

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

Кротов Володимир Вадимович

УДК 612.83:612.822:612.884:616-002

**Зміни функціонування нейронної мережі поверхневих
пластин спинного мозку при хронічному болю різного
генезу**

03.00.02 – Біофізика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

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 біологічних наук, професор

Жолос Олександр Вікторович

ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ ім. Тараса Шевченка,
завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики.

доктор фізико-математичних наук, старший науковий співробітник

Єсилевський Семен Олександрович

Інститут фізики НАН України,
провідний науковий співробітник відділу фізики біологічних систем.

Захист відбудеться «29» травня 2018 р. о 14⁰⁰ 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 .

Автореферат розісланий «28» квітня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої
вченої ради ,



к. б. н. Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми

На хронічні больові синдроми страждають близько 20% населення Європи (Breivik et al., 2006). І хоча досі тривають суперечки з приводу того, чи є хронічний біль захворюванням (Cohen et al., 2013), цей синдром залишається серйозною клінічною проблемою та суттєвим фінансовим тягарем для суспільства: тільки в Європі на боротьбу з хронічним болем витрачається більше 200 млрд. євро на рік (Tracey and Bushnell, 2009). Проте розуміння механізмів виникнення подібного болю, а, отже, і розробка ефективних терапевтичних підходів до його лікування все ще лишаються обмеженими.

Постійний біль може бути спричинений багатьма факторами - пошкодженням тканин, травмою периферійних нервів або спинного мозку, запаленням, нейропатіями різної етіології тощо. Навіть після усунення початкових причин ті зміни, які вони спричинили, можуть продовжувати викликати біль, тобто виникає хронічний больовий синдром. Хронічний біль змінює роботу як периферичної, так і центральної нервової системи (ПНС та ЦНС відповідно). Протягом останніх десятиліть дослідження болю та розробка стратегій його лікування були здебільшого сконцентровані на ПНС, в той час як основні метаболічні зміни, викликані хронічним болем, розвиваються в дорсальних рогах (ДР) спинного мозку (СМ), а не в периферичних нервах чи дорсально-корінцевих гангліях (ДКГ) (Patti et al., 2012). На сьогоднішній день центральні механізми хронічного болю залишаються маловивченими, і саме це суттєво обмежує та сповільнює розробку нових терапевтичних підходів до лікування хронічного болю периферичного та, особливо, центрального генезу.

Першопричиною хронічного болю будь-якого генезу є центральна сенситизація, яка за визначенням є підвищенням функціонального статусу нейронів та мереж ноцицептивних шляхів вздовж всієї нервової вісі, викликаним підвищенням мембранної збудливості, синаптичної ефективності і/або зменшенням гальмування у відповідних нейронах (Latremoliere and Woolf, 2009; Ji et al., 2018). Останні дослідження показують, що центральна сенситизація викликається цілою низкою змін клітинних та іонних механізмів, як, наприклад, ап-регуляцією натрієвих каналів (Hains et al., 2003; Lampert et al., 2006), збільшенням концентрації зовнішньоклітинного глутамату (Liu and McAdoo, 1993), зменшенням експресії глутаматдекарбоксілази (Gwak and Hulsebosch, 2011; Meisner et al., 2010) та зміною хлорного градієнту (Coull et al., 2003; Hasbargen et al., 2010; Janssen et al., 2012; Jolivald et al., 2008; Lu et al., 2008; Zhang et al., 2008), це супроводжується посиленням активності первинних аферентів (Bedi et al., 2010; Weyer et al., 2016) та інтернейронів широкого динамічного діапазону у відповідь на ноцицептивні та неноцицептивні стимули (Gwak et al., 2007; Hao et al., 2004). Проте досі залишається невідомим, які саме зміни збуджуючої та гальмівної синаптичної передачі в різноманітних нейронах поверхневих пластин ДР призводять до гіперзбудливості ноцицептивної мережі спинного мозку при хронічних больових синдромах.

Для вивчення цього питання на гострих зрізах спинного мозку (СМ), які зберігають структуру СМ та більшість синаптичних контактів, проводилося дослідження змін спонтанних збуджуючих та гальмівних постсинаптичних струмів, які виникають в умовах периферичного запалення та травми спинного мозку. Це дослідження доповнювалося аналізом частоти, амплітуди та кінетики АМРА-рецептор-опосередкованих мініатюрних ЗПСС (мЗПСС), що дозволило виявити клітинну специфічність механізмів змін збуджуючої синаптичної передачі, а також розрізнити пре- та постсинаптичну природу цих змін. Дана робота була також доповнена поведінковими больовими тестами *in vivo*, які показали, що дікатіонні сполуки інгібітори АМРА-рецепторів і модулятори ферменту протеїнкінази С можуть ефективно використовуватися для запобігання розвитку та підтримання хронічного больового синдрому.

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 «Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології» (2011 - 2013; номер державної реєстрації – 0110U004750), «Розробка нових терапевтичних стратегій лікування хронічного болю з малою кількістю побічних ефектів, що базуються на генетичному регулюванні динамічних властивостей глутаматних рецепторів нейронів спинного мозку» (2010 – 2014; номер державної реєстрації – 0110U004761), «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014 – 2018; номер державної реєстрації – 0113U007273) та «Розробка новітніх знеболюючих засобів на основі інгібіторів кальцій-проникних АМРА-рецепторів» (2015 – 2019; номер державної реєстрації – 0115U003632).

Мета дослідження

Мета даної роботи полягала у визначенні змін балансу між збудженням та гальмуванням в нейронній мережі ДР СМ в умовах периферичного запалення та травми спинного мозку, а також у визначенні ймовірних іонних механізмів, що можуть спричинювати ці зміни.

Завдання дослідження

Згідно з цією метою були поставлені наступні завдання:

1. Порівняти амплітудні та частотні характеристики спонтанних ЗПСС в різних типах нейронів поверхневих пластин (ПП) ДР у фізіологічних умовах.
2. Визначити зміни амплітудних та частотних характеристик спонтанних та АМРА-рецептор-опосередкованих мЗПСС в різних типах нейронів ПП ДР в умовах периферичного запалення та при травмі спинного мозку.

3. Визначити зміни амплітудних та частотних характеристик сГПСС та їх вплив на загальний баланс збудження та гальмування в різних типах нейронів ПП ДР при периферичному запаленні та при травмі спинного мозку.

4. Провести аналіз кінетики АМРА-рецептор опосередкованих мЗПСС та зробити висновки щодо можливих змін синаптичних АМРА-рецепторів в різних типах нейронів ПП ДР при хронічному болю.

5. Дослідити антиноцицептивний ефект інтратекального введення дікатіонних інгібіторів АМРА рецепторів та інгібітору протеїнкінази С челеритрину при периферичному запаленні та зробити висновки щодо можливості їх використання для полегшення больового синдрому.

Об'єкт досліджень: збуджуюча та гальмівна синаптична активність в мережі нейронів ПП ДР

Предмет досліджень: зміни збуджуючої та гальмівної синаптичної активності в мережі нейронів ПП ДР при периферичному запаленні та травмі спинного мозку та механізми даних змін

Наукова новизна

В роботі вперше досліджено зміни у балансі збуджуючих та гальмівних синаптичних входів в різних нейронах ПП ДР СМ в умовах периферичного запалення та травми спинного мозку. Особливий інтерес щодо відповідних результатів полягає у тому, що виявилася клітинна специфічність вищеназваних змін. Було продемонстровано, що в переважно збуджуючих адаптативних нейронах ДР периферичне запалення та травма спинного мозку супроводжуються значним підвищенням амплітуди та частоти ЗПСС та одночасним зменшенням цих характеристик для гальмівних спонтанних подій, тоді як для переважно гальмівних тонічних нейронів ситуація є прямо протилежною. Таке зміщення балансу між синаптичним збудженням та гальмуванням призводить до загальної гіперзбудливості ноцицептивної мережі СМ, а, отже, і до виникнення хронічних больових синдромів. Також було вперше досліджено *in vivo* вплив дікатіонних сполук-інгібіторів кальційпроникних АМРА-рецепторів на зменшення больового синдрому при периферичному запаленні.

Теоретичне та практичне значення роботи

Результати, отримані в роботі, мають в основному фундаментальне значення. Визначення змін балансу збудження/гальмування в різних типах нейронів дорсального рогу спинного мозку, що відбуваються при периферичному запаленні та після травми спинного мозку, прояснює загальні принципи виникнення гіперзбудливості ноцицептивної мережі спинного мозку, яка є основною причиною хронічного больового синдрому. До того ж використання різних больових моделей дозволяє знайти відмінності у змінах функціонування нейронних мереж дорсального рогу при хронічному болю різного генезу.

Практична цінність даної роботи полягає у встановленні клітинної специфічності змін балансу збудження та гальмування в нейронах ДР СМ при хронічних больових синдромах різного генезу. Цей факт має обов'язково враховуватись при розробці

нових стратегій та прийомів у боротьбі з хронічним болем, особливо тих, які будуть ґрунтуватися на модуляції функціонування ноцицептивної мережі спинного мозку. До практичної цінності даної роботи відноситься також встановлення того факту, що дікатіонні - сполуки-інгібітори кальційпроникних AMPA-рецепторів - можуть успішно застосовуватися для полегшення хронічного больового синдрому, викликаного периферичним запаленням.

Особистий внесок здобувача

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

Електрофізіологічні експерименти та оформлення публікацій були проведені разом із співавтором опублікованих робіт співробітником інституту ім. О. О. Богомольця НАН України, к. б. н. Копач О. В. Експериментальне моделювання травми спинного мозку проводилося у тісній співпраці зі співробітником Національного Медичного Університету України ім. О. О. Богомольця д. мед. н. Медведєвим В. В. Аналіз провідності синаптичних AMPA-каналів в умовах травми спинного мозку було проведено у співробітництві зі співробітником інституту ім. О. О. Богомольця НАН України, к. б. н. Борисюк А. Л.

Мета дослідження, планування робіт, обговорення результатів експериментів та формулювання висновків досліджень проводилося за участі наукового керівника д.б.н., проф. Войтенко Н. В., а також д. б. н., проф. Білана П. В.

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи доповідались на двох щорічних конференціях американського товариства нейронаук, США (Сан Дієго, 2013; Вашингтон, 2017), VI конгресі українського товариства нейронаук (Україна, Київ, 2014), VIII міжнародному симпозиумі 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 симпозиумі з фізіології гладеньких м'язів, біофізики та фармакології (Україна, Київ, 2017), а також на семінарах сектора молекулярної фізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця.

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 15 друкованих робіт: 6 статей у міжнародних наукових журналах та 9 тез доповідей на 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 (157 найменувань). Робота викладена на 126 сторінках машинописного тексту та проілюстрована 54 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

В розділі **Матеріали та методи дослідження** описані методичні підходи, використані при виконанні роботи. В даній роботі для експериментів використовували самців щурів лінії Вістар.

