

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

КОПАЧ ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 612.812:611.813.14

**КЛІТИННІ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ
СПІНАЛЬНІ МЕХАНІЗМИ НОЦИЦЕПЦІЇ ЯК МІШЕНІ ДЛЯ
КОРЕГУВАННЯ ХРОНІЧНИХ БОЛЬОВИХ СИНДРОМІВ**

03.00.13 – Фізіологія людини і тварин

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є сукупність наукових статей за науковою тематикою

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

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор
Войтенко Нана Володимирівна
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України
завідувач відділу сенсорної сигналізації

Офіційні опоненти: академік НАН України, доктор біологічних наук, професор
Костерін Сергій Олексійович
Інститут біохімії імені О.В. Палладіна НАН України
завідувач відділу біохімії м'язів

доктор біологічних наук, професор
Жолос Олександр Вікторович
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики
ННЦ "Інститут біології та медицини"

доктор медичних наук, професор
Натрус Лариса Валентинівна
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця
директор науково-дослідного інституту
експериментальної та клінічної медицини

Захист дисертації відбудеться 30 червня 2020 р. о 14:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та на сайті Інституту <http://biph.kiev.ua/>

Автореферат розісланий 27 травня 2020 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

кандидат біологічних наук



Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Згідно зі статистичними даними ВООЗ, біль за масштабами свого поширення у розвинених країнах світу цілком порівнянний із пандемією – щонайменше кожний п'ятий житель Європи страждає від хронічного болю різноманітного походження, що становить близько 20% населення Європи. Це призводить до невідворотніх втрат внаслідок зниження працездатності, а також значних витрат на профілактику охорони здоров'я (Rice et al., 2016; Breivik et al., 2006). Міжнародна асоціація з вивчення болю (IASP) розглядає хронічний або постійний біль як біль, що «відірвався» від основного захворювання і набув «надорганного» характеру, який є багатофакторним патологічним феноменом та розвивається у випадках, коли неможливо вилучити вплив ініціюючого чинника, часто є автономним, таким, що сам себе підтримує (Treede et al., 2019, 2015; Scholz et al., 2019; Nicholas et al., 2019; Schug et al., 2019). Хронічний біль може отримувати риси хвороби («біль як хвороба»); цей стан проявляється не лише болем, але й вегетативними, емоційними та психічними порушеннями і потребує серйозної терапії (Goldberg, McGee, 2011; Jensen et al., 2007). Актуальність відповідних досліджень обумовлена відсутністю чіткої схеми ефективного лікування хронічного болю в більшості країн світу. Причиною невдачі при лікуванні хронічного болю, за висновками ВООЗ, є, найперше, відсутність повноцінної наукової концепції щодо фундаментальних механізмів виникнення та підтримання хронічного болю, основою якої були б результати ґрунтовних науково-експериментальних досліджень для подальшої розробки нових підходів до терапії болю. Відповідно, одним із фундаментальних завдань, які матимуть вагоме біомедичне (клінічне) значення, є з'ясування молекулярних та клітинних механізмів розвитку хронічного болю – як у центральній нервовій системі (ЦНС), так і периферичній – для пошуку перспективних мішеней у терапії больових синдромів та можливості ефективного полегшення больових відчуттів.

На сьогодні основним механізмом, котрий, як вважається, опосередковує розвиток і підтримання хронічного болю, є так званий феномен центральної сенситизації (Treede, 2016; Kuner, 2010; Latremoliere, Woolf, 2009; Woolf, 1983). IASP характеризує центральну сенситизацію як «підвищену реакцію ноцицептивних нейронів у ЦНС на їх нормальні або підпорогові аферентні входні стимули». В основі цього феномену може лежати щонайменше три патофізіологічні процеси, а саме: постійна ектопічна активність як у пошкоджених, так і у здорових волокнах периферичних нервів та їх дорзальних гангліях, зміни внутрішніх властивостей нейронів та синаптичних мереж дорзального рогу (ДР) спинного мозку та порушення регуляції низхідних ноцицептивних шляхів. Ці процеси супроводжуються посиленням генерації спонтанних потенціалів дії (ПД) у спинному мозку та, як наслідок, посиленням та подовженням відповідей нейронів на периферичну стимуляцію. Активна увага останніми роками приділяється вивченню центральних механізмів

ноцицепції, за яких патологічна активність поодиноких сенсорних нейронів може призводити до гіперзбудливості нейронних мереж, а відтак – патологічної гіперактивності нервової тканини (Kuner, 2010; Dubner, Basbaum, 1994). Така гіперактивність має здатність самопідтримуватися та призводити до незворотніх змін у функціонуванні системи загалом (gain-of-function). Природа цих патологічних змін і закономірності, котрим вони підпорядковані на клітинному рівні, залишаються не з'ясованими, що обмежує поступ у розвитку ефективної терапії.

Для нейронів спинного мозку характерна складна морфологія, яка визначається насамперед різноманітністю дендритних розгалужень та їх проєкцій як у латеральному, так і висхідному-нисхідному напрямках (Häring et al., 2018; Szucs et al., 2013; Todd, 2010; Lu, Perl, 2005). Наявність у нейронній мембрані чисельних популяцій іонних каналів (потенціалзалежних та лігандкерованих) додатково ускладнює повноцінне розуміння деталізованої картини регулювання динаміки процесів збудження-гальмування сенсорних нейронів для детектування сенсорної інформації та її біофізичної обробки (процесінгу) у нейронних мережах ДР спинного мозку для подальшої передачі у вищі нервові центри емоційної діяльності, де формується усвідомлене (психофізіологічне) відчуття болю. Останнім часом активна увага приділяється регуляції функціонування іонотропних глутаматних рецепторів АМРА-типу, які активуються збуджуючим нейротрансмітером глутаматом і відіграють одну із ключових ролей у збуджувальній синаптичній передачі в ЦНС (Heine, Holcman, 2020; Choquet, 2018; Diering, Haganir, 2018; Bredt, Nicoll, 2003; Malinow, Malenka, 2002). Спинний мозок характеризується високим рівнем експресії АМРА-рецепторів; зокрема, нейрони ДР містять АМРА-рецептори, проникні для іонів Ca^{2+} (без GluR2 субодиниці у складі тетрамеру, що формує активний канал) та Ca^{2+} -непроникні (GluR2-вмісні) (Galan et al, 2004; Hartmann et al., 2004; Tong, MacDermott, 2006). Експериментальні дані свідчать, що цільове порушення експресії АМРА-рецепторів у спинному мозку сприяє проявам ноцицептивної пластичності і посилює довготривалу гіпералгізію, викликану периферичним запаленням (Han et al., 2019; Lin et al., 2015; Peng et al., 2012; Hartmann et al., 2004).

Представлена робота присвячена комплексному дослідженню клітинних та молекулярних спінальних механізмів, які лежать в основі феномену центральної сенситизації. Основна увага була зосереджена на встановленні ролі та регуляції функціонування АМРА-рецепторів у нейронах ДР спинного мозку за наявності хронічних больових синдромів різного генезу, а саме: периферичного запалення та травми спинного мозку. Оскільки відомості щодо динамічного регулювання функцій АМРА-рецепторів у спинному мозку практично відсутні, результати таких досліджень представлятимуть істотний фундаментальний інтерес, а виявлення терапевтичного ефекту модуляції функціонування цих рецепторів на поведінкові прояви болю відкриє нові перспективи у пошуку новітніх біотехнологічних засобів для лікування

хронічного болю та обґрунтування клінічних підходів до сучасної терапії больових синдромів (зокрема ефективності генної терапії).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках наукових програм відділу загальної фізіології нервової системи (пізніше відділу сенсорної сигналізації) Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Генетична корекція функцій глутаматних рецепторів спинного мозку як шлях лікування хронічного болю» (2011-2013 рр.; № 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 рр.; № державної реєстрації 0110U004761), у рамках гранту НАН України для молодих вчених «Функціонування нейрональних мереж спинного мозку при тривалому запаленні: участь AMPA-рецепторів у спонтанній активності нейронів» (2011-2012 рр.; № державної реєстрації 0111U007132), «Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології» (2011-2013 рр.; № державної реєстрації 0110U004750), «Молекулярні та генетичні механізми клітинної сигналізації в нормі та патології» №UF45.2/001 (на базі державної ключової лабораторії молекулярної та клітинної біології) та «Розробка новітніх знеболюючих засобів на основі інгібіторів кальцій-проникних AMPA-рецепторів» (2015-2019 рр.; № державної реєстрації 0115U003632).

Мета дослідження: з'ясування спінальних механізмів ноцицепції для подальшого пошуку та обґрунтування новітніх біотехнологічних підходів для корекції хронічних больових синдромів.

Завдання дослідження:

1. Виявити порушення функціонування синаптичних AMPA-рецепторів у нейронах ДР спинного мозку при периферичному запаленні як потенційний механізм, що опосередковує феномен центральної сенситизації при больових синдромах.
2. З'ясувати молекулярні механізми порушення функціонування синаптичних AMPA-рецепторів та виявити участь інших клітинних білків, залучених у зміни функціонування цих рецепторів у синапсах ноцицептивних нейронів, при периферичному запаленні.
3. Встановити функціонування позасинаптичних AMPA-рецепторів у нейронах ДР спинного мозку за фізіологічних умов та охарактеризувати їх можливі зміни при тривалому периферичному запаленні.
4. Оцінити динамічний обіг AMPA-рецепторів між синаптичною та позасинаптичними ділянками мембрани у нейронах ДР спинного мозку при тривалому запальному болю.
5. Вивчити функціонування нейронних мереж ДР спинного мозку та встановити баланс між збудженням і гальмуванням за фізіологічних умов та при больовому синдромі.

6. Оцінити зміни функціонування нейронних мереж ДР спинного мозку при хронічному болю різного генезу (периферичного та центрального походження).
7. Розробити метод локальної цільової доставки інгібіторів нового покоління у поперековий відділ спинного мозку та з'ясувати терапевтичний вплив фармакологічного блокування АМРА-рецепторів на полегшення больового синдрому. Оцінити побічні ефекти такої терапії.
8. Охарактеризувати ефект фармакологічного блокування протеїнкінази С альфа (PKC α) як мішені для корегування порушеного обігу АМРА-рецепторів у нейронах ДР спинного мозку та модулювання хронічного болю при периферичному запаленні.
9. Застосувати генну терапію для корекції хронічного болю та оцінити терапевтичну ефективність генетичного вимкнення (нокдауну) PKC α у спинному мозку на експериментальній моделі периферичного запалення. Обґрунтувати застосування такого підходу на клітинному рівні.

Об'єкт дослідження – активність сенсорних нейронів і нейронних мереж дорзального рогу спинного мозку та поведінкові прояви больових відчуттів при експериментальному моделюванні хронічних больових синдромів.

Предмет дослідження – клітинні та молекулярні спінальні механізми виникнення та корегування хронічного болю у спинному мозку.

Методи дослідження включають біофізичні підходи, зокрема реєстрацію іонних струмів у режимі локальної фіксації мембранного потенціалу (patch-clamp) у конфігурації “ціла клітина” (whole-cell) та флуоресцентне вимірювання внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію ($[Ca^{2+}]_i$), фізіологічні (введення тест-речовин в інтратекальний простір спинного мозку, моделювання хронічного болю різного генезу), молекулярно-біологічні (real-time PCR та Western-blot), фармакологічні та математичні методи експериментальних досліджень (оцінка провідностей поодиноких каналів), застосування підходів генної інженерії, нанотехнологій, поведінкові тести на лабораторних тваринах і методи варіаційної статистики при кількісній обробці результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Отримані експериментальні дані свідчать про низку нових аспектів у функціонуванні складного комплексу клітинних та молекулярних спінальних механізмів, що залучені у підтримання хронічного болю у нейронних мережах ДР спинного мозку. Експериментально обґрунтований новий підхід для полегшення хронічних больових відчуттів шляхом селективного таргетування ланок молекулярного каскаду, що забезпечує регулювання динамічного обігу (трафікінгу) АМРА-рецепторів у сенсорних нейронах спинного мозку. Виявлені у проведенні експериментальних дослідженнях порушення трафікінгу АМРА-рецепторів у нейронах ДР вперше в світі демонструють причинно-наслідкові зв'язки між порушеннями регуляції функціонування АМРА-рецепторів на клітинному рівні та розвитком і підтриманням хронічного болю у експериментальних тварин.

Вперше встановлено молекулярний механізм порушеного обігу АМРА-рецепторів – інтерналізація GluR2-вмісних рецепторів із синапсів між

первинними аферентами та ноцицептивними нейронами ДР спинного мозку – при тривалому периферичному запаленні та охарактеризовано каскад внутрішньоклітинних білків, залучених у регуляцію трафікінгу синаптичного пулу рецепторів (старгазин, АВР/GRIP, PICK1 та РКСа як ключовий фермент-регулятор). Продемонстровано, що саме ці зміни є однією із необхідних передумов підтримання хронічного запального болю.

Вперше експериментально продемонстровано, що в сенсорних нейронах ДР спинного мозку функціонує чисельна популяція позасинаптичних АМРА-рецепторів, які характеризуються змінною проникністю до іонів Ca^{2+} , і що різні підтипи нейронів експресують за фізіологічних умов позасинаптичні АМРА-рецептори подібного складу, які містять домінуючу кількість GluR2-субодиниць; це визначає їх низьку проникність до Ca^{2+} . Вперше показано порушення обігу позасинаптичних АМРА-рецепторів при тривалому периферичному запаленні.

Вперше експериментально показано, що порушення трафікінгу АМРА-рецепторів призводить до змін у балансі збудження та гальмування у нейронних мережах ДР спинного мозку; це, в свою чергу, спричиняє довготривалу підвищену збудливість ДР, яка може самопідтримуватися і опосередковувати хронічний біль різного генезу.

Вперше продемонстровано клітиносцифічність вищеназваних змін, а саме: специфіку порушення обігу АМРА-рецепторів та зміщення балансу збудження-гальмування у сенсорних нейронах різних підтипів.

Розроблено метод цільової доставки терапевтичного матеріалу для локального таргетування нейронів поперекового відділу спинного мозку. Вперше продемонстровано терапевтичний вплив фармакологічного блокування Ca^{2+} -проникних АМРА-рецепторів високоселективними сполуками-інгібіторами нового покоління (активаційнозалежними блокаторами IEM-1460 та IEM-1925) на полегшення больових синдромів із мінімальними побічними ефектами.

Вперше застосовано генну терапію для корекції хронічного болю у експериментальних моделях лабораторних тварин та продемонстровано істотний терапевтичний ефект блокування експресії РКСа на послаблення больового синдрому при тривалому периферичному запаленні (із науковим обґрунтуванням на клітинному рівні).

Вперше застосовано новітні підходи у галузі наноінженерії для практичного впровадження з метою корекції хронічного больового синдрому, а також у створенні цільових біоматеріалів для потенційного впровадження у терапію болю.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дослідження мають фундаментальне значення для деталізованого розуміння каскаду молекулярних механізмів у нейронах ДР та порушень процесів збудження і гальмування на рівні нейронних мереж спинного мозку, які лежать в основі довготривалого підтримання больових синдромів. Вагомість роботи полягає найперше у формулюванні гіпотези щодо ключового вкладу центральних

механізмів у підтримання хронічного болю та у науковому обґрунтуванні концепції нових підходів для терапії хронічного болю різного походження.

Практичне значення дослідження полягає в розробленні нових біотехнологічних підходів для полегшення хронічного болю. В основі такого напрямку лежить селективне таргетування виявленого фундаментального механізму больової пластичності ЦНС шляхом фармакологічної корекції порушень функціонування АМРА-рецепторів у нейронах ДР (із використанням інгібіторів нового покоління) та застосування генної терапії (нок-дауна РКСа за допомогою антисенсових олігонуклеотидів). Терапевтичні ефекти, продемонстровані на експериментальних тваринах, відкривають нові можливості для розробки новітніх методів у боротьбі з хронічним запальним болем (патент на корисну модель № 94492 від 10.11.2014).

Розроблений інноваційний підхід із застосуванням нанотехнологій може бути використаний для цільової доставки локальних анестетиків та інших високоактивних сполук зі зменшенням їх потенційних побічних ефектів при використанні у клініці.

Особистий внесок здобувача. Автором проведено науковий пошук та критичний аналіз наявних даних літератури щодо обґрунтування ролі та вибраного таргетування АМРА-рецепторів для потенційної корекції хронічного болю. При проведенні досліджень автором особисто виконано основну частину експериментальної роботи, аналіз отриманих результатів, їх наукову інтерпретацію та узагальнення, формулювання висновків та написання статей. Деякі експерименти були проведені разом зі співавторами опублікованих робіт, зокрема співробітниками Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України к.б.н. В.Ю. Вятченко-Карпінским, А.О. Сотником, к.б.н. В.В. Кротовим, Ю.В. Гончаренко, к.б.н. Є. Іщенко. Аналіз провідностей АМРА-рецепторів проведено у співпраці із співробітником інституту ім. О.О. Богомольця к.б.н. А.Л. Борисюк. Моделювання травми спинного мозку та оцінку ступеня дисфункцій у експериментальних тварин проводили разом із співробітником Національного Медичного Університету України імені О.О. Богомольця д.м.н. В.В. Медведєвим. Дослідження експресії РКСа проводили у співробітництві із завідувачем відділом загальної та молекулярної патофізіології д.м.н. В.Є. Досенком та к.б.н. А. Шиш. Дослідження молекулярних механізмів порушення трафікінгу синаптичних АМРА-рецепторів було проведено на базі Школи Медицини Університету Джона Хопкінса (Балтимор, США) (керівник проф. Я.Х. Тао). Експерименти з моделювання травмування трійчастого нерва та периферичних ноцицепторних нейронів були проведені на базі Лабораторії ноцицепції Університетського Коледжу Лондона (керівник проф. Дж.Н. Вуд). Автор щиро вдячний керівнику Лабораторії іміджингу синапсів Інституту Нейрології Університетського Коледжу Лондона (UCL, Великобританія) проф. Д.А. Русакову та професору Університету Королеви Марії (QMU, Лондон, Великобританія) Г.Б. Сухорукову за плідну співпрацю із використанням підходів у галузі нанотехнологій та застосуванням наноматеріалів для практичного впровадження, а також завідувачу відділом біофізики мембран Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця проф. П.В. Білану за плідну співпрацю.

