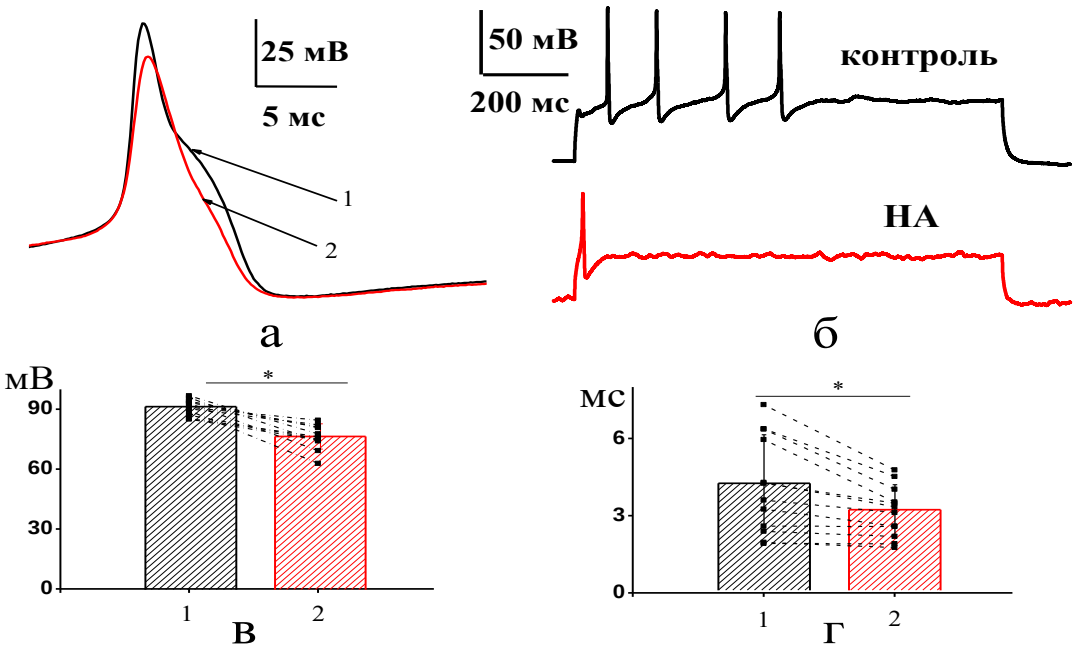


Рис.4 Вплив НА на електрофізіологічні характеристики адаптивних нейронів та нейронів з затриманою генерацією ПД. а – Репрезентативні реєстрації ПД адаптивного нейрона. б – відповіді на деполяризацію нейрона з затриманою генерацією в контролі та при аплікації НА. Статистичне порівняння амплітуди (в) та тривалості фази спаду (г) ПД в адаптивних нейронах та нейронах з затриманою генерацією. 1 – контроль, 2 – при аплікації НА (100мкмоль/л). На а та б представлені реєстрації від одного нейрона ГТН.

Дія НА призводила до зменшення вхідного струму зі збереженням кінетичних параметрів у 62% (n=65) нейронів (I тип модуляції). У решти (29%, n=31) нейронів ГТН спостерігали достовірні зміни у кінетиці струмів через

ПКК (II тип модуляції). Фаза наростання струму в контролі апроксимувалася моноекспоненційною кривою з постійною часу спаду τ_1 (2,6 ± 0,4 мс; n=12). При аплікації НА помітно уповільнювалася фаза інактивації, а наростання струму модифікувалася додатковою компонентною з часовою константою τ_2, яка дорівнювала 20,6 ± 3,5 мс (n=12), при цьому швидка компонента достовірно не відрізнялася від контролю, постійна τ_1 становила 2,9 ± 0,5 мс (n=12). Середній рівень пригнічення амплітуди струму через ПКК для норадренергічної модуляції I-го та II-го типу складав (17 ± 2%; n=23, від 5% до 44%) та (22 ± 3%; n=16 від 5% до 44%) відповідно.

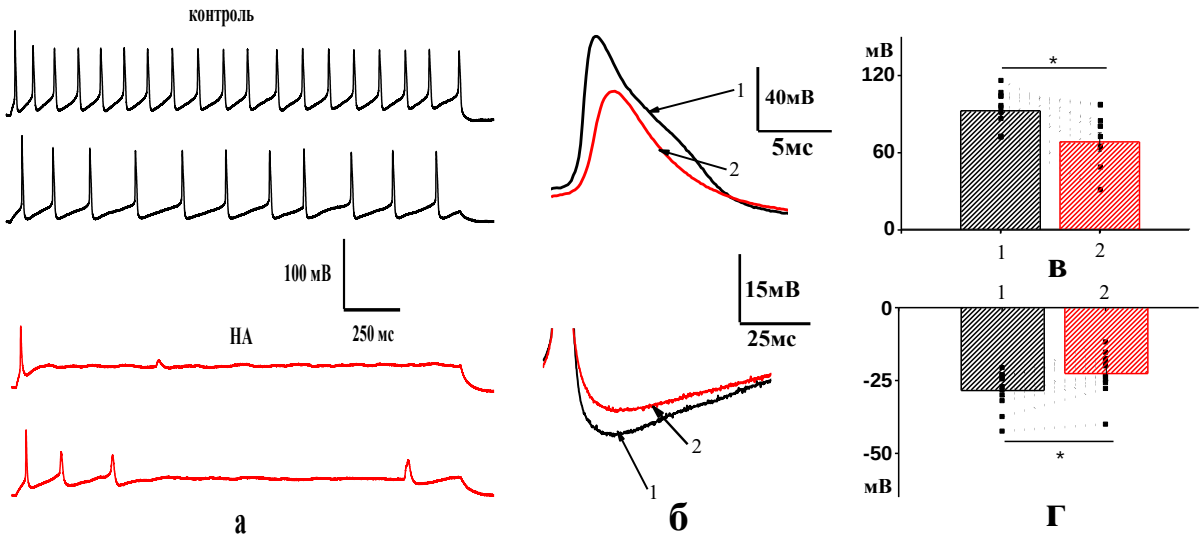


Рис.5 Зміни електрофізіологічних параметрів нейронів ГТН, які при дії НА втрачали здатність до тонічної генерації ПД. а – репрезентативна відповідь тонічного нейрона ГТН на деполяризацію мембрани пороговим та максимальним імпульсом струму в контролі та при аплікації НА (а). б – реєстрації ПД та слідової гіперполяризації. Статистичне порівняння значень амплітуди (в) та слідової гіперполяризації (г) ПД. 1 – контроль, 2 – при аплікації НА (100 мкмоль/л). На а та б представлені реєстрації від одного нейрона ГТН.

