

Національна академія наук України
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця

На правах рукопису
УДК 612.83:612.822:612.884:616-002

Кротов Володимир Вадимович

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

03.00.02 – Біофізика

Дисертація
на отримання вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
Доктор біологічних наук, професор
Войтенко Нана Володимирівна

Київ – 2018

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. В роботі було вперше досліджено, як дані патології змінюють баланс синаптичного збудження та гальмування в різних типах нейронів ноцицептивної мережі спинного мозку. Також вперше *in vivo* був досліджений вплив дікатіонних сполук-інгібіторів кальційнепроникних АМРА-рецепторів ІЕМ 1460 та ІЕМ 1925, а також вплив блокатору протеїнкінази С челеретрину на полегшення больового синдрому, викликаного периферичним запаленням. Використовуючи метод отримання «гострих» зрізів спинного мозку, метод петч-клемп у конфігурації «ціла клітина» та метод нестационарного аналізу шуму для оцінки провідностей поодиноких каналів, була продемонстрована клітинна специфічність змін синаптичної активності в нейронах ПП ДР. Детальний аналіз амплітудних та частотних характеристик спонтанних збуджуючих та гальмівних постисинаптичних 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 вищеназвані 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-модулятору 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.

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.

The dissertation is 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 performed a profound study to investigate how the mentioned pathologies affect the balance of synaptic excitation and inhibition in various types of neurons in nociceptive spinal cord circuitry. We also examined *in vivo* effects of IEM 1460 and IEM 1925 (dicationic compounds that inhibit calcium permeable AMPA-receptors) and chelerythrine (PKC inhibitor) on

alleviation of inflammatory-induced pain syndrome. Using thin spinal cord slices, patch-clamp technique in whole-cell configuration and non-stationary fluctuation analysis for estimation of single-channel conductance, we 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 ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ:

- 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.

які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

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

Kopach O., Medvediev V., **Krotov V.**, Borisyuk A., Tsymbaliuk 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

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ЗМІСТ	8
СПИСОК СКОРОЧЕНЬ.....	12
ВСТУП	13
Актуальність проблеми	15
Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.....	17
Мета дослідження.....	18
Завдання дослідження	18
Наукова новизна	19
Теоретичне та практичне значення роботи.....	20
Особистий внесок здобувача.....	20
Апробація результатів дисертації.....	21
Публікації	22
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	23
1.1. Біль, його природа та фізіологічне значення.	23
1.2. Біль при запаленні.	24
1.3. Біль при травмі спинного мозку.	26
1.4. Загальні відомості про мережу ПП ДР.....	27
1.5. Зміни збудливості нейронів ДР при хронічному болю.	29
1.6. Зміни синаптичного збудження нейронів ДР при хронічному болю.....	30

1.7. Зміни синаптичного гальмування нейронів ДР при хронічному болю.	32
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.	34
2.1. Експериментальні тварини.	34
2.2. Підшовний тест Харгрівса для оцінювання термічної больової чутливості.	35
2.3. Метод філаментів фон Фрея для оцінювання механічної больової чутливості.	36
2.4. Імплантація інтратекального катетеру.....	37
2.4. Моделювання хронічного запалення ін'єкцією повного ад'юванту Фройнда.....	39
2.5. Моделювання травми спинного мозку методом гемісекції спинного мозку.	41
2.6. Метод отримання «гострих» зрізів спинного мозку.	44
2.7. Реєстрація іонних струмів з використанням методики «петч- клемп».	46
2.7.1. Загальні відомості.	46
2.7.2. Експериментальна конфігурація.	47
2.8. Детектування та аналіз постсинаптичних струмів.....	49
2.9. Метод нестаціонарного флуктуаційного аналізу шуму для розрахунку провідності постсинаптичних ліганд-керованих каналів.....	50
2.10. Статистична обробка результатів дослідження.	51
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.	53

3.1. Різниця мережевої синаптичної активності в різних популяціях нейронів поверхневих пластин спинного мозку.	53
<i>3.1.1. Різні популяції нейронів в поверхневих пластинах спинного мозку.....</i>	<i>53</i>
<i>3.1.2. Різниця в збуджуючій синаптичній активності в тонічних та адаптивних нейронах в фізіологічних умовах.</i>	<i>55</i>
<i>3.1.3. Різниця в гальмівній синаптичній активності та баланс збудження-гальмування в тонічних та адаптивних нейронах в фізіологічних умовах.....</i>	<i>58</i>
3.2. Зміни мережевої синаптичної активності в нейронах поверхневих пластин дорсального рогу при периферичному запаленні.	61
<i>3.2.1. Зміни збуджуючої синаптичної передачі в мережі ПП ДР при периферичному запаленні.</i>	<i>62</i>
<i>3.2.2. Зміни гальмівної синаптичної передачі та балансу збудження гальмування в мережі ПП ДР при периферичному запаленні.....</i>	<i>75</i>
3.3. Зміни мережевої синаптичної активності в нейронах поверхневих пластин дорсального рогу при травмі спинного мозку.	80
<i>3.3.1. Зміни збуджуючої синаптичної передачі в мережі ПП ДР при травмі спинного мозку.</i>	<i>81</i>
<i>3.3.2. Зміни гальмівної синаптичної передачі та балансу збудження гальмування в мережі ПП ДР при травмі спинного мозку.....</i>	<i>93</i>

3.4. Вплив інгібування кальційзалежних AMPA-рецепторів на больовий синдром, викликаний периферичним запаленням....	104
<i>3.4.1. Антиноцицептивний ефект інтратекального введення блокаторів кальційпроникних AMPA-рецепторів IEM 1460 та IEM 1925 при хронічному запаленні.</i>	<i>105</i>
<i>3.4.2. Антиноцицептивний ефект інтратекального введення челеритрину при хронічному запаленні.</i>	<i>108</i>

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ. 113

4.1. Хронічний біль та центральна сенситизація. Гіперзбудливість мережі ПП ДР як прояв центральної сенситизації.	113
4.2. Відмінності синаптичного збудження та гальмування в різних популяціях нейронів ПП ДР.....	115
4.3. Клітинна специфічність змін збуджуючої синаптичної передачі за хронічного болю.	116
4.4. Клітинна специфічність змін гальмівної синаптичної передачі за хронічного болю.	120
4.5. Синаптична специфічність змін, викликаних хронічним болем.	122

ВИСНОВКИ..... 125

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ..... 127

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

АМРА - α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота

ГАМК – γ -аміномасляна кислота

ГПСС – гальмівний постсинаптичний струм

ДКГ – дорсально-корінцеві ганглії

ДР – дорсальний ріг

ЗПСС – збуджуючий постсинаптичний струм

мЗПСС – мініатюрний збуджуючий постсинаптичний струм

NMDA - N-метил-D-аспартат

ПАФ – Повний ад'ювант Фройнда

ПД – потенціал дії

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

GluA2 – A2 субодиниця АМРА глутаматних рецепторів

ВСТУП

Міжнародна асоціація з вивчення болю визначає останній як «неприємне сенсорне та емоційне переживання, яке викликане істинним або потенційним пошкодженням тканин або може бути описане в термінах такого пошкодження». Деякі дослідники визначають біль як гомеостатичну емоцію (Craig, 2003). Таким чином біль – це складне явище, яке включає в себе не тільки сукупність фізіологічних процесів сприйняття та передачі сигналу про загрозу («ноцицепція» за Шеррінгтоном), але й результатом когнітивної та емоційної обробки цього сигналу у головному мозку, наслідком яких є суб'єктивні та залежні від попереднього досвіду відчуття болю, його переживання та подальша больова поведінка.

Біль може класифікуватися за багатьма параметрами, такими як інтенсивність, переносимість, суб'єктивні відчуття, етіологія, біологічна значимість, тривалість, механізм виникнення тощо. За тривалістю біль розділяється на гострий та хронічний, і якщо гострий біль – це нормальне фізіологічне явище, яке забезпечує захист організму від пошкодження тканин, то хронічний біль є патологічним, оскільки продовжується навіть після усунення першопричини його виникнення.

Основою хронічного болю будь-якого генезу є центральна сенситизація, яка за визначенням є підвищенням функціонального статусу нейронів та мереж ноцицептивних шляхів вздовж всієї нервової вісі, викликаного підвищенням мембранної збудливості, синаптичної ефективності і/або зменшення гальмування (Latremoliere and Woolf, 2009). На відміну від периферичної сенситизації, яка також виникає при хронічному болю, центральна сенситизація в основному пов'язана не зі збільшенням збудливості окремих нейронів – ні запальний, ні нейропатичний біль не викликали відхилень пасивних чи активних

мембранних властивостей (Müller et al., 2003; Balasubramanyan et al., 2006; Schoffnegger et al., 2006; Chen et al., 2009; Gassner et al., 2013; Chiu et al., 2016), - а зміною балансу збудження та гальмування в ноцицептивній мережі поверхневих пластин дорсального рогу спинного мозку.

На сьогоднішній день відомо багато клітинних, іонних та молекулярних механізмів, які опосередковують зміни збудження та гальмування, які відбуваються в умовах хронічного болю. Проте загальна картина змін збуджуючої та гальмівної синаптичної передачі в гетерогенних нейронах дорсального рогу спинного мозку досі залишається маловивченою.

В даній роботі вперше було досліджено вплив хронічного периферичного запалення та травми спинного мозку на зміну балансу збуджуючої та гальмівної синаптичної передачі в нейронах поверхневих пластин дорсального рогу, які відповідають за обробку ноцицептивної інформації спинним мозком.

Дисертація складається з чотирьох розділів та завершується висновками.

В I розділі «Огляд літератури» дані з вітчизняних та закордонних літературних джерел аналізуються на предмет актуального стану досліджень функціонування ноцицептивних мереж дорсального рогу спинного мозку та змін цього функціонування в умовах хронічного болю різного походження.

В розділі II «Матеріали та методи досліджень» описані застосовані в роботі тваринні моделі периферичного запалення та травми спинного мозку, які призводять до появи хронічних больових синдромів, поведінкові дослідження, які проводились над тваринами, методи отримання «гострих» зрізів спинного мозку та біофізичні методи дослідження постсинаптичних струмів у нейронах у нейронах поверхневих пластин спинного мозку.

В розділі III «Результати досліджень» наведені отримані результати та їх статистичний аналіз.

В розділі IV «Обговорення результатів дослідження» проведено узагальнення отриманих результатів, здійснено їх критичний аналіз на основі наявних літературних джерел.

Робота закінчується списком процитованої літератури.

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 (ДКТГ)

(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 глутаматдекарбоксилази (Meisner et al., 2010; Gwak and Hulsebosch, 2011) та зміною хлорного градієнту (Coull et al., 2003; Jolivald et al., 2008; Lu et al., 2008; Zhang et al., 2008; Hasbargen et al., 2010; Janssen et al., 2012). 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 (Hao et al., 2004; Gwak et al., 2007a). 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 AMPA-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 AMPA-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 кальційпроникних AMPA-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 сПСС 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 адаптивних 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 АМРА-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 самотійно..

Електрофізіологічні експерименти та оформлення публікацій були проведені разом із співавтором опублікованих робіт співробітником інституту ім. О. О. Богомольця НАН України, кандидатом біологічних наук Копач О. В. Експериментальне моделювання травми спинного мозку продилося у тісній співпраці зі співробітником Національного Медичного Університету України ім. О. О. Богомольця доктором медичних наук Медведєвим В.В. Аналіз провідності синаптичних АМРА-каналів в умовах травми спинного мозку було проведено у співпраці зі співробітником інституту ім. О. О. Богомольця НАН України, кандидатом біологічних наук Борисюк А. Л.

Мета дослідження, планування робіт, обговорення результатів експериментів та формулювання висновків досліджень проводилося за участі наукового керівника доктора біологічних наук, професора Войтенко Н. В., а також доктора біологічних наук, професора 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 симпозіумі з експериментальної та клінічної нейробиології (Словаччина, Кошице, 2017), VII конгресі українського товариства нейронаук (Україна, Київ, 2017), конференції польського товариства нейронаук (Польща, Варшава, 2017), III Київському міжнародному симпозіумі з фізіології гладеньких м'язів, біофізики та

фармакології (Україна, Київ, 2017), 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.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.

1.1. Біль, його природа та фізіологічне значення.

Біль – це неприємні відчуття, які виникають у випадку наявного або потенційного ушкодження тканин. З цього випливає, що біль виконує дві надзвичайно важливі функції: сигнальну, попереджаючи організм про можливу загрозу, та захисну, викликаючи відповідну реакцію.

Гострий короточасний біль, викликаний активацією відповідних клітин-сенсорів надпороговим стимулом із навколишнього середовища, є фізіологічним, оскільки саме він виконує сигнальну функцію. Проте з різних причин біль може хроніфікуватися, тобто ставати постійним. Такий біль є патологічним, і, зважаючи на наявність емоційної складової у сприйнятті болю, негативно впливає на якість життя.

Хронічний біль може тривати навіть після усунення першопочаткових причин його виникнення. Такий біль характеризується спонтанністю, тобто відсутністю зовнішнього больового стимулу, та може проявлятися як аллодинією (тобто зниженням больового порогу, при якому біль викликається стимулом, який за звичайних умов є не больовим), так і гіпералгезією, коли стану больова відповідь на стимул із зовнішнього середовища є більш інтенсивною, ніж за звичайних умов.

Хронічний біль може мати різну етіологію, як то запалення (запальний біль), ушкодження нервової системи, викликане як травмами, так і аутоімуними захворюваннями (нейропатичний біль) тощо. Однак незалежно від генезу постійний біль передбачає зміну функціонування як периферичної, так і центральної нервової системи. Розуміння цих змін і є ключем до розробки терапевтичних підходів, які будуть не просто купіювати симптоми, але й ефективно лікувати хронічний біль.

1.2. Біль при запаленні.

Запалення – це патологічний процес, який розвивається при пошкодженні тканин. Запалення може бути викликане будь-яким пошкоджувальним агентом, що за своєю силою і/або тривалістю перевищує адаптаційні можливості тканини. Цей процес є здебільшого місцевим, проте в ньому приймають участь одразу імунна, ендокринна та нервова системи.

Клінічні прояви запальної відповіді можуть бути класифіковані за п'ятьма ознаками: набряком, почервонінням, підвищенням температури, болем та порушенням функції.

Набряк – це збільшення об'єму тканини, яке супроводжує гостре запалення. Воно здебільшого пояснюється підвищенням проникності стінок судин, яке і викликає набряк.

Почервоніння тканин при запаленні пов'язане частково з розширенням судин, а частково виливом еритроцитів.

Підвищення температури запальної тканини також є наслідком розширення судин. Воно також є характерним показником інтенсивності запалення.

Певні запальні відповіді супроводжуються больовими відчуттями. В цьому випадку біль є ноцицептивним, і в залежності від місця запалення може бути соматичним або вісцеральним. Причини виникнення болю при запаленні можуть бути різноманітними та можуть включати підвищення тиску рідин при набряку тканин, постійну активацію первинних сенсорних нейронів, а також прямий або опосередкований вплив лізосомальних ферментів, АТФ, іонів калію, які викидаються з пошкоджених тканин, тобто вплив медіаторів запалення та ацидозу (Millan, 1999).

Порушення функції виникає внаслідок пошкодження тканин в процесі запалення.

Одним з ключових елементів відповіді організму на запалення є дія біологічно активних речовин, які називаються медіаторами запалення та можуть бути клітинними або гуморальними.