Автор висловлює подяку науковому консультанту проф. Н.В. Войтенко за допомогу у плануванні комплексного підходу та організації проведення досліджень, в обговоренні та підготовці матеріалів до публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи доповідались на щорічних конференціях Американського Товариства Нейронаук (Сан Дієго, 2007, 2010 та 2013; Чікаго, 2009; Вашингтон, 2014 та 2017, США), щорічних з'їздах Фізіологічного Товариства Великобританії (Едінбург, 2012; Абердин, 2019), Конгресах Міжнародного Товариства Дослідження Мозку (Флоренція, 2011, Італія; Ріо-де-Жанейро, 2015, Бразилія), форумах Європейського Товариства Нейронаук (Женева, 2008, Швейцарія; Амстердам, 2010, Нідерланди; Барселона, 2012, Іспанія), Конгресах Фізіологічних Наук (Кіото, 2009, Японія; Бірмінгем, 2013, Великобританія), Товариства Нейронаук Польщі (Варшава, 2009) та Українського Товариства Нейронаук (Київ, 2014 та 2017, Україна), слухали та обговорювали на засіданнях сектору молекулярної фізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Публікації. Результати дисертації викладено у 14 статтях (опублікованих у виданнях, віднесених до першого і другого квартилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports) та 42 тезах міжнародних конференцій та з'їздів.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Дисертацією є **сукупність наукових статей за науковою тематикою** із детальним аналізом сучасного стану наукової проблеми та запропонованого рішення щодо її експериментального вирішення проведеними дослідженнями, що детально представлено в опублікованих працях.

Методи досліджень включають комплексний підхід для проведення експериментальних досліджень у галузі сучасної фізіології та біомедицини. Усі експерименти проводили на лабораторних тваринах із дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях, та статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447-IV, 21.02.2006), а також усіх норм біоетики та біологічної безпеки, прийнятих в установах НАН України та Університетському Коледжі Лондона. В експериментах використовували шурів ліній Вістар (Wistar), Спрейг-Доулі (Sprague-Dawley), мишей лінії C57BL6 (Charles River, UK) «дикого» типу та трансгенних за вилученими (knockout) натрієвими каналами типу 1.9 ($Na_v1.9^{-/-}$), яких утримували за стандартних умов.

Моделювання хронічного болю різного генезу проводили шляхом а) індукування постійного периферичного запалення внаслідок підшкірної ін'єкції запального агента CFA у задню кінцівку тварин та б) травми спинного мозку при його половинній перерізці (гемісекції). У деяких експериментах проводили моделювання хронічного нейропатичного болю у мишей (нейропатії

трійчастого лицевого нерва) шляхом перетяжки інфраорбітального нерву лігатурою.

Оцінку больових синдромів у тварин проводили із використанням низки поведінкових тестів для визначення порогу болю у відповідь на теплові (метод Харгрівса) та механічні (метод філаментів фон Фрея) стимули та кількісного міжгрупового порівняння досліджуваних показників (поведінкових проявів больових відчуттів). Розвиток і підтримання теплової больової чутливості оцінювали за допомогою методу Харгрівса у спеціальному пристрої (Ugo Basil, Італія), який складається із прозорих експериментальних камер, що встановлюються на пластині зі скла, яка служить підлогою камер, та рухливого джерела інфрачервоного випромінення, що розташовується під скляною пластинною. Випромінення за допомогою системи лінз сфокусовано на верхній поверхні скла. Тварину вміщували в експериментальну камеру та давали можливість акліматизуватися. Джерело інфрачервоного випромінення підводили під задню кінцівку тварини, вмикали одночасно із автоматичним секундоміром (відлік часу з точністю до 0.1 с) до настання характерної больової поведінкової реакції – відсмикування кінцівки. Після відсмикування світло автоматично вимикалося, і час фіксувався. Для уникнення опіків тривалість безперервної роботи джерела була обмежена (33 с). Метод філаментів фон Фрея для дослідження больової чутливості у відповідь на механічну стимуляцію проводили каліброваними філаментами (Bioseb, США). Тварину вміщували в експериментальну камеру із сітчастою підлогою, через яку підошву задньої кінцівки стимулювали філаментами різної жорсткості (інтенсивність стимулу); вимірювали кількість відсмикувань при дії різних філаментів (стимулів різної інтенсивності).

Для локальної доставки терапевтичних сполук у спинний мозок проводили хронічну імплантацію катетеру в інтратекальний простір спинного мозку через атланта-окципітальну мембрану. Тварин залучали у дослідження не раніше, ніж через 4-5 дні після оперування. Тварин з будь-якими неврологічними розладами негайно вилучали.

Генетичну модуляцію (нок-даун) гену, що кодує РКCa, проводили за допомогою антисенсових олігонуклеотидів (AS ODN) наступної нуклеотидної послідовності: 5'-GACATCCCTTTCCCCCTCGG-3'. Як контроль використовували міссенсові олігонуклеотиди (MS ODN) із послідовністю: 5'-CGTCCTCAGTCGTCCCTCAC-3' (ISIS Pharmaceuticals, США).

Для отримання зрізів спинного мозку тварину анестезували; відпрепарували сегменти L₄₋₅ спинного мозку; тканину вміщували в охолоджений розчин наступного складу (у мМ): цукроза 250, KCl 2, NaH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 7, NaHCO₃ 26, глюкоза 11, який постійно оксигенувався (95% O₂ і 5% CO₂). Приготування зрізів товщиною 300 мкм проводили за допомогою вібратома; зрізи зберігали при кімнатній температурі у фізіологічному розчині Кребса наступного складу (у мМ): NaCl 125, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.25, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, NaHCO₃ 26, глюкоза 10 (pH 7.4, осмолярність 310-320 мОсм).

Електрофізіологічні дослідження включали реєстрацію активності поодиноких сенсорних нейронів, які візуально ідентифікували у поверхневих пластинах ДР (пластини I-II) спинного мозку, у режимі локальної фіксації мембранного потенціалу (patch-clamp) у конфігурації “ціла клітина” (whole-cell) за допомогою підсилювача MultiClamp 700B (Molecular Devices, США) та програмного забезпечення pClamp 9.2 (Molecular Devices, США). Збуджуючі постсинаптичні струми (ЗПСС) у відповідь на стимуляцію первинних аферентних волокон реєстрували при підтримуваному потенціалі на мембрані – 70 мВ; аферентні волокна стимулювали струмом 70-400 мкА (0.1 мсек). Струми, опосередковані активацією AMPA-рецепторів та інших іонних каналів, ідентифікували фармакологічно. Спонтанні ЗПСС (сЗПСС) реєстрували при мембранному потенціалі –70 мВ, мініатюрні ЗПСС (мЗПСС) – у присутності блокатору Na⁺-каналів тетродотоксину (ТТХ), гальмівні постсинаптичні струми (ГПСС) – при потенціалі 0 мВ, щонайменше протягом 10 хв. Детектування струмів та аналіз здійснювали за допомогою програми MiniAnalysis (Synaptosoft, США).

Оцінку провідностей поодиноких каналів проводили з використанням нестационарного флуктуаційного аналізу струмів, опосередкованих активацією AMPA-рецепторів (Traynelis et al., 1993). Для аналізу відбирали лише струми із стабільним базовим рівнем та кінетикою спаду 1-5 мс.

Флуоресцентну мікроскопію застосовували для вимірювання [Ca²⁺]_i одночасно із реєстрацією струмів із використанням кальційчутливого барвника фура-2, який вводили внутрішньоклітинно через піпетку у режимі whole-cell. Динаміку флуоресцентного сигналу вимірювали одночасно у сомі та дендритах нейронів за допомогою програмного забезпечення Imaging Workbench (INDEC System, США) та аналізували як зміни співвідношення інтенсивностей флуоресценції барвника на довжинах хвиль збудження 340 та 380 нм, що пропорційне змінам [Ca²⁺]_i. Реєстрували флуоресценцію барвника на 510 нм.

Молекулярно-біологічні методи включали використання полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (real-time PCR) та визначення рівня експресії білка (Western-blot) у тканині. Зокрема використовували поліклональні антитіла до РК α (CAF5340-SP, R&D Systems Inc, Великобританія), GluR2 субодиниці і GluR2-p Ser⁸⁸⁰ (Millipore Bioscience Research Reagents, США) та β -актину (A1978, Sigma, США).

Для **обробки та статистичного аналізу** експериментальних даних застосовували методи варіаційної статистики та відповідні статистичні тести. Для нормально розподілених вибірок експериментальних даних (згідно тесту Шапіро-Уїлка) визначали середні значення та похибку середнього і застосовували параметричні тести (t -тест Стьюдента, ANOVA). Вибірки даних, що не відповідали критерію нормального розподілу, представляли як значення медіан та застосовували непараметричні тести (Манна-Уїтні, Колмогорова-Смірнова). Критерієм достовірності міжгрупових відмінностей вважали різницю при вірогідності $P < 0,05$.

Основні результати досліджень та їх обговорення

AMPA-рецептори є тетраметрами і складаються із 4 гомологічних субодиниць (GluR1-4) у різних комбінаціях. GluR1 і GluR2 субодиниці найбільш чисельно представлені у ЦНС ссавців. Субодиниця GluR2 містить аргінін у критичному положенні M2-сегменту, який бере участь в утворенні пори іонного каналу; включення GluR2 у складі рецептору усуває проникність для Ca^{2+} і змінює випрямлення струму та провідність макроскопічного каналу (Burnashev et al., 1992; Song, Huganir, 2002). Таким чином, зміна субодиничного складу рецепторів ефективно регулює глутаматергічну синаптичну передачу та визначає збудливість нейронів і нейронних мереж.

Зменшення частки GluR2-вмісних AMPA-рецепторів у синапсах між первинними аферентами та ноцицептивними нейронами ДР при периферичному запаленні

Для встановлення функціонування AMPA-рецепторів у синапсах нейронів ДР ми реєстрували ЗПСС, викликані стимуляцією аферентних волокон, розташованих іпсилатерально (Рис. 1А-Б), через добу після ін'єкції СФА або фізіологічного розчину (контроль). Викликані ЗПСС блокувалися блокатором глутаматних рецепторів NBQX у концентрації 30 μM та блокатором AMPA-рецепторів GYKI 52466 у концентрації 100 μM (Рис. 1В).

Ми не виявили достовірної різниці між значеннями мембранного потенціалу спокою нейронів у контрольній групі та після ін'єкції СФА (-60 ± 0.8 мВ, $n=38$ та -58 ± 0.7 мВ, $n=31$, відповідно; $p>0.5$), вхідного опору мембрани (512 ± 50 МОм, $n=38$ та 586 ± 74 МОм, $n=31$; $p>0.5$), а також порогу виникнення ПД (-33.5 ± 0.9 мВ, $n=38$ та -34.0 ± 1.4 мВ, $n=31$, відповідно; $p>0.5$).

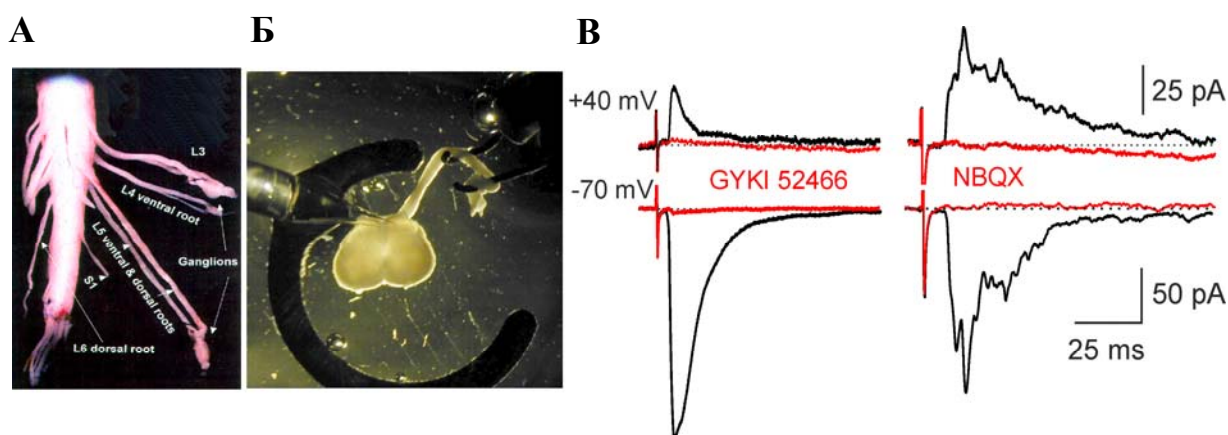


Рис. 1. Дизайн експериментів та приклади викликаних ЗПСС у нейронах ДР у відповідь на стимуляцію аферентних волокон. (А) Зображення поперекового відділу спинного мозку із дорзальними корінцями. (Б) Фотографія зрізу спинного мозку (сегменти L4-5) із препарованим дорзальним корінцем для стимуляції аферентів. (В) Приклади ЗПСС до прикладання та у присутності антагоністів при підтримуваному потенціалі -70 мВ та $+40$ мВ.

Амплітуди ЗПСС достовірно не розрізнялися у контролі та після СФА (-191 ± 27 пА, $n=10$ та -220 ± 45 пА, $n=14$, відповідно; $p>0.6$). Значення характерного часу активації та інактивації струму також не розрізнялися (час активації: 1.3 ± 0.1 мс, $n=11$ у контролі та 1.2 ± 0.2 мс, $n=10$ у СФА-групі, $p>0.5$; час інактивації: 4.7 ± 0.5 мс, $n=11$ та 5.7 ± 0.6 мс, $n=9$, відповідно; $p>0.2$). Проте спостерігалась істотна різниця у вольт-амперній ($I-V$) характеристиці струмів, а саме відмічалось слабе випрямлення при позитивних потенціалах у контрольній групі на противагу помітному внутрішньому випрямленню у групі із запаленням. Ми чисельно виразили ці зміни, розраховуючи індекс випрямлення (ІВ), тобто співвідношення струму при $+40$ мВ до такого при -70 мВ. У контрольній групі ІВ становив 0.26 ± 0.01 ($n=16$) проти 0.18 ± 0.02 ($n=12$) у СФА-групі ($p<0.01$; Рис. 2А).

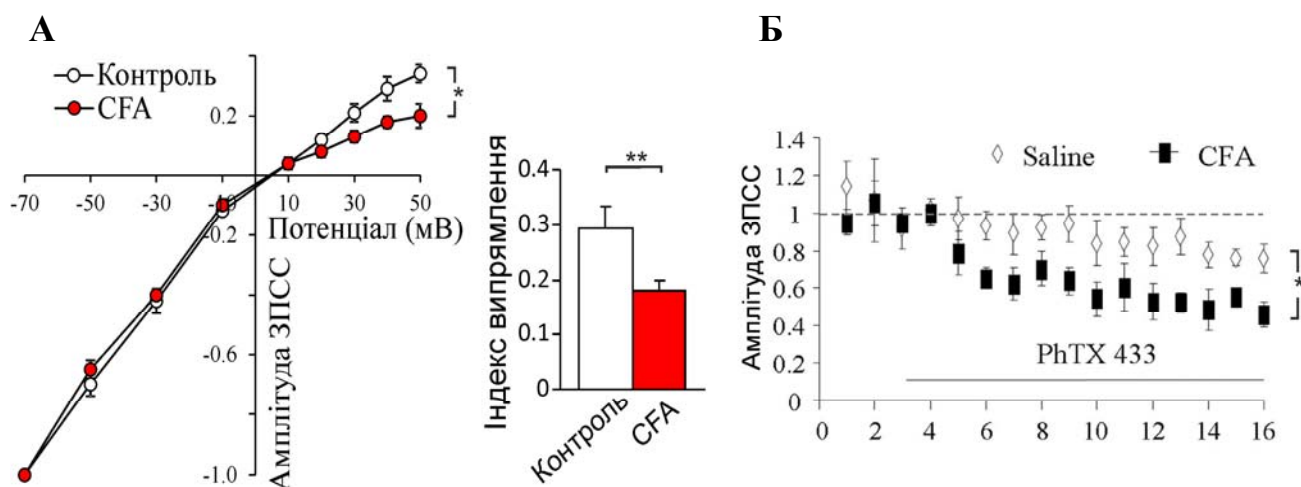


Рис. 2. (А) $I-V$ криві та індекс випрямлення ЗПСС у нейронах ДР у контролі та при периферичному запаленні. (Б) Зміни амплітуди ЗПСС, нормалізовані щодо середнього значення амплітуди перед аплікацією філантотоксину (PhTx-433) у нейронах ДР у тварин контрольної групи та із запаленням. * $P<0.05$, ** $p<0.01$.