5. Вплив короткотривалої високоамплітудної деполяризації на НА-викликане пригнічення струмів через ПКК. Механізми впливу НА на кінетику струму було досліджено з застосуванням короткотривалої високоамплітудної деполяризації, яка призводить до від'єднання субодниці G білка від ПКК та збільшення амплітуди струму [Ikeda 1991, Formenti, Arrigoni et al. 1993].

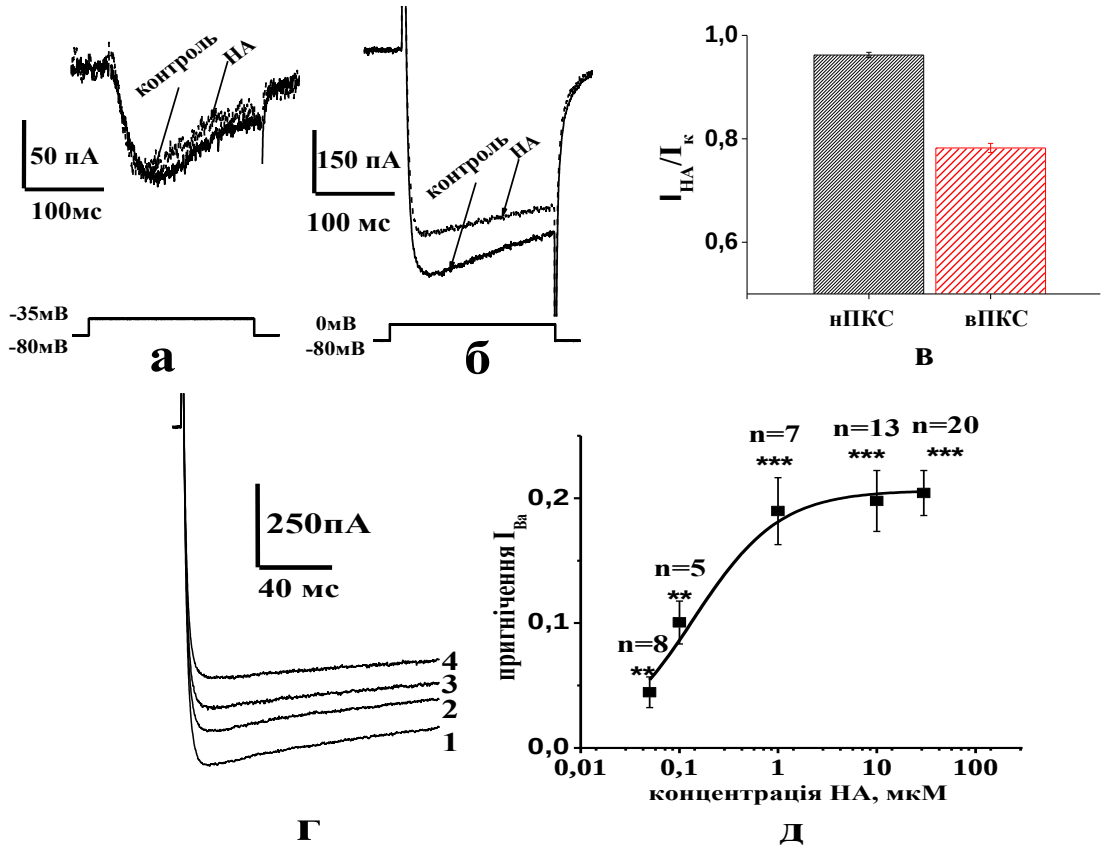


*Рис.6 НА-індукована модуляція струмів через високопорогові ПКК. Зміни вхідного струму, викликаного зміною потенціалу від -90 до -35 мВ, були відсутні (а), пригнічення струму спостерігалося при зміні потенціалу від -90 до 0 мВ (б). Порівняння НА-індукованого пригнічення для низько- та високопорогових струмів (нПКС та вПКС) (в) г – репрезентативні реєстрації в контролі (1); при аплікації 0.1 мкмоль/л (2); 1 мкмоль/л (3) та 10 мкмоль/л НА (4). д – крива доза-ефект пригнічення струму через ПКК. Експериментальні значення апроксимовано кривою Міхаеліса-Ментен $I=I_{max}/(EC_{50}+[HA])$ з визначеними параметрами $I_{max}=0,21$ та $EC_{50}=0,139$ мкмоль/л. **P<0.01, ***P<0.001 – порівняно з контролем.*

Деполяризація мембрани здійснювалася шляхом прикладання кондиціонуючого передімпульсу тривалістю 50 мс від -80 мВ до 80 мВ, який через 15 мс змінювався тестуючим імпульсом від -80 мВ до 5 мВ (Рис.8 а). Для модуляції I типу прикладання кондиціонуючого передімпульсу не відновлювало параметрів струмів. У нейронах з II типом норадренергічної

модуляції попередня деполяризація призводила до відновлення кінетики та (частково) амплітуди струму (Рис 8 б, в).