Найважливішими гуморальними медіаторами є кініни. Найдослідженішим серед них є брадикінін, що продукується в плазмі крові внаслідок пошкодження тканин та ацидозу та безпосередньо впливає на розширення капілярів та збільшення їх проникності. Але брадикінін також може модулювати ноцицепцію. Підшкірне введення брадикініну викликало інтенсивний біль, який супроводжувався одночасним збудження полімодальних С- та механочутливих А δ -волокон первинних сенсорних нейронів (Lang et al., 1990; Khan et al., 1992).

Іншими важливими медіаторами запалення є компоненти комплементу – системи білків сироватки. Фрагменти комплементу С3а та С5а теж збільшують проникність судин, а також стимулюють секрецію гістаміну. Останній також є медіатором запалення, який у великих концентраціях може прямо діяти на первинні ноцицептори (Millan, 1999), викликаючи больові відчуття (Carlton and Coggeshall, 1999).

Серед медіаторів запалення слід відзначити також серотонін, який при взаємодії з відповідними 5-НТ рецепторами активує іонні канали, проникних для натрію та калію, а також ряд внутрішньо клітинних процесів, сукупність яких може призводити до збудження первинних сенсорних нейронів.

Ще одну групу речовин-медіаторів складають простагландини. Ці речовини приймають участь в сенситизації аферентних волокон, викликаючи гіпералгезію та алодинію (Minami et al., 1997). Відомо, що цей клас медіаторів може збуджувати первинні С-ноцицептори, що призводить до посиленого викиду глутамату з їх центральних терміналей та наступної сенситизації ноцицептивної мережі ПП ДР (Nicol et al., 1992).

Активовані макрофаги та лімфоцити є джерелом ще однієї групи медіаторів запалення, а саме інтерлейкінів, що належать до цитокінів. Найбільш вивченими серед цієї групи є інтерлейкіни 1 та 6 (IL-1 та IL-6 відповідно). Відомо IL-1 збільшує продукцію збуджуючих амінокислот та субстанції P, що призводить до посилення збуджуючої синаптичної передачі.

При пошкодженні клітин в області запалення викидається також АТФ, яке має проноцицептивну дію (Bland-Ward and Humphrey, 1997; Millan, 1999), пов'язану як з прямою активацією ноцицепторів відповідними пуринорецепторами, так із активацією гліальних клітин (Ji et al., 2013), які в свою чергу можуть викидати інші медіатори запалення.

Звичайно медіатори запалення діють здебільшого на первинні ноцицептори, але викликана ними сенситизація останніх призводить до змін функціонування ноцицептивних мереж ПП ДР.

1.3. Біль при травмі спинного мозку.

Травма спинного мозку (ТСМ) – це серйозна клінічна та соціальна проблема (Mann et al., 2013), яка негативним чином впливає на якість життя пацієнтів (Adams and Hicks, 2005) через виникнення супутніх моторних та сенсорних патологій. Механізми виникнення цих патологій є досі незрозумілими, а терапевтичні підходи до їх лікування мають низьку успішність та велику кількість побічних ефектів (Finnerup and Jensen, 2004; Snedecor et al., 2013; Woller and Hook, 2013; D'Amico et al., 2014).

Моторні патології проявляються в серйозному порушенні функцій кінцівок та зокрема виникненні синдрому спастичності, який характеризується м'язовими спазмами та гіперрефлексією (Nielsen et al., 2007). У 65–78 % пацієнтів з ТСМ спостерігається розвиток спастичності (Sköld et al., 1999).

Больовий синдром також є частим ускладненням після ТСМ, на котрий страждають до 80 % пацієнтів з ТСМ, 30 % яких характеризують біль як сильний або нестерпний (Finnerup and Jensen, 2004; Finnerup, 2013; Finnerup et al., 2014; Nees et al., 2017). Хронічний біль впливає на якість життя сильніше ніж посттравматичні моторні дисфункції (Rintala et al., 1998), часто призводячи до депресії та самогубств (Cairns et al., 1996). Біль, викликаний ТСМ, включає в себе як ноцицептивну, так і нейропатичну компоненту, та залежить від типу травми та положення відносно неї (Finnerup and Jensen, 2004; Cardenas and Felix, 2009; Hulsebosch et al., 2009). Розвиток та підтримання ТСМ-опосередкованого болю можуть відбуватися за рахунок різноманітних анатомічних, запальних, нейрохімічних та ексайтотоксичних змін (Finnerup and Jensen, 2004; Cardenas and Felix, 2009; Hulsebosch et al., 2009; D'Angelo et al., 2013), проте ключовим механізмом його виникнення, як і для болю будь-якого іншого генезу є центральна сенситизація (Carlton et al., 2009; Hulsebosch et al., 2009) (Carlton et al., 2009; Hulsebosch et al., 2009), яка в спинному мозку проявляється як гіперзбудливість ноцицептивних мереж ПП ДР. Причому ця гіперзбудливість може впливати й на розвиток спастичного синдрому, оскільки ТСМ змінює сенсорний вхід на мотонейрони (D'Amico et al., 2014).

Механізми, які опосередковують біль при ТСМ будуть описані у наступних розділах.

1.4. Загальні відомості про мережу ПП ДР.

Обробка сенсорної та ноцицептивної інформації в спинному мозку інтегрально виконується всією мережею дорсального рогу, яка складається

з різних типів нейронів. Розуміння зв'язності ДР є ключовим для розуміння фізіологічної та патологічної обробки сенсорної інформації.

Спираючись на цитоархітекtonіку, Рексед виокремив 6 паралельних пластин дорсального рогу (REXED, 1952). Поверхневі пластини дорсального рогу (пластини I-II) складаються з малих ноцицептивних клітин та отримують синаптичні входи від ноцицептивних немієлінізованих С- та слабо мієлінізованих А δ первинних аферентів. Ноцицептивні А δ волокна здебільшого закінчуються у першій пластині, що, як і зовнішня частина другої пластини, також інервується пептидергічними С волокнами, в яких викид глутамату з центральних терміналей супроводжується викидом різних пептидів, здатних подовжувати деполяризацію постсинаптичних нейронів (Todd, 2010). Внутрішня частина другої пластини інервується ізолектин В4-позитивними непептидергічними С-волокнами, що схильні формувати гломерули – складні синаптичні зв'язки між первинними аферентами та нейронами дорсального рогу. Гломерули забезпечують різні типи регуляції аферентних входів, один з яких – деполяризація первинних аферентів (ДПА) - є ключовим для нормальної обробки ноцицептивних сигналів (Zeilhofer et al., 2012; West et al., 2015). Глибокі пластини дорсального рогу (пластини III-VI) відрізняються від поверхневих (Punnakkal et al., 2014). Вони здебільшого отримують входи від А δ - and А β -механорецепторів (які переносять ненотицептивну інформацію), однак також містять велику кількість нейронів широкого динамічного діапазону, які здатні сприймати стимули різної інтенсивності (Todd, 2010).

Враховуючи передачу ноцицептивної та сенсорної інформації, нейрони дорсального рогу можуть бути розділеними на 2 нерівні групи – проєкційні нейрони та інтернейрони. Проєкційні нейрони – це збуджуючі нейрони, які передають інформацію з спинного мозку до супраспинальних структур. Більшість з них розташована в першій пластині ДР, інші ж

розподілені в пластинах III-VI (Todd, 2010). Незважаючи на те, що проєкційні нейрони отримують прямі синаптичні входи від первинних аферентів, за обробку соматосенсорної інформації відповідають інтернейрони, і саме вони визначають вихідні сигнали проєкційних нейронів.

Інтернейрони складають більш ніж 95% від всіх нейронів ДР (Todd, 2010) та відрізняються гетерогенністю. Таке різноманіття ускладнює їх типування та ускладнює розуміння їх функціональних ролей в мережі ДР. Незважаючи на велику кількість класифікацій нейронів, не існує загально прийнятої, бо жодна не здатна комбінувати усі можливі параметри. Здебільшого інтернейрони класифікують за морфологією, електрофізіологічними властивостями та нейрохімічним фенотипом; при цьому слід зазначити, що морфологія слабо корелює з нейрохімічним фенотипом, а от конкретні види генерації ПД у відповідь на стимуляцію струму переважно відповідають або збуджуючим, або гальмівним нейронам (Lu and Perl, 2003; Graham et al., 2007; Yasaka et al., 2007, 2010; Todd, 2010).

1.5. Зміни збудливості нейронів ДР при хронічному болю.

Хронічний біль будь-якого генезу опосередковується центральною сенситизацією (Latremoliere and Woolf, 2009). В спинному мозку центральна сенситизація – це, фактично, гіперзбудливість мережі дорсального рогу. Яка може бути викликана як збільшенням збудливості нейронів, так і змінами синаптичної передачі між ними.

Підвищена збудливість нейронів ДР була виявлена після травми спинного мозку (Lampert et al., 2006; Hains and Waxman, 2007) та при специфічному виду травми сідничного нерву (Hains et al., 2004), і в обох

випадках вона була пов'язана з ап-регуляцією натрієвих потенціал-керованих каналів Nav1.3. Однак, пасивні та активні властивості нейронних мембран залишалися незмінними як при запальному (Müller et al., 2003), так і при нейропатичному болю (Balasubramanyan et al., 2006; Schoffnegger et al., 2006; Chen et al., 2009; Gassner et al., 2013; Chiu et al., 2016). Це означає, що збільшення збудження нейронної мережі ДР, яке і опосередковує центральну сенситизацію, викликається не зміною збудливості окремих нейронів, а зміною мережевого балансу збудження та гальмування.

1.6. Зміни синаптичного збудження нейронів ДР при хронічному болю.

В умовах хронічного болю збуджуюча глутаматергічна синаптична передача значно посилюється (Balasubramanyan et al., 2006; Wang et al., 2007; Chen et al., 2009). З одного боку це посилення пов'язане зі збільшеною активністю інтернейронів спинного мозку: відомо, що нейрони широкого динамічного діапазону демонструють підвищену генерацію ПД після травми спинного мозку, а також в умовах запального та нейропатичного хронічного болю (Chu et al., 2004; Zhang et al., 2005; Liu et al., 2011). З іншої сторони синаптичне збудження посилюється за рахунок збільшеної активності первинних аферентів. Спонтанна активність А та С первинних ноцицептивних нейронів була виявлена при хронічному запаленні (Xiao and Bennett, 2008), діабетичній нейропатії (Khan et al., 2002; West et al., 2015) та травмі периферичного нерву (Liu et al., 2000; Heinke et al., 2004; Hulse et al., 2010). Така спонтанна активність має ключове значення для розвитку та підтримання хронічного болю, що було доведено низькочастотною стимуляцією С-волокон, яка призводила до центральної сенситизації, викликаючи фасилітацію синаптичного

збудження в проекційних нейронах (Ikeda et al., 2006; Kim et al., 2015) та викликаючи довготривалу потенціацію збуджуючої синаптичної передачі між інтернейронами (Fenselau et al., 2011). Збільшення викиду глутамату з первинних аферентів також пов'язане зі зменшенням ДПА, викликане зміною хлорного градієнту в нейронах ДКГ, що спровокована зміною експресії натрій-калій-хлорного транспортеру NKCC1 (Zeilhofer et al., 2012; West et al., 2015)

Незважаючи на загальне посилення збуджуючої синаптичної передачі в мережі ДР при хронічному болю, її зміни в конкретних нейронних популяціях можуть відрізнятися. Відомо, що в умовах нейропатичного болю, викликаного травмою сідничного нерву, частоти спонтанних та мініатюрних постсинаптичних струмів збільшуються в нейронах з транзиєнтним та іррегулярним типом генерації ПД у відповідь на стимуляцію струмом та зменшуються в нейронах з тонічним типом генерації (Balasubramanyan et al., 2006; Chen et al., 2009). Схожі зміни синаптичної передачі в нейронах ДР викликалися також при прикладанні BDNF (Lu et al., 2007) – нейротрофіну, який викидається мікроглією при травматичному пошкодженні нерву (Ji et al., 2013; Tsuda et al., 2013), – та при прикладанні запального цитокіну інтерлейкіну 1β (Gustafson-Vickers et al., 2008). Вищеназвані дослідження також виявили клітиноспецифічність зміни амплітуд, що, враховуючи різницю зміни частоти, свідчить про клітиноспецифічність пре- та постсинаптичних механізмів зміни збуджуючої синаптичної передачі.

Дослідження показали, що в умовах нейропатичного болю ГАМК-ергічні нейрони другої пластини спинного мозку отримують менше синаптичного збудження від первинних аферентів (Leitner et al., 2013), що може бути опосередкованим як впливом ретроградного месенджера, який зменшує викид глутамату з центральних терміналей (Leitner et al., 2013), так і зменшенням кількості синапсів ГАМК-ергічних нейронів (Lorenzo et

al., 2014). Довготривала депресія спостерігалася в ГАМК-ергічних нейронах і після низькочастотної стимуляції первинних аферентів (Kim et al., 2015), що свідчить про те що зниження збуджуючого синаптичного входу до гальмівних нейронів ПП ДР також вносить значний вклад до загальної гіперзбудливості мережі ДР при хронічному болю.

1.7. Зміни синаптичного гальмування нейронів ДР при хронічному болю.

Численні дослідження вказують на те, що зміни синаптичної гальмівної передачі є ключовими для розвитку та підтримання хронічних больових (Moore et al., 2002; Coull et al., 2003; Polgár et al., 2005; Torsney and MacDermott, 2006; Sandkühler, 2009). Раніше існувало припущення, що зменшення синаптичного гальмування пов'язане з клітинною смертю гальмівних нейронів дорсального рогу (Moore et al., 2002; Scholz et al., 2005). Дійсно, експерименти з цілеспрямованого вибивання гальмівних нейронів показали, що вони супроводжується больовою поведінкою піддослідних тварин (Foster et al., 2015). Втрата ГАМК-ергічних нейронів (Meisner et al., 2010), що також супроводжувалася зменшенням експресії ферментів, що синтезують ГАМК (Meisner et al., 2010; Gwak and Hulsebosch, 2011), спостерігалася і при травмі спинного мозку. Однак, при нейропатичному болю не відбувалося селективного зменшення кількості ГАМК-ергічних нейронів (Polgár et al., 2003, 2004, 2005).

Більш того, нейропатичний біль не впливає на кількість збуджуючих глутаматергічних пресинаптичних терміналей, що утворюють синаптичні контакти з гальмівними ГАМК-ергічними нейронами (Leitner et al., 2013), та не призводить до зменшення рівня ГАМК чи ГАМК-рецепторів (Moore et al., 2002; Polgár et al., 2004; Polgár and Todd, 2008). Разом ці факти

свідчать про те, що гіперзбудливість мережі ПП ДР пов'язана не зі зменшенням кількості гальмівних нейронів, а з реорганізацією синаптичних входів в цій популяції нейронів.