Внутрішнє випрямлення (inward rectification) є характерною ознакою AMPA-рецепторів, які не містять GluR2-субодиниці; отже, ці дані свідчать про зменшення частки GluR2-вмісних AMPA-рецепторів у синапсах при периферичному запаленні. Для підтвердження цього ми застосували філантотоксин (PhTx-433) – поліамінний блокатор Ca^{2+} -проникних AMPA-рецепторів (тих, що не містять GluR2). Блокуючий вплив PhTx-433 ($40 \mu M$) на AMPA-рецептор-опосередковані ЗПСС був майже у 2 рази вищим у нейронах групи із СФА-індукованим запаленням, ніж у контролі (зменшення амплітуди струмів при аплікації PhTx-433 на $23 \pm 3\%$ відносно базового рівня у контролі проти $51 \pm 4\%$ у СФА-групі; $p<0.01$; Рис. 2Б). Отже, частка GluR2-вмісних AMPA-рецепторів істотно зменшується у синапсах нейронів ДР через 1 добу після ін'єкції СФА.

Молекулярний механізм інтерналізації GluR2-вмісних AMPA-рецепторів із синапсів у нейронах ДР при довготривалому запальному болю

У нормі субодиниці AMPA-рецепторів конститутивно циркулюють між синаптичною мембраною та внутрішньоклітинним простором внаслідок вбудовування у мембрану та клатрин-опосередкованої інтерналізації. Відповідно, популяція AMPA-рецепторів у синапсах залежить від балансу між двома згаданими процесами (Adesnik et al., 2005; Greger, Esteban, 2007). Трафікінг GluR2 здійснюється за участі двох якорних білків – ABP/GRIP, які закріплюють GluR2-вмісний рецептор у постсинаптичній мембрані, та PICK1, котрий залучає PKC α у взаємодію із рецептором. Ми виявили, що CFA викликає залежне від часу посилення фосфорилування GluR2 у ланці Ser880 (Рис. 3).

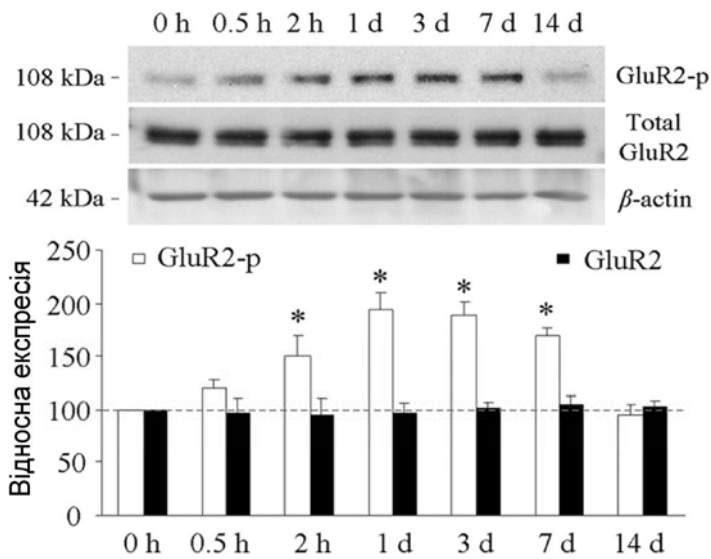


Рис. 3. Залежність зміни фосфорилування GluR2-субодиниці в ланці Ser880 від часу після індукції запалення. Приклади Western-blot для фосфорильованої GluR2-субодиниці та загальної кількості GluR2, а також діаграма часової залежності відносних значень експресії. * $P < 0.05$ у порівнянні з контролем («0»).

Процес фосфорилування GluR2-субодиниці є PKC α -залежним. Внаслідок фосфорилування спорідненість GluR2-субодиниці щодо синаптичних білків ABP/GRIP зменшується (Park et al., 2009); це викликає посилену інтерналізацію GluR2-вмісного AMPA-рецептору із постсинаптичної мембрани (Рис. 4). В свою чергу, такі зміни призводять до збільшення частки Ca²⁺-проникних AMPA-рецепторів та, відповідно, зростання входу Ca²⁺ у нейрони. Довготривале збільшення [Ca²⁺]_i у ноцицептивних нейронах призводить до потенціації Ca²⁺-залежних процесів, що підтримує постійний біль.

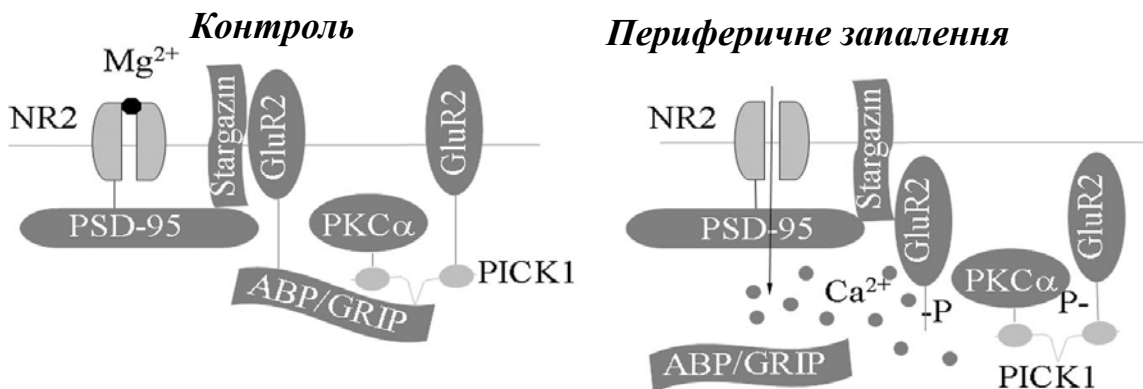


Рис. 4. Схема інтерналізації GluR2-вмісних AMPA-рецепторів із синапсів між первинними аферентами та нейронами ДР при периферичному запаленні.

Функціонування позасинаптичних АМРА-рецепторів у нейронах ДР та порушення їх динамічного обігу при периферичному запаленні

Для активації АМРА-рецепторів ми використали їх селективний агоніст АМРА (5 μM , прикладання до зрізів 60 сек). За таких умов активується загальний пул АМРА-рецепторів (у сомі та дендритах). Аплікація АМРА спричиняла генерацію вхідного струму при потенціалі -60 mV , який характеризувався повільним наростанням та десенситизацією (Рис 5). Активація струму супроводжувалась синхронними підвищеннями $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у сомі та дендритах із наступним повільним відновленням до базового рівня. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -транзиєнти свідчать про функціональну експресію Ca^{2+} -провідних АМРА-рецепторів у нейронах ДР. Як і у випадку ЗПСС, активація струму та $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -транзиєнтів не спостерігалась у присутності блокатору глутаматних рецепторів NBQX (30 μM), а також блокатору АМРА-рецепторів GYKI 52466 (100 μM) (Рис 5).

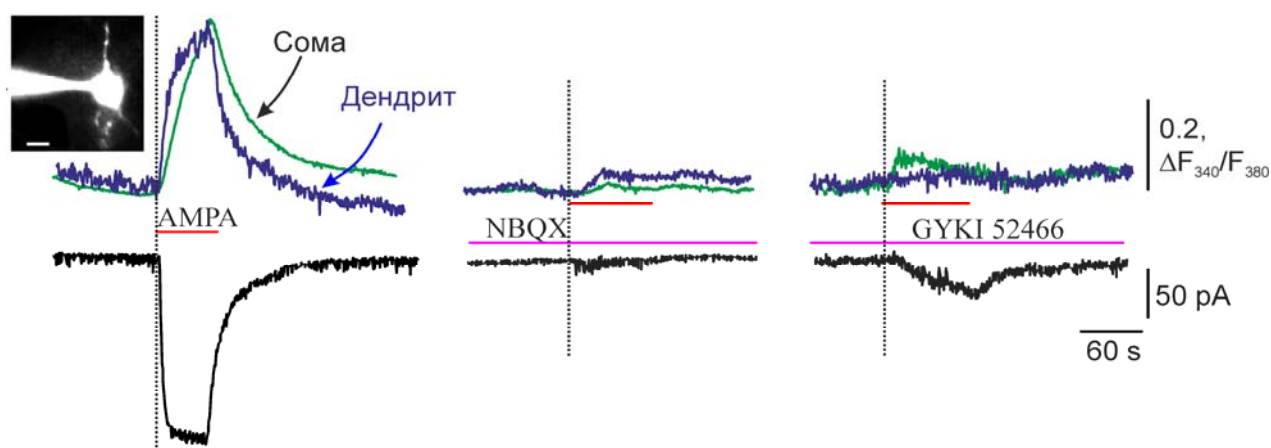


Рис. 5. Приклади струмів та $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -транзиєнтів у сомі та дендритах нейронів ДР, викликаних аплікацією АМРА (5 μM), та їх блокування антагоністами рецепторів.

СФА-індуковане запалення призводило до збільшення амплітуди струму (в середньому на $125 \pm 13\%$, $n=20$; $p<0.001$) та амплітуди $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -транзиєнтів у сомі (на $92 \pm 11\%$) та дендритах (на $96 \pm 17\%$, $n=11$; $p<0.05$; Рис. 6), що свідчить про збільшення Ca^{2+} -провідності АМРА-рецепторів у нейронах ДР при запаленні.

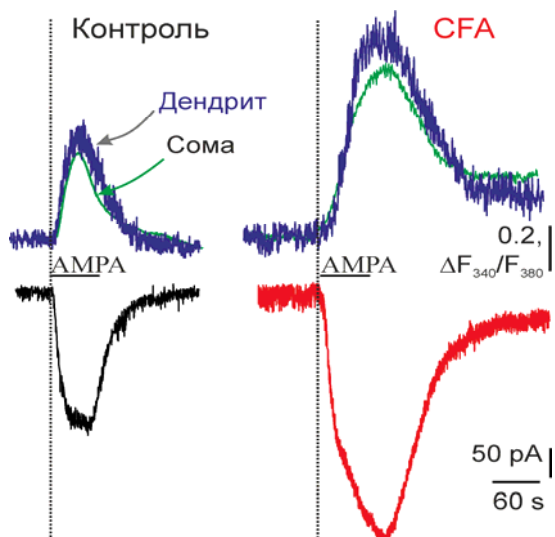


Рис. 6. Приклади струмів та $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транзиєнтів у сомі та дендритах нейронів ДР спинного мозку, викликаних аплікацією АМРА (5 μM , 60 сек), у контрольній групі тварин та із СФА-індукованим периферичним запаленням.

Частку Ca^{2+} -проникних AMPA-рецепторів можна чисельно оцінити за ефектом блокування струмів поліамінами (або їх похідними), а також згідно з $I-V$ кривими. Ми застосували синтетичний блокатор IEM-1460, який характеризується зворотністю дії, і дослідили блокуючий ефект IEM-1460 у концентрації 40 μM із використанням двох експериментальних підходів: 1) преінкубування з блокатором (близько 5 хв; Рис. 7А), 2) блокування відкритих (активованих) каналів (аплікація IEM-1460 на піку генерації струму; Рис. 7Б). Блокуючий ефект IEM-1460 був незначним у контролі ($7 \pm 2\%$ для обох протоколів), однак зростав до $30 \pm 4\%$ ($n=14$, $p<0.001$) при постійному периферичному запаленні (Рис. 7).

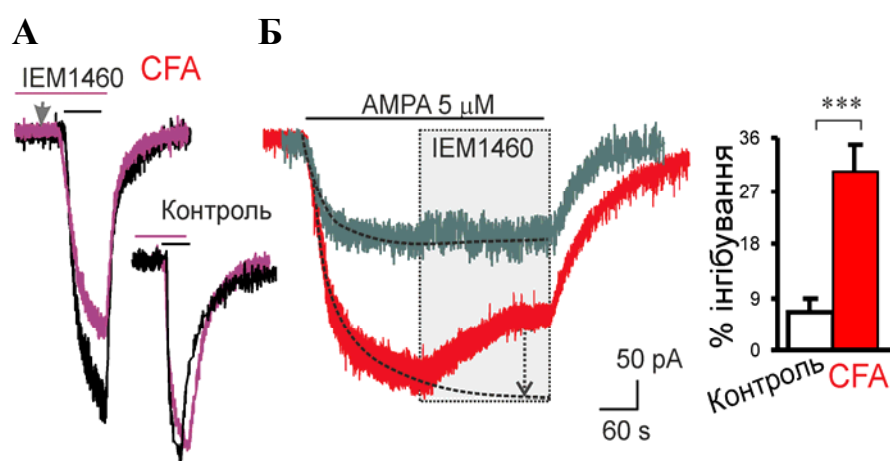


Рис. 7. Приклади AMPA-індукованих струмів у контролі та при запаленні до та у присутності IEM-1460. (А) Інкубація IEM-1460 ~5 хв; (Б) блокування каналу на піку генерації струму. *** $P<0.05$.

Для визначення $I-V$ характеристики струму, опосередкованого активацією позасинаптичних AMPA-рецепторів, ми застосували плавне (100–300 мсек) пиловидне наростання напруги від -70 mV до $+50$ mV та ізолювали досліджуваний компонент шляхом віднімання струмів, зареєстрованих до аплікації АМПА (базовий рівень) від таких при аплікації агоніста на кожному значенні потенціалу. $I-V$ залежність була майже лінійною у контролі (слабке викривлення при позитивних мембранних потенціалах), однак демонструвала значне викривлення при периферичному запаленні (Рис. 8А). Значення ІВ, розрахований як співвідношення амплітуди струму, зареєстрованого при $+30$ mV, до такого при -50 mV, складав 0.74 ± 0.07 ($n=11$) у контролі проти 0.27 ± 0.05 ($n=12$) при запаленні (Рис. 8Б). Отже, частка Ca^{2+} -проникних AMPA-рецепторів у позасинаптичних мембранах нейронів ДР при постійному периферичному запаленні зростає. Вестерн-блот аналіз підтвердив кількісне збільшення GluR1-вмісних AMPA-рецепторів у мембранній (але не синаптичній) фракції ДР спинного мозку у тварин із периферичним запаленням (Korach et al., 2011).

Поведінкові тести підтвердили розвиток і підтримання болю різної модальності (теплової та механічної гіперчутливості) у тварин із CFA-індукованим периферичним запаленням (Korach et al., 2012; 2013; 2016; 2018), що спостерігалось протягом 0.5–2 години після підшкірного введення CFA у

задню лапу щура і підтримувалося на постійному рівні щонайменше протягом кількох наступних днів (Рис. 18-20).

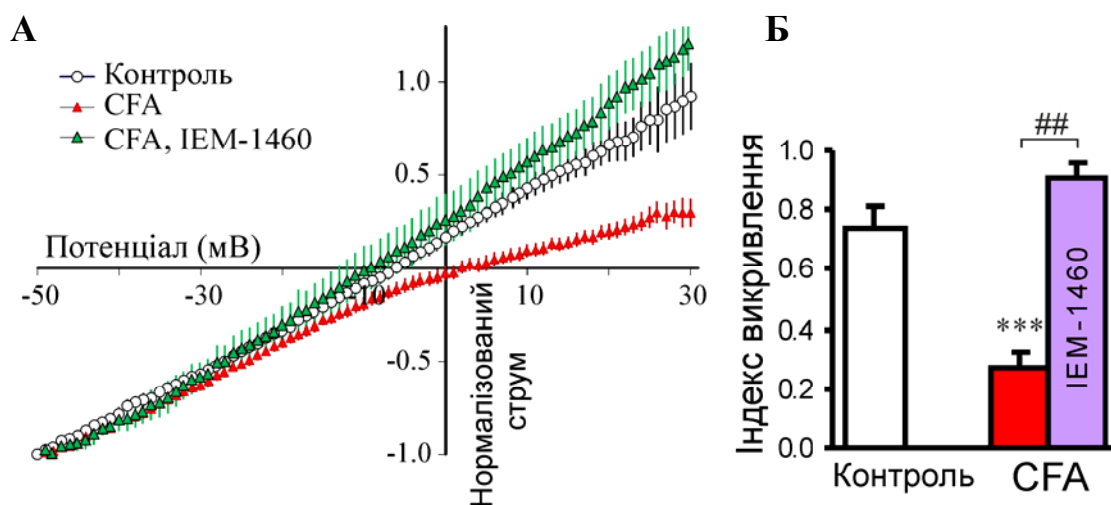


Рис. 8. I-V криві (А) та ІВ струму (Б), опосередкованого активацією позасинаптичних АМРА-рецепторів у нейронах ДР у контролі та при запаленні до і після аплікації ІЕМ-1460. *** $P < 0.001$ порівняно з контролем; ## $p < 0.01$.