Експериментальні моделі. Периферичне запалення викликали підшкірною ін'єкцією повного ад'юванту Фройнда (ПАФ, Sigma Aldrich, США) у задню кінцівку щура (50 мкл ПАФ в пропорції 1:1 з 0,9 % розчином NaCl). Травму спинного мозку (ТСМ) моделювали лівобічною гемісекцією спинного мозку.

Больові поведінкові тести. Для визначення наявності хронічного больового синдрому у піддослідних тварин, а також для дослідження впливу дікатионних сполук-блокаторів АМРА-рецепторів та інгібітору ферментів-модуляторів РКС проводили больові поведінкові тести. Зміни периферичної чутливості у відповідь на термічний стимул оцінювали методом Харгрівса (Hargreaves et al., 1988). Для дослідження больової чутливості тварин у відповідь на механічний стимул застосовували подразнення філаментами фон Фрея.

Імплантація інтратекального катетеру проводили згідно з процедурою, детально описаною раніше (Korach et al., 2017).

Електрофізіологічні експерименти. Електрофізіологічні дослідження проводили на зрізах СМ, котрі отримували способом, описаним раніше (Korach, Medvediev, et al., 2017; Korach et al., 2015). переміщували до експериментальної камери, котру перфузували зі швидкістю 1,5-2 мл/хв насиченим карбогеном розчином Кребса, який мав наступний склад (ммоль/л): NaCl – 125, NaHCO₃ – 26, KCl – 2,5, MgCl₂ – 1, CaCl₂ – 2, NaH₂PO₄ – 1,25, глюкоза – 10 (рН 7,4, осмолярність 310-315 мОсм). Нейрони ПП ДР візуалізували за допомогою мікроскопу Olympus BX50WI (Olympus, Японії) з водно-імерсійним об'єктивом (×60). Петч-піпетки мали опір 3-4 МΩ при заповненні внутрішньоклітинним розчином наступного складу (ммоль/л): калію глюконат – 133, NaCl – 5, MgCl₂ – 0,5, Mg-АТР – 2, Na-ГТР – 0,5, HEPES – 10 та EGTA – 0,5 (рН 7,2; осмолярність 290 мОсм). Відведення трансмембранних струмів та подача командних імпульсів здійснювали за допомогою підсилювача MultiClamp 700B (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; для реєстрації ГПСС потенціал дорівнював 0 мВ. Реєстрацію мЗПСС проводили при -70 мВ за присутності в розчині Кребса наступних блокаторів (мкмоль/л): ТТХ - 0,2, CdCl₂ - 100, AP5 - 50, стрихнін - 2, бікукулін - 5.

Аналіз постсинаптичних струмів. Постсинаптичні струми детектували за допомогою програми MiniAnalysis (Synaptosoft, США). Аналізували лише ті реєстрації, у котрих не відбувалося змін базової лінії струму, середньоквадратичне значення шуму якої не перевищувало 3пА при фіксації потенціалу на -70 мВ та 4-4,5 пА при фіксації на рівні 0 мВ. Детектування проводилася в основному в ручному режимі шляхом 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 хибно-позитивних подій.

Спонтанні та мініатюрні ЗПСС та спонтанні ГПСС аналізували за частотою (загальна кількість задетектованих подій, поділена на тривалість реєстрації), інтервалом між подіями (часовий проміжок між двома сусідніми піками), амплітудою, інтегральною величиною (площею) постсинаптичного струму та кінетикою його спаду. При аналізі сЗПСС та мЗПСС час спаду фіксувався програмою автоматично та визначався як часовий проміжок між піком синаптичної події та часом, за який величина струму зменшувалася до 37% амплітуди. Час спаду сГПСС характеризували часовою константою моноекспоненційної апроксимації постсинаптичного струму. Провідність одиночних каналів (γ) постсинаптичних AMPA-рецепторів оцінювали з використанням **нестационарного флуктуаційного аналізу шуму** (Traynelis et al., 1993).

Статистична обробка результатів дослідження. Для визначення нормальності розподілів числових даних, усі набори останніх аналізували із застосуванням тесту Шапіро-Вілка. Якщо вибірки були розподілені за Гаусом, то вони представлялися у вигляді «середнє значення \pm похибка середнього» та їх порівнювали між собою за допомогою «двоххвостового» парного або непарного t-тесту Стьюдента. Більшість розподілів даних не відповідали критерію нормальності, тому для них наводили лише медіанне значення вибірок, достовірність відмінностей яких порівнювали за допомогою непараметричних тестів Манна-Вітні та Колмогорова-Смірнова. В даній роботі проводили: а) аналіз загальних вибірок конкретного параметру для усіх збуджуючих або гальмівних синаптичних подій в усіх клітинах (достовірність різниці між функціями ймовірності визначали за тестом Колмогорова-Смірнова), б) аналіз медіанних значень параметрів по клітинах (статистичну достовірність визначали за тестом Манна-Вітні). Критерієм достовірності відмінностей для всіх статистичних тестів було значення $p < 0,05$. У всіх випадках наводилося також значення числа експериментів (n), яке дорівнювало кількості клітин у електрофізіологічних дослідах.

Результати дослідження та їх обговорення

Специфіка мережевої синаптичної активності в різних популяціях нейронів поверхневих пластин спинного мозку

В експериментах були виявлені тонічні нейрони, які могли генерувати потенціали дії протягом всієї тривалості стимулу струму (Рис. 1А), а також нейрони, які адаптувалися («односпайкові» нейрони та нейрони, які генерували ПД лише на початковому етапі ін'єкції струму, Рис.1А). Оскільки адаптивні відповіді пов'язані в основному з А-типу калієвим струмом (Melnick et al., 2004; Todd, 2010; Yasaka et al., 2010), в даній роботі ми розділяли нейрони поверхневих пластин дорсального рогу на дві основні популяції – тонічні та адаптивні. З літературних джерел відомо, що в поверхневих пластинках дорсального рогу тонічні нейрони є переважно гальмівними, в той час як нейрони, які проявляють адаптивні властивості, є в основному збуджуючими.

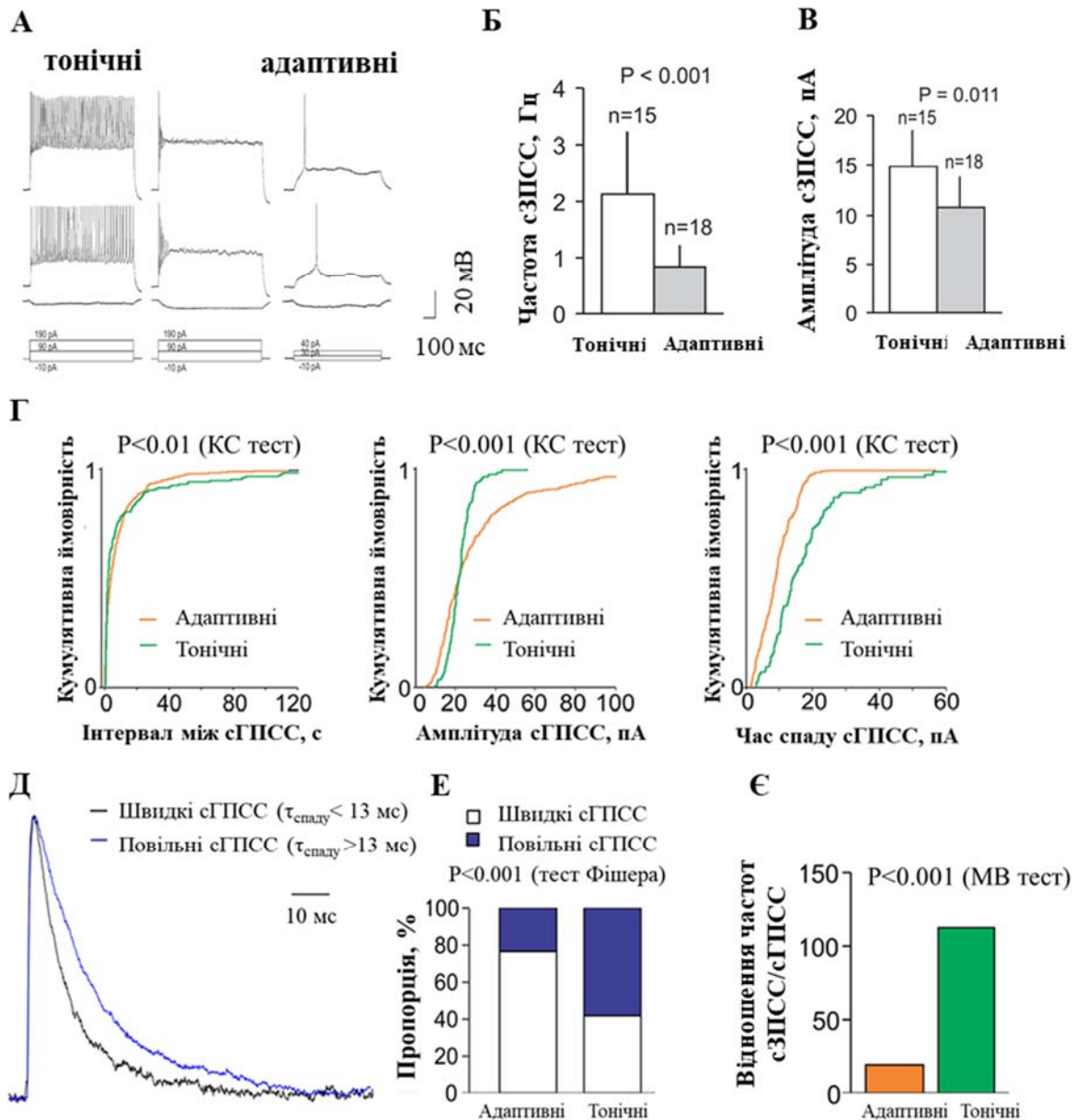


Рис. 1. Специфіка збуджуючої та гальмівної синаптичної передачі в нейронах ПП ДР, що належать до різних типів. А - відповіді нейронів ПП ДР на стимуляцію прямокутними поштовхами струму в режимі фіксації струму. Б, В – медіанні значення частоти (Б) та амплітуди (В) сЗПСС в тонічних та адаптивних нейронах ПП ДР. Г- графіки кумулятивної ймовірності інтервалів між сГПСС, амплітуд та часів спаду сГПСС в тонічних та адаптивних нейронах за контрольних умов. Д – усереднені та нормовані криві «швидких» та «повільних» сГПСС. Е – відносні кількості «швидких» та «повільних» сГПСС в адаптивних та тонічних нейронах. Є – баланс збудження та гальмування, виражений як відношення частоти сЗПСС до частоти сГПСС в адаптивних та тонічних нейронах ПП ДР в контрольних умовах.

У фізіологічних умовах амплітудні та частотні характеристики сЗПСС в тонічних та адаптивних нейронах ПП ДР статистично достовірно розрізнялися. Медіанна частота сЗПСС в тонічних нейронах була 2,1 Гц (n=15), в той час як в ададаптивних нейронах ПП ДР вона становила 0,8 Гц (n=19, різниця ~ 62 %, $p < 0,001$, тест Манна-Вітні; Рис.1Б). Медіанна амплітуда сЗПСС в тонічних нейронах

становила ПП ДР 14,8 пА (n=15), а в адаптивних нейронах вона складала 10,8 пА (n=20, різниця ~ 27 %, p=0,011, тест Манна-Вітні; Рис. 1В).