Зміни гальмівної синаптичної передачі можуть відрізнятися в залежності від популяції нейронів ПП ДР. Відомо, що і при запальному і при нейропатичному хронічному болю в нейронах першої пластини спинного мозку зменшується частота гліцинергічної мініатюрної синаптичної активності (Müller et al., 2003; Chiu et al., 2016). В той же час гліцинергічна передача до ГАМК-ергічних нейронів другої пластини зростає під дією інтерлейкіну 1β (Chirila et al., 2014). Зниження ефективності гальмівної синаптичної передачі може бути клітинно неспецифічним та пов'язаним зі зміною хлорного градієнту, опосередковане зниженням рівня експресії калій-хлорного транспортеру KCC2, яке спостерігалось при запаленні (Zhang et al., 2008), травмі периферичного нерву (Coull et al., 2003) або спинного мозку (Lu et al., 2008; Hasbargen et al., 2010), та при діабетичній нейропатії (Jolivald et al., 2008; Morgado et al., 2008; Janssen et al., 2011).

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.

2.1. Експериментальні тварини.

В даній роботі для експериментів використовували самців щурів лінії Вістар. Всі тварини утримувалися в віварії Інституту Фізіології ім. О. О. Богомольця та мали вільний доступ до їжі та води.

Всі протоколи досліджень та експерименти дотримувались положень Конвенції з біоетики Ради Європи (1997 року), Гельсінської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (1996 року), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), загальних етичних принципів наукових досліджень, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006 р) та інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі, що було підтверджено комітетом біомедичної етики Інституту Фізіології ім. О. О. Богомольця.

Вік тварин, яких брали в експерименти становив 20-21 день. В цьому віці щурам була проведена а) ін'єкція повного ад'юванту Фройнда для моделювання периферичного запалення або б) гемісекція спинного мозку для моделювання травми спинного мозку. Для дослідження змін синаптичної активності в ноцицептивних мережах поверхневих пластин спинного мозку при периферичному запалення тварин брали в електрофізіологічні досліді через добу після введення ПАФ. При дослідженні впливу ТСМ на синаптичну передачу в ПП ДР тварин брали в дослід через 3-4 тижні після гемісекції спинного мозку.

2.2. Підшовний тест Харгрівса для оцінювання термічної больової чутливості.

Для визначення наявності хронічного больового синдрому у піддослідних тварин, а також для дослідження впливу дікатіонних сполук-блокаторів АМРА-рецепторів та інгібітору ферментів-модуляторів РКС проводили больові поведінкові тести. Зміни периферичної чутливості у відповідь на термічний стимул оцінювали методом Харгрівса у спеціальному пристрої. Останній складається із прозорих експериментальних камер, що встановлюються на пластині зі скла, та рухливого джерела інфрачервоного випромінювання, що розташовується під скляною пластиною. ІЧ-промінь за допомогою системи лінз сфокусовано на верхній стороні скла. Тварину вміщували в експериментальну камеру та давали можливість адаптуватися до експериментальної системи перед початком дослідів. Після того джерело ІЧ-випромінювання підводили під задню кінцівку тварини та вмикали, після чого розпочинався відлік часу (з точністю до 0,1 с) до початку проявів характерної больової реакції – відсмикування кінцівки. Після відсмикування лапи ІЧ-випромінювання автоматично вимикалося, а часовий інтервал щодо стимулу тривалості стимулу фіксувався автоматичним секундоміром. Для уникнення важких опіків тривалість безперервної роботи джерела була обмежена 33 с.

В даній роботі для підшовного тесту Харгрівса використовували відповідне обладнання виробництва Ugo Basile (Італія). Схематичне представлення вищеназваного обладнання наводиться на Рис. 2.1.



Рис. 2.1. Зображення експериментальної установки для проведення підшовного тесту Харгрівса виробництва Ugo Basile (Італія). Зображення взяте з сайту компанії <http://www.ugobasile.com>

2.3. Метод філаментів фон Фрея для оцінювання механічної больової чутливості.

Для дослідження больової чутливості тварин у відповідь на механічний стимул застосовували подразнення філаментами фон Фрея. Лабораторну тварину вміщували у робочу камеру із сітчастою підлогою та давали час на адаптацію. Після завершення адаптації через сітчасту підлогу каліброваними філаментами різної жорсткості стимулювали підшву задньої кінцівки. Вимірювали кількість відсмикування кінцівки при дії філаментів певної жорсткості. Поріг больової механічної чутливості визначався філаментом найменшої жорсткості, при стимуляції

яким тварина проявляла характерну больову реакцію відсмикування кінцівки в 50 % випадків.

В даній роботі для оцінювання механічної чутливості щурів використовували набір філаментів фон Фрея виробництва BioSeb (Франція). Принцип визначення механічної чутливості щурів методом філаментів фон Фрея представлений на Рис. 2.2.



Рис 2.2. Принцип визначення механічної чутливості щурів методом філаментів фон Фрея. А. Принципове зображення досліду з використанням методу філаментів фон Фрея. Щур знаходиться в камері з сітчастою підлогою, до підшви задньої кінцівки лапи підводяться калібровані філаменти фон Фрея. Б. Схематичне зображення лапи щура. Стрілкою позначене область, механічна чутливість якої визначається філаментами фон Фрея. Зображення запозичене з роботи (Ferrier et al., 2016).

2.4. Імплантація інтратекального катетеру.

Імплантацію інтратекального катетеру проводили згідно з процедурою, детально описаною раніше (Korach et al., 2017). Для цього тварину анестезували внутрішньочеревною ін'єкцією кетаміну (70 мг/кг) та ксилазину (15 мг/кг). Після цього з шийної ділянки видаляли волосяний

покрив, і тварину закріплювали в стереотаксичному апараті. Шкіру щура обробляли антисептиком, після чого розрізом забезпечували доступ до атланта-окципітальної мембрани. В якості катетера використовувалася трубка РЕ-10, довжиною, достатньою для досягнення верхніх сегментів люмбального відділу спинного мозку. Після імплантації катетера на м'язи та шкіру накладали лігатуру, а місце розрізу обробляли антисептиком. Тварин утримували в приміщенні з підвищеною температурою до повного виходу з анестезії.

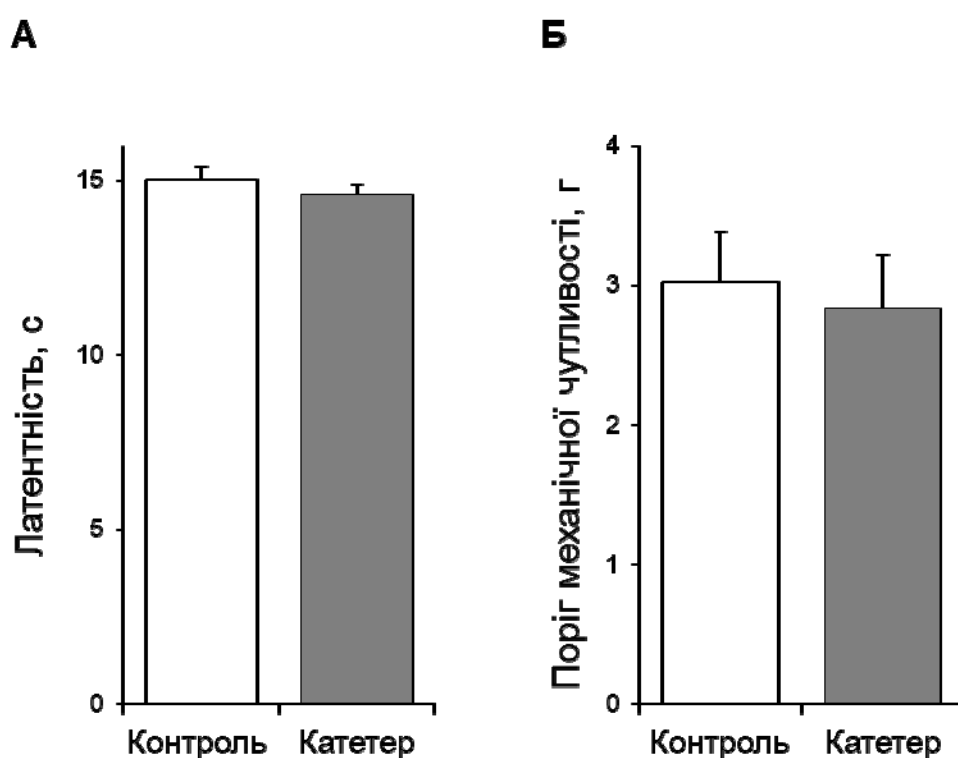


Рис. 2.3. Інtrateкальна катеризація не змінювала термічної та механічної больової чутливості тварин. А. Латентність відсмикування кінцівки в підшовному тесті Харгрівса. Б. Пороги механічної больової чутливості контрольних та катетеризованих щурів, визначені методом філаментів фон Фрея.

Інtrateкальна катеризація не змінювала термічної та механічної больової чутливості тварин. Латентність відсмикування кінцівки в

підшовному тесті Харгрівса становила $15,0 \pm 0,3$ с ($n=18$) для контрольних тварин та $14,6 \pm 0,3$ с ($n=21$, $p>0,3$; Рис 2.3А) для катетеризованих. Пороги механічної больової чутливості становили $3,0 \pm 0,4$ г ($n=18$) для контрольних та $2,8 \pm 0,4$ г ($n=21$, $p>0,8$; Рис. 2.3Б) для катетеризованих тварин.

2.4. Моделювання хронічного запалення ін'єкцією повного ад'юванту Фройнда.

Периферичне запалення задньої кінцівки щура викликали підшкірною ін'єкцією 50 мкл ПАФ (CFA, Sigma, St.Louis, MO, USA), розведеного у 0,9% розчині NaCl (Натрію хлорид, розчин для інфузій, «Дарниця», Київ, Україна) у пропорції 1:1, як описано у статтях (Korach et al., 2015, 2016).

ПАФ - це мінеральне мастило із додаванням поверхнево-активної речовини, а також термічно оброблених *Mycobacterium tuberculosis*. Поєднання цих трьох компонентів викликає сильну імунну реакцію та викликає підвищення рівня запальних цитокінів.

У дослідях із хронічним запаленням, яке було викликано ПАФ, використовували самців щурів лінії Вістар у віці 20-21 діб постнатального розвитку. У дослід тварин відбирали через добу після ін'єкції ПАФ. Умови утримання контрольних тварин, та тварин, у яких було викликане запалення були ідентичні. Незважаючи на те, що, тварини, в яких було викликане запалення, уникали активно користуватись ураженою кінцівкою, вони демонстрували стабільну поведінку, та нормальні поведінкові реакції, тобто споживання їжі, грумінг та дослідження території.

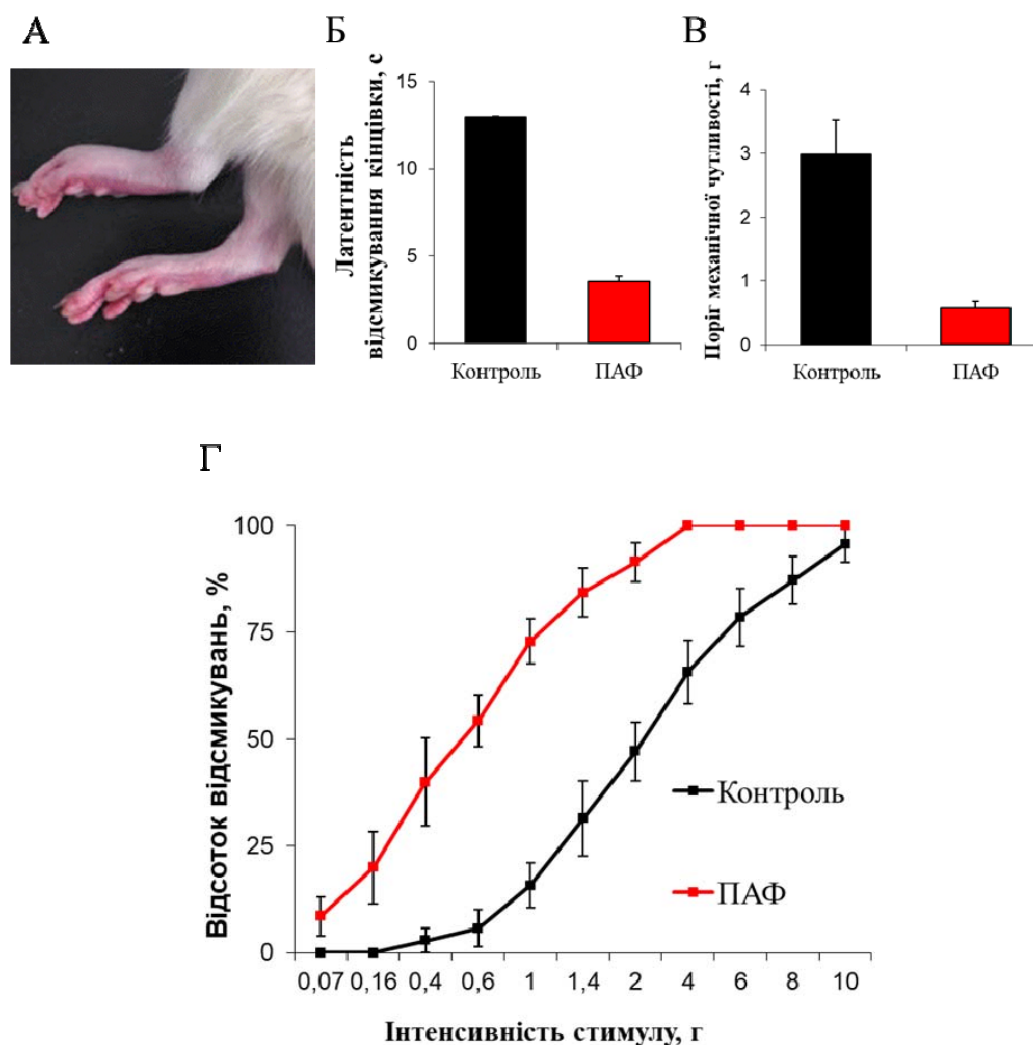


Рис 2.4. Зміни больової чутливості щурів, викликані ПАФ-індукованим периферичним запаленням. А. Фотографія задніх кінцівок щура, якому була здійснена ін'єкція ПАФ у ліву лапу. Б. Результати підшовного тесту Харгрівса в контрольних умовах і при периферичному запаленні. В. Пороги механічної больової чутливості в контрольних умовах та при периферичному запаленні, визначені методом філаментів фон Фрея. Г. Криві механічної чутливості в контрольних умовах і при периферичному запаленні.

Як показали поведінкові тести Харгрівса та фон Фрея, процедури яких детально описані вище, а також описані у статті (Korach et al., 2017a), у піддослідних тварин спостерігалася термічна та механічна гіперчутливість,

яка розвивалася вже на протязі перших 30 хвилин після ін'єкції ПАФ (Рис. 2.4А) та була стабільною протягом двох-трьох тижнів.

Вимірювання термічної чутливості, що проводили підшовним тестом Харгрівса, показали, що латентність між початком больового стимулу та поведінковою реакцією відсмикування запаленої кінцівки достовірно зменшувалася з $12,9 \pm 0,6$ с ($n=7$) в контрольних умовах до $3,5 \pm 0,3$ с ($n=7$) при периферичному запаленні ($p < 0,001$, парний t-тест Стьюдента, Рис. 2.4Б).

Метод філаментів фон Фрея, який застосовувався для оцінювання механічної чутливості, показав наявність алодинії, тобто зменшення больового порогу при периферичному запаленні. Це підтверджується як різницею між кривими частоти відсмикування кінцівки (Рис. 2.4 Г), так і розрахованим по цим кривим порогам механічної чутливості, які зменшувались при запаленні ($3,0 \pm 0,5$ г в контрольних умовах та $0,6 \pm 0,1$ г, $p < 0,01$, парний t-тест Стьюдента; Рис. 2.4В).