Зміни функціонування нейронних мереж ДР спинного мозку при хронічних больових синдромах різного генезу

Дослідження трафікінгу АМРА-рецепторів (проведене здебільшого у нейронах гіпокампу) виявили, що позасинаптичні АМРА-рецептори в плазматичній мембрані дуже мобільні і швидко та безперервно переміщуються між поверхнею мембрани і внутрішньоклітинними компартментами шляхом клатрин-опосередкованого вбудовування та ендоцитозу (Bredt, Nicoll, 2003; Malinow, Malenka, 2002), а також латеральної дифузії (Bats et al., 2007; Choquet, Triller, 2003). Субодиниці рецептора синтезуються і збираються в ендоплазматичному ретикулумі та апараті Гольджі (у сомі та локально у дендритах), а потім вбудовуються у плазматичну мембрану. Значна частина рецепторів є мобільною – ці рептори безперервно дифундують між ділянками мембрани і не закріплюються у постсинаптичній щільності, тому можуть надходити до внутрішньоклітинних депо внаслідок інтерналізації (Heine et al., 2008; Petrini et al., 2009). Вилучені рецептори можуть надалі повторно вбудовуватися у плазматичну мембрану або підлягати лізосомній деградації (Carroll et al., 2001) (Рис. 9А). Таким чином, позасинаптичний пул рецепторів постачає АМРА-рецептори у синапси. Кількість АМРА-рецепторів у постсинаптичній мембрані визначає синаптичну пластичність і може драматично розрізнятися у різні періоди нейронної активності, більше того – бути передумовою патологічної активності нейронів і загалом визначати патологічні стани, зокрема вищезазначені зміни у нейронах ДР спинного мозку при периферичному запаленні. Виявлені нами порушення обігу синаптичних та позасинаптичних АМРА-рецепторів опосередковуватимуть гіперзбудливість

нейронних мереж та сенситизацію ДР спинного мозку, що лежить в основі підтримання хронічного болю (Рис. 9Б).

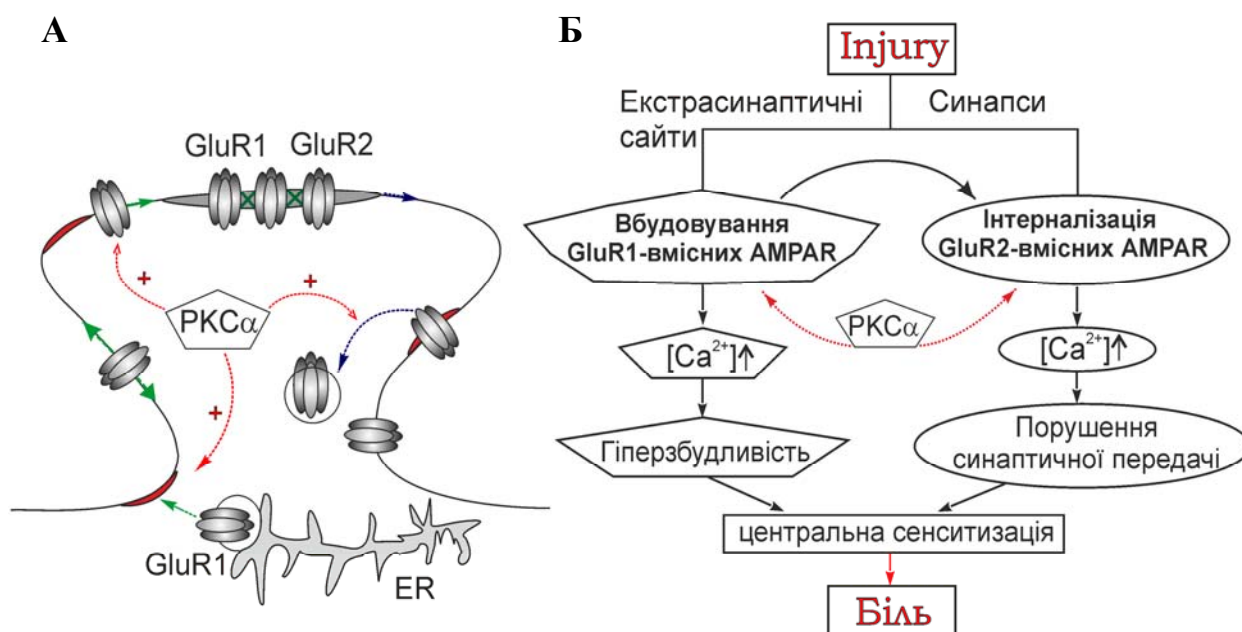


Рис. 9. (А) Схема динамічного обігу АМРА-рецепторів між синаптичною та позасинаптичними ділянками мембрани. (Б) Схема порушень трафікінгу АМРА-рецепторів у нейронах ДР, що беруть участь у підтриманні сенситизації ДР.

Для підтвердження цієї гіпотези ми провели дослідження змін функціонування нейронних мереж ДР спинного мозку та зокрема внесок АМРА-рецепторів у регуляцію синаптичного збудження нейронів ДР при больових синдромах різного генезу. Враховуючи, що популяція нейронів ДР є не гомогенною і демонструє відмінні імуногістохімічні, електрофізіологічні та функціональні властивості, усі нейрони попередньо тестували за типом генерації ПД у відповідь на стимуляцію вхідним струмом. Нейрони ДР розділили на дві основні групи: «тонічні» та «адаптивні». Тонічними були нейрони, які здатні підтримувати тривалу генерацію ПД із збільшенням частоти такої генерації при збільшенні інтенсивності струму. Адаптивними вважали нейрони, у яких спостерігали швидку адаптацію генерації ПД, або ті, що генерували лише один ПД незалежно від величини деполяризуючого струму (Рис. 10А).

Оцінюючи сЗПСС, ми виявили, що частота генерації та амплітуда струмів у обох групах нейронів розрізнялися за фізіологічних умов (медіанні значення 2.1 Гц, n=15 у тонічних нейронах та 0.8 Гц, n=19 в адаптивних нейронах; $p < 0.001$ тест Манна-Уїтні; Рис. 10Б). СФА-індуковане периферичне запалення супроводжувалось гіперзбудливістю нейронів ДР (збільшення частоти генерації сЗПСС на ~27% через 1 день після індукції запалення; $p < 0.001$, тест Колмогорова-Смірнова). Характерно, що зміни були клітинно-специфічними. Частота сЗПСС достовірно збільшувалась в адаптивних нейронах (підвищення

на $\sim 177\%$, $n=15$, $p<0.001$, тест Манна-Уїтні; Рис. 10Б), однак достовірно не змінювалася у тонічних нейронах (2.1 Гц, $n=15$ у контролі та 1.6 Гц, $n=11$ у CFA-групі, $p=0.47$).

Подібний характер змін спостерігався також у випадку мЗПСС, опосередкованих активацією AMPA-рецепторів: збільшення частоти в адаптивних нейронах при запаленні (на $137 \pm 31\%$, $p<0.05$), на противагу зменшенню цього показника у тонічних нейронах (Korach et al., 2015). Характерно, що при запаленні спостерігався перерозподіл мЗПСС на користь синаптичних подій із тривалішою кінетикою спаду (яка характерна для GluA2-вмісних AMPA-рецепторів).

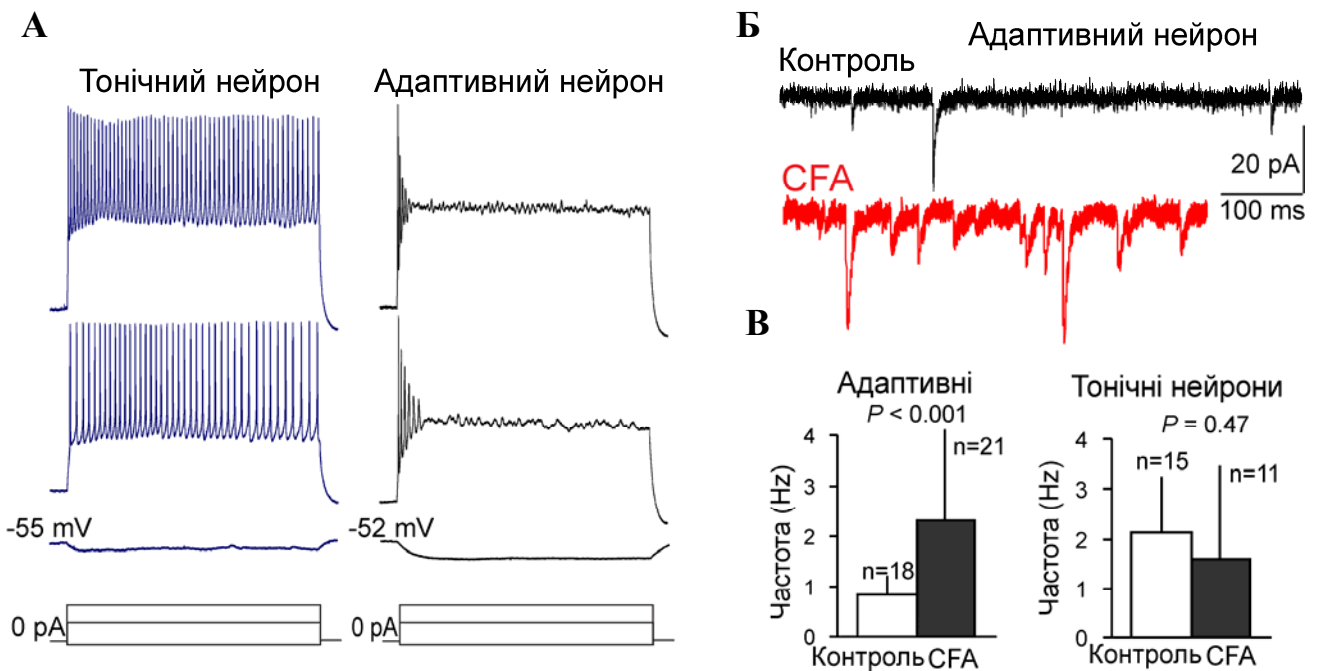


Рис 10. (А) Приклади генерації ПД, викликаних деполяризаційним струмом різної інтенсивності, у нейронах ДР спинного мозку. (Б) Приклади сЗПСС в адаптивних нейронах у контрольних тварин та із CFA-індукованим периферичним запаленням. (В) Статистика змін частоти сЗПСС у двох групах нейронів через 1 день після індукції запалення.

Для встановлення можливих змін балансу між синаптичним збудженням та гальмуванням при периферичному запаленні ми реєстрували також ГПСС при підтримуючому потенціалі 0 мВ. Співвідношення частот сЗПСС та сГПСС для адаптивних нейронів становило 21 ($n=13$) у контролі, однак 65 ($n=15$) при CFA-індукованому запаленні, демонструючи зміщення балансу в сторону гіперзбудження (в ~ 3 рази; $p<0.05$, тест Манна-Уїтні) (Korach et al., 2015).

Загалом постійне периферичне запалення супроводжується генерацією ПД первинними ноцицепторами, вивільненням глутамату із аферентних терміналей, що спричиняє активацію AMPA-рецепторів у синапсах та у позасинаптичних ділянках мембрани (внаслідок спіловеру («переливу») глутамату) і призводить до порушень збалансованого обігу AMPA-рецепторів, а

відтак – до гіперзбудливості ноцицептивних нейронів та нейронних мереж і сенситизації ДР (Рис. 11).

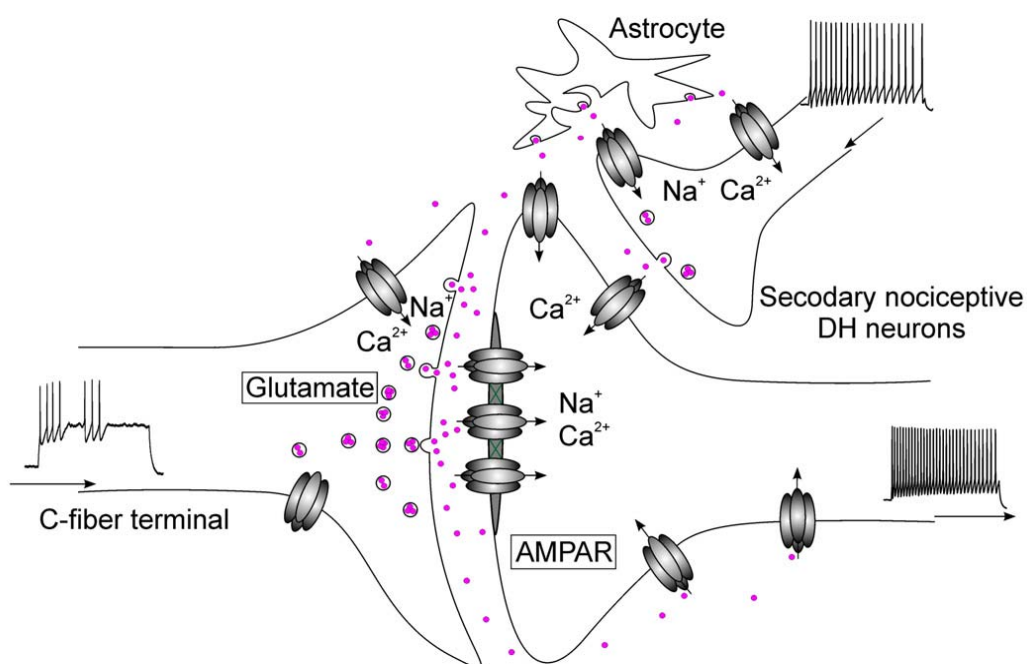
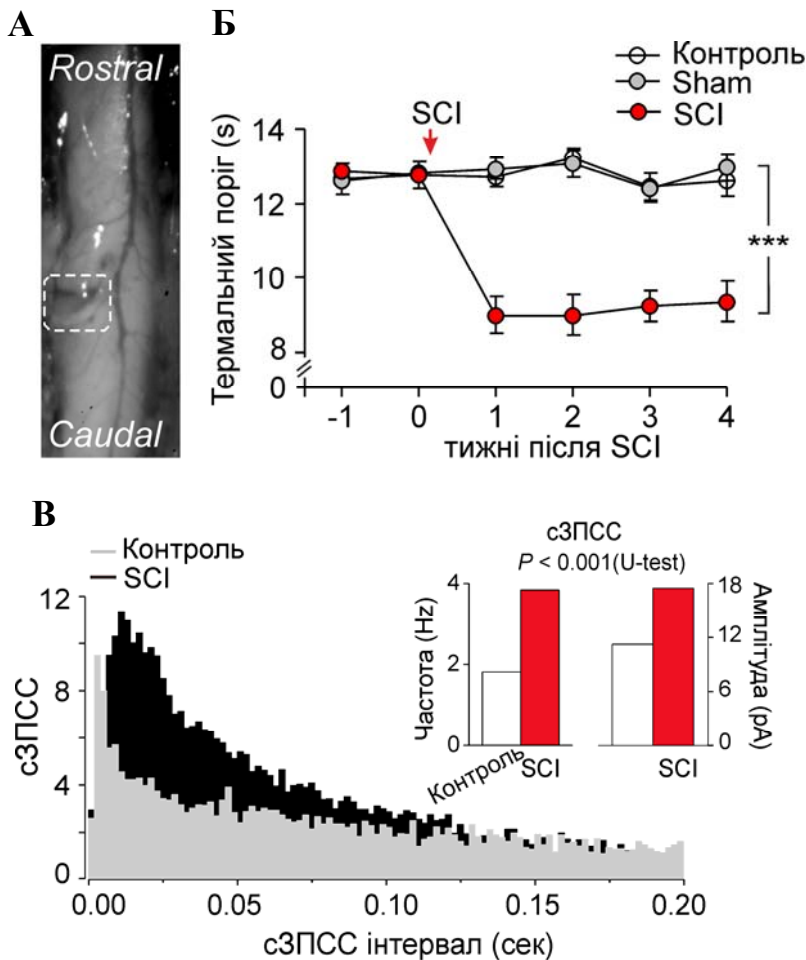


Рис. 11. Модель ноцицептивної сигналізації за участю синаптичних та позасинаптичних АМРА-рецепторів у нейронах ДР спинного мозку при периферичному запаленні.

Для моделювання хронічного больового синдрому центрального походження (не периферичного, як у випадку СФА-індукованого запалення) ми використали травмування спинного мозку (spinal cord injury, SCI; Рис. 12А). Відомо, що у близько 80% пацієнтів із травмою спинного мозку розвивається одне з найбільш важких ускладнень – синдром спастичності (Biering-Sorensen et al., 2006). Останнє являє собою дефіцит моторної функції (проявляється м'язовими спазмами, гіперрефлексією, розладами локомоції) і часто супроводжується хронічним болем, який розвивається протягом перших місяців після травми; при цьому близько третини пацієнтів характеризують біль як «сильний» (Finnerup et al., 2014). Експериментальні дослідження свідчать, що механізм спастичності, а саме гіперзбудливість мотонейронів нижче місця травми, пов'язаний із змінами в обробці сенсорної інформації (Norton et al., 2008). Це підтверджується збільшенням активності первинних аферентів та інтернейронів у відповідь на ноцицептивні (больові) та не больові стимули. Такі зміни, у свою чергу, можуть бути зумовлені низкою міжклітинних та внутрішньоклітинних механізмів, наприклад, збільшенням вивільнення глутамату (Xu et al., 2004), посиленням функції натрієвих каналів (Hains et al., 2003), зменшенням експресії хлорного транспортеру (відповідно – зміною градієнту хлору) (Boulenguez et al., 2010).