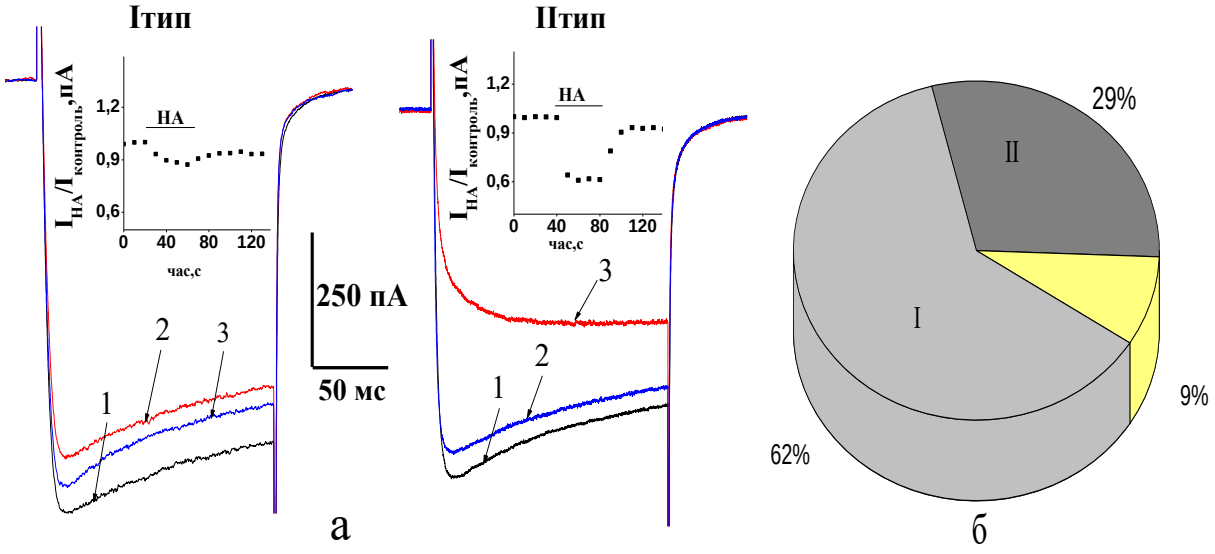


Рис.7 Два типи НА-індукованої модуляції струмів через ПКК: без змін кінетики (I тип модуляції) та з уповільненням кінетики (II тип модуляції). На вставках наведено часовий перебіг амплітуди струму через ПКК при аплікації НА. 1 – контроль, 2 – при аплікації НА, 3 – відмив б – Діаграма розподілу між типами НА-модуляції струму через кальцієві канали в нейронах ГТН. Жовтим сектором позначено частку нечутливих до НА нейронів.

6. Потенціалзалежність НА-індукованого пригнічення в нейронах ГТН. У наступній серії експериментів показано, що НА-індуковане пригнічення струмів через ПКК залежить від потенціалу на мембрані. Для нейронів, які характеризувались норадренергічною модуляцією струмів через ПКК I-го типу межі пригнічення становили від -20 мВ до 30 мВ (Рис. 9). Для НА-індукованого впливу II-го типу аналіз ВАХ проводили для значень струму через 15 мс та 95 мс після початку команди, при цьому межі пригнічення були в діапазоні між -35 та 40 мВ. Таким чином, межі пригнічення для двох типів модуляції відрізнялися між собою діапазоном потенціалів.

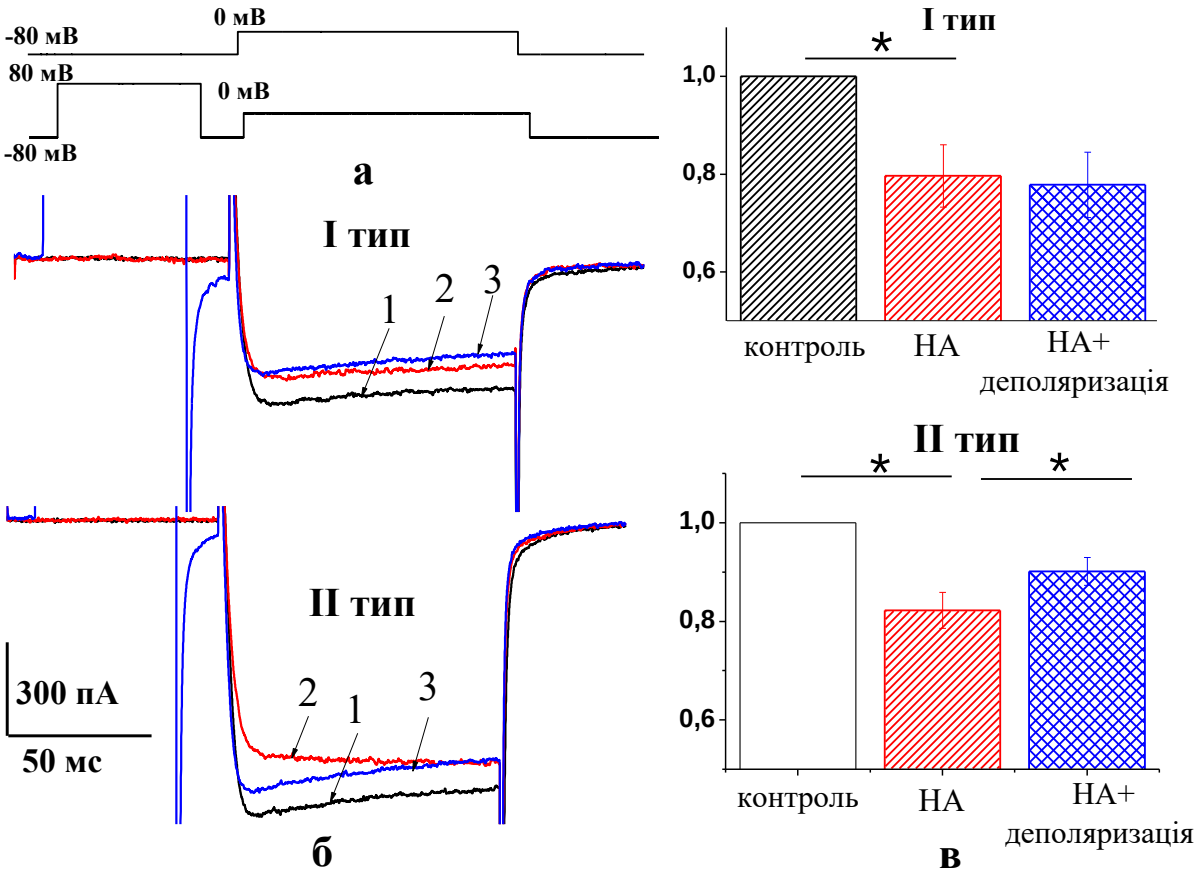


Рис.8 Вплив високоамплітудної деполяризації на норадренергічну модуляцію струмів через ПКК. а – схема протоколу: спочатку здійснювалася реєстрація струму при зміні потенціалу від -80 до 0 мВ в контролі та при аплікації НА, а потім попередньо прикладали високоамплітудну деполяризацію (кондиціонуючий передімпульс від -80 до 80 мВ) у присутності НА. б – репрезентативні реєстрації для нейронів з модуляцією НА I та II типів, 1– контроль, 2 – аплікація НА, 3 – дія НА при застосуванні передімпульсу. в – порівняння змін інтегралу струму (перенесеного заряду) в контролі, при дії НА та після кондинціонуючого передімпульсу.