Таким чином ін'єкція ПАФ є надійним методом для моделювання хронічного периферичного запалення.

2.5. Моделювання травми спинного мозку методом гемісекції спинного мозку.

Усі дослідження впливу травми спинного мозку у межах даної роботи виконано на моделі гемісекції спинного мозку, тобто перетину (лівобічного) половини спинного мозку у нижньогрудному відділі (Korach et al., 2017b).

Хірургічні втручання здійснювалися при загальній анестезії, викликаній шляхом інтраперитонеальної ін'єкції суміші ксилазину ("Sedazin", "Biowet", Польща; 10 мг/кг) і кетаміну ("Кетамін", "Фармак",

Україна; 65 мг/кг), глибина знеболення перевірялася відсутністю рогівкового рефлексу. Після індукування анестезії шерстистий покрив спинної та поперекової ділянки видалявся, а поверхня шкіри дезінфікувалася 70 % розчином спирту. Далі тварину фіксували на оперативному столику, після чого робили розтин шкіри по лінії, що з'єднує остисті відростки T8–L2 хребців. Після того остисті відростки T9–L1 скелетували, а кровотеча спинялася тампонуванням. Гемісекцію, тобто перетин тканини лівої половини поперечного перерізу спинного мозку проводили в декілька прийомів на рівні T11 (Рис 2.5А), після чого знову проводили гемостаз.

Після проведення гемісекції та повного усунення кровотечі хребтовий канал прикривався фрагментом підшкірної фасції. На м'язи та шкіру в зоні хірургічного втручання накладали лігатури поліамідними нитками (ПО "Хімволокно", Київ). З метою антисептики ділянку рани обробляли повідон-йодом ("Бетадин", EGIS, Угорщина). З метою профілактики інфекційних ускладнень підшкірно вводили біцилін-5 (БАТ "Київмедпрепарат") у дозі 1 млн ОД на 1 кг живої маси (~150–200 тис ОД, 1 мл приготовленого розчину на одну тварину). Для зменшення запалення та набряку проводилося внутрішньочеревне введення розчину дексаметазону (KRKA, Словенія) у дозі 6 мг/кг живої маси. Після проведення хірургічних процедур та введення необхідних розчинів тварин утримували в приміщенні з підвищеною температурою (30° С) на протязі 3-4 годин, після чого їх переміщували в індивідуальні клітки.

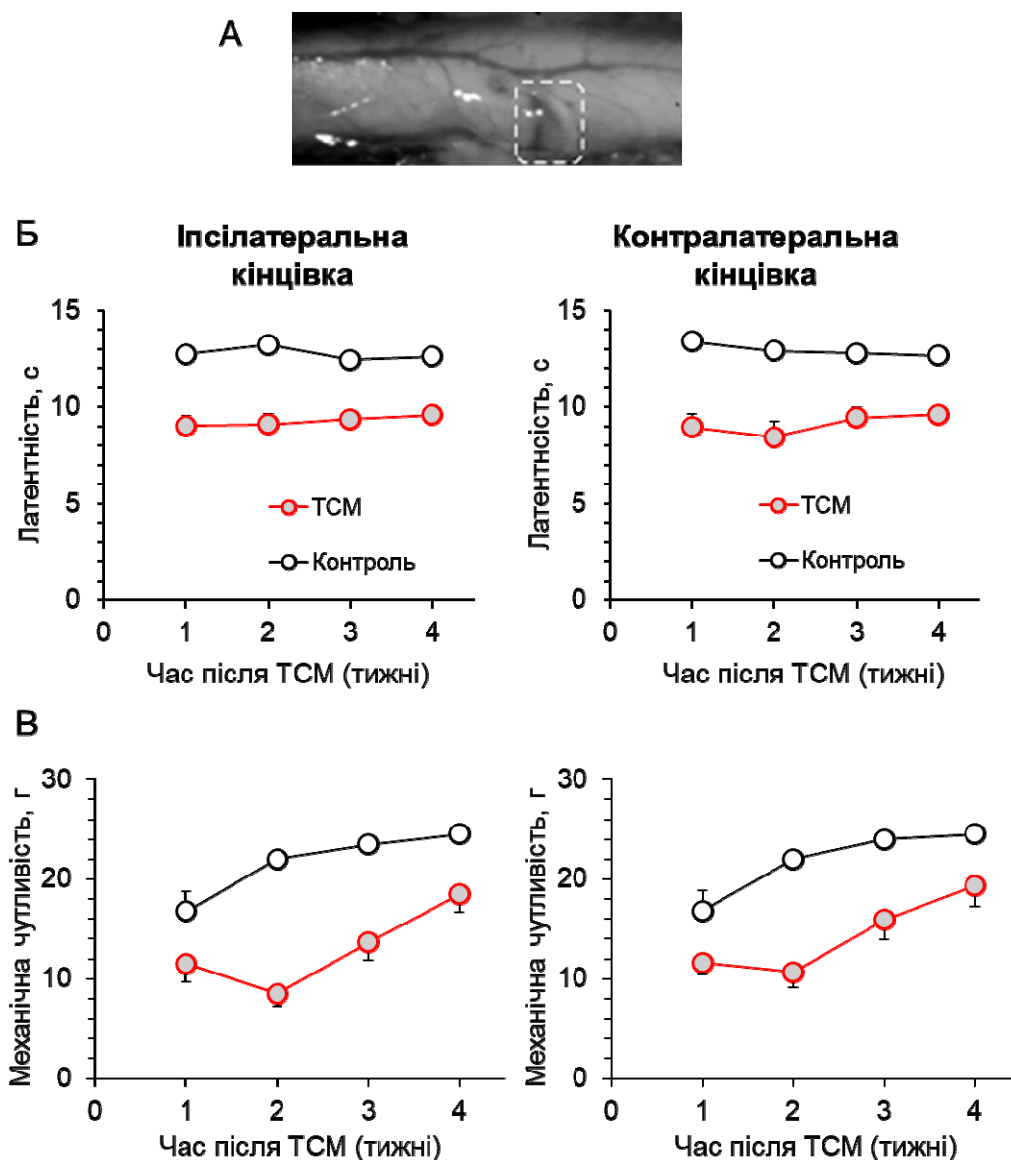


Рисунок. 2.5. Зміни больової чутливості при ТСМ. А. Фотографія спинного мозку щура після моделювання ТСМ гемісекцією спинного мозку. Б. Термічна больова чутливість в контрольних умовах і при ТСМ. В. Механічна больова чутливість в контрольних умовах і при ТСМ.

Вимірювання больових відповідей щурів з ТСМ було ускладненим через виникнення моторного дефіциту та зокрема синдрому спастичності. Проте тварини, функція задніх кінцівок яких дозволяла провести тести Харгрівса та фон Фрея, демонстрували двосторонню термічну гіперчутливість, яка достовірно відрізнялася від контрольних значень

($p < 0,05$; Рис. 2.5Б) протягом усього часу спостережень. Ці тварини також демонстрували знижені значення порогу механічної больової чутливості (Рис. 2.5В), проте достовірна різниця з контрольними значеннями спостерігалася лише для іпсілатеральної кінцівки через 2 тижні після ТСМ ($p < 0,05$).

Схожі результати впливу гемісекції спинного мозку на больову чутливість були отримані й іншими дослідницькими групами (Christensen et al., 1996; Christensen and Hulsebosch, 1997). Таким чином можна стверджувати, що ТСМ дійсно спричинює появу хронічного больового синдрому.

2.6. Метод отримання «гострих» зрізів спинного мозку.

Обробка сенсорної, і зокрема ноцицептивної інформації в спинному мозку здійснюється всією мережею дорсального рогу (Todd, 2010). Саме тому для адекватного дослідження змін, що відбуваються в ПП ДР в умовах хронічного болю, необхідно якнаймога більше зберегти архітектуру СМ. Таку можливість дають препарати цілого спинного мозку, описані у (Safronov et al., 2007; Szűcs et al., 2009; Krotov et al., 2017), проте особливості візуалізації нейронів в таких препаратах, пов'язані з боковим освітленням за допомогою світлодіодів, дають можливість ефективно працювати на поверхні препарату (до 50 мкм), що в свою чергу не дозволяє в повній мірі досліджувати більш глибокі шари желатинозної субстанції. Саме тому для дослідження спинного мозку загалом та поверхневих пластин дорсального рогу зокрема найчастіше використовуються зрізи СМ. Відома можливість використання органотипових зрізів СМ (Rybachuk et al., 2017), проте зазвичай використовують саме «гострі» зрізи спинного мозку.

В даній роботі гострі зрізи СМ отримували способом описаним раніше (Korach et al., 2015, 2017b). Для цього тварин анестезували ізофлураном, після чого швидко проводили декапітацію. Потім спинний мозок асептично видалявся та поміщався в холодний розчин для препарування, що мав наступний склад (у ммоль/л): сахароза – 250, глюкоза – 11, NaHCO_3 – 26, CaCl_2 – 0,5, MgCl_2 – 7, KCl – 2, NaH_2PO_4 – 1,2. Розчин постійно барботувався карбогеном – сумішшю газів O_2 (95%) та CO_2 (5%) – для насичення тканини СМ киснем та стабілізації рівня рН на позначці 7,4. Далі з очищеного від твердої оболонки СМ вирізали любальний сегмент та за допомогою цианакрилового клею прикріплювали його вентральною частиною до попередньо підготованого кубика агару, який в свою чергу був прикріплений до основи для нарізання зрізів. Останню закріплювали в камері вібратору HA752 (Campden Instruments, Сполучене Королівство), заповненій холодним пробарботованим препарувальним розчином, температура якого підтримувалася на рівні 2-4°C за допомогою вбудованого елемента Пельтьє з водяним охолодженням. Зрізи СМ готувалися зі L3-5 сегментів та мали товщину 300-350 мкм. В даній роботі вивчалися зміни синаптичної активності в іпсілатеральному дорсальному розі, тому одразу після нарізання кожного зрізу контралатеральний до запалення або ТСМ ДР надсікався за допомогою тонкої голки. Після нарізання зрізи переміщували за допомогою піпетки до камери з експериментальним розчином, який постійно барботувався. В цій камері відбувалося відновлення зрізів після нарізання, яке тривало не менше 1-1,5 годин.

2.7. Реєстрація іонних струмів з використанням методики «петч-клемп».

2.7.1. Загальні відомості.

Спонтанні збуджуючі та гальмівні, а також мініатюрні збуджуючі постсинаптичні струми у нейронах ПП ДР реєстрували за допомогою методики «петч-клемп» у конфігурації «ціла клітина». Цей метод, який на сьогоднішній день є одним з найпоширеніших електрофізіологічних методів, був запропонований у 1976 році Е. Неєром і Б. Сакманом (Neher and Sakmann, 1976). Даний метод полягає у реєстрації струмів, котрі протікають крізь ділянку мембрани, електрично ізольовану від зовнішнього розчину скляною мікропіпеткою. Технічна можливість такої ізоляції виникає з унікальної спроможності скла утворювати контакт із високим опором ($1 \div 100 \text{ Г}\Omega$) з мембранами клітин – так званий «гігаомний контакт». За наявності гігаомного контакту між піпеткою та мембраною використання високочутливого підсилювача з низьким рівнем власного шуму дозволяє здійснювати реєстрацію струмів пікоамперного діапазону, що відповідає величинам струмів, що протікають через одиночні канали. Для вимірювання струмів, що течуть крізь усю мембрану пізніше була розроблена модифікація вищеназваного методу, яка отримала назву «ціла клітина». Електрофізіологічні реєстрації у конфігурації «ціла клітина» передбачають, що після утворення гігаомного контакту, ділянку мембрани під мікропіпеткою проривають від'ємним тиском, після чого з внутрішньоклітинним середовищем встановлюється контакт із низьким опором, що дозволяє реєструвати різницю потенціалів між зовнішньою та внутрішньою частинами клітинної мембрани, тобто трансмембранний

потенціал. В даній роботі проводили локальну фіксацію потенціалу за допомогою лише однієї мікропіпетки. У порівнянні з двохелектродною фіксацією такий підхід значно полегшує роботу із клітинами невеликих розмірів (переважно якими і є нейрони ПП ДР), а також значно зменшує рівень шумів, що є критичним для реєстрації та подальшого аналізу низькоамплітудних струмів.

2.7.2. Експериментальна конфігурація.

Для електрофізіологічних реєстрацій зрізи спинного мозку переміщували до експериментальної камери, яку перфузували зі швидкістю 1,5-2 мл/хв постійно пробарбованим карбогеном розчином Кребса, який мав наступний склад (у ммоль/л): NaCl – 125, KCl – 2,5, MgCl₂ – 1, CaCl₂ – 2, глюкоза – 10, HEPES – 10 (pH 7,4, осмолярність 310-315 мОсм).

Нейрони ПП ДР візуалізувалися за допомогою мікроскопу Olympus BX50WI (Olympus, Японії) з 60-кратним водно-імерсійним об'єктивом.

Скляні мікропіпетки витягували на пуллері Sutter P-87 (Sutter instruments, Сполучені Штати), із скляних заготовок BF150-86-10 Borosilcate glass with filament (зовнішній діаметр – 1,5 мм, внутрішній діаметр – 0,86 мм, довжина – 10 см) виробництва Sutter instrument (Сполучені Штати). Піпетки мали діаметр кінчика 1-2 мкм, а їх опір складав 3-4 МΩ при заповненні внутрішньоклітинним розчином наступного складу (у ммоль/л): калійглюконат – 133, NaCl – 5, MgCl₂ – 0,5, Mg-ATP – 2, Na-GTP – 0,5, HEPES – 10 та EGTA – 0,5. Рівень pH дорівнював 7,2 та досягався титруванням розчину за допомогою КОН. Осмолярність складала 290 мОсм.

Заповнення піпетки внутрішньоклітинним розчином проводили за допомогою спеціального філаменту. Після цього піпетку опускали у

зовнішньоклітинний експериментальний розчин, та здійснювали компенсацію різниці потенціалів на границі розподілу розчинів. Гігаомний контакт між піпеткою та клітинною мембраною встановлювався притисканням піпетки, в якій попередньо був створений незначний надмірний тиск, до мембрани, із одночасним зменшенням тиску у піпетці до атмосферного. Утворення гігаомного контакту контролювали, подаючи на мембрану клітини прямокутні гіперполяризуючі імпульси із амплітудою у 10 мВ у режимі фіксації потенціалу. Після утворення щільного контакту піпетки із поверхнею мембрани проводили компенсацію ємності піпетки. Конфігурацію «ціла клітина» отримували через прорив клітинної мембрани під піпеткою імпульсами від'ємного тиску.