Для дослідження сенситизації ДР та можливої участі АМРА-рецепторів у змінах процесінгу сенсорної інформації після SCI ми найперше провели поведінкові тести для підтвердження наявності хронічного больового синдрому після SCI. Було виявлено істотну ноцицептивну гіперчутливість теплової

модальності, яка розвивалась у тварин із SCI-індукованою спастичністю протягом одного тижня і зберігалася увесь досліджуваний період часу (зниження порогу чутливості на $\sim 30\%$, $n=15$; $p<0.001$; Рис. 12Б). Гіперчутливість корелювала із моторною дисфункцією і змінами Н-рефлексу (Korach et al., 2017). Електрофізіологічні дослідження на зрізах спинного мозку нижче рівня травми виявили гіперзбудливість ДР у тварин із спастичним та больовим синдромами: частота сЗПСС зростала від 1.8 Гц до 3.8 Гц (на $\sim 116\%$; $p<0.001$ тести Колмогорова-Смірнова та Манна-Уїтні; Рис. 12В).



Гіперзбудливість ДР була клітинноспецифічною. Збільшення частоти та амплітуди сЗПСС спостерігалось в адаптивних нейронах (Рис. 13), тоді як зміни у тонічних нейронах були протилежними, а саме зменшення частоти та амплітуди сЗПСС (Korach et al., 2017). В адаптивних нейронах частота сЗПСС достовірно збільшувалась у ~ 9 разів (медіанні значення 0.83 Гц, $n=18$ у контролі та 7.60 Гц, $n=11$ після SCI; $p<0.001$, тест Манна-Уїтні; Рис. 13); амплітуда сЗПСС зростала від 7.2 пА у контролі до 16.6 пА після SCI ($p<0.05$, тест Манна-Уїтні). У тонічних нейронах медіанне значення частоти сЗПСС достовірно зменшувалося на $\sim 49\%$ ($p<0.001$, тест Колмогорова-Смірнова) та медіанне значення амплітуди сЗПСС зменшувалося на $\sim 20\%$ ($n=15$ у контролі та $n=10$ після SCI; $p<0.05$, тест Манна-Уїтні) (Korach et al., 2017).

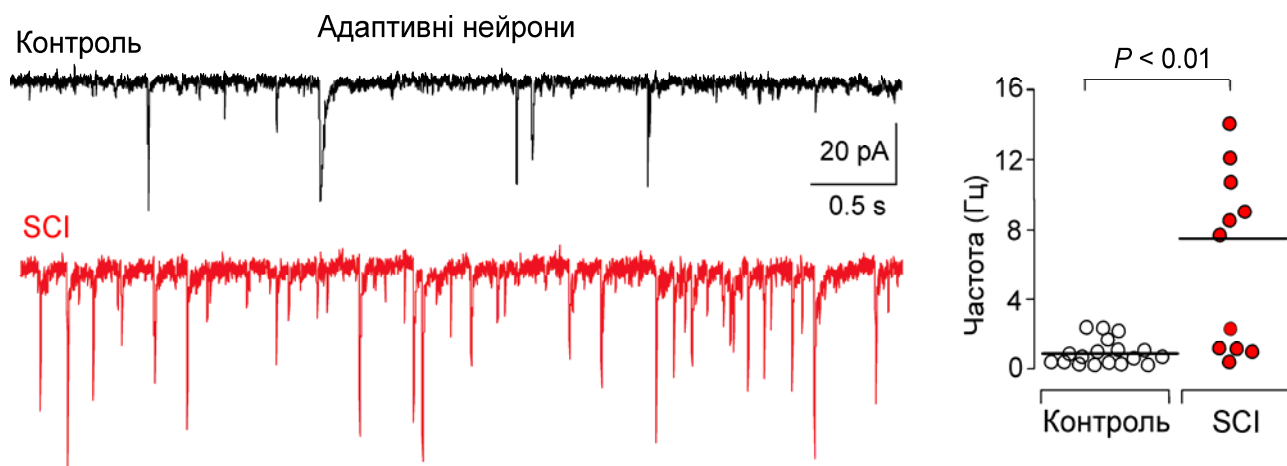


Рис 13. Приклади сЗПСС та медіанні значення їх частоти в адаптивних нейронах ДР у контрольній групі та після травми спинного мозку (SCI).

Дослідження мЗПСС, опосередкованих активацією AMPA-рецепторів, виявило подібний характер порушень. Частота і амплітуда постсинаптичних струмів зростала в адаптивних нейронах у середньому на $\sim 60\%$ ($p < 0.01$, тест Манна-Уїтні; Рис. 14А). Збільшувалась також площа (інтеграл) струмів (на $\sim 113\%$, $p < 0.01$) і кінетика спаду (на $\sim 71\%$, $p < 0.01$), що супроводжувалось перерозподілом кінетик у досліджуваній вибірці. Зміни були цілком подібні до таких, виявлених при СФА-індукованому периферичному запаленні. Характерно, що у тонічних нейронах зміни мали протилежний характер; зокрема медіанне значення амплітуди зменшувалось на $\sim 32\%$ ($p < 0.01$, тест Манна-Уїтні; Рис. 14Б). Аналіз AMPA-рецептор-опосередкованих мЗПСС виявив зменшення провідності поодиноких каналів в адаптивних нейронах (від 19.9 ± 3.7 pS у контролі до 6.1 ± 1.3 pS після SCI; $p < 0.001$; Рис. 14А). Це підтверджує інтерналізацію GluA2-вмісних AMPA-рецепторів із синапсів у адаптивних нейронах. Аналогічний аналіз у тонічних нейронах не виявив достовірних розбіжностей між розрахованими значеннями у контрольній групі (9.1 ± 2.1 pS) та після SCI (11 ± 2 pS, $p = 0.67$; Рис. 14Б).

Як і у випадку СФА-індукованого периферичного запалення, зміни в постсинаптичних AMPA-рецепторах у нейронах ДР після SCI призводили до зміщення балансу між збудженням та гальмуванням. Баланс, розрахований як співвідношення медіанних значень частот сЗПСС та сГПСС, викривлявся в бік гіперзбудження адаптивних нейронів: співвідношення зростало майже в 11 разів (із 20, $n = 14$ у контролі до 228, $n = 10$ після SCI; $p < 0.01$, тест Манна-Уїтні; Рис. 15). У тонічних нейронах зміни були протилежними – зміщення балансу відбувалося в бік синаптичного гальмування: співвідношення медіанних значень частот сЗПСС та сГПСС зменшувалося від 113 ($n = 10$) у контролі до 55 після SCI ($n = 9$; $p < 0.01$, тест Манна-Уїтні; Рис. 15).

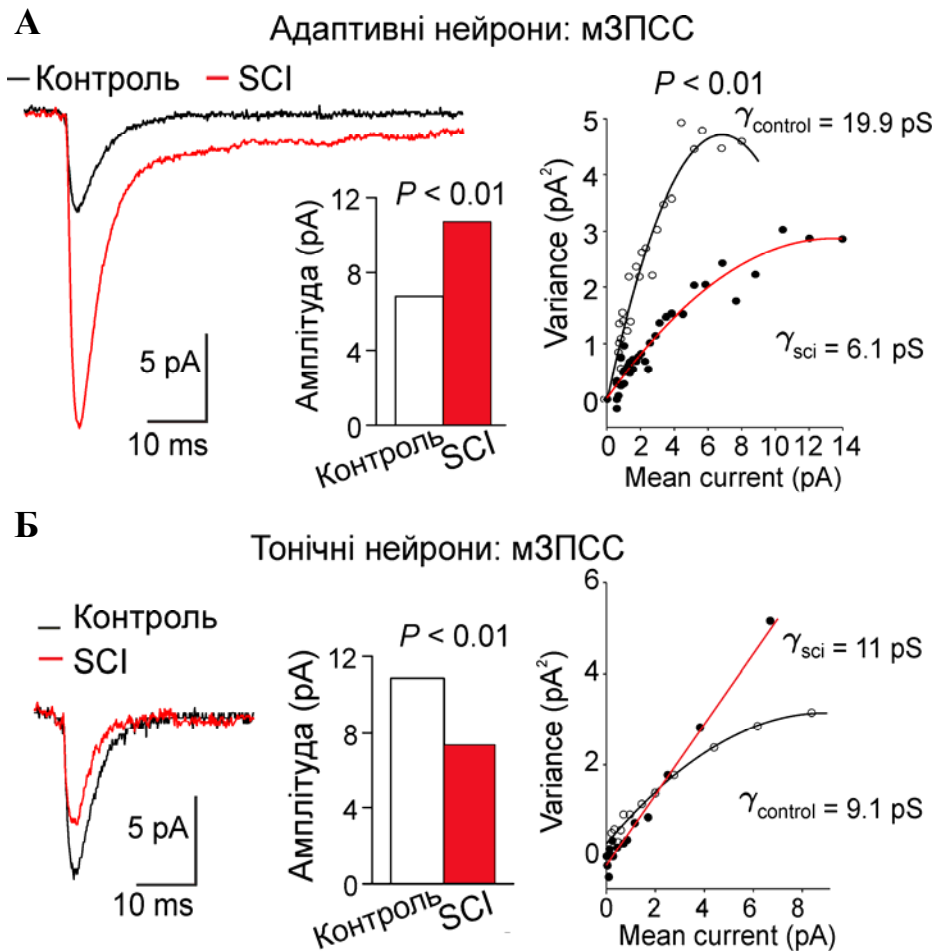


Рис. 14. (А) Приклади мЗПСС, опосередкованих активацією АМРА-рецепторів, та їх медіанні значення амплітуди в адаптивних нейронах у контролі та після травми спинного мозку (SCI). Аналіз провідностей поодиноких АМРА-рецепторів (single-channel conductance) у контролі та після SCI. (Б) Аналогічно як для (А) тільки для нейронів тонічного типу. $P < 0.01$ порівняно з контролем.

У нейронах тонічного типу збільшувалась кількість швидких (гліцинергічних) сГПСС у порівнянні із кількістю повільних (ГАМКергічних) струмів, що свідчить про потенціацію гліцинергічної передачі у цих нейронах. Таким чином, баланс між синаптичним збудженням та гальмуванням зміщувався в бік збудження адаптивних нейронів (домінуюча група збуджуючих інтернейронів) та одночасного гальмування тонічних (переважно гальмівних) нейронів. Наслідком такого комбінованого впливу двох вищезазначених порушень є гіперзбудливість мереж ДР спинного мозку, що лежить в основі самопідтримання хронічних больових синдромів різного генезу.

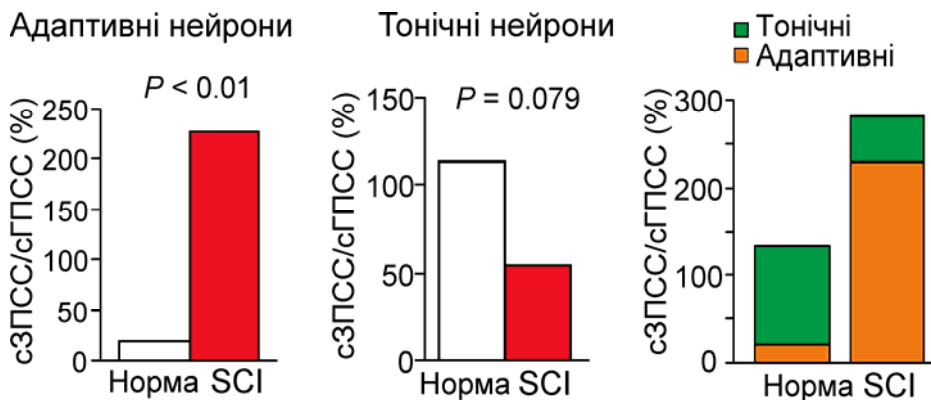


Рис 15. Зміщення балансу між синаптичним збудженням та гальмуванням у нейронах ДР різних типів після травми спинного мозку (SCI).

Терапевтичні ефекти «смайт»-блокування Ca^{2+} -проникних АМРА-рецепторів спинного мозку при хронічному больовому синдромі

Враховуючи вищенаведені дані, зростання пропорції Ca^{2+} -проникних АМРА-рецепторів (без GluR2-субодиниці) у нейронах ДР спинного мозку опосередковує підтримання хронічного больового синдрому. Відповідно, потенційна корекція такого перерозподілу рецепторів має впливати на патогенез хронічного болю. З урахуванням цього наступні дослідження ми проводили на рівні цілого організму.

В першу чергу ми дослідили, чи призводить селективне інгібування Ca^{2+} -проникних АМРА-рецепторів у спинному мозку до усунення (полегшення) болю. Враховуючи ключову роль рецепторів цього підтипу у пластичності ЦНС, ретельний вибір сполуки-інгібітора є необхідною передумовою для відсутності побічних ефектів (першочергової умови будь-якої терапії). Ми застосували нове покоління високоселективних блокаторів Ca^{2+} -проникних АМРА-рецепторів, блокуюча дія яких підсилюється при активації рецепторів, – активаційно-залежне інгібування. Збільшення блокуючої здатності органічних катіонів (зокрема, дикатіонної похідної фенілциклогексила, ІЕМ-1925) при високочастотній активації АМРА-рецепторів було продемонстровано на нейронах гіпокампу (Zaitsev et al., 2010). Дія таких блокаторів посилюється при гіперактивації синапсів. Ця властивість активаційної залежності дозволяє вибірково блокувати патологічну гіперактивацію глутаматергічних синапсів нейронів при мінімальному впливі на фізіологічні процеси.

Для доставки сполук локально у поперекові сегменти спинного мозку, ділянку яка іннервує задні кінцівки тварини, була розроблена методика вживлення катетеру у спинномозковий канал (Korach et al., 2017). Використання такого підходу дозволяє багаторазово вводити досліджувані речовини у нижні рівні спинного мозку під оболонки спинного мозку, що істотно підвищує ефективність тест-сполук та локальність їх дії (Рис. 16).

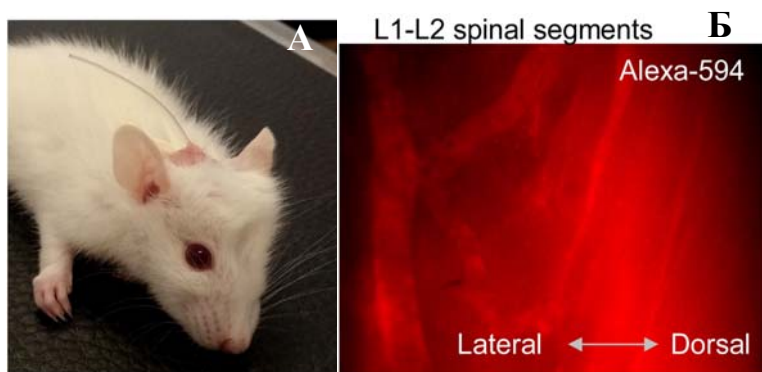


Рис. 16. (А) Фотографія 19-денного щура незабаром після вживлення катетеру у спинномозковий канал. (Б) Флуоресцентне зображення поперекового відділу спинного мозку після інтратекального введення барвника.

Дійсно, застосування активаційнозалежних блокаторів, які вводили інтратекально у поперековий відділ спинного мозку, не призводило до змін сенсорної чутливості різних модальностей у контрольних тварин (Korach et al., 2016), проте супроводжувалось вираженим антиноцицептивним ефектом у тварин із периферичним запаленням. Це проявлялось для обох досліджуваних

сполук (IEM-1460 та IEM-1925) у послабленні гіперчутливості до теплових стимулів вже протягом годин після інтратекального введення (Рис. 17А). Ефект блокаторів був дозозалежним (виявлявся у мікромолярних концентраціях) і тривав принаймні сім днів поспіль (тривалий ефект одноразового введення). Таким чином, тривалість болювого синдрому помітно зменшувалася. Зокрема, механічна гіперчутливість (поріг болю) відновлювалася до базового рівня (контролю) протягом 2-3 днів (Рис. 17Б).