У фізіологічних умовах тонічні та адаптивні нейрони ПП ДР розрізнялися за величинами не тільки збуджуючої, але й гальмівної мережевої синаптичної інервації. Статистично достовірна різниця була знайдена навіть для інтервалів сГПСС (p<0,01, тест Колмогорова-Смірнова; Рис. 1Г); кумулятивні ймовірності амплітуди (p<0,001, тест Колмогорова-Смірнова; Рис. 1Г) та часу спаду (p<0,001, тест Колмогорова-Смірнова; Рис. 1Г) різнилися ще істотніше. Популяції спонтанних гальмівних подій як в тонічних, так і в адаптивних нейронах були гетерогенними. Додатковий аналіз показав, що сГПСС можна було розділити на дві категорії – «швидкі», з часом спаду менше 13 мс, та «повільні», у яких, відповідно, кінетика була повільнішою (Рис. 1Д). Пропорції «швидких» та «повільних» сГПСС у двох різних популяціях нейронів ПП ДР статистично достовірно розрізнялася (p<0,001, точний тест Фішера; Рис. 1Е). В адаптивних нейронах синаптичне гальмування відбувалося за рахунок гліцинергічних сЗПСС, оскільки частка «швидких» подій у порівнянні з часткою «повільних» була більш ніж втричі більшою (77 % проти 23 %, відповідно). В тонічних нейронах мережева гальмівна активність проявлялася інакше; частки «швидких» та «повільних» подій не відрізнялися кардинально, а частка «повільних» подій у фізіологічних умовах був помітно більшою (42 % проти 58%). Статистичний аналіз поклітинних вибірок дозволив встановити, що для адаптивних нейронів медіанне співвідношення складало 19,8 (n=14), а для нейронів з тонічним типом генерації ПД - 113 (n=10, p<0,001, тест Манна-Вітні; Рис. 1Є). Це свідчить про клітинну специфічність синаптичних входів в нейронній мережі ПП ДР, а також про істотніше синаптичне збудження переважно гальмівної популяції тонічних нейронів.

Зміни мережевої синаптичної активності в нейронах ПП ДР за наявності периферичного запалення

Зміни збуджуючої синаптичної передачі в мережі ПП ДР при наявності периферичного запалення були клітиноспецифічними. В адаптивних нейронах в умовах периферичного запалення частота сЗПСС була значно більшою: медіанне значення частот, розраховане по вибірці клітин, дорівнювало 0,8 Гц (n=19) в контрольних умовах та досягало аж до 2,3 Гц (n=21, ~177 % підвищення) через одну добу після ін'єкції ПАФ (p<0,001, тест Манна-Вітні; Рис. 2Аб). Периферичне запалення змінювало також й амплітудні характеристики спонтанної збуджуючої синаптичної активності в адаптивних нейронах: медіанне значення амплітуди сЗПСС, розраховане по вибіркам подій, збільшувалося на 12 % (p<0,001, тест Колмогорова-Смірнова; Рис. 2Аа). В багатьох тонічних клітинах, навпаки, спостерігалось зменшення частоти сЗПСС (Рис. 3.20), хоча таке зрушення і було недостовірним. Медіанна амплітуда в контрольних умовах дорівнювала 2,1 Гц (n=15), а при периферичному запаленні – 1,6 Гц (n=11, p=0,47, тест Манна-Вітні; Рис. 1Бб). На відміну від адаптивних, в тонічних нейронах ін'єкція ПАФ призводила до зменшення амплітуд сЗПСС на 13 % (p<0,001, тест Колмогорова-Смірнова; Рис. 1Ба).

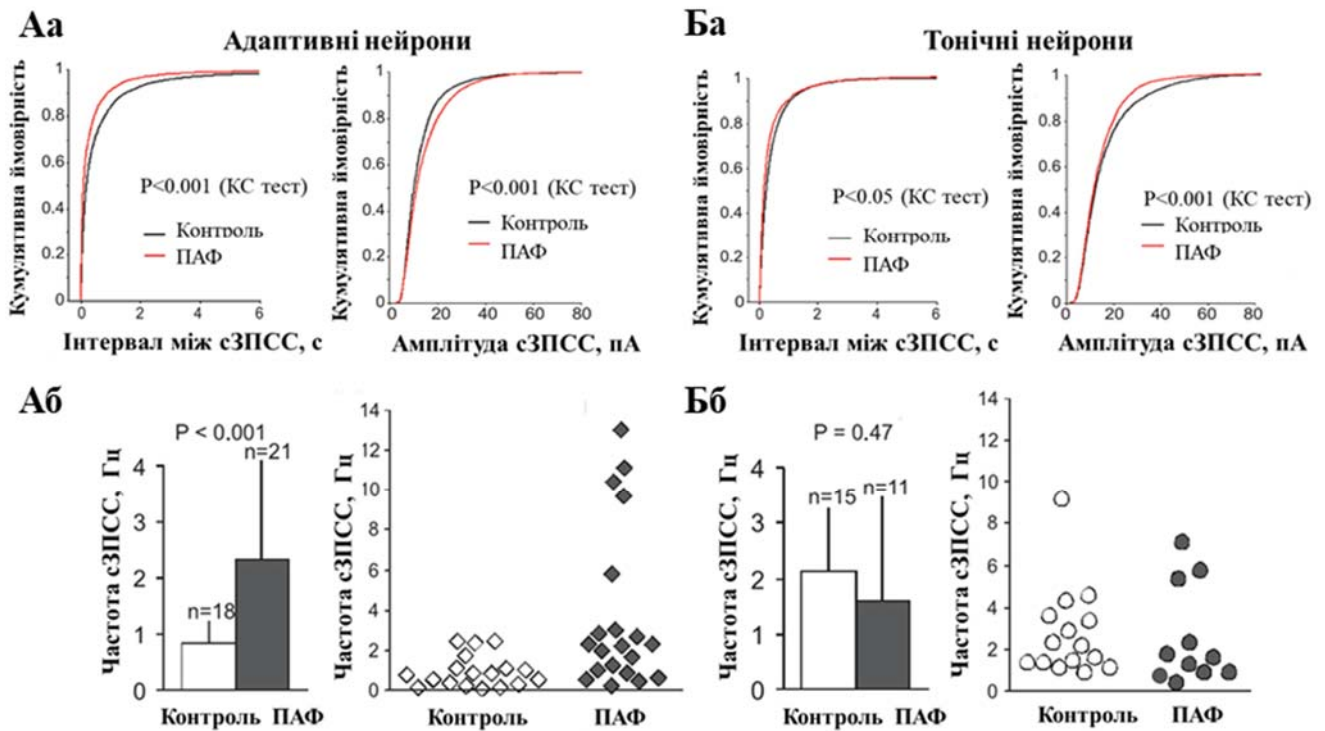


Рис. 2. Клітинна специфічність змін спонтанної збуджуючої активності при індукції периферичного запалення. Аа, Ба – графіки кумулятивні ймовірності для амплітуд та інтервалів між сЗПСС в адаптивних (Аа) та тонічних (Ба) нейронах у контрольних умовах та при периферичному запаленні. Ба, Бб – Медіанні (зліва) та індивідуальні частоти сЗПСС в адаптивних (Ба) та тонічних (Бб) нейронах у контрольних умовах та при периферичному запаленні.

Зміни АМРА-рецептор-опосередкованої мініатюрної активності також були клітиноспецифічними та фактично мали такий самий характер, як і зміни сЗПСС. В адаптивних нейронах медіанний інтервал між мініатюрними синаптичними подіями, розрахований по їх вибіркам, ставав суттєво меншим (~230 %, $p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова; Рис. 3А), що вказувало на відповідне зростання частоти, а, отже, й на збільшення ймовірності викиду нейротрансмітера в синапсах адаптивних нейронів. Медіанне значення амплітуд, розраховане по вибіркам подій, збільшувалося на 42 % ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова; Рис. 3А), що, скоріш за все, свідчить про зміни складу синаптичних АМРА-рецепторів. Медіанний час спаду, розрахований по вибірці подій, зростав на 23 % в адаптивних нейронах в умовах периферичного запалення ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова; Рис. 3А). Детальний аналіз показав суттєвий перерозподіл подій за часом їх спаду (Рис. 3Ва). В тонічних нейронах медіанний інтервал між мЗПСС змінювався слабо (~9 %, Рис. 3Б), а медіанні амплітуди мЗПСС, розраховані по вибірках подій, при хронічному запаленні зменшувалися (~23 %, $p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова; Рис. 3Б). Аналіз щільностей ймовірності часу спаду мЗПСС вказував на подовження кінетики, проте, на відміну від адаптивних нейронів, форма розподілу зберігалася, а сама функція щільності ймовірності зміщувалася вправо, тобто в бік більших значень часу спаду мЗПСС (Рис. 3Вб).