Реєстрацію мембранних струмів та подачу командних імпульсів здійснювали за допомогою підсилювача MultiClamp 700B (Molecular Devices, США) та ЦАП/АЦП (Molecular Devices, США), що контролювався за допомогою програми pClamp 9.2 (Molecular Devices, США). Для реєстрації збуджуючих постсинаптичних струмів потенціал на клітинній мембрані підтримували на рівні -70 мВ, тривалість запису становила 5 хвилин. Для реєстрації гальмівних постсинаптичних струмів потенціал на клітинній мембрані підтримували на рівні 0 мВ, запис тривав 10 хв. Реєстрацію мініатюрних постсинаптичних подій проводили при -70мВ за присутності в розчині Кребса блокаторів натрієвих потенціалкерованих каналів (TTX, 200 нмоль/л), потенціалкерованих кальцієвих каналів (CdCl_2 , 100 мкмоль/л), NMDA рецепторів (AP5, 50 мкмоль/л), гліцинових рецепторів (стрихнін, 2 мкмоль/л) та ГАМК-рецепторів (бікукулін, 5 мкмоль/л), які додавали за 10 хвилин перед записом. Підтвердження того, що при цьому реєструвалися саме АМРА-рецептор-опосередковані постсинаптичні струми проводили за допомогою додавання селективного блокатору GYKI 52466: при застосуванні всіх вищеназваних інгібіторів не спостерігали жодних синаптичних струмів (Рис. 2.6).

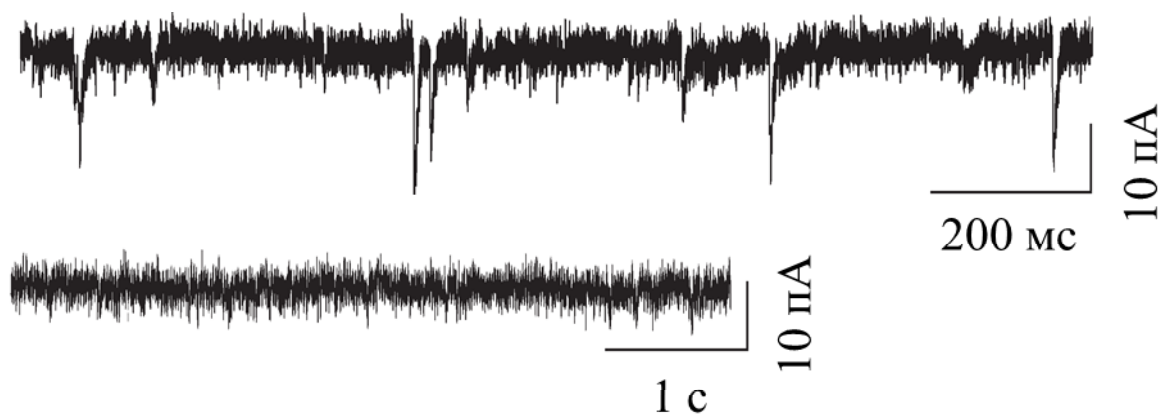


Рисунок 2.6. Приклади збуджуючих постсинаптичних струмів (зверху) при реєстрації в зовнішньоклітинному розчині Кребса та їх відсутність при додаванні повного набору блокаторів.

2.8. Детектування та аналіз постсинаптичних струмів.

Детектування постсинаптичних струмів здійснювали за допомогою програми MiniAnalysis (Synaptosoft, США). Аналізували лише ті реєстрації, що не демонстрували змін базової лінії струму, середньоквадратичне значення шуму якої не перевищувало 3 пА при фіксації потенціалу на -70 мВ та 4-4,5 пА при фіксації на рівні 0 мВ. Детектування проводили в основному в ручному режимі шляхом підбору оптимальних параметрів детекції. За невисоких частот синаптичних подій та низьких рівнях середньоквадратичного шуму детектування проводили в автоматичному режимі, але його результати перевіряли на наявність хибно позитивних подій.

Спонтанні та мініатюрні збуджуючі та спонтанні гальмівні події аналізували за наступними характеристиками: частотою (що визначалася як загальна кількість задетектованих подій поділена на весь час реєстрації), інтервалом між подіями (часовий проміжок між двома сусідніми піками),

амплітудою, 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% від амплітуди. Оскільки реєстрації гальмівних подій були більш зашумленими, за рахунок фіксації потенціалу на рівні 0 мВ, час спаду сГПСС розраховували як часову константу моноекспоненційної апроксимації постсинаптичного струму.

2.9. Метод нестационарного флуктуаційного аналізу шуму для розрахунку провідності постсинаптичних ліганд-керованих каналів.

Провідність одиночних каналів (γ) постсинаптичних AMPA-рецепторів оцінювали за допомогою нестационарного флуктуаційного аналізу (Traynelis et al., 1993). Для даного аналізу відбирали мініатюрні збуджуючі AMPA-рецептор-опосередковані події з часом спаду від 1 до 5 мс, які мали стабільну базову лінію струму та не перетиналися з іншими подіями. Відібрані постсинаптичні струми усереднювали для отримання усередненого мЗПСС, після цього для отримання нормалізованих струмів індивідуальні струми нормувалися на усереднений, згідно наступної формули:

$$I_i^{peak-scaled} = I_i - \langle I \rangle \frac{\max \langle I_i \rangle}{\max \langle I \rangle},$$

де I_i - індивідуальний струм, $\langle I \rangle$ - усереднений мЗПСС.

Далі будували залежність дисперсії нормованих мЗПСС $\sigma^2(I^{peak-scaled})$ від середньої величини постсинаптичних струмів, що апроксимували

параболою (відповідна формула наведена нижче) методом найменших квадратів з вагами.

$$\sigma^2(I_{peak-scaled}) = i_{ch}\langle I \rangle - \frac{\langle I \rangle^2}{N} + \sigma_0^2,$$

де $\langle I \rangle$ – усереднений мЗПСС, N – кількість каналів, що функціонують, σ_0^2 – дисперсія фонового шуму, i_{ch} – струм, що проходить через одиночний канал.

Нарешті провідність γ розраховували з рівняння

$$\gamma = \frac{i_{ch}}{V - E_{rev}},$$

де V – потенціал, що підтримувався на мембрані, E_{rev} – потенціал реверсії (0 мВ).

2.10. Статистична обробка результатів дослідження.

Для визначення нормальності розподілу всі набори даних аналізувалися тестом Шапіро-Вілка. Якщо вибірки були розподілені за Гаусом, то вони були представлені у вигляді «середнє значення \pm стандартна похибка середнього» та порівнювали між собою за допомогою двохвостого парного або непарного t-тестів Стьюдента. Більшість даних не відповідали критерію нормального розподілу, тому для них наводилося лише медіанне значення вибірок, достовірність відмінностей яких порівнювали за допомогою непараметричних тестів Манна-Вітні та Колмогорова-Смірнова. В даній роботі проводили: а) аналіз по загальній вибірці конкретного параметру усіх збуджуючих або гальмівних синаптичних подій в усіх клітинах (достовірність різниці між функціями

ймовірності демонстрували тестом Колмогорова-Смірнова), б) аналіз медіанних значень параметрів по клітинам (статистична достовірність розраховували тестом Манна-Вітні).

Критерієм достовірності відмінностей для всіх статистичних тестів було значення $p < 0,05$.

Після результатів наводили також значення числа експериментів (n), яке дорівнювало кількості клітин у електрофізіологічних або поведінкових дослідках.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

3.1. Різниця мережевої синаптичної активності в різних популяціях нейронів поверхневих пластин спинного мозку.

3.1.1. Різні популяції нейронів в поверхневих пластинах спинного мозку.

Нейрони спинного мозку загалом та нейрони поверхневих пластин дорсального рогу зокрема відзначаються значною гетерогенністю. Очевидно, що таке різноманіття пов'язане з функціями, які та чи інша популяція нейронів виконує у високоорганізованій мережі спинного мозку. Саме тому при роботі зі СМ виникає необхідність в ідентифікації нейронів, що вивчаються. Існує кілька класифікацій нервових клітин поверхневих пластин СМ, що базуються на морфології, нейрохімічному фенотипі та електрофізіологічних властивостях. В даній роботі ми класифікували нейрони в залежності від того, яким чином вони генерували потенціали дії у відповідь на ін'єкцію струму. Усі нейрони поверхневих пластин дорсального рогу стимулювалися в режимі фіксації струму 0,5-1 секундними прямокутними імпульсами. Стимуляція починалася з гіперполяризаційного імпульсу амплітудою -20 або -10 пА та повторювалася через рівні проміжки часу з тим самим профілем наростання.

В експериментах спостерігалися тонічні нейрони, які могли генерувати потенціали дії на протязі всієї тривалості стимулу (Рис. 3.1), а також нейрони, які адаптувалися (односпайкові нейрони та нейрони, які генерували ПД лише на початковому етапі ін'єкції струму, Рис. 3.1). Оскільки адаптивні відповіді пов'язані в основному з А-типом калієвого струму (Melnick et al., 2004; Todd, 2010; Yasaka et al., 2010), в даній роботі

ми розділяли нейрони поверхневих пластин дорсального рогу на 2 великі популяції – тонічні та адаптивні.

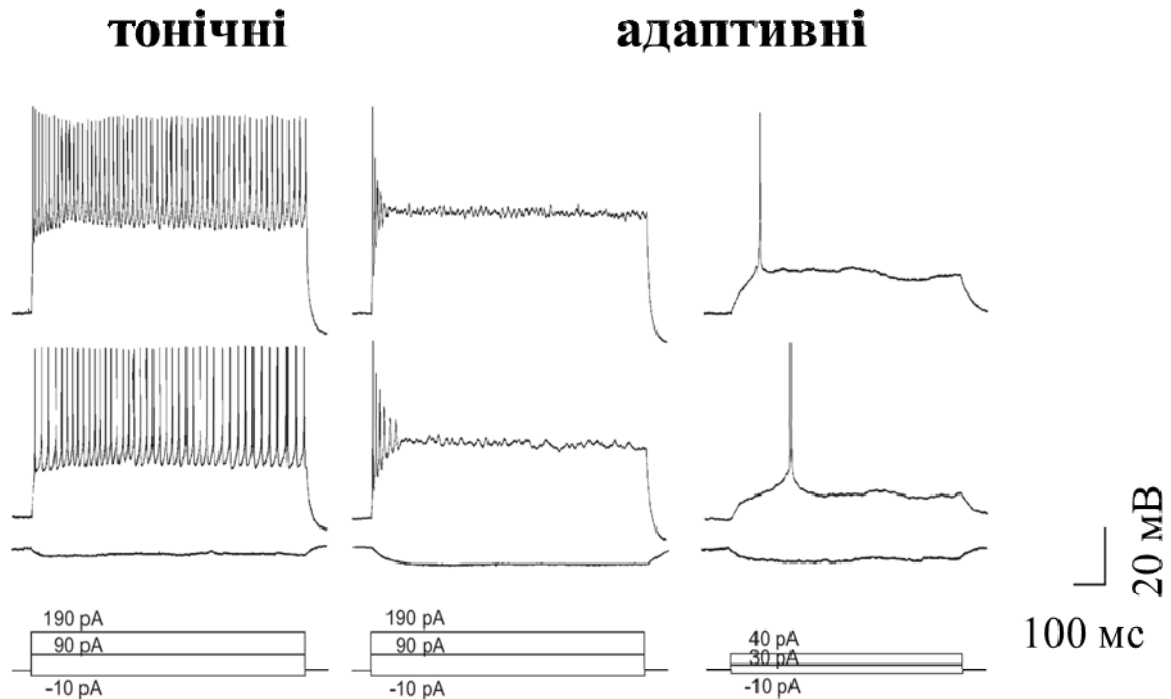


Рисунок 3.1. Приклад генерації ПД тонічним та адаптивними нейронами у відповідь на 1 с стимуляцію прямокутними імпульсами у режимі фіксації струму.

З літературних джерел відомо, що в поверхневих пластинах дорсального рогу тонічні нейрони є переважно гальмівними, в той час як нейрони, які проявляють адаптивні властивості, є в основному збуджуючими. Враховуючи таку різницю в фізіологічних ролях, логічно було б припустити різну синаптичну інервацію тонічних та адаптивних нейронів не тільки при хронічному болю, але й в контрольних умовах.

3.1.2. Різниця в збуджуючій синаптичній активності в тонічних та адаптивних нейронах в фізіологічних умовах.

Навіть в фізіологічних умовах амплітудні та частотні характеристики спонтанних збуджуючих постсинаптичних струмів (Рис. 3.2) в тонічних та адаптивних нейронах поверхневих пластин спинного мозку статистично достовірно відрізнялися.

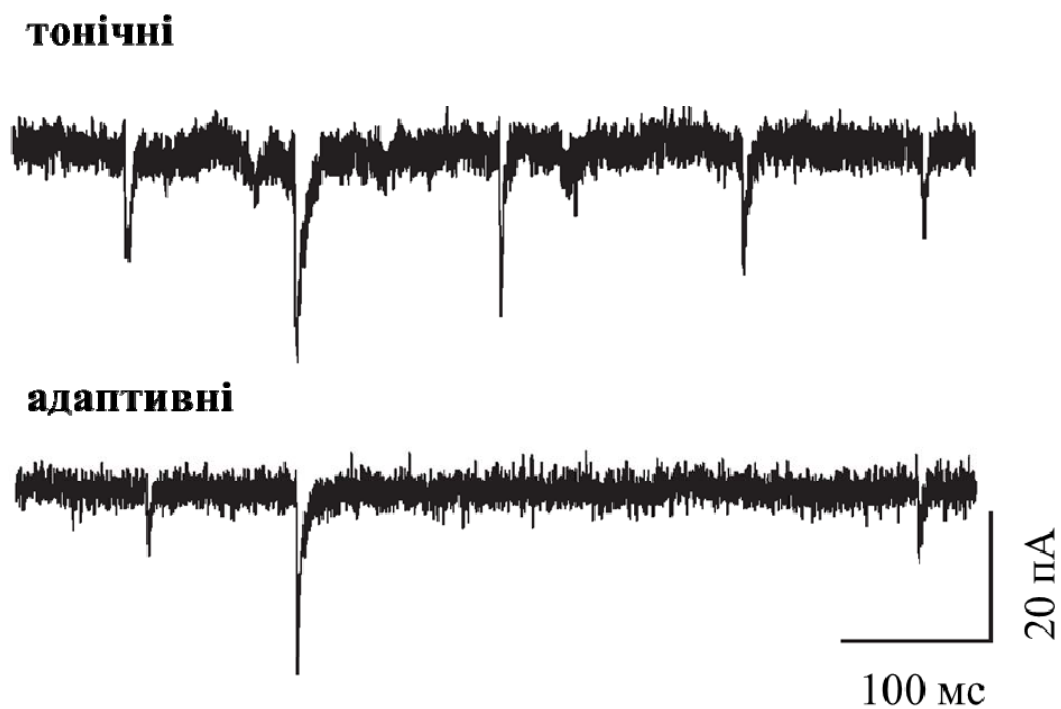


Рисунок 3.2. Приклади сЗПСС в тонічних та адаптивних нейронах.

Як показало порівняння вибірок синаптичних подій, інтервал між подіями та амплітуди сЗПСС (Рис.3.3) були достовірно різними ($p < 0,001$ тест Колмогорова-Смірнова).