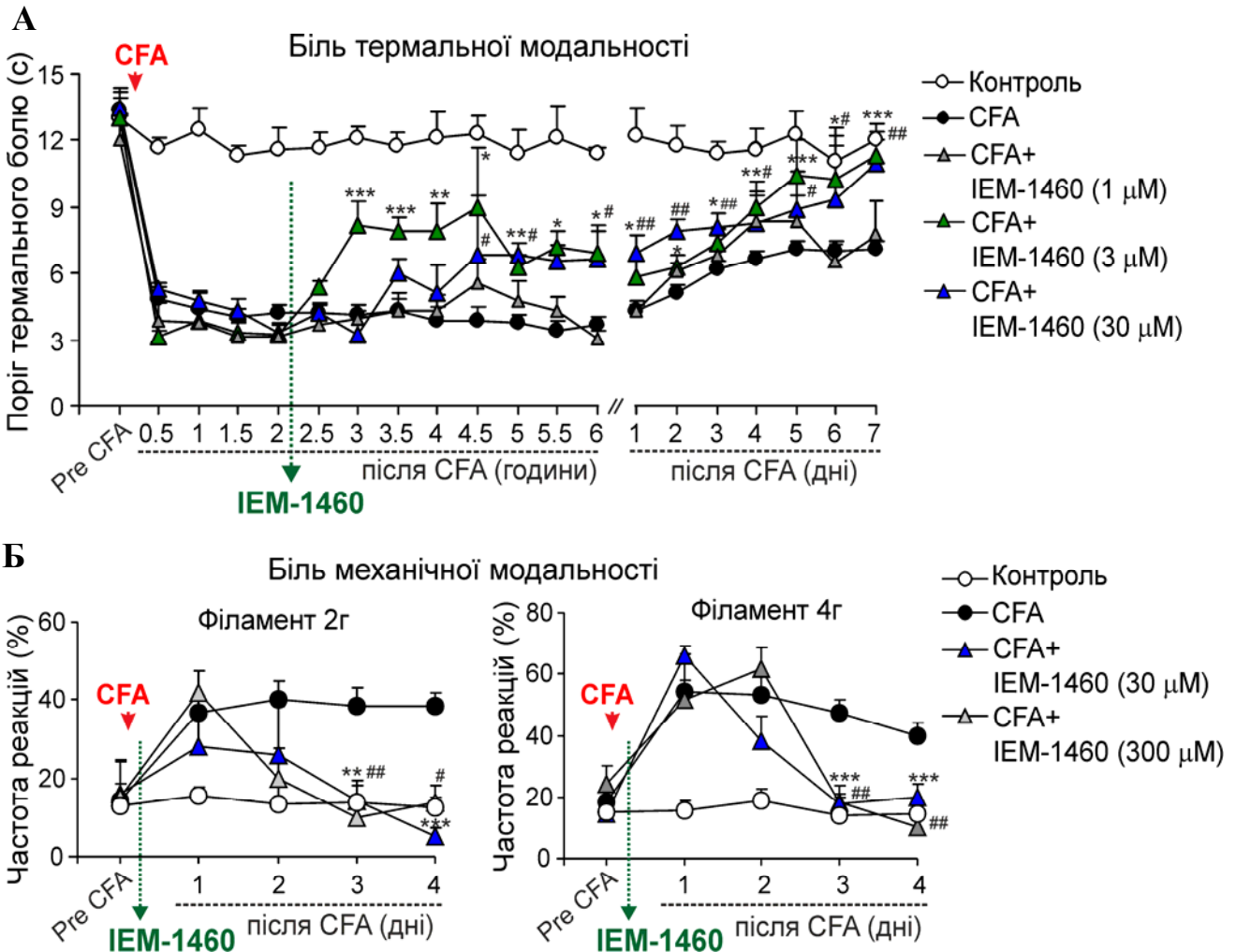


Рис. 17. Терапевтичний вплив активаційнозалежного селективного блокатора Ca^{2+} -проникних AMPA-рецепторів IEM-1460 на гіперчутливість у тварин із CFA-індукованим периферичним запаленням. (А) Зміни теплової чутливості у тварин різних груп (тест Харгрівса). (Б) Зміни тактильної чутливості у відповідь на механічні стимули різної інтенсивності (тест фон Фрея). ** $P < 0.01$, *** $p < 0.001$ у порівнянні з контролем. # $P < 0.05$, ## $p < 0.01$ порівнянно із CFA (one-way ANOVA).

Корегування порушеного обігу AMPA-рецепторів у нейронах ДР спинного мозку для терапії хронічного болю: фармакологічний підхід

Наступним етапом було встановлення терапевтичних впливів на порушений обіг AMPA-рецепторів у нейронах ДР спинного мозку шляхом пригнічення

активності РКСа – ключового ферменту, що задіяний у молекулярному механізмі таких порушень. Як наслідок, ми очікували полегшення больового синдрому при тривалому периферичному запаленні. Високоєфективний інгібітор РКС челеритрин (chelerythrine), який вводили інтратекально незадовго (30 хв) перед індукуванням периферичного запалення (Рис. 18А), виявляв дозозалежний антиноцицептивний ефект (Рис. 18Б). Такий ефект челеритрину проявлявся вже у концентрації 660 нМ (IC50 для інгібування РКС) як часткове відновлення порогу теплової чутливості на іпсилатеральній (запаленій) лапі (зростання на ~168%, $n=5$; $p<0.001$ порівняно із відповідним показником для CFA-групи без блокатора). Тривалість антиноцицептивного ефекту челеритрину залежало від концентрації та часу після одноразового введення блокатора. Зокрема поріг теплової чутливості у тварин із запаленням після введення челеритрину у концентрації 396 мкМ не відрізнявся від такого у контрольній групі тварин ($p>0.2$; Рис. 18Б) і лишався стабільним щонайменше протягом 2 днів.

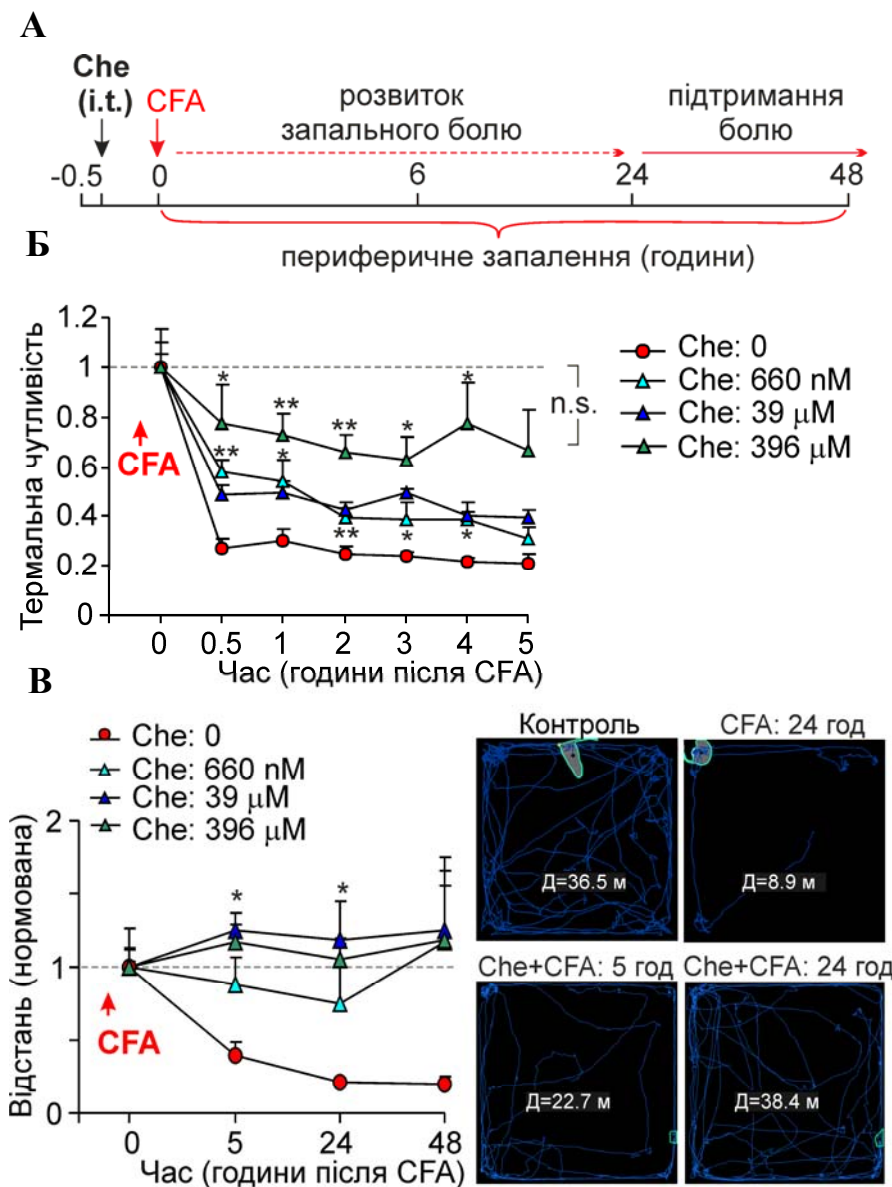


Рис. 18. (А) Схема експериментальної терапії з використанням челеритрину (Che), який вводили інтратекально (i.t.) перед індуцією запалення. (Б-В) Фармакологічне інгібування РКС у спинному мозку дозозалежно усуває ноцицептивну гіперчутливість (Б) та розвиток локомоторного дефіциту у тесті «відкрите поле» у щурів із периферичним запаленням (В). (В) Приклади часових змін локомоції у щура після введення Che та ін'єкції CFA. * $P<0.05$, ** $p<0.01$ у порівнянні з контролем; n.s. – зміни недостовірні (ANOVA тест).

Оскільки больовий синдром супроводжується вираженим дефіцитом локомоції, що проявлялося протягом години після індукції запалення і зберігалось тривалий період часу (щонайменше кілька днів; Рис. 18В), ми провели оцінку відновлення рухової активності з використанням тесту «відкрите поле». Челеритрин скасовував розвиток порушень локомоції у щурів із периферичним запаленням ($p>0.1$; Рис. 18Б).

Челеритрин виявляв істотний терапевтичний ефект також при його застосуванні після розвитку периферичного запалення (більш клінічно обґрунтований випадок). Зокрема інтратекальне введення блокатору через один день після індукції периферичного запалення ін'єкцією CFA (Рис. 19А) та підтвердження больового синдрому у тварин призводило до скорочення тривалості хронічного болю різної модальності. Також така терапія супроводжувалась відновленням локомоторної функції та усуненням підвищеної тривожності тварин із постійним периферичним запаленням (Korach et al., 2018).

Електрофізіологічні дослідження на клітинному рівні підтвердили, що блокування РКС челеритрином усуває порушення AMPA-рецептор-опосередкованих ЗПСС у нейронах ДР спинного мозку при постійному периферичному запаленні, а саме: відновлює $I-V$ криві та індекс випрямлення струмів через один день після індукції запалення (Рис. 19Б).

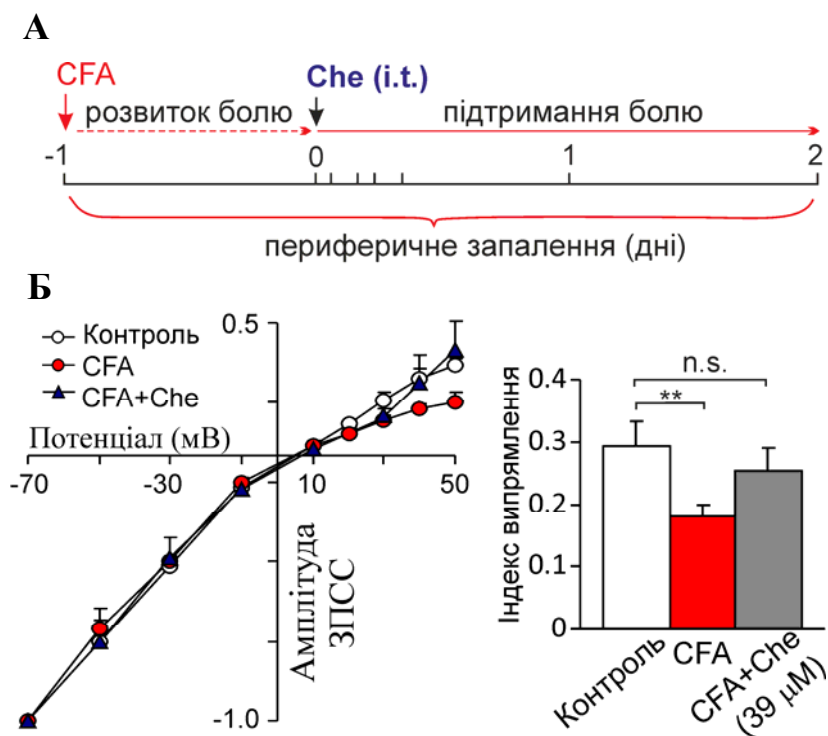


Рис. 19. (А) Схема інтратекального (i.t.) введення челеритрину (Che) після індукції периферичного запалення ін'єкцією CFA. (Б) $I-V$ криві та індекс випрямлення ЗПСС у нейронах ДР у контролі, при периферичному запаленні та після експериментальної терапії з використанням челеритрину (Che). ** $P < 0.01$, n.s. – зміни недостовірні.

Для інгібування РКСа локального у спинному мозку ми застосували новий селективний блокатор цього підтипу РКС – пептид С2-4, який вводили інтратекально у досліджуваних концентраціях (1–100 мкМ). Антиноцицептивний ефект пептиду проявлявся протягом 30 хв після його введення у мікромольних концентраціях, залежав від часу та залишався стабільним протягом наступних 1-2 днів ($p < 0.05$; Рис. 20).

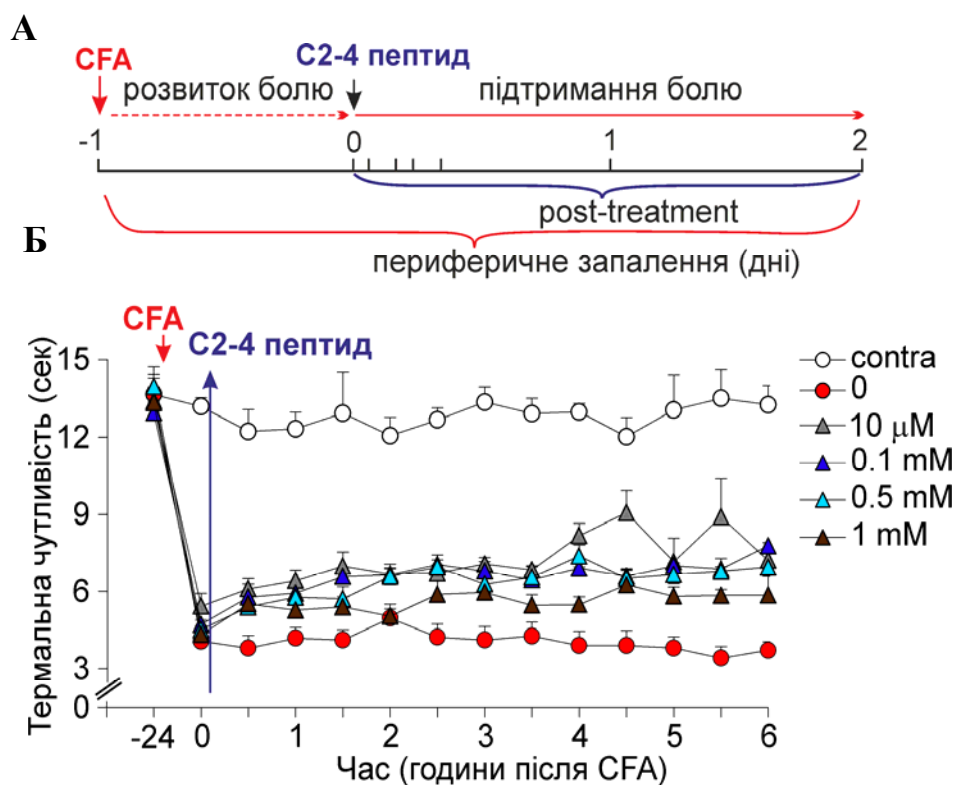


Рис. 20. (А) Схема експериментальної терапії хронічного болю шляхом інгібування спінальної РКСа після розвитку CFA-індукованого периферичного запалення. (Б) Антиноцицептивний ефект інtrateкального введення пептиду C2-4 у різних концентраціях.

Корекція порушеного обігу AMPA-рецепторів у нейронах ДР спинного мозку: генна терапія хронічного болю

Наступним підходом для регуляції активності РКСа було генетичне вимкнення (нокдаун) гену, що кодує РКСа, за допомогою антисенсових олігонуклеотидів (AS ODN). Олігонуклеотиди являють собою одноланцюгові синтетичні молекули ДНК завдовжки у 12-35 нуклеотидів, комплементарні до мРНК, які модулюють експресію генів шляхом утворення гетеродуплексів із мРНК. Внаслідок цього відбувається алостеричне блокування трансляції та деградація мРНК і, відповідно, пригнічення роботи гену.

Тестуючи ефект генетичного вимкнення РКСа у поперековому відділі спинного мозку на чутливість тварин у нормі, ми виявили, що базальна чутливість різної модальності (теплова та механічна) у різних групах тварин не розрізнялися. Це свідчить про відсутність істотного впливу олігонуклеотидів на чутливість у нормі. У тварин із периферичним запаленням та больовим синдромом генна терапія зупиняла розвиток хронічного болю. Було протестовано різні схеми введення генетичного матеріалу (Рис. 21А). Зокрема, інtrateкальне введення AS ODN протягом 3 діб перед індукцією периферичного запалення супроводжувалось зростанням порогу теплової чутливості в середньому на ~64% (n=8; $p<0.001$) та ~70% ($p<0.05$ порівняно з MS ODN) у дні 1 та 2 після індукування запалення, відповідно; введення AS ODN протягом 4 днів – на ~84% (n=6; $p<0.001$) та ~98% ($p<0.05$), відповідно (Рис. 21Б).