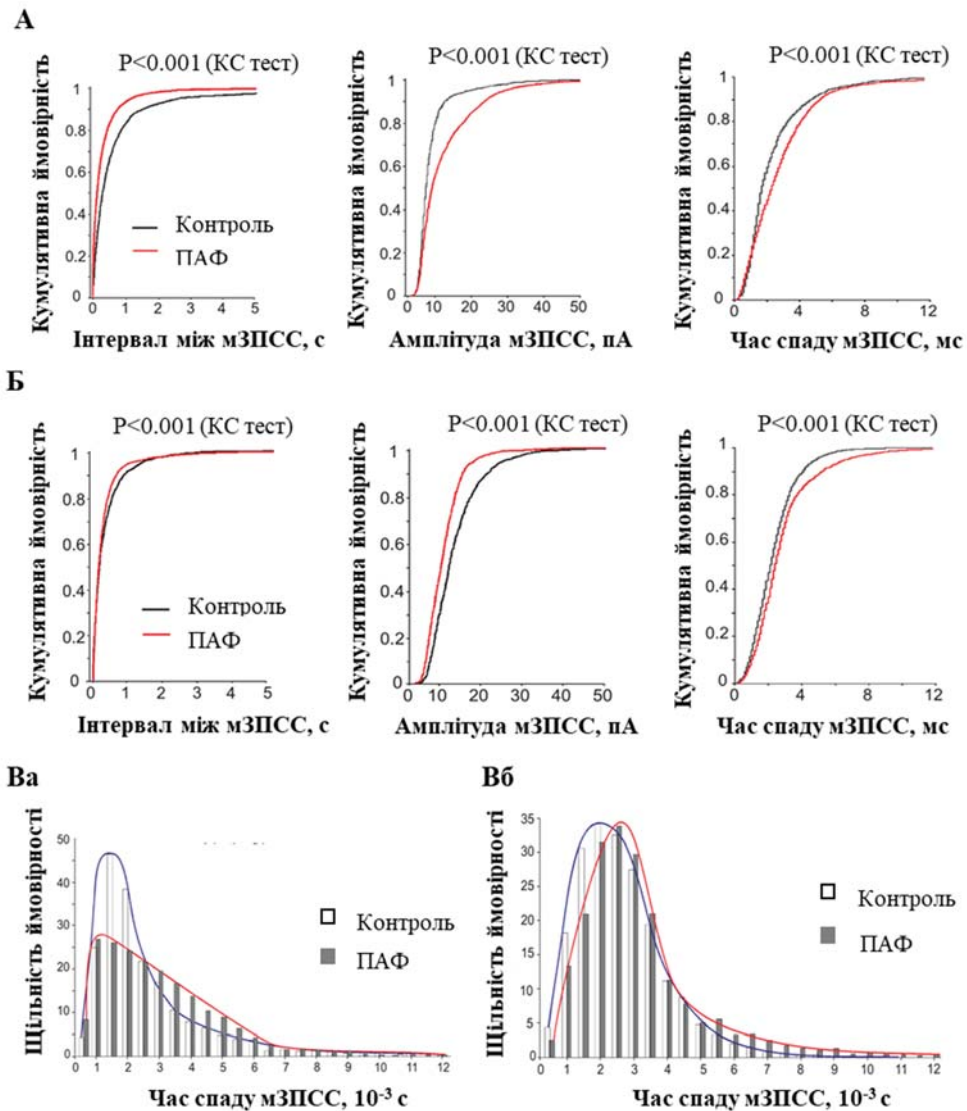


Рис. 3. Клітинна специфічність змін характеристик мініатюрної збуджуючої синаптичної передачі при периферичному запаленні. А, Б – графіки кумулятивних ймовірностей для амплітуд, часів спаду мЗПСС та інтервалів між ними в адаптивних (А) та тонічних (Б) нейронах в контрольних умовах та при периферичному запаленні. Ва, Вб – розподіли часів спаду мЗПСС у контрольних умовах та при периферичному запаленні в адаптивних (Ва) та тонічних (Вб) нейронах.

Клітинна специфічність впливу периферичного запалення була також характерна і для гальмівної синаптичної передачі, проте зміни характеристик гальмування були протилежними в порівнянні зі змінами синаптичного збудження. В адаптивних нейронах частота спонтанних ГПСС змінювалася слабо, а амплітуда сГПСС виявляла тенденцію до зменшення (Рис. 4А). В тонічних нейронах на відміну від адаптивних периферичне запалення, навпаки, призводило до зменшення розрахованого за вибіркою подій медіанного інтервалу між спонтанними ГПСС на 59 % ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова; Рис. 4А); це, зрозуміло, свідчило про збільшення частоти сГПСС. Медіанна амплітуда сГПСС у популяції тонічних

нейронів ПП ДР після індукування запалення збільшувалася на 28 % ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова; Рис. 4А).

Таким чином, периферичне запалення посилює збудження та зменшує інтенсивність гальмування переважно збуджуючих адаптивних нейронів, проте зменшує збудження та збільшує гальмування переважно гальмівних тонічних нейронів. Така зміна балансу збудження та гальмування (Рис. 4Ва-Вб), ймовірно, і призводить до проявів центральної сенситизації та розвитку хронічного болювого синдрому.

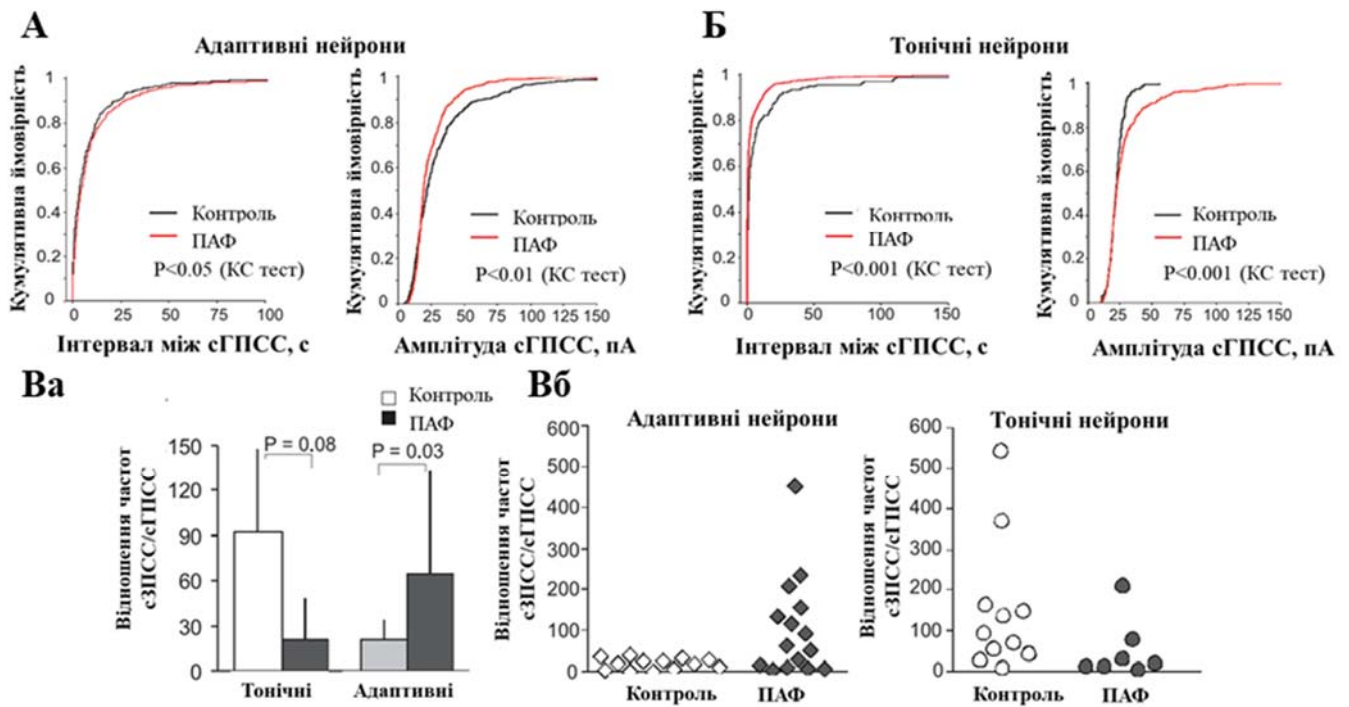


Рис. 4. Клітинна специфічність змін характеристик спонтанної гальмівної синаптичної передачі при периферичному запаленні. А, Б – графіки кумулятивних ймовірностей для амплітуд сГПСС та інтервалів між ними в адаптивних(А) та тонічних (Б) нейронах в контрольних умовах та при периферичному запаленні. Медіанні (Ва) та індивідуальні (Вб) значення балансу збудження та гальмування, вираженого як відношення частоти сЗПСС до частоти сГПСС, в адаптивних та тонічних нейронах ПП ДР в контрольних умовах та при периферичному запаленні.

Зміни мережевої синаптичної активності в нейронах ПП ДР при травмі спинного мозку

Зміни синаптичного збудження та гальмування, викликані ТСМ, принципово не відрізнялися від викликаних периферичним запаленням. Їм також була характерна клітинна специфічність та різноспрямованість як змін балансу синаптичного збудження та гальмування, так і механізмів, котрі їх опосередковують.

В адаптивних нейронах спостерігалася збільшення частоти сЗПСС з 0,83 Гц в контролі до 7,6 Гц при ТСМ ($p < 0,01$, тест Манна-Вітні; Рис. 5А). При цьому медіанна амплітуда також суттєво зростала - з 7,2 пА в контрольних умовах до 16,6 пА після

ТСМ ($p < 0,05$, тест Манна-Вітні; Рис. 5Б). Зміни частот та амплітуд спонтанної збуджуючої активності в адаптивних нейронах ПП ДР при ТСМ були пов'язані між собою: коефіцієнт кореляції Спірмена збільшувався з 0,38 ($n=17$, $p=0,12$) до 0,83 та ставав статистично достовірним ($n=12$, $p < 0,001$; Рис. 5В). Цей факт може свідчити на користь залежної від активності ап-регуляції глутаматних рецепторів в синапсах адаптивних нейронів.

Травма спинного мозку змінювала частотні, амплітудні та кінетичні характеристики мЗПСС в адаптивних нейронах. При цьому характер таких змін співпадав зі спровокованими ТСМ варіаціями параметрів спонтанних ЗПСС і відповідав посиленню синаптичного збудження. Медіанні значення амплітуди, площі та часу спаду мЗПСС зростали при ТСМ на 60 %, 113 % та 71 %, відповідно ($p < 0,01$, тест Манна-Вітні; Рис. 5Д). Розглянуті разом, вищенаведені факти засвідчують, що збільшення синаптичного збудження відбувається за рахунок як пре- так і постсинаптичних механізмів. Додатковий аналіз щільностей ймовірностей показав, що розподіл мЗПСС за часом спаду змінював профіль та зміщувався в сторону більших значень кінетики АМРА-опосередкованих мініатюрних подій ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова; Рис. 5Е). Уповільнення кінетики спаду мЗПСС давало підстави для гіпотези, що як і при периферичному запаленні, при травмі спинного мозку в адаптивних нейронах ПП ДР відбуваються зміни трафікінгу АМРА-рецепторів на користь кальційнепроникних каналів. Ця гіпотеза була підтверджена результатами нестационарного флуктуаційного аналізу АМРА-опосередкованих мЗПСС, котрі показали достовірно зменшену провідність цих постсинаптичних каналів (19,9 пСм у контрольних умовах та 6,1 пСм при ТСМ; Рис. 5Є), характерну саме для GluA2-вмісних кальційнепроникних АМРА-рецепторів.

На відміну від адаптивних нейронів нанесення ТСМ призводило до зменшення синаптичного збудження переважно гальмівних тонічних нейронів. Медіанний інтервал між сЗПСС, збільшувався на 49 % ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова; Рис. 6А), що відповідало зменшенню частоти сЗПСС. Медіанні значення амплітуд сЗПСС, як розраховані по вибірці подій ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова; Рис. 6Б), так і розраховані по вибірці клітин, зменшувалися приблизно на 20 % ($p < 0,05$, тест Манна-Вітні; Рис. 6В). Характер змін мініатюрної синаптичної активності в тонічних нейронах співпадав зі змінами спонтанних ЗПСС та здебільшого був подібним в умовах ТСМ та хронічного запалення. Медіанна амплітуда мЗПСС зменшувалася на 32 % ($p < 0,01$, тест Манна-Вітні; 6Д). Медіанна площа мЗПСС збільшувалася при ТСМ на ~26 % ($p < 0,01$, тест Манна-Вітні; Рис. 6Д). При цьому такі зміни швидше за все були пов'язані саме зі зменшенням амплітуд мЗПСС, оскільки медіанна величина часу спаду мЗПСС при ТМС проявляла тенденцію до збільшення (~9 %, $p < 0,01$, тест Манна-Вітні; Рис. 6Д). Додатковий аналіз щільностей ймовірностей показав, що розподіл мЗПСС за часом спаду не зазнавав суттєвих змін (Рис. 6Е). Аналіз провідностей постсинаптичних АМРА-рецепторів також не виявив суттєвих відмінностей. За контрольних умов величина провідності дорівнювала 11,0 пСм, а при ТСМ – 9,1 пСм (Рис. 6Є). Враховуючи ці факти, а також зниження амплітуди мЗПСС, логічно припустити, що відбувалося ТСМ-опосередковане зменшення кількості постсинаптичних АМРА-рецепторів в тонічних нейронах, тобто

відбувалися зміни трафікінгу, які супроводжувалися підвищеною інтерналізацією рецепторів.