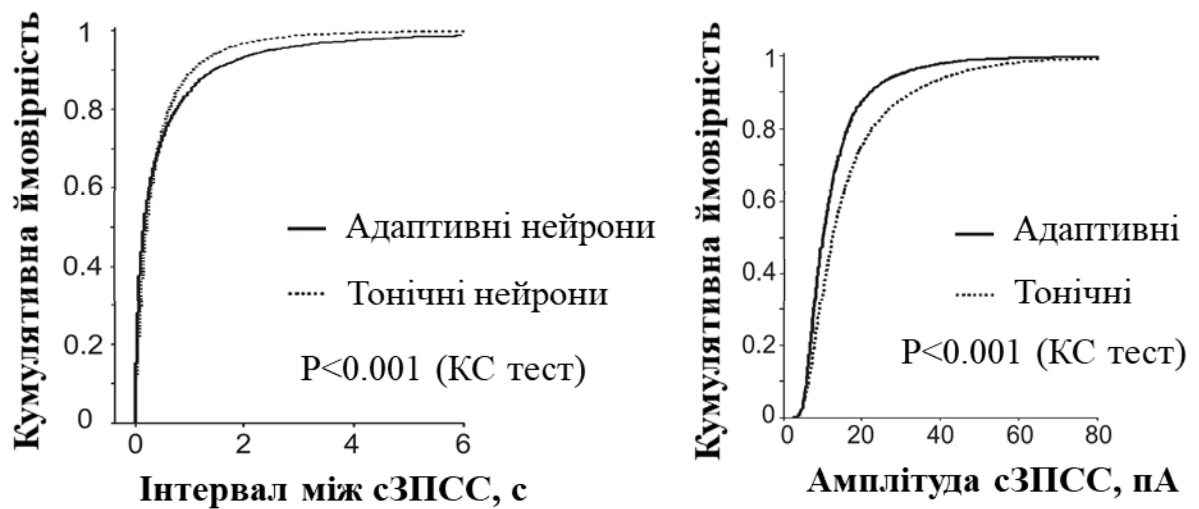


Рисунок 3.3. Графіки кумулятивних ймовірностей інтервалів та амплітуд сЗПСС по вибіркам подій в тонічних та адаптивних нейронах в фізіологічних умовах.

Достовірна різниця була також продемонстрована також статистичним порівнянням частот та амплітуд сЗПСС по вибіркам клітин. Медіанна частота сЗПСС в тонічних нейронах була 2,1 Гц ($n=15$), в той час як в адаптивних нейронах ПП ДР вона становила 0,8 Гц ($n=19$, різниця $\sim 62\%$, $p<0,001$ тест Манна-Вітні, Рис.3.4).

Медіанна амплітуда сЗПСС в тонічних нейронах становила 14,8 пА ($n=15$), а в адаптивних нейронах ПП ДР вона складала 10,8 пА ($n=20$, різниця $\sim 27\%$, $p=0,011$ тест Манна-Вітні, Рис.3.4).

На відміну від частот та амплітуд, не спостерігалось відмінностей в кінетиці сЗПСС між тонічними й адаптивними нейронами. Час наростання був 1,3 мс ($n=15$) та 1,5мс ($n=20$, $p=0,45$ тест Манна-Вітні), а час спаду становив 3,4 мс ($n=15$) та 2,8 мс ($n=20$, $p=0,39$ тест Манна-Вітні) в тонічних й адаптивних нейронах відповідно.

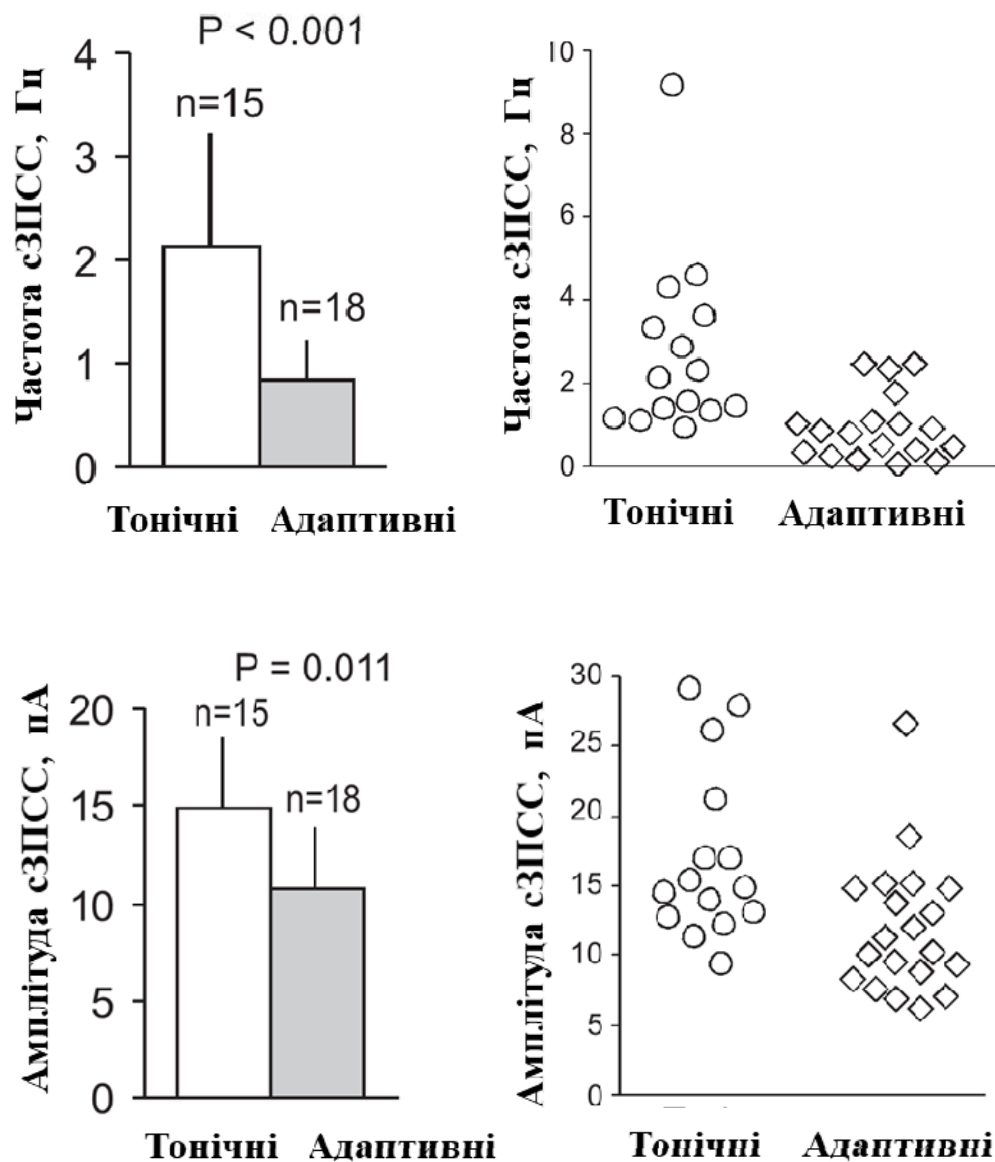


Рисунок 3.4. Розраховані по вибіркам клітин медіанні (зліва) та індивідуальні (справа) значення частот та амплітуд сЗПСС в тонічних та адаптивних нейронах у фізіологічних умовах.

Таким чином значні відмінності в частотах та амплітудах мережевої синаптичної активності в тонічних та адаптивних нейронах ще раз підтверджують різнопланові ролі, які ці клітини поверхневих пластин

дорсального рогу спинного мозку відіграють в обробці сенсорної, і зокрема ноцицептивної інформації.

3.1.3. Різниця в гальмівній синаптичній активності та баланс збудження-гальмування в тонічних та адаптивних нейронах в фізіологічних умовах.

Виявляється, що в фізіологічних умовах тонічні та адаптивні нейрони ПП ДР відрізняються не тільки збуджуючою, але й гальмівною мережевою синаптичною іннервацією. Статистична достовірна різниця була знайдена навіть для інтервалів сГПСС ($p < 0,01$ тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.6), а функції ймовірностей інших параметрів сГПСС, таких як амплітуда ($p < 0,001$ тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.5) та час спаду ($p < 0,001$ тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.5) різнилися ще істотніше.

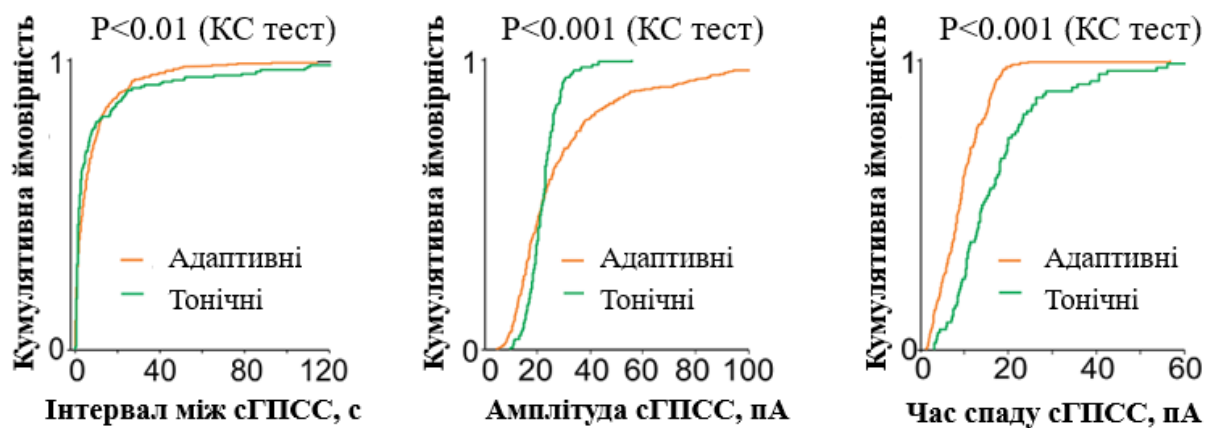


Рисунок 3.5. Графіки кумулятивної ймовірності інтервалів між сГПСС, амплітуд та часів спаду сГПСС в тонічних та адаптивних нейронах за контрольних умов.

Цікаво, що популяція спонтанних гальмівних подій як в тонічних, так і в адаптивних нейронах була гетерогенною. Додатковий аналіз показав, що сГПСС можна було розділити на 2 категорії – «швидкі», з часом спаду менше 13 мс, та «повільні», у яких, відповідно, кінетика була довшою 13 мс (Рис. 3.6А).

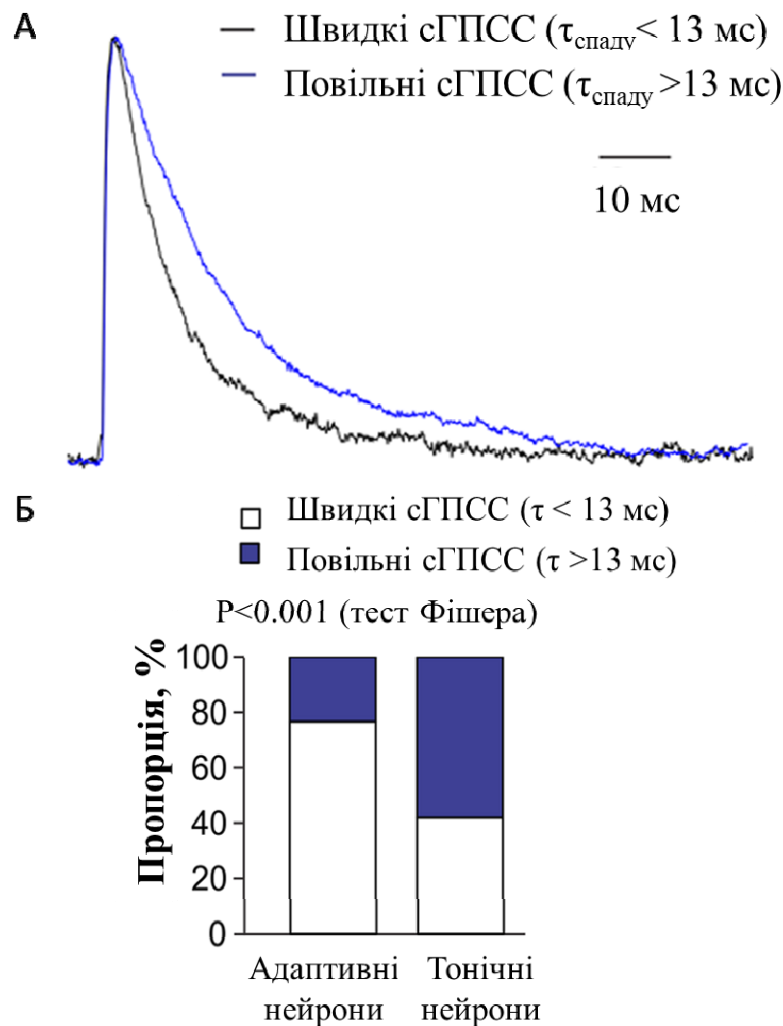


Рисунок 3.6. А. Віднормовані усереднені «швидкі» ($\tau_{\text{спаду}} = 10,5$ мс, $n=112$) та «повільні» ($\tau_{\text{спаду}} = 19,6$ мс, $n=44$) сГПСС в адаптивних нейронах в контрольних умовах. Б. Відносні кількості «швидких» та «повільних» сГПСС в адаптивних та тонічних нейронах у контрольних умовах.

Відмінності кінетики сГПСС відображають різні типи синаптичного гальмування, пов'язані з активацією гліцин- та ГАМК-ергічних ліганд-керованих каналів. Це підтверджується літературними даними: попередньо було показано, що характерна кінетика мініатюрних гліцинових ГПСС складає 8,4 мс, а час спаду мГПСС, опосередкованих ГАМК-рецепторами, - 26,9 мс (Takazawa and MacDermott, 2010).

Пропорція «швидких» та «повільних» сГПСС статистично достовірно відрізнялася в двох різних популяціях нейронів ПП ДР ($p < 0,001$ точний тест Фішера, Рис. 3.6Б).

В адаптивних нейронах синаптичне гальмування відбувалося за рахунок гліцинергічних сЗПСС, оскільки відсоток швидких подій у порівнянні з відсотком повільних був більш ніж втричі більшим (77% проти 23%, відповідно). В тонічних нейронах мережева гальмівна активність проявлялася інакше: частки швидких та повільних подій не відрізнялися кардинально, причому процент повільних подій в фізіологічних умовах був навіть трохи вищим (42% проти 58%). Ці факти опосередковано підтверджують вже опубліковані дані про наявність двох різних типів (гліцин та ГАМК-ергічних) гальмівних інтернейронів в поверхневих пластинах спинного мозку (Takazawa and MacDermott, 2010; Punnakal et al., 2014).

Оскільки збуджуюча та гальмівна синаптична активність реєструвалася в одних і тих самих клітинах, був проведений порівняльний аналіз балансу між синаптичним збудженням та гальмуванням в двох популяціях нейронів ПП ДР. Для цього оцінювалося співвідношення частоти сЗПСС до частоти сГПСС. Статистичний аналіз поклітинних вибірок встановив, що для адаптивних нейронів медіанне співвідношення було 19,8 ($n=14$), а для нейронів з тонічним типом генерації ПД воно складало 113 ($n=10$, $p < 0,001$ тест Манна-Вітні, Рис. 3.7).