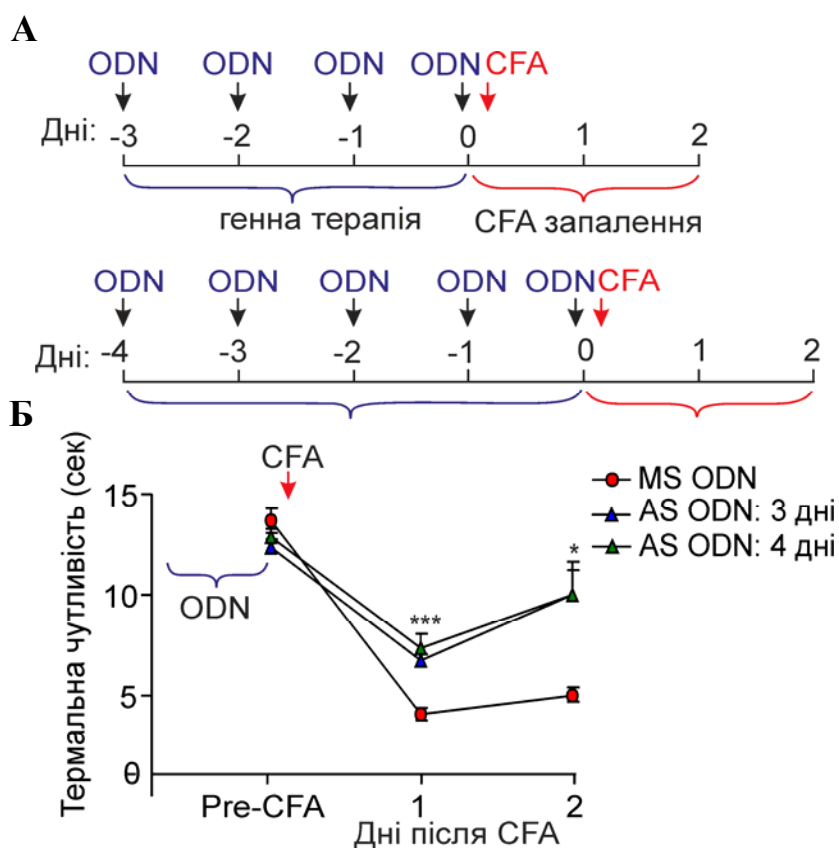


Рис. 21. А) Схеми проведення генетичної терапії олігонуклеотидами, введеними локально у поперековий відділ спинного мозку для нокдауну РКСа. (Б) Зміни порогу теплової ноцицептивної чутливості тварин із CFA-індукованим периферичним запаленням після введення генетичного матеріалу. * $P < 0.05$, *** $p < 0.001$ у порівнянні з MS ODN.

Генетичне вимкнення РКСа призводило також до полегшення хронічного болю механічної модальності. У щурів із периферичним запаленням та вимкненням експресії РКСа поріг механічної чутливості у відповідь на механічні стимули різної інтенсивності істотно зменшувався (Рис. 22).

Генетичне вимкнення РКСа у поперековому відділі спинного мозку було асоційовано із відновленням АМРА-рецептор-опосередкованих ЗПСС у синапсах між первинними аферентами та сенсорними нейронами ДР. Аналіз ЗПСС, викликаних стимуляцією первинних аферентів, виявив відновлення ІВ у нейронах CFA-групи після генетичної терапії тривалістю 4 дні. У тварин із периферичним запаленням ІВ становив 0.18 ± 0.02 ($n=6$) після введення MS ODN (контроль) проти 0.25 ± 0.02 ($n=11$) після введення AS ODN ($p < 0.05$). Таке значення ІВ в умовах запалення та введення AS ODN достовірно не відрізнялось від значення ІВ, отриманого у контрольній групі (без периферичного запалення; $p=0.5$; Рис. 23).

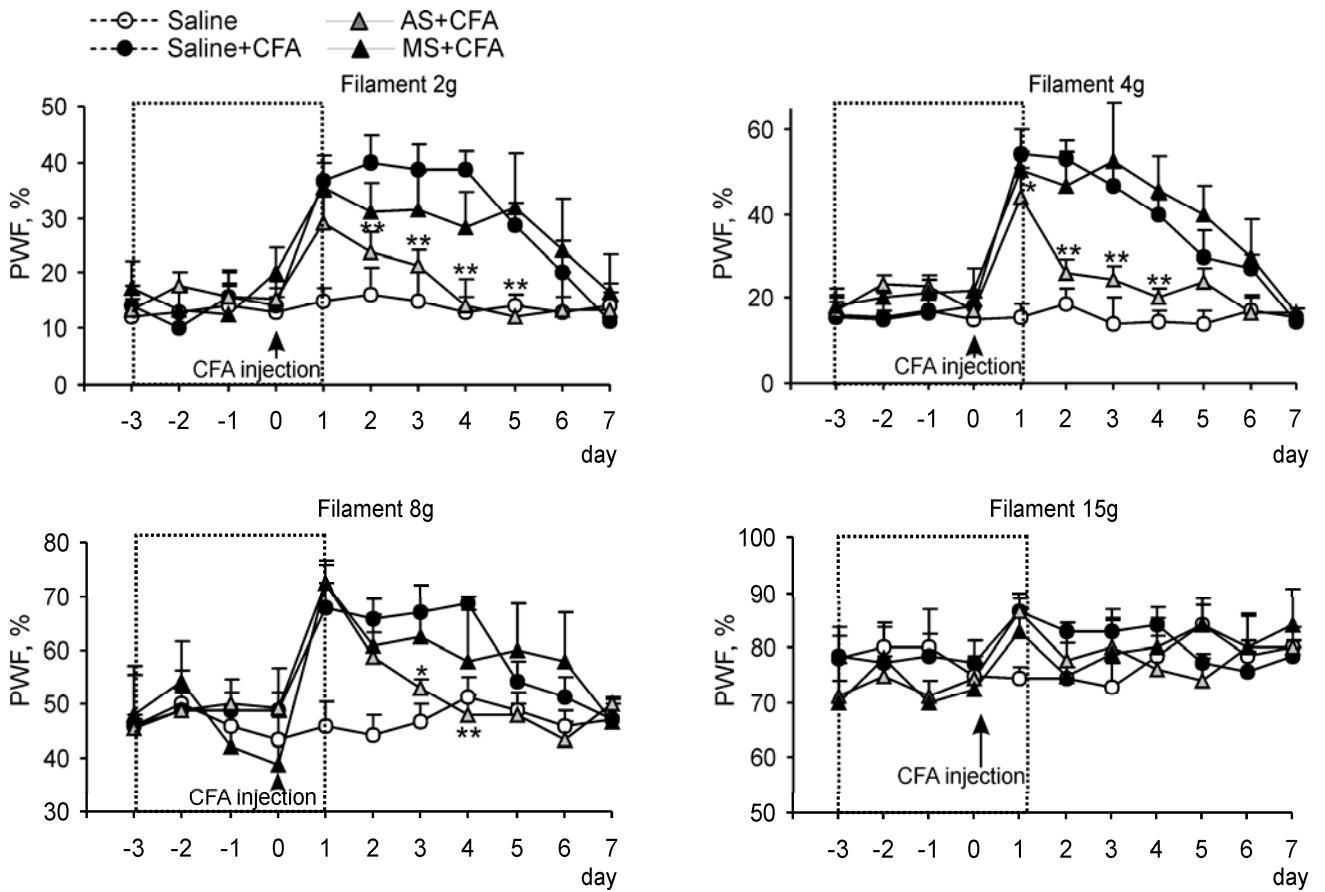


Рис. 22. Зміни механічної чутливості у відповідь на стимули різної інтенсивності (філаменти фон Фрея) до і після CFA-індукованого запалення та генетичного блокування РКСа у поперековому відділі спинного мозку за допомогою AS ODN. * $P < 0.05$, *** $p < 0.001$ у порівнянні з CFA.

Загалом, це свідчить, що антиноцицептивні ефекти модуляції активності РКСа (фармакологічне або генетичне пригнічення ферменту) причинно-наслідково пов'язані із РКСа-залежними порушеннями динамічного обігу АМРА-рецепторів (GluR1 та GluR2-вмісних рецепторів) у нейронах ДР спинного мозку.

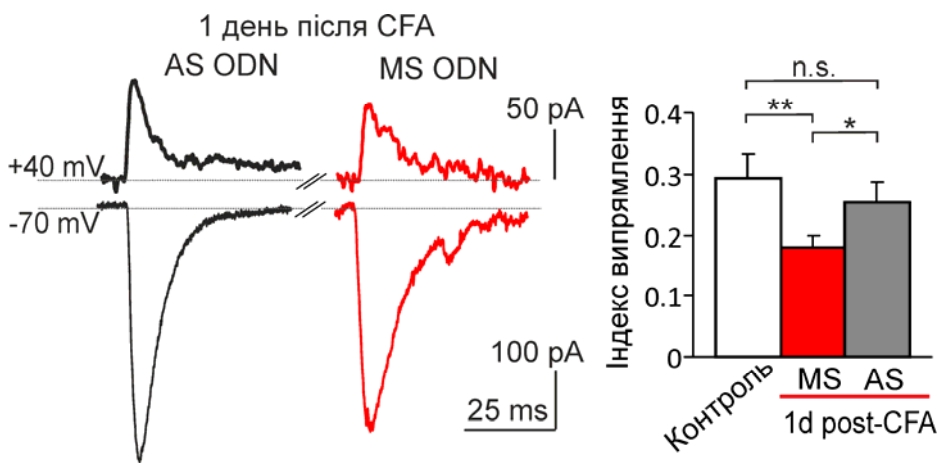


Рис. 23. Приклади ЗПСС та статистика ІВ у нейронах ДР у тварин із периферичним запаленням після генної терапії (нокдаун РКСа). * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлені результати комплексного дослідження клітинних та молекулярних спінальних механізмів хронічного болю; ідентифіковано порушення динамічного обігу АМРА-рецепторів як центральний механізм, що опосередковує підтримання хронічного болю різного генезу, з'ясовано молекулярний механізм таких порушень та запропоновано нові підходи для полегшення хронічних больових синдромів із мінімальною кількістю побічних ефектів, які базуються на корекції виявлених порушень.

1. Тривале периферичне запалення викликає зменшення популяції GluR2-вмісних АМРА-рецепторів у синапсах між первинними аферентами та ноцицептивними нейронами спинного мозку. Показано, що в основі такого зменшення лежить вилучення (інтерналізація) GluR2-вмісних АМРА-рецепторів із постсинаптичної мембрани.
2. Описаний молекулярний механізм, що опосередковує інтерналізацію синаптичних GluR2-вмісних АМРА-рецепторів при периферичному запаленні, та охарактеризовано каскад внутрішньоклітинних білків (старгазин, АВР/GRIP, PICK1 та протеїнкіназа С підтипу α), залучених у цей процес.
3. У нейронах дорзального рогу (ДР) спинного мозку функціонує чисельна популяція позасинаптичних АМРА-рецепторів, у яких за фізіологічних умов домінують GluR2-вмісні рецептори, що визначає відносно низьку проникність позасинаптичних АМРА-рецепторів для іонів кальцію. Сенсорні нейрони різних типів у спинному мозку щурів експресують АМРА-рецептори подібного складу. При периферичному запаленні кількість Ca^{2+} -проникних АМРА-рецепторів у позасинаптичних мембранах збільшується.
4. Тривале периферичне запалення посилює вбудовування GluR1-вмісних Ca^{2+} -проникних АМРА-рецепторів у позасинаптичні ділянки мембрани нейронів ДР спинного мозку. Механізм такого вбудовування є РКСа-залежним.
5. Порушення динамічного обігу АМРА-рецепторів у нейронах ДР призводять до змін у балансі між збудженням та гальмуванням у нейронних мережах, що спричиняє сенситизацію ДР спинного мозку.
6. Порушення трафікінгу АМРА-рецепторів у нейронах ДР мають місце при больових синдромах різного генезу (як периферичного, так і центрального походження). Гіперзбудливість (сенситизація) мереж ДР спинного мозку є результатом посилення збуджуючої синаптичної передачі та послаблення синаптичного гальмування. Такі зміни є клітинноспецифічними, а саме зміщення балансу у бік збудження адаптивних нейронів (переважно збуджуючі інтернейрони) та посилене синаптичне інгібування нейронів тонічного типу (гальмівні інтернейрони).
7. Розроблено метод цільової доставки у поперековий відділ спинного мозку для таргетування нейронів ДР з метою терапії хронічного болю. Отримані

дані демонструють терапевтичний ефект фармакологічного блокування Ca^{2+} -проникних АМРА-рецепторів інгібіторами нового покоління (активаційно-залежними блокаторами) на полегшення болювого синдрому з мінімальними побічними ефектами.

8. Показано терапевтичний вплив фармакологічного блокування РКСа як мішені для корегування порушеного трафікінгу АМРА-рецепторів у нейронах ДР спинного мозку та полегшення хронічного болю при тривалому периферичному запаленні.
9. Запропоновано застосування генної терапії хронічного болю. Продемонстровано терапевтичні ефекти нокдауну РКСа у поперековому відділі спинного мозку на полегшення запального болю у експериментальних тварин та обґрунтовано ефективність такого підходу на клітинному рівні.

Отримані дані демонструють причинно-наслідкові зв'язки між порушеннями регуляції динамічного обігу АМРА-рецепторів у нейронах ДР спинного мозку та розвитком і підтриманням хронічного болю, а також науково обґрунтовують впровадження нових підходів у стратегію лікування хронічних болювих синдромів із врахуванням ключової ролі центральних механізмів у підтриманні хронічного болю різного походження.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті (фахові видання, віднесені до першого і другого квартилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports)

1. Park JS, Voitenko N, Petralia RS, Guan X, Xu JT, Steinberg JP, Takamiya K, Sotnik A, **Корач О**, Huganir RL, Tao YX. Persistent inflammation induces GluR2 internalization via NMDA receptor-triggered PKC activation in dorsal horn neurons. (2009). *Journal of Neuroscience*, 29(10), 3206-3219. (Особисто дисертантом проведено частину електрофізіологічних досліджень, статистичну обробку та інтерпретування результатів).
2. **Корач О**, Kao SC, Petralia RS, Belan P, Tao YX, Voitenko N. (2011). Inflammation alters trafficking of extrasynaptic AMPA receptors in tonically firing lamina II neurons of the rat dorsal horn. *Pain*, 152(4), 912-923. (Особисто дисертантом проведено електрофізіологічні та флуоресцентні дослідження, статистичний аналіз та інтерпретування результатів, формулювання висновків та підготовку матеріалів до друку).
3. **Корач О**, Viatchenko-Karpinski V, Belan P, Voitenko N. (2012). Development of inflammatory-induced hyperalgesia and allodynia is accompanied by upregulation of extrasynaptic AMPA receptors in tonically firing lamina II dorsal horn neurons. *Frontiers in Physiology*, 3: 391. doi:10.3389/fphys.2012.00391

(Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, статистичний аналіз результатів та оформлення статті).

4. **Корач О**, Viatchenko-Karpinski V, Atianjoh FE, Belan P, Tao YX, Voitenko N. (2013). PKC α is required for inflammation-induced trafficking of extrasynaptic AMPA receptors in tonically firing lamina II dorsal horn neurons during the maintenance of persistent inflammatory pain. *Journal of Pain*, 14(2), 182-192. (Особисто дисертантом проведено електрофізіологічні та частину поведінкових експериментів, статистичний аналіз та інтерпретування результатів, оформлення статті).
5. **Корач О**, Voitenko N. (2013). Extrasynaptic AMPA receptors in dorsal horn: evidence and functional significance. *Brain Research Bulletin*. 93, 47-56. (Особисто дисертантом проведено аналіз даних літератури, оформлення ілюстрацій та написання статті).
6. **Корач О**, Krotov V, Belan P, Voitenko N. (2015). Inflammatory-induced changes in synaptic drive and postsynaptic AMPARs in lamina II dorsal horn neurons are cell-type-specific. *Pain*, 156(3), 428-438. (Особисто дисертантом проведено електрофізіологічні дослідження, інтерпретацію результатів та формулювання висновків, написання статті).
7. Choi ML¹, Vernon J¹, **Корач О**¹, Minett MS, Mills K, Clayton PT, Meert T, Wood JN. (2015). The Fabry disease-associated lipid Lyso-Gb3 enhances voltage-gated calcium currents in sensory neurons and causes pain. *Neuroscience Letters*, 594, 163-168. (Особисто дисертантом проведено електрофізіологічні дослідження, їх аналіз та інтерпретування результатів, написання статті). (¹ перший автор)
8. Luiz AP¹, **Корач О**¹, Santana-Varela S, Wood JN. (2015). The role of Nav1.9 channels in the development of neuropathic orofacial pain associated with trigeminal neuralgia. *Molecular Pain*, 11(1), 72. (Особисто дисертантом проведено частину експериментальних досліджень, аналіз отриманих результатів та написання статті). (¹ перший автор)
9. **Корач О**, Krotov V, Goncharenko J, Voitenko N. (2016). Inhibition of spinal Ca²⁺-permeable AMPA receptors with dicationic compounds alleviates persistent inflammatory pain without adverse effects. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10:50. (Особисто дисертантом проведено частину експериментальних досліджень, статистичний аналіз, формулювання висновків та написання статті).
10. **Корач О**, Medvediev V, Krotov V, Borisyuk A, Tymbaliuk V, 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. *Scientific Reports*, 7(1), 5884. doi: 10.1038/s41598-017-06049-7. (Особисто дисертантом проведено електрофізіологічні дослідження, аналіз та інтерпретування результатів, написання статті).
11. **Корач О**, Krotov V, 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. *Journal of Neuroscience Methods*, 290, 125-132. (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, аналіз та інтерпретування отриманих результатів, оформлення статті).