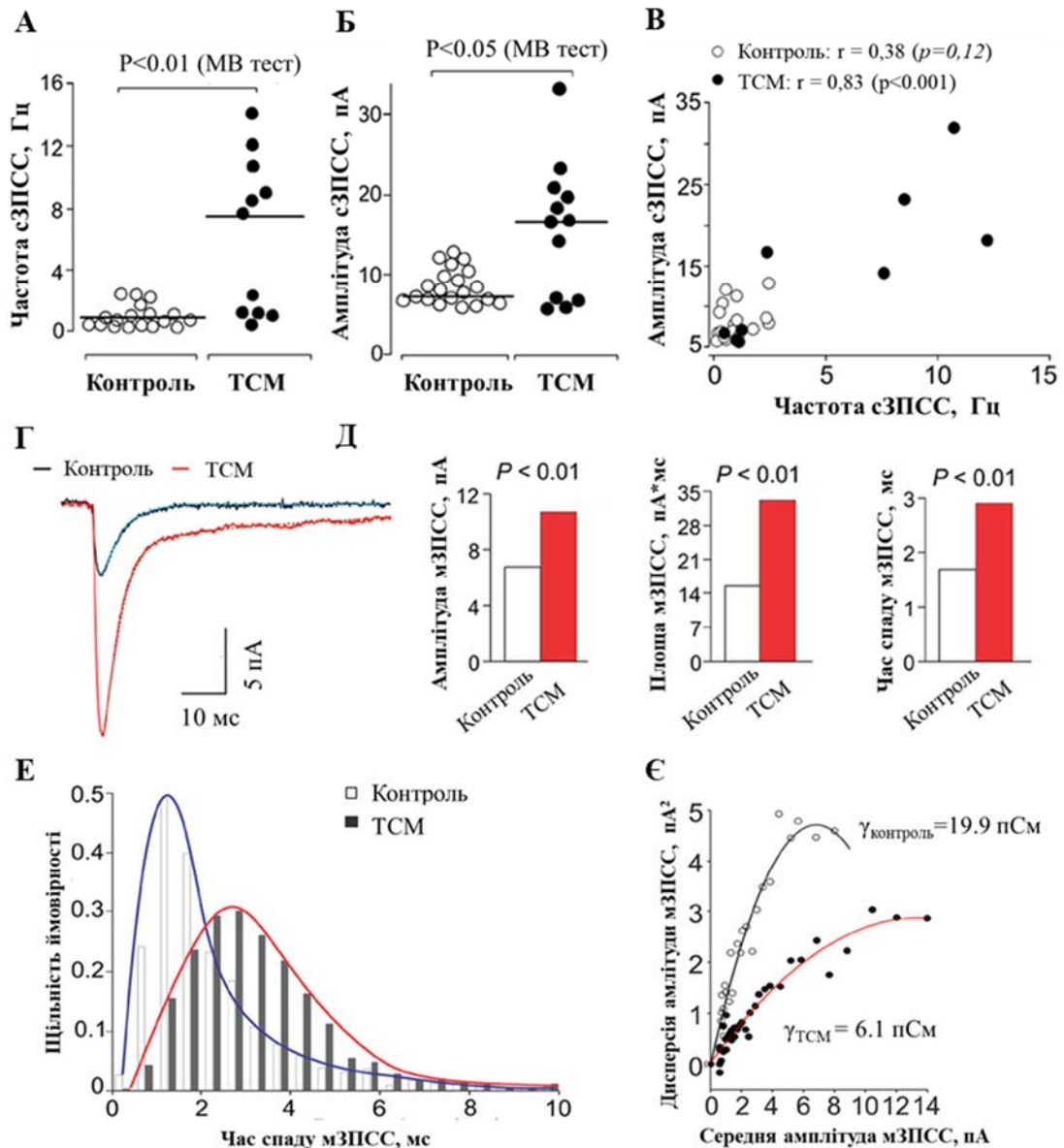


Рис. 5. Збільшення ефективності збуджуючої синаптичної передачі в адаптивних нейронах при травмі спинного мозку. А, Б – індивідуальні та медіанні значення частоти та амплітуди сЗПСС в адаптивних нейронах у контрольних умовах та при ТСМ. В – кореляційна гістограма для медіанних частот та амплітуд в адаптивних нейронах у контрольних умов та при ТСМ. Г – усереднені АМРА-рецептор-опосередковані мЗПСС в адаптивних нейронах у контрольних умовах та при ТСМ. Д – медіанні значення амплітуди, площі та часу спаду мЗПСС в адаптивних нейронах у контрольних умовах та при ТСМ. Е – розподіл часу спаду мЗПСС в адаптивних нейронах у фізіологічних умовах та після ТСМ. Є – провідності одиночних синаптичних АМРА-каналів, розраховані з використанням нестационарного флуктуаційного аналізу шуму, в адаптивних нейронах у контролі та після ТСМ.

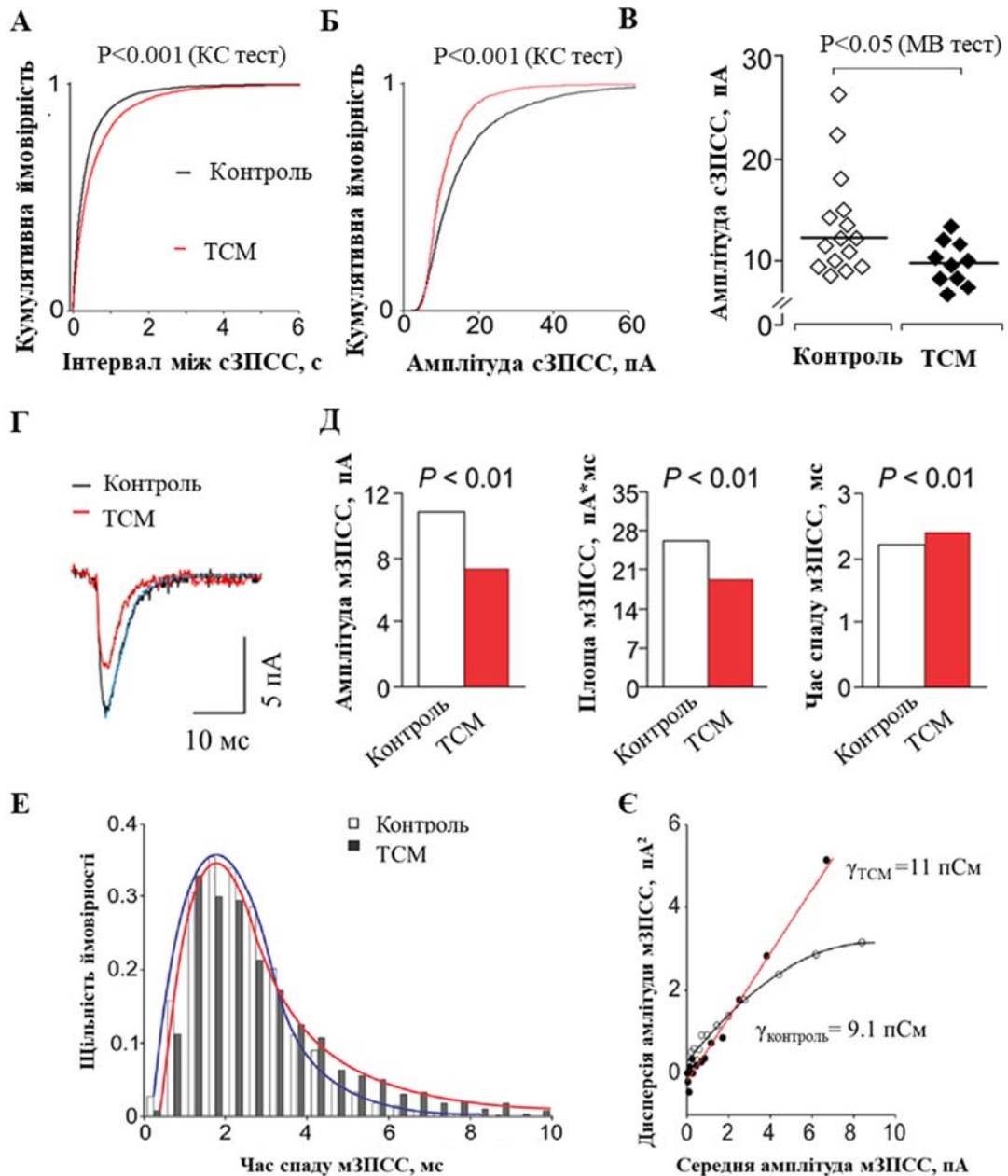


Рис. 6. Зменшення інтенсивності збуджуючої синаптичної передачі в тонічних нейронах ПП ДР при травмі спинного мозку. А, Б – графіки кумулятивних ймовірності для амплітуд сЗПСС та інтервалів між ними в тонічних нейронах у фізіологічних умовах та після TCM. В – індивідуальні значення медіанних амплітуд сЗПСС в тонічних нейронах у фізіологічних умовах та після TCM. Г – усереднені AMPA-рецептор-опосередковані мЗПСС в тонічних нейронах у контрольних умовах та при TCM. Д – медіанні значення амплітуди, площі та часу спаду мЗПСС в тонічних нейронах у контрольних умовах та при TCM. Е – розподіл часу спаду мЗПСС в тонічних нейронах за фізіологічних умов та після TCM. Є – провідності одиночних синаптичних AMPA-каналів, розраховані з використанням нестационарного флуктуаційного аналізу шуму, в тонічних нейронах у фізіологічних умовах та після TCM.

Клітинна специфічність була також характерна і для гальмівної синаптичної передачі. Проте після ТСМ, як і при периферичному запаленні, ця властивість характеризувалася різноспрямованістю в порівнянні зі змінами у синаптичному збудженні.