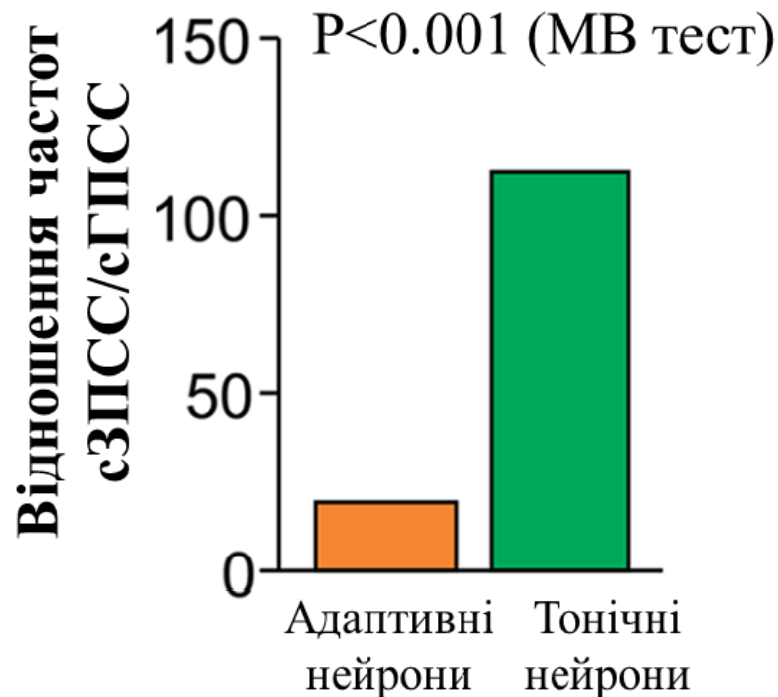


Рисунок 3.7. Баланс збудження та гальмування, виражений як відношення частоти сЗПСС до частоти сГПСС в адаптивних та тонічних нейронах ПП ДР в контрольних умовах.

Це свідчить про клітиноспецифічність синаптичних входів в мережі ПП ДР, а також про істотніше синаптичне збудження переважно гальмівної популяції тонічних нейронів.

Результати даного розділу опубліковані у роботах (Korach et al., 2015; Korach et al., 2017).

3.2. Зміни мережевої синаптичної активності в нейронах поверхневих пластин дорсального рогу при периферичному запаленні.

Хронічний біль, що виникає внаслідок периферичного запалення, пов'язаний з розвитком центральної сенситизації, тобто гіперзбудливості ноцицептивних мереж центральної нервової системи. Така гіперзбудливість характерна і для мережі поверхневих пластин

дорсального рогу. Дані, що наводяться нижче переконливо доводять, що периферичне запалення викликає загальне збільшення синаптичного збудження в желатинозній субстанції спинного мозку, при чому це збільшення опосередковується клітиноспецифічністю змін у збуджуючій та гальмівній синаптичній передачі.

3.2.1. Зміни збуджуючої синаптичної передачі в мережі ПП ДР при периферичному запаленні.

Експериментальні дані демонструють значне посилення синаптичного збудження в дорсальному розі спинного мозку. Це видно зі збільшення загальної кількості задетектованих збуджуючих синаптичних подій: було зареєстровано 17162 спонтанних ЗПСС в 33 нейронах ПП ДР з тварин контрольної групи, в той час як у 32 нейронах з тварин, у яких периферичне запалення викликалося ін'єкцією повного ад'юванту Фройнда в задню кінцівку, кількість сЗПСС становила 19653. Інтервал між сЗПСС, розрахований за цими вибірками, дорівнював 532 мс в фізіологічних умовах, та зменшувався до 386 мс через 1 день після ін'єкції ПАФ (різниця у $\sim 27\%$, $p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова), що свідчить про збільшення загальної частоти сЗПСС, а, отже, і про викликане периферійним запаленням збільшення збудження в мережі ПП ДР.

Зміни у мініютюрній AMPA-рецептор-опосередкованій збуджуючій спонтанній активності також вказують на загальну гіперзбудливість мережі ПП ДР при хронічному запаленні. Загалом в контрольних умовах в 13 нейронах желатинозної субстанції було зареєстровано 3975 мЗПСС, в той час як при периферичному запаленні ця цифра досягала 7067 (14 нейронів). Інтервал між подіями зменшився з 646 мс до 376 мс ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова), що означає збільшення частоти мЗПСС.

Враховуючи те, що частота мЗПСС визначається пресинаптичними чинниками, її збільшення після індукування хронічного запалення свідчить про збільшення ймовірності викиду нейромедіатору з пресинаптичних терміналей первинних аферентів та збуджуючих глутаматергічних нейронів дорсального рогу.

Однак, незважаючи на загальну тенденцію до збільшення синаптичного збудження, його зміни при індукуванні хронічного запалення були неоднаковими та відрізнялися в залежності від популяції нейронів желатинозної субстанції.

3.2.1.1. Зміни спонтанної збуджуючої синаптичної активності в адаптивних нейронах при периферичному запаленні.

Статистичні підрахунки по вибіркам подій доводять, що в адаптивних нейронах периферичне запалення викликало зменшення інтервалу між сЗПСС на 39% ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.8), що свідчить про збільшення частоти спонтанних збуджуючих синаптичних подій.

В адаптивних нейронах частота сЗПСС значно збільшувалася в умовах периферичного запалення, при чому в деяких клітинах спостерігалось майже десятикратне підвищення у порівнянні з контрольним рівнем збуджуючої синаптичної активності (Рис. 3.11). Медіанне значення частот, розраховане по вибірці клітин, дорівнювало 0,8 Гц ($n=19$) в контрольних умовах та збільшувалося аж до 2,3 Гц ($n=21$, ~177% підвищення) через 1 добу після ін'єкції ПАФ ($p < 0,001$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.9).

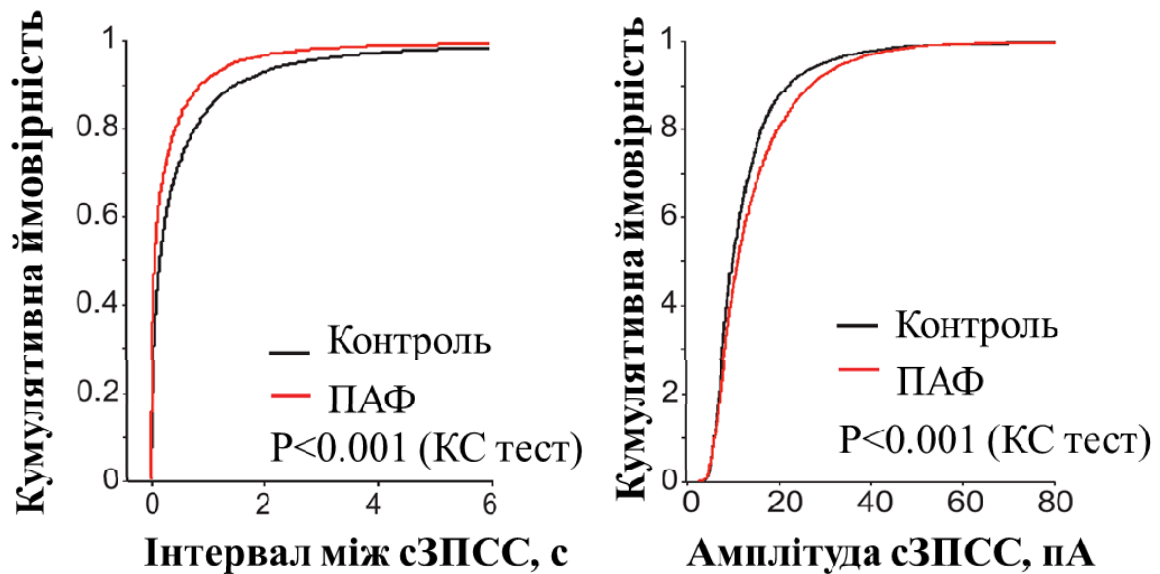


Рисунок 3.8. Графіки кумулятивних ймовірностей інтервалів та амплітуд сЗПСС в адаптивних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та в умовах периферичного запалення, викликаного ін'єкцією повного ад'юванту Фройнда (ПАФ) у задню кінцівку щура.

Периферичне запалення змінювало також й амплітудні характеристики спонтанної збуджуючої синаптичної активності в адаптивних нейронах, збільшуючи медіанне значення амплітуди сЗПСС, розраховане по вибіркам подій, на 12% ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.8).

Таким чином периферичне запалення спричинює зміни як у частотних, так і в амплітудних характеристиках збуджуючої синаптичної передачі в адаптивних нейронах ПП ДР. Проте якщо зменшення інтервалу між синаптичними подіями недвозначно вказує на пресинаптичні механізми таким змін, оскільки частота сЗПСС визначається лише кількістю пресинаптичних терміналей та ймовірністю викиду нейротрансміттеру з них, то зміни в амплітудах сЗПСС можуть бути

викликані як варіаціями в кількості синаптичних везикул та їх квантового складу, так і відмінностями у складі постсинаптичних глутаматних рецепторів, які виникають при хронічному запаленні.

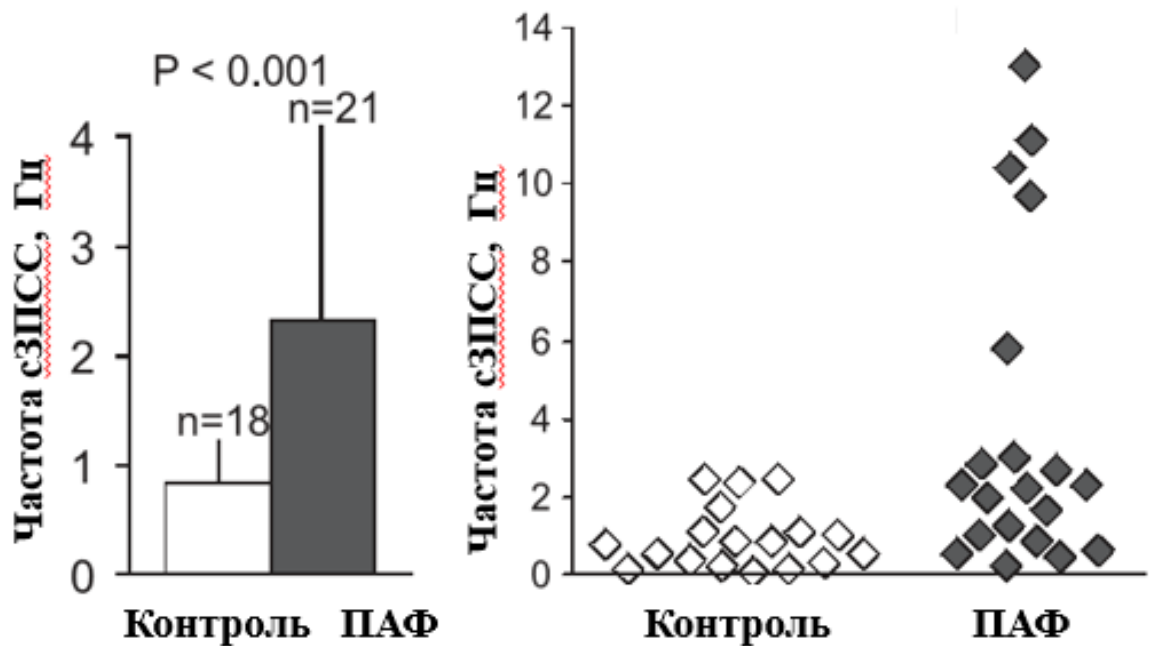


Рисунок 3.9. Розраховані по вибіркам клітин медіанні (зліва) та індивідуальні (справа) значення частот сЗПСС в адаптивних нейронах ГП ДР у фізіологічних умовах та через 1 добу після ін'єкції ПАФ.

Саме для того, щоб визначити, чи дійсно постсинаптичні механізми впливають на зміни синаптичного збудження при периферичному запаленні, була досліджена мініатюрна збуджуюча синаптична активність, опосередкована активацією AMPA глутаматних рецепторів.

3.2.1.2. Зміни мініатюрної збуджуючої синаптичної активності в адаптивних нейронах при периферичному запаленні.

В адаптивних нейронах ПП ДР зміни мініатюрної спонтанної синаптичної активності, викликані периферичним запаленням, носили той самий характер, що й для спонтанної активності, і навіть були ще більш виразними.

Інтервал між мініатюрними синаптичними подіями, розрахований по їх вибіркам, суттєво зменшився ($\sim 230\%$, $p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.10А), вказуючи на відповідне зростання частоти.

Аналіз середніх значень частот мЗПСС, розрахованих по вибіркам клітин, так само доводить її збільшення на $137 \pm 31\%$ через 1 день після ін'єкції ПАФ ($p < 0,05$, непарний t-тест Стьюдента, Рис. 3.10Б). Вищенаведені дані демонструють, що периферичне запалення значно збільшує ймовірність викиду нейротрансмітера в адаптивних нейронах.

Амплітудні характеристики мЗПСС також суттєво відрізнялися. В адаптивних нейронах медіанне значення амплітуд, розраховане по вибіркам подій, збільшувалося на 42% ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.10А).

Аналіз середніх значень амплітуд, розрахованих по вибіркам клітин, також показав тенденцію до збільшення мЗПСС при периферичному запаленні ($\sim 39\%$, $p = 0,14$, Рис. 3.16), хоча непарний параметричний t-тест Стьюдента й не виявив статистично достовірної різниці.

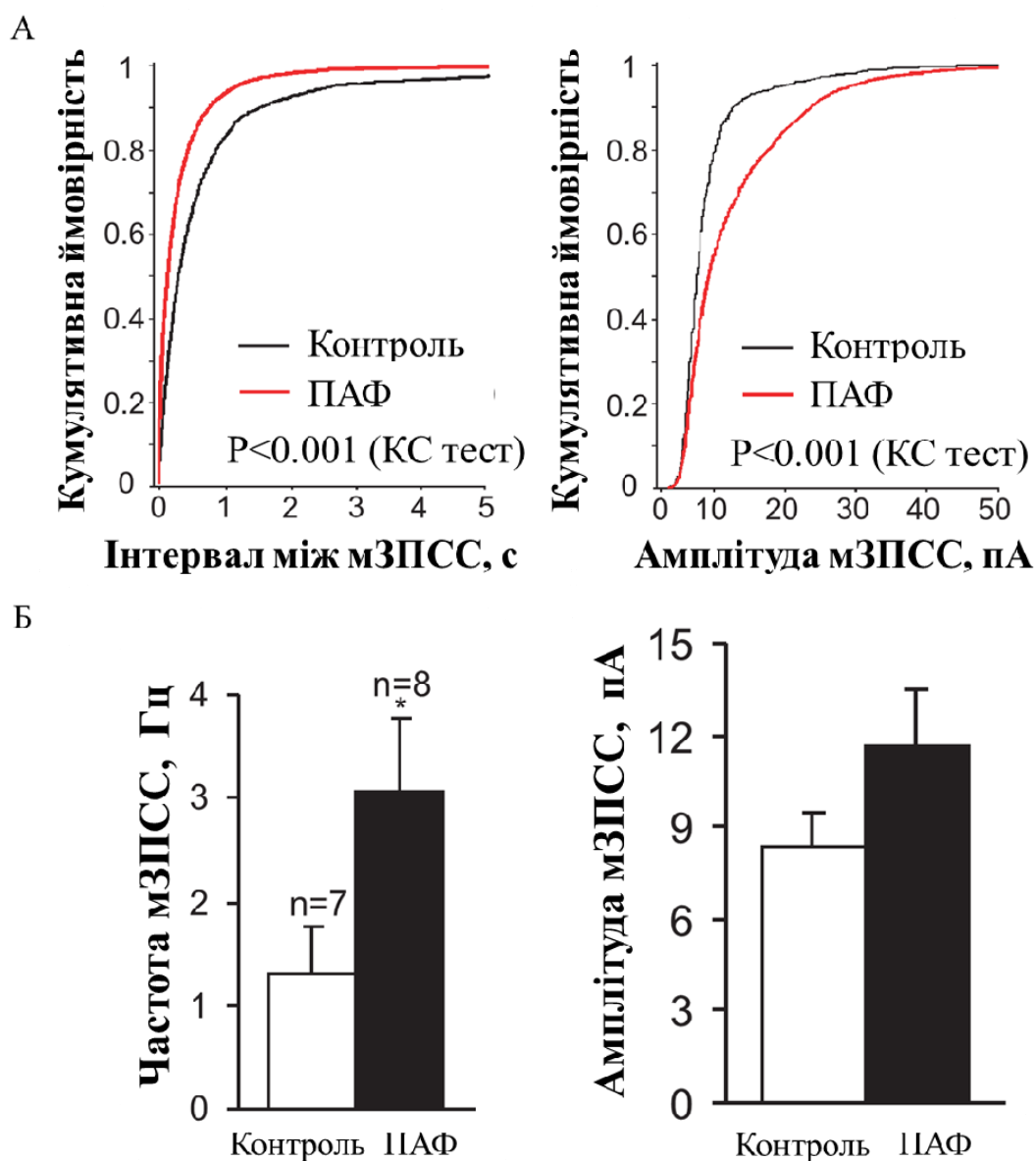


Рисунок 3.10. А. Графіки кумулятивних ймовірностей інтервалів та амплітуд мЗПСС в адаптивних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та в умовах периферичного запалення. Б. Розраховані по вибіркам клітин середні значення частот та амплітуд мЗПСС в адаптивних нейронах у фізіологічних умовах та в умовах периферичного запалення.