7. Участь α_2-АР у НА-індукованій модуляції ПКК. Адренергічна модуляція кальцієвих каналів у багатьох центральних та периферичних нейронах здійснюється за рахунок активації α_2-АР [Abdulla and Smith 1997, Bian and Galligan 2007, Li and Horn 2008]. Відомо, що у нейронах ГТН ці рецептори також експресуються, а їх активація призводить до пригнічення електричної активності [Takeda, Ikeda et al. 2002]. Однак вплив даного типу АР на ПКК у нейронах ГТН раніше не досліджувався. Аплікація селективного антагоніста α_2-АР йохімбіну (10 мкмоль/л) разом з НА (10 мкмоль/л)

(Рис. 10, а) призводила до пригнічення струму через кальцієві канали в середньому на 13 ± 2% (n = 7), тоді як при прикладанні лише НА середнє пригнічення становило 21 ± 2% (n = 7). Отримані результати свідчать, що адренергічне пригнічення кальцієвих струмів нейронів ГТН (на відміну від нейронів спінальних гангліїв) лише частково (близько 60%) опосередковується α_2-АР. Вірогідно, що у цей процес також залучені АР α_1 типу.

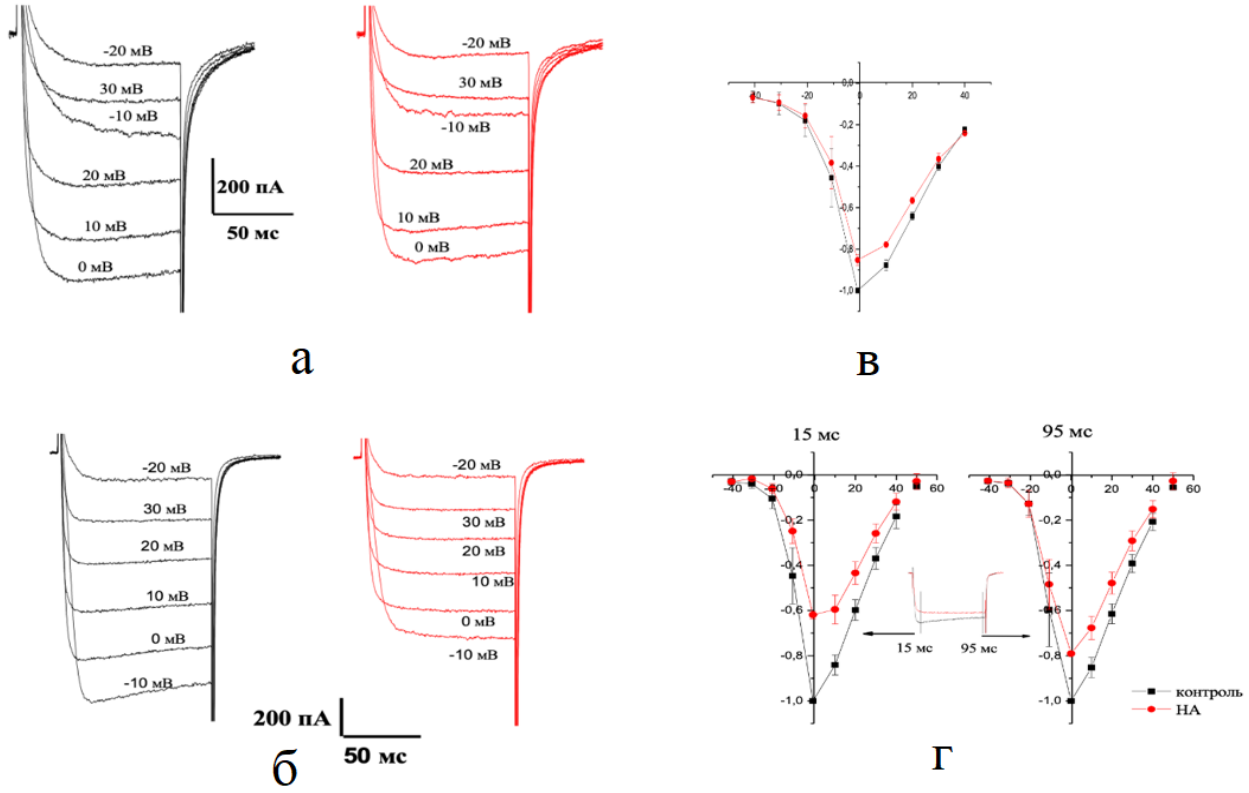


Рис.9 Вплив НА на струми через ПКК при різних значеннях мембранного потенціалу. Оригінальні реєстрації струмів через ПКК для першого (а) та другого (б) типу модуляції. Нормовані усереднені ВАХ піку вхідного струму в контролі та при аплікації НА для першого (n = 5) (в) та другого (n = 6) (г) типу модуляції. На (г) представлено ВАХ для значень струмів через 15 та 95 мс після прикладання командного потенціалу.

8. Участь різних типів високопорогових ПКК у НА-індукованій модуляції. Високопороговий кальцієвий струм за електрофізіологічними та фармакологічними характеристиками поділяється на N-, L- P/Q- та R- підтипи. У наших експериментах для кожного підтипу ПКК було оцінено його внесок

у сумарний струм та визначено наявність НА-індукованого пригнічення за присутності відповідного селективного блокатора.