В адаптивних нейронах ТСМ призводила до зменшення частоти гальмівних подій на ~43 % ($p < 0,001$, тест Манна-Вітні; Рис. 7А), а амплітуди – на ~25 % ($p < 0,001$, тест Манна-Вітні; Рис. 7А). Спонтанні синаптичні події були також проаналізовані за кінетикою їх спаду. Результати даного аналізу показали, що після ТСМ зменшення частоти є приблизно однаковим як для «швидких» (гліцин-опосередкованих), так і для «повільних» (ГАМК-опосередкованих) подій, оскільки їх частки практично не розрізнялися (відповідно 77 % та 23 % в контролі та 78 % та 22 % при ТСМ, $p > 0,7$, точний тест Фішера; Рис. 7Б). Медіанна амплітуда швидких сГПСС дорівнювала 23 пА в контролі та зменшувалася до 16 пА після ТСМ ($p < 0,001$, тест Манна-Вітні; Рис. 7Г). ТСМ також змінювала розподіл швидких сГПСС за часом спаду, що виражалось у зменшенні медіанної величини цього параметру сГПСС з 7,6 мс у контрольних умовах до 5,2 мс після ТСМ ($p < 0,01$, тест Манна-Вітні; Рис. 7Г). Амплітуди та кінетика спаду «швидких» сГПСС були скорельованими, причому коефіцієнт кореляції Спірмена достовірно знижувався з 0,60 ($p < 0,01$) у фізіологічних умовах до 0,38 ($p < 0,05$) після ТСМ ($p < 0,01$; Рис. 7Д). Ці факти, ймовірно, свідчать на користь зміни трафікінгу та зміни субодиничного складу синаптичних гліцинових рецепторів, які опосередковують гальмівні постсинаптичні струми зі швидкою кінетикою.

В тонічних нейронах зміни гальмівної синаптичної активності не були настільки яскраво вираженими, як в адаптивних нейронах. Аналіз вибірок клітин не виявив достовірної різниці між медіанними значеннями частоти та амплітуди ($p = 0,80$ та $p = 0,40$ для частоти та амплітуди відповідно, тест Манна-Вітні; Рис. 8А). Аналіз кінетики спаду спонтанних гальмівних синаптичних подій показав наявність суттєвих відмінностей між змінами, які ТСМ спричиняє в різних популяціях нейронів ПП ДР. На відміну від адаптивних нейронів, в тонічних нейронах виявлявся значний та статистично достовірний ($p < 0,001$, точний тест Фішера) перерозподіл часток «швидких» та «повільних» синаптичних подій. Зі схожих відсоткових часток (42% проти 58%) у контрольних умовах пропорція зміщувалася на користь «швидких» синаптичних подій (Рис. 8Б), що свідчить про збільшення внеску гліцин-опосередкованого гальмування. Розгорнутий аналіз характеристик «швидких» синаптичних подій показав збільшення їх амплітуди ($p < 0,05$, тест Колмогорова-Смірнова; Рис. 8Г). При ТСМ значення часу спаду «швидких» сГПСС та їх амплітуди ставали скорельованими: коефіцієнт кореляції Спірмена дорівнював 0,44 ($p < 0,001$), в той час як у контрольних умовах він складав 0,09 ($p = 0,6$; Рис. 8Д). Це може вказувати на залежну від активності зміни трафікінгу гліцинових рецепторів в синапсах тонічних нейронів ПП ДР при травмі спинного мозку.

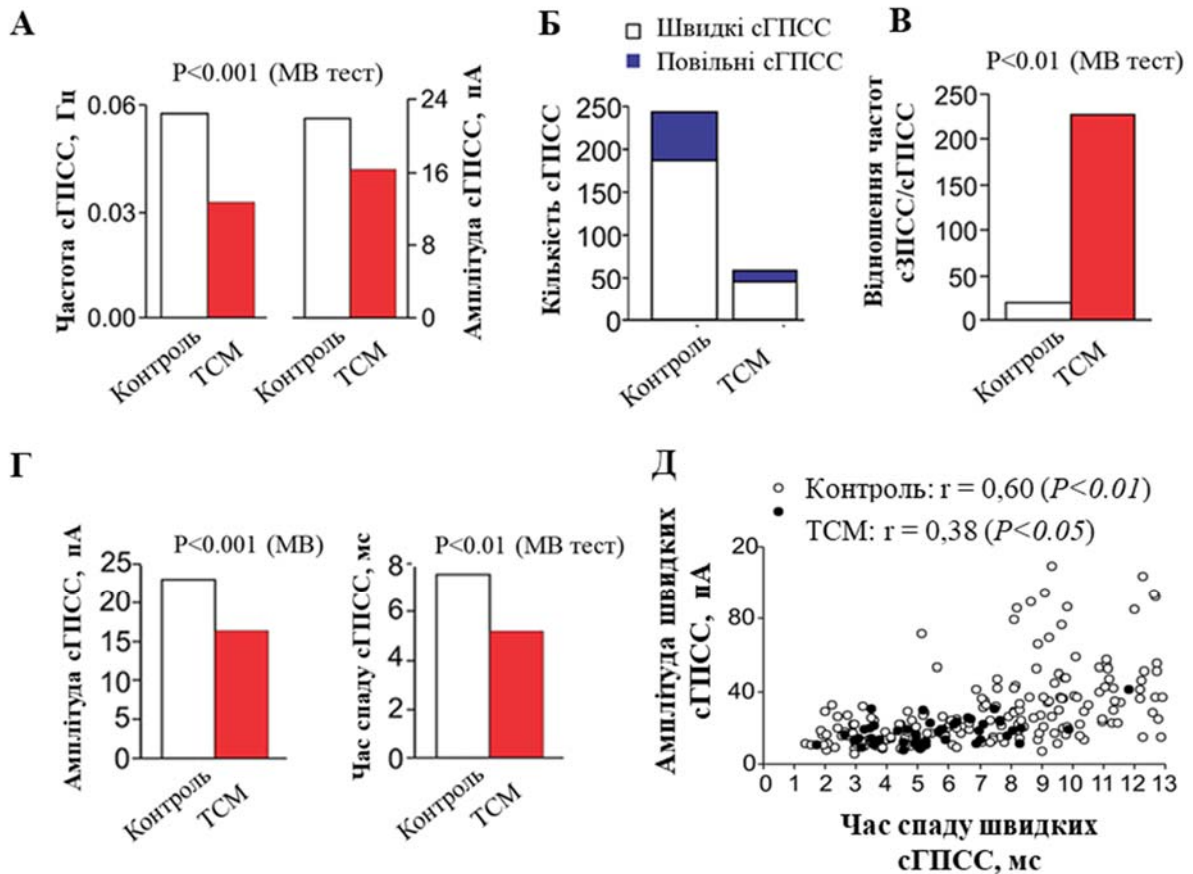


Рис. 7. Зменшення ефективності гальмівної синаптичної передачі в адаптивних нейронах ПП ДР при травмі спинного мозку. А - медіанні значення частоти та амплітуди сГПСС в адаптивних нейронах у фізіологічних умовах та після ТСМ. Б – Кількість «швидких» та «повільних» сГПСС в адаптивних нейронах у фізіологічних умовах та при ТСМ. В - медіанні значення балансу збудження та гальмування, вираженого як відношення частоти сЗПСС до частоти сГПСС, в адаптивних нейронах ПП ДР у контрольних умовах та при ТСМ. Г- Медіанні значення амплітуди та часу спаду «швидких» ГПСС в адаптивних нейронах у фізіологічних умовах та при ТСМ. Д – кореляційні гістограми амплітуди «швидких» сГПСС від часу їх спаду в адаптивних нейронах у контролі та після ТСМ.

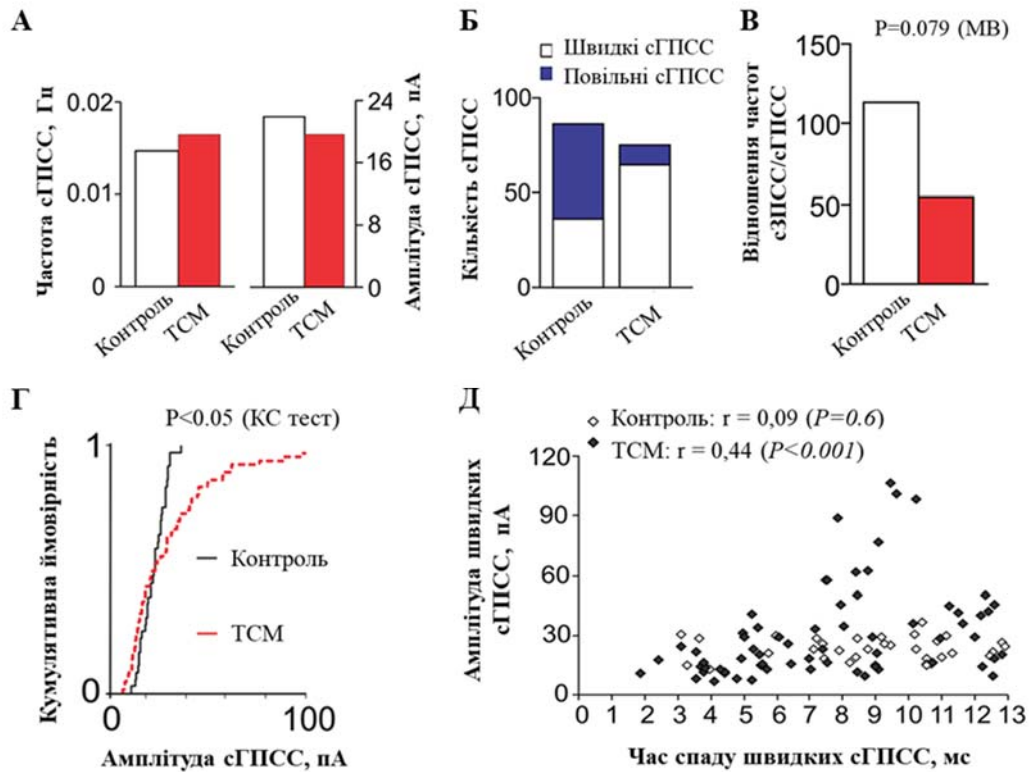


Рис. 8. Збільшення ефективності гальмівної синаптичної передачі в тонічних нейронах при травмі спинного мозку. А - медіанні значення частоти та амплітуди сГПСС в тонічних нейронах у фізіологічних умовах та після ТСМ. Б – Кількість «швидких» та «повільних» сГПСС в тонічних нейронах у фізіологічних умовах та при ТСМ. В - медіанні значення балансу збудження та гальмування, вираженого як відношення частоти сЗПСС до частоти сГПСС, в тонічних нейронах ІІІ ДР у контрольних умовах та при ТСМ. Г- графіки кумулятивної ймовірності амплітуд «швидких» сГПСС в тонічних нейронах у контрольних умовах та при ТСМ. Д – кореляційні гістограми амплітуди «швидких» сГПСС від часу їх спаду в тонічних нейронах у контролі та при ТСМ.

При травмі спинного мозку, як і при периферичному запаленні, баланс збудження та гальмування, виражений відношенням частот сЗПСС та сГПСС, також був клітинспецифічним. В адаптивних нейронах медіанна величина відношення частот сЗПСС до сГПСС збільшувалася більш ніж в 11 разів - з 20 ($n=14$) в контролі до 228 ($n=10$, $p < 0,01$, тест Манна-Вітні; Рис. 7В) при ТСМ. В тонічних нейронах ситуація була протилежною - відношення частот збуджуючих та гальмівних подій проявляло чітку тенденцію до зменшення: 113 за фізіологічних умов ($n=10$) та 55 при ТСМ ($n=9$, $p=0,079$, тест Манна-Вітні; Рис. 8В). Відповідно, при травмі спинного мозку, так само як і при хронічному периферичному запаленні, баланс збудження та гальмування зміщувався в сторону збудження переважно збуджуючих адаптивних нейронів, але в бік гальмування переважно гальмівних тонічних нейронів. Це дає змогу стверджувати, що клітинспецифічні зміни балансу збудження та гальмування є універсальним механізмом розвитку гіперзбудливості ноцицептивних мереж поверхневих пластин спинного мозку, що опосередковує хронічні больові синдроми будь-якого генезу.