12. **Корач О**, Zheng K, Dong L, Sapelkin A, Voitenko N, Sukhorukov GB, Rusakov DA. (2018). Nano-engineered microcapsules boost the treatment of peripheral pain. *Drug Delivery*, 25(1), 435-447. (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, аналіз отриманих результатів та написання статті).
13. **Корач О**, Krotov V, Shysh A, Sotnik A, Viatchenko-Karpinski V, Dosenko V, Voitenko N. (2018). Spinal PKC α inhibition and gene-silencing for pain relief: AMPAR trafficking at the synapses between primary afferents and sensory interneurons. *Scientific Reports*, 8(1), 10285. doi: 10.1038/s41598-018-28512-9. (Особисто дисертантом проведено електрофізіологічні дослідження та частину поведінкових експериментів, аналіз та інтерпретування отриманих результатів, написання статті).
14. **Корач О**, Zheng K, Sindeeva OA, Gai M, Sukhorukov GB, Rusakov DA. (2019). Polymer microchamber arrays for geometry-controlled drug release: a functional study in human cells of neuronal phenotype. *Biomaterials Science*, 7(6), 2358-2371. (Особисто дисертантом проведено експериментальні дослідження, аналіз та інтерпретування отриманих результатів, оформлення статті).

Тези доповідей на конференціях (вибраних 15 із загальної кількості 42)

1. Корач О., Sotnik A., Voitenko N. The extrasynaptic AMPA receptors functioning is altered under inflammatory pain // *9th International Congress of the Polish Neuroscience Society*, 9-12 Sept. 2009, Warsaw (Poland).
2. Корач О., Park J.-S., Petralia R.S., Sotnik A., Belan P., Tao Y.-X., Voitenko N. The extrasynaptic AMPA receptors functioning is altered under inflammatory pain // *39th Annual Meeting of SfN*. Program # 856.9. 17-21 October, 2009, Chicago (USA).
3. Voitenko N, Корач О, Sotnik A, Shang X, Belan P, Tao YX. Changes in Ca²⁺ permeability of AMPA receptors expressed on spinal dorsal horn neurons after peripheral inflammation // *XXXVI Congress of Physiological Sciences*, July 27-August 1, 2009, Kyoto (Japan). *Journal of Physiological Sciences*, 59, 422. SPRINGER Tokyo.
4. Корач О., Park J.-S., Petralia R.S., Belan P., Tao Y.-X., Voitenko N. Trafficking of extrasynaptic AMPA receptors in tonically firing dorsal horn neurons is involved in the maintenance of inflammatory pain // *7th FENS Forum of*

European Neuroscience. 3-7 July 2010, Amsterdam (Netherlands).

5. Kopach O., Sotnic A., Viatchenko-Karpinski V., Tao Y.-X., Belan P., Voitenko N. *In vivo* silencing of spinal protein kinase C α gene alleviates inflammation-induced hyperalgesia by adjusting a functional expression of Ca²⁺-permeable AMPA receptors in Substantia Gelatinosa neurons // *40th Annual Meeting of SfN*, 12-17 November 2010, San Diego (USA). 81.19/VV17.
6. Kopach O., Petralia R.S., Tao Y.-X., Belan P., Voitenko N. Trafficking of AMPA receptors at extrasynaptic plasma membrane of spinal lamina II neurons during persistent inflammatory pain // *8th IBRO World Congress of Neuroscience 2011*, 14-18 July 2011, Florence (Italy).
7. Kopach O., Viatchenko-Karpinski V., Belan P., Tao Y.X., Voitenko N. Role of PKC α in adjusting of extrasynaptic AMPA receptors trafficking in dorsal horn neurons during persistent inflammatory pain // *Main Meeting of the Physiological Society*. 2-5 July, 2012, Edinburg (United Kingdom).
8. Goncharenko Y., Kopach O., Voitenko N. Selective inhibition of Ca²⁺-permeable AMPA receptors attenuates persistent inflammatory pain and inflammatory-promoted AMPA receptors trafficking in dorsal horn neurons // *8th FENS Forum*, 14-18 July, 2012, Barselona (Spain).
9. Kopach O., Sotnik A., Belan P., Voitenko N. Trafficking of AMPA receptors in dorsal horn neurons during persistent pain: the changes in synaptic and extrasynaptic receptor pools // *IUPS Congress*. 21-56 July, 2013, Birmingham (United Kingdom).
10. Kopach O., Krotov V., Belan P., Voitenko N. Chronic peripheral inflammation increases excitability of neuronal network in substantia gelatinosa of spinal cord // *43rd Annual Meeting of SfN*, 8-13 November, 2013, San Diego, CA (USA).
11. Kopach O., Krotov V., Belan P., Voitenko N. "Persistent peripheral inflammation rearranges synaptic drive and postsynaptic ampars in lamina II dorsal horn neurons in a cell-type-specific manner" // *6th Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience*, 4-8 June 2014, Kiev (Ukraine).
12. Voitenko N., Kopach O., Viatchenko-Karpinski V., Belan P. "AMPA receptor trafficking in persistent pain: a basis for pain therapies" // *6th Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience*, 4-8 June 2014, Kiev (Ukraine).
13. Kopach O., Pavlov A., Sanders A., Sapelkin A., Sukhorukov G.B., Rusakov D.A. Cell-targeted drug delivery to neurons using purpose-designed microcapsules // *9th IBRO World Congress of Neuroscience*, July 7–11, 2015, Rio de Janeiro (Brazil).
14. Kopach O., Medvediev V, Krotov V, Borisyuk A, Tsymbaliuk V, Voitenko N. Reshuffle between synaptic excitation and inhibition in specific types of the DH interneurons mediates chronic pain in the spinal cord injury-induced spasticity // *VII Congress of the Ukrainian Society for Neuroscience*, June 7-11, 2017, Kyiv (Ukraine).

15. Kopach O., Zheng K., Dong L., Sapelkin A., Voitenko N., Sukhorukov G.B., Rusakov D.A. Nano-engineered drug encapsulation: a long-lasting, localised drug delivery in chronic pain treatment // *47th Annual Meeting of Society for Neuroscience*, 11-15 November, 2017, Washington, DC (USA).

АНОТАЦІЯ

Копач О.В. Клітинні та молекулярні спільнальні механізми ноцицепції як мішені для корегування хронічних больових синдромів. – Сукупність наукових статей.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

У роботі представлено комплексне дослідження клітинних та молекулярних механізмів, що залучені у підтримання хронічного болю різного генезу у нейронних мережах дорзального рогу (ДР) спинного мозку. Продемонстровано, що порушення динамічного обігу (трафікінгу) АМРА-рецепторів, які містять GluR1 та GluR2 субодиниці, у синапсах та позасинаптичних ділянках мембрани нейронів ДР лежать в основі розвитку та підтримання хронічного болю. Встановлений молекулярний механізм таких порушень при периферичному запаленні та охарактеризовано каскад внутрішньоклітинних білків (старгазин, АВР/GRIP, P1CK1), які залучені у регуляцію обігу АМРА-рецепторів між синаптичною та позасинаптичними мембранами за участю ключового ферменту протеїнкінази С підтипу α (PKC α). Експериментально продемонстровано, що порушення трафікінгу АМРА-рецепторів призводить до змін у балансі між синаптичним збудженням та гальмуванням у мережах ДР, що спричиняє довготривалу збудливість ДР спинного мозку – феномен центральної сенситизації. Останній, як вважається, опосередковує розвиток і підтримання хронічного болю різного генезу. Вперше продемонстровано клітинноспецифічність порушень трафікінгу АМРА-рецепторів у сенсорних нейронах та зміщення балансу між синаптичним збудженням та гальмуванням у мережах ДР спинного мозку. Виявлені зміни вперше в світі демонструють причинно-наслідкові зв'язки між порушеннями регуляції динамічного обігу АМРА-рецепторів на клітинному рівні та розвитком і підтриманням хронічного болю. Розроблено та експериментально обґрунтовано новий підхід для потенційно нової терапії хронічних больових синдромів із врахуванням ключової ролі спінальних механізмів у підтриманні хронічного болю різного походження. В основі такого підходу лежить корегування порушень у ланці молекулярного каскаду, що опосередковує регулювання трафікінгу АМРА-рецепторів у сенсорних нейронах ДР спинного мозку. Уперше продемонстровано терапевтичні ефекти фармакологічного

блокування Ca^{2+} -проникних АМРА-рецепторів високоселективними сполуками-інгібіторами нового покоління (активаційнозалежними блокаторами ІЕМ-1460 та ІЕМ-1925) на полегшення больового синдрому із мінімальними побічними ефектами. Вперше застосовано генну терапію хронічного болю в експериментальній моделі СФА-індукованого периферичного запалення і доведено терапевтичну доцільність корегування порушень молекулярного механізму регуляції трафікінгу АМРА-рецепторів у нейронах ДР спинного мозку при тривалому периферичному запаленні. Науково обґрунтовано терапевтичні ефекти на клітинному рівні.

Ключові слова: хронічний біль, спінальні механізми ноцицепції, нейрони дорсального рогу спинного мозку, АМРА-рецептори.

АННОТАЦІЯ

Копач О.В. Клеточные и молекулярные спильнальные механизмы ноцицепции как мишени для коррекции хронических болевых синдромов. – Совокупность научных статей.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.13 – физиология человека и животных – Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2020.

В работе представлены результаты комплексного исследования клеточных и молекулярных механизмов, обеспечивающих поддержание хронической боли различного генеза в нейронных сетях дорсального рога (ДР) спинного мозга. Продемонстрировано, что нарушение динамического перераспределения (трафикинга) АМРА-рецепторов, которые содержат GluR1 и GluR2 субъединицы, между синаптическими и внесинаптическими мембранами нейронов ДР лежит в основе развития и поддержания хронической боли. Установлен молекулярный механизм таких нарушений при периферическом воспалении и охарактеризованы внутриклеточные белки, вовлеченные в регуляцию трафикинга АМРА-рецепторов (старгазин, АВР / GRIP, PICK1) с участием ключевого фермента протеинкиназы С подтипа α (PKC α). Экспериментально показано, что нарушение трафикинга АМРА-рецепторов приводит к изменениям в балансе между синаптическим возбуждением и торможением в нейрональных сетях ДР, что вызывает длительную возбудимость ДР спинного мозга – феномен центральной сенситизации. Последний, как считается, опосредует развитие и поддержание хронической боли различного генеза. Впервые продемонстрировано специфичность нарушений трафикинга АМРА-рецепторов в сенсорных нейронах разных подтипов и смещение баланса между синаптическим возбуждением и торможением в сетях ДР спинного мозга. Выявленные изменения впервые в мире демонстрируют причинно-следственные связи между нарушениями

регуляции динамического перераспределения АМРА-рецепторов на клеточном уровне и развитием и поддержанием хронической боли. Разработан и экспериментально обоснован новый подход к потенциально новой терапии хронических болевых синдромов с учетом ключевой роли спинальных механизмов в поддержании хронической боли различного происхождения. В основе такого подхода лежит коррекция нарушений в звене молекулярного каскада, который опосредует регулирование трафикинга АМРА-рецепторов в сенсорных нейронах ДР спинного мозга. Впервые продемонстрировано терапевтические эффекты фармакологического блокирования Ca^{2+} -проницаемых АМРА-рецепторов высокоселективными соединениями-ингибиторами нового поколения (активационно-зависимыми блокаторами IEM-1460 и IEM-1925) на облегчение болевого синдрома с минимальными побочными эффектами. Впервые применена генная терапия хронической боли в экспериментальной модели СФА-индуцированного периферического воспаления и доказана терапевтическая целесообразность коррекции нарушений молекулярного механизма регуляции трафикинга АМРА-рецепторов в нейронах ДР спинного мозга при длительном периферическом воспалении. Научно обоснованы терапевтические эффекты на клеточном уровне.

Ключевые слова: хроническая боль, спинальные механизмы ноцицепции, нейроны дорсального рога спинного мозга, АМРА-рецепторы.

SUMMARY

Kopach O.V. Targeting cellular and molecular spinal mechanisms of nociception for the treatment of chronic pain. – Collection of scientific manuscripts.

The thesis for the Degree of Doctor of Biological Sciences in Human and Animal Physiology (03.00.13). – Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science of Ukraine. Kyiv, 2020.

This is a complex study of the intricate cellular and molecular mechanisms for the maintenance of chronic pain of different aetiology in the dorsal horn (DH) of the spinal cord. By employing different techniques and varied approaches, this study demonstrates the impaired trafficking of AMPA receptors in sensory neurons of the DH in persistent pain conditions. This includes internalization of GluR2-containing AMPA receptors from the synapses between primary afferents and DH neurons, whereas insertion of GluR1-containing, Ca^{2+} -permeable AMPA receptors into the extrasynaptic plasma membranes of sensory neurons. The molecular mechanism of altered AMPA receptor trafficking in the DH neurons has been deciphered, showing the involvement of numerous intracellular proteins (stargazin, ABP/GRIP, PICK1), with the key role of PKC subtype α , a ubiquitous intracellular enzyme, in regulation of GluR1 and GluR2 membrane translocations. The obtained data provide evidence

for the causally linked changes between AMPA receptor trafficking and the balanced synaptic excitation and inhibition within the DH neuronal networks, leading to the hyperexcitability of the DH – the phenomenon of central sensitization. The latter is thought to represent the mechanistic basis behind chronic pain of different origins. In this study, it has been demonstrated, for the first time, that altered AMPA receptor trafficking occurs in a cell-type-specific manner, shifting the balance between synaptic excitation and inhibition differently for subpopulations of DH neurons. The revealed causality between the altered AMPA receptors at the cellular level and the chronic pain maintenance *in vivo* provides evidence for the key role of spinal mechanisms in chronification of the emerged pain. Hence it ensures that developing strategies for targeting the central mechanisms (rather than peripheral ones) would succeed in the cure of chronic pain. With this, the next studies were, therefore, focusing on elaborating new approaches to the treatment of chronic pain via targeting the established molecular mechanism of AMPA receptor trafficking in the DH neurons. First, an experimental methodology was evolved to deliver compounds of interests site-specifically, using surgically implanted catheters for the local, intrathecal drug delivery to the lumbar spinal cord segments, prone to minimize potential adverse effects. The therapeutic efficacy of targeting the impaired spinal AMPA receptors was next tested by using a pharmacological approach, i.e. selective inhibition of Ca²⁺-permeable AMPA receptors. For this, it has been implemented a class of novel high potent blockers of Ca²⁺-permeable AMPA receptors, the open-channel antagonists acting in an activity-dependent manner (dicationic compounds IEM-1460 and IEM-1925). The obtained data confirmed the antinociceptive effects of the two compounds tested, with no side effects detectable upon activity-dependent inhibition of spinal Ca²⁺-permeable AMPA receptors. The next strategy consisted of targeting spinal PKC α – as a prerequisite for the impaired AMPA receptor trafficking – via either pharmacological or genetic inhibition. A novel selective antagonist of PKC α , C2-4 peptide, was probed, which first revealed the antinociceptive effect here. For gene-therapy, the gene-silencing approach has been utilized to knock-down spinal PKC α with antisense oligonucleotides delivered to the lumbar spinal cord in an experimental model of persistent inflammatory pain. The therapeutic outcomes of gene-therapy included substantial relief in inflammatory pain (alleviated nociceptive hypersensitivity of different modalities) and shortening of the pain maintenance, in either pre- or post-treatment. This pain relief was paralleled by a decline in the impaired AMPA receptor trafficking at the cellular level, as confirmed by electrophysiological recordings made from the DH neurons from animals with persistent peripheral inflammation. Together, these data provide fundamental knowledge for the dynamic AMPA receptor trafficking in sensory neurons and open a new line of studies to focus on the mechanism-based treatment of chronic pain through interference with molecular mechanisms for nociceptive signalling in central pain pathways.

Keywords: chronic pain, spinal nociceptive mechanisms, the dorsal horn neurons of spinal cord, AMPA receptors.

Перелік основних умовних позначень та скорочень

- АМРА – α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота
- ДР – дорсальний ріг спинного мозку
- ЗПСС – збуджуючий постсинаптичний струм
- ГАМК – γ -аміномасляна кислота
- ГПСС – гальмівний постсинаптичний струм
- ІВ – індекс випрямлення струму
- мЗПСС – мініатюрний збуджуючий постсинаптичний струм
- мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота
- сЗПСС – спонтанний збуджуючий постсинаптичний струм
- ПД – потенціал дії
- ЦНС – центральна нервова система
- AS ODN – антисенсові олігонуклеотиди
- СФА – ад'ювант Фройнда (Complete Freund's adjuvant), реагент для індукції хронічного запалення
- $[Ca^{2+}]_i$ – концентрація вільного внутрішньоклітинного Ca^{2+}
- GluR1-4 – субодиниці АМРА-рецепторів
- IC50 – концентрація напівмаксимального інгібування
- ІЕМ-1460 – 1-trimethylammonio-5-1-adamantane-methyl-ammoniopentane dibromide, активаційнозалежний блокатор
- ІЕМ-1925 – N1-(1-phenylcyclohexyl)pentane-1,5-diaminium bromide, активаційнозалежний блокатор Ca^{2+} -проникних АМРА-рецепторів
- I-V* криві – вольт-амперні характеристики струмів
- MS ODN – помилкові (міссенсові) олігонуклеотиди
- Na_v – натрієві (Na^+) канали
- NMDA – N-метил-D-аспарат
- PCR – полімеразна ланцюгова реакція (polymerase chain reaction)
- PKC – протеїнкіназа C, внутрішньоклітинний фермент
- PKC α – протеїнкіназа C підтипу альфа
- SCI – spinal cord injury, травма спинного мозку
- TTX – тетродотоксин, блокатор натрієвих каналів