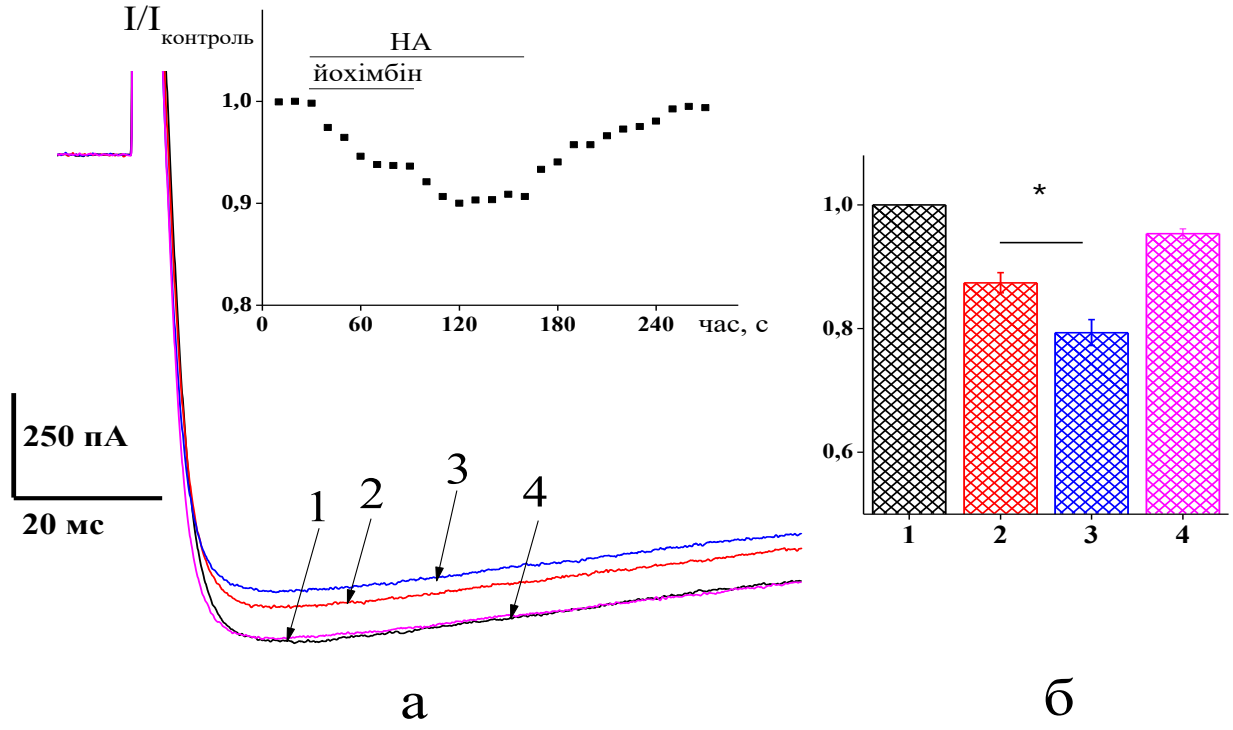


Рис.10 Роль α_2-АР у норадренергічній модуляції струмів через ПКК нейронів ГТН. а – зміни нормованих на контроль (1) струмів при дії норадреналіну (НА) разом з йохімбіном (2), при дії лише НА (3) та при відмиві (4). б – порівняння нормованих середніх значень в контролі (1) при сумісній дії НА з йохімбіном (2) , при дії лише НА (3) та відмиві (4).

Застосування селективного блокатора N-типу ПКК – ω-конотоксину (1мкмоль/л) призводило до зменшення струму в середньому на 42 ± 6% (12-70%; n=14), P/Q- типу – ω-агатоксин (1 мкмоль/л) на 10 ± 4% (2 - 37%; n = 10), L-типу – ніфедипіну (10 мкмоль/л) на 28 ± 5% (11 – 46%; n = 6). Дія НА в присутності блокаторів була відсутня лише при наявності селективного блокатора N-типу ПКК. Прикладання всіх блокаторів в концентрації повного пригнічення показали наявність токсин резистивного струму (R-тип), який був чутливий до НА. У присутності ніфедипіну дія НА не відрізняється від такої в контролі, що свідчить про відсутність помітної норадренергічної модуляції каналів L-типу на нейронах ГТН. На фоні ω-конотоксину та ω-агатоксину дія НА була меншою аніж за відсутності блокаторів, середні значення пригнічень

кальцієвого струму в присутності ω-конотоксину та ω-агатоксину становили відповідно 8 ± 2% (n = 12) та 14 ± 3% (n = 11). Пригнічення токсин-резистивного струму становило 38 ± 9% (n = 5). Ці результати свідчать, що залишковий струм є найбільш чутливим до НА. Аналіз отриманих даних показав, що у середньому близько половини модулюючого ефекту НА на ПКК здійснюється за рахунок каналів N-типу, близько третини – R типу та одної шостої – P/Q.

Обговорення результатів. Отримані дані показали, що дія НА призводить до пригнічення викликаної електричної активності нейронів ГТН. НА-індуковані зміни у імпульсації нейронів спостерігаються внаслідок впливу АР на потенціалкеровані іонні канали. Гіперполяризація мембрани при дії НА пояснюється активацією калієвих каналів вхідного випрямлення ($K_{ir}3$), вплив на які здійснюється через активацію G-білка.

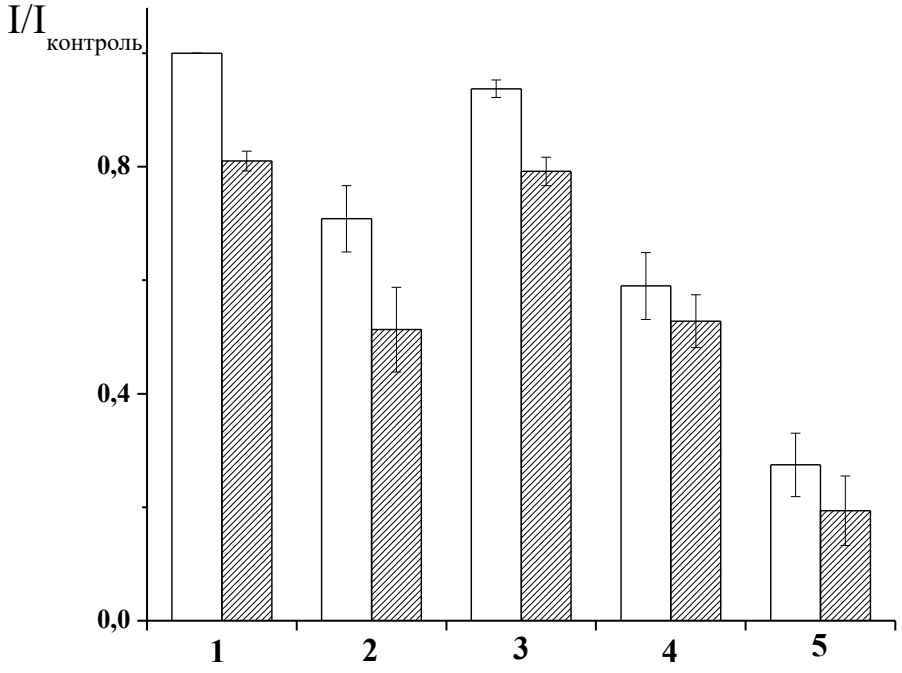


Рис.11 Участь різних типів високопорогових кальцієвих каналів у норадренергічній модуляції нейронів ГТН. НА-індуковане пригнічення струмів через ПКК в контролі (1), при наявності 10 мкмоль/л ніфедипіну (2), 1 мкмоль/л ω-агатоксину (3), 1 мкмоль/л ω-конотоксину (4) та при аплікації трьох блокаторів (5).