Вплив дікатіонних інгібіторів АМРА-рецепторів та блокатору протеїнкінази С челеритрину на больову чутливість при периферичному запаленні.

Дослідження характеристик мініатюрних збуджуючих постсинаптичних подій при хронічному болю показали, що в адаптивних нейронах відбувається затягування спаду постсинаптичних струмів та зменшення провідності одиночних АМРА каналів. Обидві ці характеристики є типовими для кальційнепроникних GluA2-вмісних АМРА-рецепторів. Тому, беручи до уваги зростання амплітуди спонтанних та мініатюрних ЗПСС, логічно припускати додаткове вбудовування саме цих АМРА-каналів у постсинаптичні мембрани адаптивних нейронів при периферичному запаленні та травмі спинного мозку. Дані літератури, проте, вказують на те, що хронічний біль супроводжується вбудовуванням кальційпроникних АМРА рецепторів в постсинаптичні мембрани (Hartmann et al., 2004; Sullivan et al., 2017; Vikman et al., 2008). Для розв'язання подібного протиріччя була проведена серія поведінкових дослідів з використанням блокаторів кальційпроникних АМРА-рецепторів та інгібіторів протеїнкінази С – ферменту. Один з підтипів останнього ензиму (PKC α) є відповідальним за інтерналізацію GluA2-субодиниці, яка і обумовлює кальцієву непроникність АМРА-каналів (Park et al., 2009). Припускалося, що інтратекальне введення вищеназваних речовин не мало б призводити до значного полегшення больового синдрому у тому випадку, якщо основним іонним механізмом гіперзбудливості мережі ПП ДР є вбудовування GluA2-вмісних кальційнепроникних рецепторів в постсинаптичні мембрани.

Введення дікатіонних сполук-інгібіторів ІЕМ 1460 та ІЕМ 1925 через дві години після індукування периферичного запалення призводило до відновлення термічної чутливості. Цей ефект був тривалим та виявляв концентраційну залежність, діючи ефективніше в концентраціях, більших за IC50 для кальційпроникних АМРА-рецепторів, проте менших за IC50 для кальційнепроникних каналів (Рис. 9А-Б).

Дані літератури свідчать про те, що збільшення кількості кальційпроникних рецепторів при хронічному болю, може відбуватися за рахунок РКС-залежної фосфориляції GluA2-субодиниць, що зумовлює їхню інтерналізацію (Korach et al., 2011, 2013; Park et al., 2009). Це в свою чергу призводить до збільшення частки кальційпроникних АМРА-рецепторів. Саме тому, для того щоб виключити вплив дікатіонних сполук на весь набір АМРА-рецепторів, було проведено серію експериментів з використанням інгібітору РКС челеритрину.

Челеритрин ефективно послаблював больовий синдром, зменшуючи термічну гіперчутливість при інтратекальному введенні за 30хв. до індукції периферичного запалення (Рис. 9Г). Антиноцицептивний ефект челеритрину спостерігався не тільки протягом фази розвитку болю, але й у перебігу фази його підтримання: введення челеритрину через 24 год. після індукування запалення також концентраційнозалежним чином збільшувало латентність відповідей підшовного тесту Харгрівса (Рис. 9Д).

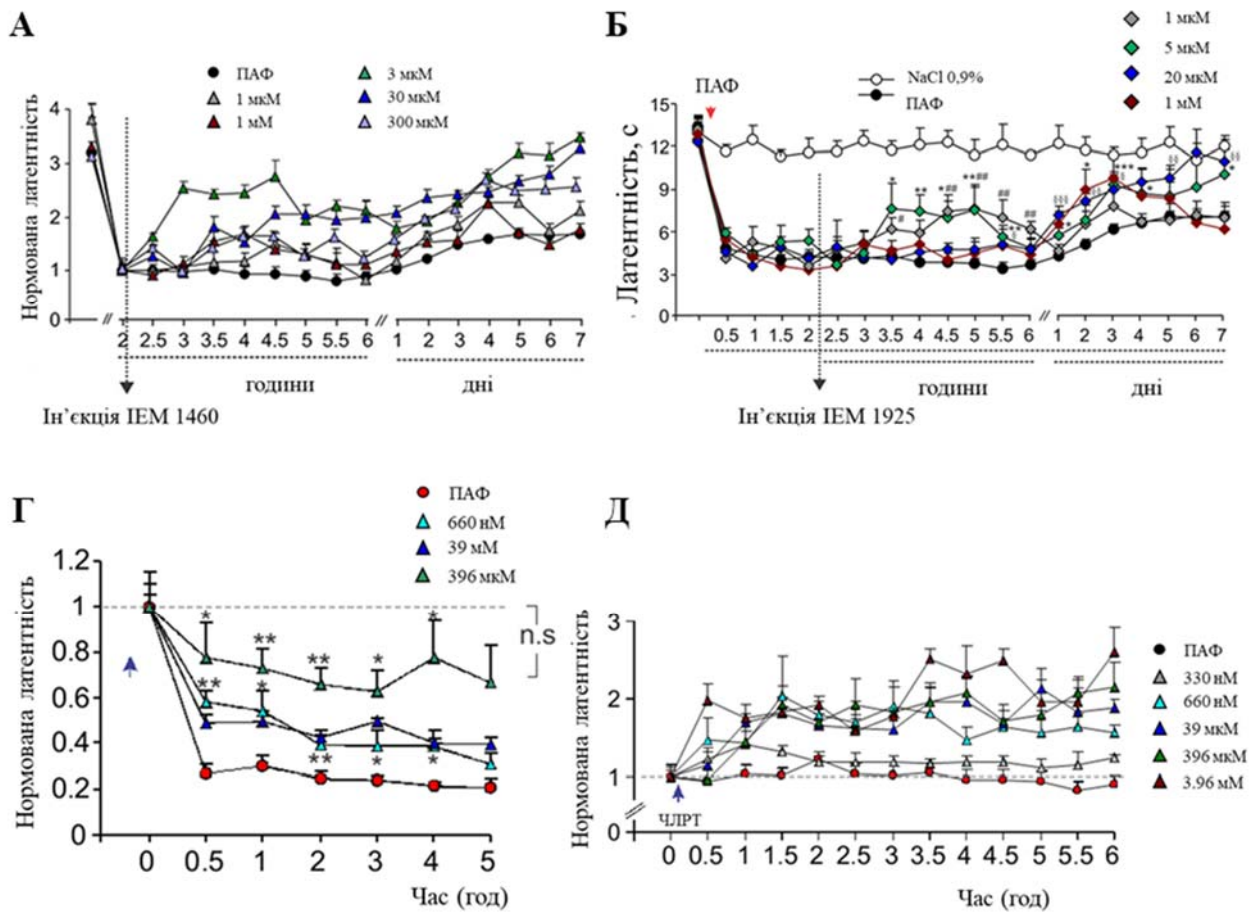


Рис. 9 Антиноцицептивний ефект введення дікатіонних блокаторів АМРА-рецепторів ІЕМ 1460 (А) та ІЕМ 1925 (Б), а також інгібітору протеїнкінази С челеритрину (Г-Д) при інтратекальному введенні в умовах периферичного запалення.

Отже, як селективні блокатори кальційпроникних АМРА-рецепторів, так і інгібітор РКС - ферменту, що відповідає за трафікінг цих рецепторів, мають яскраво виражену антиноцицептивну дію. Це проявляється у відновленні термічної гіперчутливості, викликаній периферичним запаленням. Даний факт свідчить про те, що кальційзалежні АМРА-рецептори відіграють важливу роль у розвитку та підтриманні хронічного болю. Звідси витікає, що додаткове вбудовування кальційнепроникних АМРА-каналів, яке спостерігається в синапсах адаптивних нейронів у разі хронічного болю, не є єдиним АМРА-рецептор-опосередкованим іонним механізмом, відповідальним за розвиток центральної сенситизації. Швидше за все хронічний біль викликає синаптоспецифічні зміни постсинаптичних АМРА-рецепторів. Вбудовування кальційпроникних АМРА відбувається переважно в синапсах нейронів ПП ДР та первинних аферентів, що узгоджується з літературними даними (Sullivan et al., 2017; Vikman et al., 2008). В той же час в синапсах між інтернейронами дорсального рогу відбувається додаткове вбудовування кальційнепроникних АМРА рецепторів, що підтверджується результатами даної роботи.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі відповідно до поставлених цілей і завдань було досліджено зміни функціонування нейронної мережі поверхневих пластин дорсального рогу спинного мозку при хронічному болю, спричиненому периферичним запаленням або травмою спинного мозку. Розглянуті впливи вищеназваних больових моделей на збуджуючу та гальмівну спонтанну синаптичну активність в різних типах клітин спинного мозку. На основі результатів аналізу мініатюрних АМРА-рецептор-залежних струмів та змін поведінкових реакцій у відповідь на інтратекальне введення інгібіторів та модуляторів кальційзалежних АМРА-рецепторів запропоновані гіпотези, щодо можливих іонних механізмів, які сприяють розвитку та підтриманню хронічного болю.