Вплив на ці іонні канали ймовірно здійснюється за рахунок прямого Gβγ-шляху при активації α_2-АР, експресія яких визначена у ГТН [Dascal 1997, Bunemann, Bucheler et al. 2001, Takeda, Ikeda et al. 2002, Dascal and Kahanovitch 2015]. Також в нашій роботі показано, що дія НА призводить до пригнічення ефекту вхідного випрямлення, ці зміни пов'язані з впливом НА на канали, що активуються гіперполяризацією, оскільки саме вони забезпечують ефект вхідного випрямлення [Cabanes, Lopez de Armentia et al. 2002, Cho, Staikopoulos et al. 2009, Cho, Furness et al. 2011]. Роботи на нейронах ГДК та ГТН показали, що пригнічення електричної активності відбувається внаслідок взаємозв'язку α_2-АР та каналів, що активуються гіперполяризацією [Yagi and Sumino 1998, Takeda, Ikeda et al. 2002]. Однак цей адренергічний вплив може здійснюватися як за рахунок вторинних посередників, так і через пряму дію на ПКК внаслідок активації α_{2a}-АР [Won, Lee et al. 2019]. Зміни амплітуди та зменшення тривалості ПД вказують, що адренергічний вплив на електричну активність відбувається через зв'язок АР з ПКК. Результати наших експериментів показали, що у частині нейронів аплікація НА призводила до втрати здатності до генерації тонічної активності, що супроводжувалося змінами у параметрах слідової гіперполяризації ПД. Зміни у цьому параметрі можуть бути пов'язані з впливом на кальцій-залежні калієві канали, а припинення частотної генерації з впливом на канали, що активуються гіперполяризацією [Sah 1996, Faber and Sah 2003].

ПКК є основним джерелом надходження кальцію у внутрішньоклітинне середовище, де відбувається безліч кальційзалежних процесів, таких як транскрипція, проліферація, активація ферментів та вивільнення гормонів та нейротрансмітерів [Dunlap, Luebke et al. 1995, Martin-Moutot, Charvin et al. 1996, Dolmetsch, Pajvani et al. 2001, Reid, Dixon et al. 2004]. У нейронів ГТН ПКК також беруть участь у генерації ПД [Puil and Spigelman 1988, Galdzicki, Puia et al. 1990]. ПКК є мішенню сполучених з G-білком метаботропних рецепторів, зокрема АР. Усі типи АР відносяться до метаботропних [Bylund, Eikenberg et al. 1994] і при активації впливають на ПКК як завдяки приєднанню Gβγ субодиниці, так і через сигнальні шляхи із залученням вторинних посередників [Hille 1992, Dolphin 2003, Tedford and Zamponi 2006]. Результати наших експериментів показали, що на нейронах ГТН аплікація НА призводила до дозо-залежного пригнічення струму через ПКК, при насичуючій концентрації середнє пригнічення становило близько 20%. Дія цього катехоламіну могла призводити до пригнічень двох типів: без змін кінетики (I тип модуляції) та з уповільненням кінетики струму через ПКК (II тип модуляції). Прикладання високоамплітудної деполяризації при I типі норадренергічної модуляції не призводила до змін струмів, а при II типі

сприяла відновленню кінетичних параметрів та (частково) амплітуди. Ці результати добре співвідносяться з літературними даними про вплив метаботропних рецепторів на ПКК [Ishibashi and Akaike 1995, Viana and Hille 1996, Timmons, Geisert et al. 2004]. Відновлення показників струмів через ПКК при деполяризації свідчить про механізм прямого впливу Gβγ субодиниці на α1-субодиницю ПКК [Ikeda 1996]. При цьому лише часткове відновлення амплітуди може вказувати на присутність двох механізмів впливу на ПКК, що показано на нейронах спінальних гангліїв [Formenti, Arrigoni et al. 1993].

Серед АР важливу роль відіграють α_2-АР і саме вони беруть участь у модуляції електричної активності та синаптичної передачі у нейронах центральної та периферичної нервових систем. Наші експерименти показали, що ці рецептори експресовані у мембрану ГТН. Проте, дія НА на ПКК лише частково (близько 60%) опосередковується α_2-АР, це свідчить, що також у цей процес залучені АР інших типів (вірогідно, α_1).

За допомогою селективних блокаторів у концентрації максимального пригнічення у нейронах ГТН ідентифіковано експресію N- L- та P/Q – каналів. При аплікації усіх блокаторів реєструвалм токсин-резистивний струм (R-тип ПКК). Найбільша частка сумарного струму припадає на N- та L-високопорогові ПКК. Отримані нами результати узгоджуються з даними експериментів на свіжоізольованих нейронах ГТН [Kim and Chung 1999, Ikeda and Matsumoto 2003, Gover, Moreira et al. 2007]. У нашій роботі встановлено, що у нейронах ГТН до норадренергічного впливу чутливі N- P/Q- та R- типи ПКК. Як і для більшості центральних та периферичних нейронів, найбільший внесок у НА-індуковані зміни роблять канали N-типу. Оскільки у значній частині нейронів аплікація НА в присутності селективного блокатора не призводила до змін у струмі, а при дії ніфедипіну або ω-агатоксину НА призводив до пригнічення двох типів, то можна вважати що саме цей тип ПКК може зазнавати адренергічної модуляції обох типів. Отримані дані співставні з даними на нейронах периферичної та центральної нервової систем. Можна припустити, що саме на цих каналах відбувається конвергенція декількох НА-індукованих внутрішньоклітинних процесів [Diverse-Pierluissi and Dunlap 1993, Luebke and Dunlap 1994, Diverse-Pierluissi and Dunlap 1995, Herlitze, Garcia et al. 1996]. Щодо токсин-резистивного струму, то пригнічення залишкового струму становило 7% по відношенню до контрольного. Участь R-каналів у G-білок зв’язаних процесах зареєстровано у небагатьох роботах [Bian and Galligan 2007], а у сенсорних гангліях нами це показано вперше.

ВИСНОВКИ

З використанням методу фіксації потенціалу/струму в конфігурації «ціла клітина» та локальної суперфузії досліджено норадрнергічний вплив на електрофізіологічні характеристики культивованих нейронів ГТН. Аплікація НА на сому нейронів ГТН моделює вплив симпатичної нервової системи на передачу сенсорного сигналу в первинних провідних шляхах трійчастого нерва

1. У нейронах ГТН НА-індуковані зміни у електрофізіологічних характеристиках пов’язані з впливом на ПКК та канали, що активуються при гіперполяризації соматичної мембрани. У всіх адаптивних та нейронах з затриманою генерацію ПД зменшується амплітуда та тривалість фази спаду ПД. Такі ефекти також спостерігаються у 65% тонічних клітин. 35% тонічних нейронів втрачають здатність до частотної генерації, у них знижується амплітуди ПД та слідової гіперполяризації. При дії НА нівелюється ефект вхідного випрямлення, як у адаптивних, так і тонічних нейронів.

2. У більшості (91%) нейронів ГТН НА дозозалежно пригнічує струми через ПКК. При цьому у 62% нейронів зменшується лише амплітуда струму (I тип модуляції), а у 29% – додатково уповільнюється кінетика струму (II-тип модуляції). Електрофізіологічними методами встановлено, що II тип модуляції опосередкований взаємодією βγ-субодиниці G-білка з ПКК, тоді як у I типі така взаємодія практично відсутня.

3. Модулюючий ефект НА на високопороговий струм через ПКК здійснюється через вплив на канали N-, R- та P/Q типів з середнім внеском 52, 35 та 13% відповідно, а канали L-типу у цьому процесі практично не задіяні.

4. Вплив НА на високопорогові ПКК нейронів ГТН лише частково (на 60%) опосередковується активацією α_2-АР.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Електрофізіологічні властивості нейронів трійчастого ганглія в первинній культурі. Нейрофизиология / Neurophysiology. 2013; 1 (45): 92-6. (*Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*

2. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Характеристика електричної активності нейронів ганглія трійчастого нерва в первинній культурі. Фізіологічний журнал 2016; 2 (62): 24-34. (*Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*

3. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Зміни в адренергічній модуляції кальцієвих струмів нейронів ганглія трійчастого нерва, викликані фактором росту нервової тканини. Фізіологічний журнал. 2017; 4 (63):17-23 (*Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*

4. **Телька МВ**, Маслов ВЮ, Федулова СА, Веселовський МС. Вплив норадреналіну на електричну активність культивованих нейронів ганглія трійчастого нерва. Фізіологічний журнал. 2019; 6 (65): 22-9. (*Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*

5. **Телька МВ**, Маслов ВЮ, Веселовський МС, Федулова СА. Адренергічна модуляція високопорогових потенціал-керованих кальцієвих струмів у нейронах ганглія трійчастого нерва. Фізіологічний журнал. 2020; 1 (66): 75-82 (*Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*

Додаткові статті:

6. Телька МВ, Пурнинь ОЕ, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Електрофізіологічні властивості симпатичних нейронів у первинній

культурі верхнього шийного ганглія щура. Нейрофизиология / Neurophysiology*;* 2011; №3 (43): 261-264. (*Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*

Тези доповідей:

1. Telka MV, Veselovsky NS. Electrophysiological properties of cultured rat trigeminal ganglion neurons, II International Symposium "Molecular Mechanisms of Synaptic transmission regulation" in memory of Prof. Vladimir Skok, 6 – 9 October 2012, Kyiv, Ukraine.
2. Телька МВ, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Модулюючий вплив норадреналіна на електричну активність нейронів ганглія трійчастого нерва, VI Конгрес Українського товариства нейронаук, 4 – 8 червня 2014, Київ, Україна
3. Телька МВ, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Вплив фактору росту нервової тканини на адренергічну модуляцію високопорогових кальцієвих струмів нейронів ганглія трійчастого нерва, VII Конгрес Українського Товариства Нейронаук, 7 – 11 червня 2017, Київ, Україна
4. Telka MV, Veselovsky NS. Influence of adrenergic stimulus on excitability of cultured trigeminal ganglion neurons, International neuroscience graduate summer workshop and practical training "Gazi-EgeBINGSS" in honor of Prof. Gonul O. Peker "Neuroinflammation: a sneaky FOE or a reliable FRIEND", 25 – 29 June 2018, Ankara, Turkey
5. M.V.Telka, O.V. Ryhalsky, N.S. Veselovsky. NGF-induced augmentation of adrenergic modulation of calcium currents in cultured trigeminal ganglion neurons; Abstract book of FENS Regional Meeting, Belgrade, Serbia, July 10-13, 2019 P.674
6. Телька МВ, Рихальський ОВ, Пурнинь ОЕ, Веселовський МС. Роль А2-адренорецепторів у потенціалкерованих кальцієвих струмів нейронів ганглія трійчастого нерва, XX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка, 27 – 30 травня 2019, Київ, Україна Фізіологічний журнал Т.65, №3 Додаток, С.27
7. Телька МВ, Маслов ВЮ, Веселовський МС, Федулова СА Моделювання адренергічного впливу на нейрони ганглія трійчастого нерва, VIII Національний конгрес патофізіологів України присвячений 120-річчю

Одеської патофізологічної школи, 13 – 15 травня 2020, Одеса Україна, Збірка тез, С. 202-203

Додаткові тези доповідей:

8. Телька МВ, Рихальський ОВ, Пурнинь ОЕ, Веселовський МС. Утворення синаптичних зав'язків нейронами первинної культури верхніх шийних гангліїв, конференція молодих учених «Фізіологія: від молекул до організму», 20 – 21 жовтня 2011, Київ Фізіологічний журнал Т.65, №3 Додаток, С.27

9. Телька МВ, Рихальський ОВ, Пурнинь ОЕ, Веселовський МС. Електрофізіологічні дослідження симпатичних нейронів первинної культури верхнього шийного ганглія щура, V Конгрес Українського товариства нейронаук, 6 – 10 червня 2011, Київ, Україна

10. Телька МВ, Рихальський ОВ, Пурнинь ОЕ, Веселовський МС. Швидкі синаптичні відповіді культивованих нейронів верхнього шийного ганглія, V з'їзд Українського Біофізичного Товариства 2011, Луцьк, Україна