1. Периферичне запалення, так само як і травма спинного мозку, зумовлюють розвиток гіперзбудливості нейронної мережі дорсального рогу спинного мозку, посилюючи збуджуючу та послаблюючи гальмівну синаптичну передачу; такі ефекти є клітиноспецифічними.
2. Периферичне запалення та травма спинного мозку призводять до зміщення балансу у бік збудження адаптивних (переважно збуджуючих) нейронів поверхневих пластин спинного мозку, викликаючи збільшення частоти та амплітуди спонтанних збуджуючих та зменшення відповідних параметрів гальмівних синаптичних струмів.
3. Периферичне запалення та травма спинного мозку призводять до зміщення балансу у бік гальмування тонічних (переважно гальмівних) нейронів поверхневих пластин спинного мозку, викликаючи зменшення частоти та амплітуди спонтанних збуджуючих та зменшення відповідних параметрів гальмівних синаптичних струмів. До того ж, при травмі спинного мозку у вищеназваних нейронах відбувається перерозподіл гліцин- та ГАМК-ергічних гальмівних синаптичних входів.
4. Хронічний біль викликає додаткове вбудовування кальційнепроникних АМРА-рецепторів в синапси адаптивних нейронів ПП ДР. Цей іонний механізм підтримання болю є клітиноспецифічним, оскільки не спостерігається в синапсах тонічних нейронів.
5. Дікатіонні інгібітори кальційпроникних АМРА-рецепторів ІЕМ 1460 та ІЕМ 1925, а також інгібітор протейнінази С челеритрин є ефективними сполуками щодо полегшення больового синдрому. Дія цих сполук ймовірно пов'язана з протидією підвищенню активності кальційпроникних АМРА-каналів, що відбувається в синапсах між первинними аферентами ДКГ та нейронами ПП ДР в умовах хронічного болю.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

- Kopach O., **Krotov V.**, Belan P., and Voitenko N. (2015). Inflammatory-induced changes in synaptic drive and postsynaptic AMPARs in lamina II dorsal horn neurons are cell-type specific. *Pain* 156, 428–38.
- Kopach O., **Krotov, V.**, Goncharenko J., and Voitenko N. (2016). Inhibition of Spinal Ca(2+)-Permeable AMPA Receptors with Dicationic Compounds Alleviates Persistent Inflammatory Pain without Adverse Effects. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 50.
- Kopach O., **Krotov V.**, and Voitenko N. (2017). Atlanto-occipital catheterization of young rats for long-term drug delivery into the lumbar subarachnoid space combined with in vivo testing and electrophysiology in situ. *J. Neurosci. Methods* 290, 125–132.
- Kopach O., Medvediev V., **Krotov V.**, Borisyuk A., Tsymbaliuk V., and Voitenko N. (2017). Opposite, bidirectional shifts in excitation and inhibition in specific types of dorsal horn interneurons are associated with spasticity and pain post-SCI. *Sci. Rep.* 7, 5884.
- Krotov V.**, Tokhtamysh A., Kopach O., Dromaretsky A., Sheremet Y., Belan P., and Voitenko N. (2017). Functional Characterization of Lamina X Neurons in ex-Vivo Spinal Cord Preparation. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 342.
- Rybachuk O. A., Lazarenko Y. A., **Krotov V. V.**, and Voitenko N. V. (2017). Structural/Functional Characteristics of Organotypic Spinal Cord Slices under Conditions of Long-Lasting Culturing. *Neurophysiology* 49, 162–164.

Тези доповідей:

- 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.**, Tokhtamysh A., Belan P., Voitenko V. *Electrophysiological responses of lamina X spinal cord neurons to primary afferent stimulation*, Neuroscience 2017, 11-15 November 2017, Washington DC, USA
- Agashkov K., **Krotov V.**, Rula H., Krasniakova M., Liashenko A., Safronov B., Voitenko V., Belan P. *SPECIFIC C-FIBER-ACTIVATED LAMINA I PROJECTION NEURONS AS A MAJOR CONTRIBUTOR OF ACUTE NOCICEPTIVE TRANSMISSION*, Third Kyiv International Symposium Smooth Muscles Physiology, Biophysics & Pharmacology: from genes and molecules to functions, disorders and their novel treatment opportunities, 18-22 September, Kyiv-Lutsk, Ukraine
- Krotov V.**, Tokhtamysh A., Dromaretsky A., Sheremet E., Belan P., Voitenko V. *NOVEL APPROACH FOR FUNCTIONAL INVESTIGATION OF LAMINA X SPINAL CORD NEURONS*, Third Kyiv International Symposium Smooth Muscles Physiology, Biophysics

& Pharmacology: from genes and molecules to functions, disorders and their novel treatment opportunities, 18-22 September, Kyiv-Lutsk, Ukraine

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

Krotov V., Tokhtamysh A., Dromaretsky A., Sheremet E., Belan P., Voitenko V. *New approach for studying lamina X neurons of the spinal cord*, Polish Society for Neuroscience Meeting, 28-31 August 2017, Warsaw, Poland

Agashkov K., **Krotov V.**, Krasniakova M., Shevchuk D., Safronov B., Voitenko V., Belan P. *Specific subpopulation of C-fiber-activated lamina I projection neurons with unique characteristics for acute nociceptive coding*, VII Конгрес Українського Товариства Нейронаук, 7-11 червня 2017, Київ, Україна

Korach O., Medvediev V., **Krotov V.**, Borisyuk A., Tymbaliuk V., Voitenko V. *Reshuffle between synaptic excitation and inhibition of specific types of the DH interneurons mediates chronic pain in the spinal cord injury-induced spasticity*, VII Конгрес Українського Товариства Нейронаук, 7-11 червня 2017, Київ, Україна

Krotov V., Tokhtamysh A., Dromaretsky A., Sheremet E., Belan P., Voitenko V. *Novel method for electrophysiological studies of lamina X spinal cord neurons*, VII Конгрес Українського Товариства Нейронаук, 7-11 червня 2017, Київ, Україна

АНОТАЦІЯ

Кротов В. В. Зміни функціонування нейронної мережі поверхневих пластин спинного мозку при хронічному болю різного генезу. – Рукопис

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2018.

Дисертація присвячена дослідженню змін функціонування нейронної мережі поверхневих пластин дорсального рогу (ПП ДР) спинного мозку при хронічному болю, викликаному хронічним периферичним запаленням або травмою спинного мозку. Було продемонстровано клітинну специфічність зміни синаптичної активності в нейронах ПП ДР. Детальний аналіз амплітудних та частотних характеристик спонтанних збуджуючих та гальмівних постсинаптичних струмів показав, що як периферичне запалення, так і травма спинного мозку, призводили до зміщення балансу мережевого збудження-гальмування у бік збудження адаптивних нейронів (які є переважно збуджуючими) та у бік гальмування тонічних (переважно гальмівних) нейронів. Також було досліджено можливі механізми, які опосередковують вищезазвані зміни. Аналіз кінетики мініатюрних АМРА-рецептор-опосередкованих подій виявив, що значне посилення збудження в адаптивних нейронах відбувається за рахунок додаткового вбудовування

кальційнепроникних АМРА-рецепторів у синапсах між інтернейронами ПП ДР. Водночас, інтратекальне введення інгібіторів кальційпроникних АМРА-рецепторів та їх ферменту-модулятора протеїнкінази С значно зменшувало прояви больового синдрому, викликаного периферичним запаленням. Цей факт свідчить на користь гіперзбудливості нейронної мережі ПП ДР за рахунок вбудовування кальційпроникних АМРА-рецепторів, яке, ймовірно, відбувається в синапсах між первинними аферентами та інтернейронами спинного мозку. Таким чином в роботі була продемонстрована не лише клітинна, але й синаптична специфічність змін функціонування нейронної мережі ПП ДР, які виникають при хронічному болю.

Ключові слова: спинний мозок, поверхневі пластини дорсального рогу, збуджуючі та гальмівні постсинаптичні струми, АМРА-рецептори.

АННОТАЦІЯ

Кротов В. В. Изменения функционирования нейронной сети поверхностных пластин спинного мозга при хронической боли различного происхождения. - Рукопись

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. – Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена исследованию изменений функционирования нейронной сети поверхностных пластин дорсального рога (ПП ДР) спинного мозга при хронической боли, вызванной периферическим воспалением либо травмой спинного мозга. Было продемонстрировано клеточную специфичность изменения синаптической активности в нейронах ПП ДР. Детальный анализ амплитудных и частотных характеристик спонтанных возбуждающих и тормозных постсинаптических токов показал, что как периферическое воспаление, так и травма спинного мозга, вели к смещению баланса сетевого возбуждения-торможения в сторону возбуждения адаптивных нейронов (которые являются преимущественно возбуждающими) и в сторону торможения тонических (преимущественно тормозных) нейронов. Также были исследованы возможные механизмы, опосредующие вышеуказанные изменения. Анализ кинетики миниатюрных АМРА-рецептор-опосредованных событий обнаружил, что значительное усиление возбуждения в адаптивных нейронах происходит за счет дополнительного встраивания кальцийнепроницаемых АМРА-рецепторов в синапсах между интернейронами ПП ДР. В то же время, интратекальное введение ингибиторов кальцийпроницаемых АМРА-рецепторов и их фермента-модулятора протеинкиназы С значительно уменьшало проявления болевого синдрома, вызванного периферическим воспалением. Этот факт свидетельствует в пользу гипервозбудимости нейронной сети ПП ДР за счет встраивания кальцийпроницаемых АМРА-рецепторов. Которое, вероятно, происходит в синапсах между первичными афферентами и интернейронами спинного мозга. Таким образом в работе была продемонстрирована не только клеточная, но и синаптическая специфичность изменений функционирования нейронной сети ПП ДР, которые возникают при хронической боли.

Ключевые слова: спинной мозг, поверхностные пластинки дорсального рога, возбуждающие и тормозные постсинаптические токи, АМРА-рецепторы.

SUMMARY

Krotov V. V. Changes in the functioning of neuronal circuitry of superficial dorsal horn laminae induced by chronic pain of various genesis. – Manuscript.

A dissertation submitted to acquire the degree of Candidate of Science in Biology (PhD), specialty – 03.00.02 – Biophysics – Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kyiv, 2018.

Theses are focused on the investigation of changes in the functioning of neuronal circuitry of the dorsal horn of the spinal cord induced by chronic pain of inflammatory and traumatic genesis. We have found cell-type specificity of changes in synaptic activity of superficial dorsal horn neurons. Detailed analysis of amplitudes and frequencies of spontaneous excitatory and inhibitory postsynaptic currents demonstrated that both peripheral inflammation and spinal cord injury led to the shift in the balance of network excitation-inhibition balance towards excitation of adapting-firing neurons (predominantly excitatory cells) and towards inhibition of tonic-firing neurons (presumably inhibitory cells). We also investigated possible mechanisms that mediated the aforementioned changes. Kinetics analysis of miniature AMPA-receptor-mediated events revealed that substantial increase of excitation in adapting-firing neurons is due to additional incorporation of calcium-impermeable AMPA-receptors in the synapses between the superficial dorsal horn interneurons. In the meantime, intrathecal administration of inhibitors of calcium-permeable AMPA-receptors and their modulatory enzyme protein kinase C significantly alleviated pain syndrome induced by peripheral inflammation. This fact indicates that hyperexcitation of neuronal circuitries of superficial dorsal horn laminae may be also attributed to incorporation of calcium-permeable AMPA-receptors that takes place in the synapses between primary afferent and dorsal horn interneurons. Thus, this work demonstrates both cell- and synapse-specificity of changes in the functioning of superficial dorsal horn circuitry, induced by chronic pain.

Keywords: spinal cord, superficial laminae of dorsal horn, excitatory and inhibitory postsynaptic currents, AMPA-receptors.

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

AMPA - α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота
 ГАМК – γ -аміномасляна кислота
 ДКГ – дорсально-корінцеві ганглії
 ЗПСС – збуджуючий постсинаптичний струм
 мЗПСС – мініатюрний збуджуючий постсинаптичний струм
 ПАФ – Повний ад'ювант Фройнда
 ПНС - периферична нервова система
 ПП ДР – поверхневі пластини дорсального рогу
 СМ – спинний мозок
 сГПСС - спонтанний гальмівний постсинаптичний струм
 сЗПСС – спонтанний збуджуючий постсинаптичний струм
 ТСМ – травма спинного мозку
 ЦНС - центральна нервова система