АНОТАЦІЯ

Телька М. В. Зміни електричної активності культивованих нейронів ганглія трійчастого нерва при норадренергічній модуляції кальцієвих струмів.– Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 «Біофізика». – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена виявленню особливостей норадренергічної модуляції електричної активності та струмів через потенціалкеровані кальцієві канали (ПКК) нейронів ганглія трійчастого нерва (ГТН). Електрофізіологічні дослідження проводилися на первинній культурі клітин ГТН. У роботі використані методи фіксації потенціалу/струму в конфігурації «ціла клітина» та локальної суперфузії норадреналіну (НА) та селективних блокаторів ПКК і адренорецепторів (АР). Аплікація НА на сому культивованих нейронів ГТН моделює симпато-сенсорну взаємодію в провідних шляхах трійчастого нерва. Показано, що у цих нейронах зміни у викликаній електричній активності здійснюються за рахунок зв'язку АР з

потенціалкерованими каналами: ПКК та активованих гіперполяризацією. Вперше на нейронах ГТН був проведений аналіз впливу НА на струми через ПКК. Виявлено, що у більшості нейронів (91%) НА пригнічує кальцієвий струм, при цьому виділяються два електрофізіологічно відмінні типи модуляції: зменшення лише амплітуди струму без змін у кінетиці (62%) та зменшення амплітуди, яке супроводжувалося уповільненням кінетики (29%). Встановлено, що модуляція другого типу здійснюється за рахунок впливу Gβγ-субодиниці АР на ПКК. Показано, що норадренергічна модуляція струмів через ПКК нейронів ГТН лише частково (на 60%) опосередковується α_2-АР. Сумарний модуляторний вплив НА реалізується у значній мірі через ПКК N-типу (52% від сумарного ефекту), середній внесок R- та P/Q каналів складає відповідно 35 та 13%.

Результати роботи мають фундаментальне значення про модуляторні взаємодії між різними відділами периферичної нервової системи. Практичне значення результатів зумовлено роллю симпато-сенсорних взаємодій в розвитку нейропатичних станів.

Ключові слова: нейрон, ганглій трійчастого нерва, норадреналін, викликана електрична активність, кальцієві струм.

АННОТАЦИЯ

Телька М.В. Изменения электрической активности культивированых нейронов ганглия тройничного нерва при норадренергической модуляции кальциевых токов – Квалификационный научный труд на правах рукописи

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. – Институт физиологии им. О.О. Богомольца НАН Украины, Киев, 2020.

Работа посвящена выявлению особенностей норадренергической модуляции электрической активности и токов через потенциалуправляемые кальциевые каналы (ПКК) нейронов ганглия тройничного нерва (ГТН). Электрофизиологические исследования проводились на первичной культуре клеток ГТН. В работе были использованы методы фиксации потенциала/тока в конфигурации «целая клетка» и локальной суперфузии норадреналина (НА), селективных блокаторов ПКК и адренорецепторов (АР). Аппликация НА на сому культивируемых нейронов ГТН моделирует симпато-сенсорное взаимодействие в проводящих путях тройничного нерва. Показано, что в этих нейронах изменения в вызванной электрической активности реализуются за счет связи АР с потенциалуправляемыми каналами: ПКК и активируемых при

гиперполяризацией. Впервые на нейронах ГТН был проведен анализ влияния НА токи через ПКК. Установлено в большинстве нейронов (91 %) НА угнетает кальциевый ток, при этом выделяются два электрофизиологически отличных типа модуляции: уменьшение только амплитуды тока без изменения его кинетики (62 %) и уменьшение амплитуды, которое сопровождается замедлением кинетики (29%). Показано, что модуляция второго типа осуществляется за счет влияния Gβγ-субъединицы АР на ПКК. Показано, что адренергическая модуляция тока через ПКК нейронов ГТН только частично (60 %) опосредована α_2-АР. Суммарное влияние НА преимущественно реализуеться через ПКК N типа (52% от суммарного эффекта), средний вклад R- и P/Q каналов составляет соответственно 35 и 13 %.

Результаты работы имеют фундаментальное значение про модуляторные взаимодействия между разными отделами периферической нервной системы, что определяет их фундаментальное значение. Практическое значение результатов обусловлено ролью симпато-сенсорных взаимодействий в развитии нейропатических состояний.

Ключевые слова: нейрон, ганглий тройничного нерва, норадреналин, электрическая активность, кальциевый ток, потенциалуправляемые кальциевые каналы

SUMMARY

Telka M.V. Changes of the excitability of trigeminal ganglion neurons under noradrenergic modulation of calcium currents. – Manuscript.

A dissertation to acquire the degree of Candidate of Biological Sciences (PhD), specialty – 03.00.02 – biophysics. – Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2020.

The aim of this study was to reveal the properties of noradrenergic modulation of electrical activity and calcium currents in cultured trigeminal ganglion (TG) neurons. Noradrenaline (NA)-induced changes of electrophysiological characteristics were investigated using the patch-clamp whole-cell technique in current/voltage-clamp modes. NA application on the TG neuron soma simulates sympatho-sensory interaction in the trigeminal pathways. It was shown that changes in evoked electrical activity occur due to adrenoceptors interactions with hyperpolarization-activated cationic and calcium channels. In the first time, NA influence on calcium currents in TG neurons was analyzed. It was found that the adrenergic effect is present in the majority of the neurons (92%) and two

electrophysiologically different types of the modulatory effect are present: a decrease in the current amplitude with no kinetic changes (62%, I type) and kinetic-slowing decreasing of the amplitude (29%, II type). It was established that the second type of modulation is carried out by the coupling of Gβγ-subunit with a calcium channel. It was shown that noradrenergic modulation of calcium currents partially (60%) mediates by α2-adrenoceptors activation. It was found that the NA effect on calcium currents realizes mainly via N-type channels (52% of the total effect), R- and P/Q-type channels contribute respectively 35 and 13% respectively.

The results are of fundamental value since they expand our knowledge about modulatory interactions between different parts of the peripheral nervous system. Practical significance of the results is due to the role of sympathetic-sensory interactions in neuropathies.

Keywords: trigeminal ganglion neurons, noradrenaline, electrical activity, calcium currents.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГТН – ганглій трійчастого нерва

ГДК – ганглії дорсальних корінців

НА – норадреналін

АР – адренорецептор

ПКК – потенціалкеровані кальцієві канали

ПД – потенціал дії

HEPES – 4-(2-гідроксіетил) піперазин-1-етансульфонова кислота

G-білок – Гуаніннуклеотид зв’язуючи білок

ВАХ – Вольт-амперна характеристика

α_2-АР – α_2-адренерецептор