Збільшення амплітуд мЗПСС після ін'єкції ПАФ скоріш за все свідчать про зміни складу синаптичних АМРА-рецепторів. З літературних даних відомо, що це відбувається в синапсах між первинними аферентами

та нейронами дорсального рогу (Hartmann et al., 2004a; Katano et al., 2008; Vikman et al., 2008; Park et al., 2009). В зазначених синапсах змінюється трафікінг AMPA-рецепторів, внаслідок посиленої інтерналізації кальцій-непроникних рецепторів та їх заміни на кальційпроникні канали, що не містять GluA2 субодиницю (Hartmann et al., 2004a; Park et al., 2009). Оскільки субодиничний склад AMPA-рецепторів можна передбачити на основі кінетики деактивації AMPA-опосередкованих струмів - GluA2-вмісні рецептори мають довшу кінетику (Burnashev et al., 1992; Geiger et al., 1995; Liu and Cull-Candy, 2000) -, мЗПСС були проаналізовані за часом їх спаду.

В адаптивних нейронах медіанний час спаду, розрахований по вибірці подій, зростає на 23% в умовах периферичного запалення ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.11).

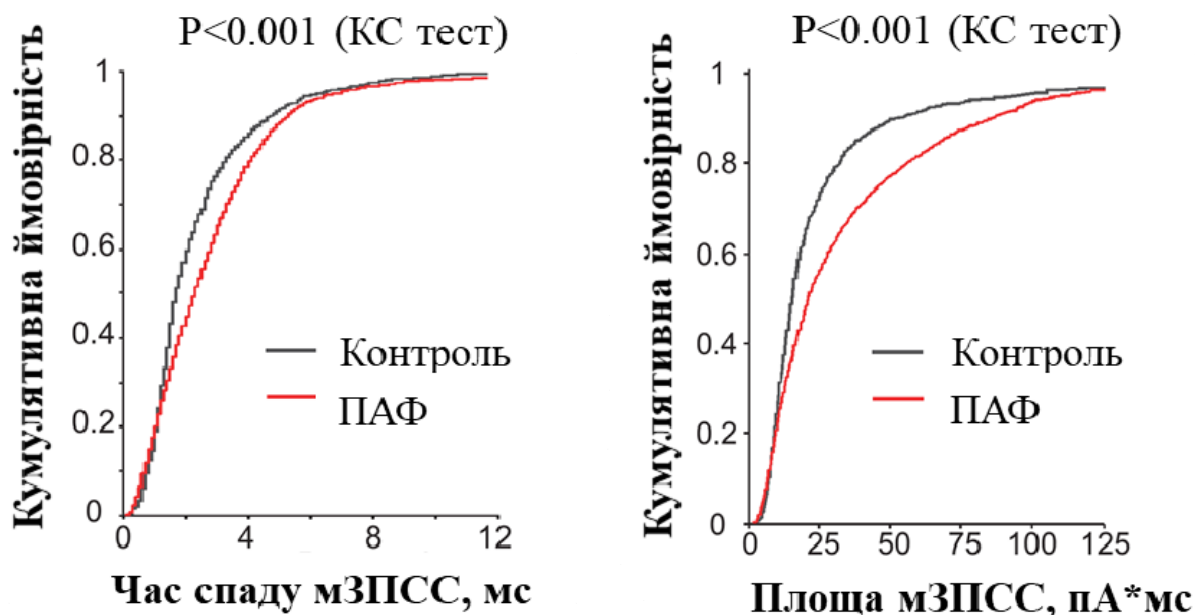


Рисунок 3.11. Графіки кумулятивних ймовірностей часу спаду та площі мЗПСС в адаптивних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та в умовах периферичного запалення.

Подовження кінетики у комбінації зі підвищенням амплітуд мЗПСС призводило до значного 40% збільшення площі мЗПСС ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.11).

Аналіз щільностей ймовірності показав суттєвий перерозподіл мЗПСС за часом спаду при периферичному запаленні (Рис. 3.12)

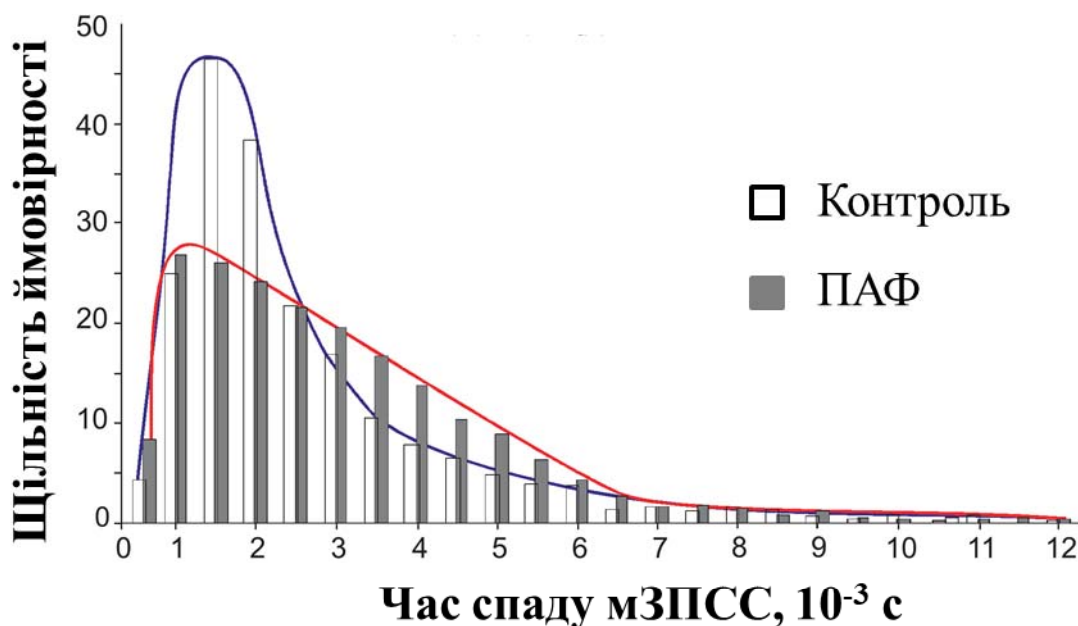


Рисунок 3.12. Розподіли часів спаду мЗПСС у контрольних умовах та при периферичному запаленні в адаптивних нейронах ПП ДР.

Згідно графіків ПАФ викликає в адаптивних нейронах перерозподіл мЗПСС на користь подій з довшою кінетикою спаду, яка відповідає кальційнепроникним GluA2-вмісним AMPA-рецепторам. Беручи до уваги той факт, що названі рецептори мають меншу провідність ніж кальційпроникні, а також те, що амплітуда мЗПСС збільшується, логічно припустити, що при периферичному запаленні в синапсах адаптивних нейронів відбувається не заміна кальційпроникних AMPA-рецепторів, через інтерналізацію останніх, а додаткова інкорпорація

кальційнепроникних GluA2-вмісних каналів. Такий механізм може одночасно забезпечувати як гіперзбудливість мережі дорсального рогу, характерну для больових станів, так і захист переважно збуджуючих адаптивних нейронів від ексайтотоксичності.

3.2.1.3. Зміни спонтанної збуджуючої синаптичної активності в тонічних нейронах при периферичному запаленні.

В тонічних нейронах периферичне запалення змінювало спонтанну збуджуючу синаптичну активність у зовсім інший спосіб ніж в адаптивних нейронах. Розрахований по вибірці подій інтервал між сЗПСС зменшувався слабо – лише на 13% ($p < 0,05$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.13).

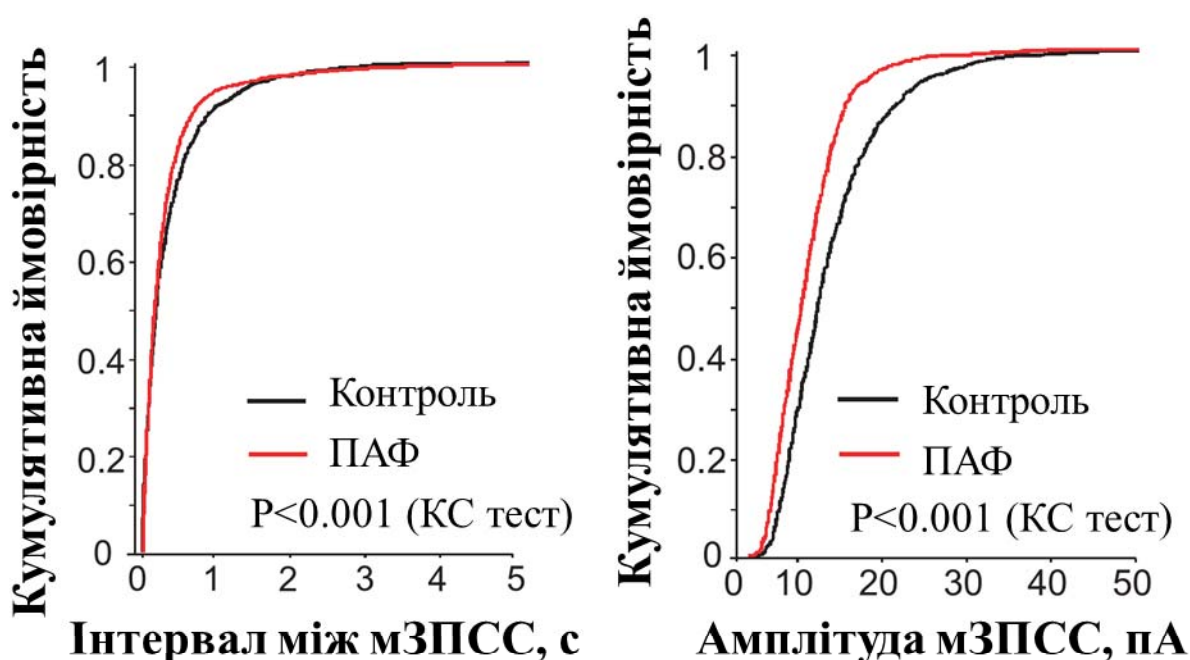


Рисунок 3.13. Графіки кумулятивних ймовірностей інтервалів та амплітуд сЗПСС в тонічних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та в умовах периферичного запалення, викликаного ін'єкцією повного ад'юванту Фройнда (ПАФ) у задню кінцівку щура.

Доволі несподівано результати аналізу по вибірці клітин відрізнялися, не підтверджуючи зменшення інтервалу між сЗПСС та відповідне збільшення їх частоти. Більше того, в багатьох клітинах спостерігалось зменшення частоти сЗПСС (Рис. 3.14), хоча воно і було недостовірним:

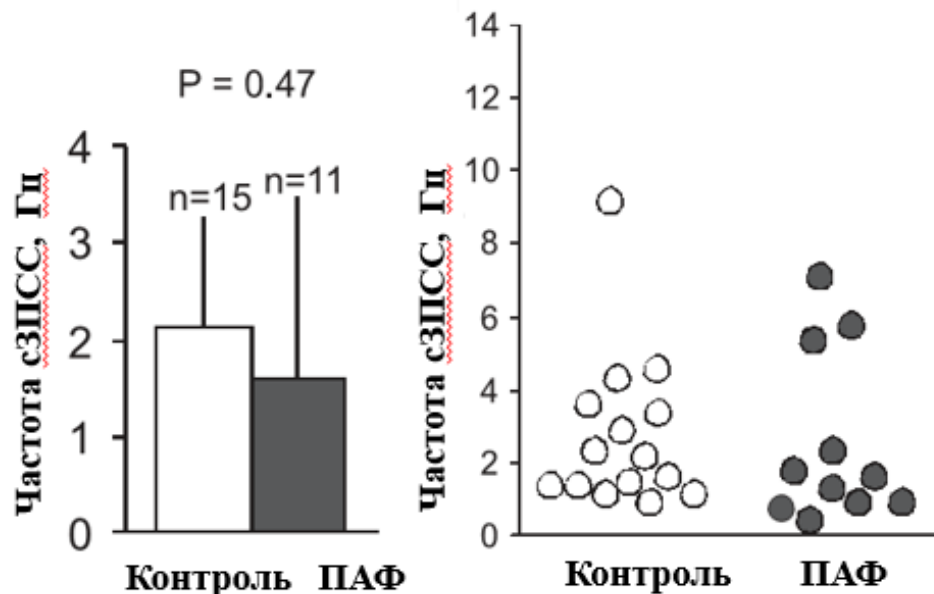


Рисунок 3.14. Розраховані по вибіркам клітин медіанні (зліва) та індивідуальні (справа) значення частот сЗПСС в тонічних нейронах у фізіологічних умовах та в умовах периферичного запалення.

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. 3.14).

Спровоковані периферійним запалення зміни в амплітудних характеристиках спонтанних синаптичних подій також були клітинно специфічними. На відміну від адаптивних, в тонічних нейронах ін'єкція ПАФ призводила до зменшення амплітуд сЗПСС на 13% ($p<0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.13).

3.2.1.4. Зміни мініатюрної збуджуючої синаптичної активності в тонічних нейронах при периферичному запаленні.

Зміни мініатюрної синаптичної активності в тонічних нейронах ПП ДР носили той самий характер, що й для спонтанних ЗПСС, і кардинально відрізнялися від тих змін, які периферичне запалення провокувало в адаптивних нейронах.

Аналіз медіанних інтервалів між мЗПСС, розрахованих по вибіркам подій, показав, невелике його зменшення при периферичному запаленні ($\sim 9\%$, $p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.15). Проте, так само як і для інтервалів сЗПСС, аналіз по вибіркам клітин не підтвердив побідні зміни, оскільки середні частоти не змінювалися ($2,1 \pm 0,7$ Гц, $n=6$ в контрольних умовах та $2,1 \pm 0,8$ Гц, $n=6$ через 1 добу після ін'єкції ПАФ, $p > 0,9$ непарний t-тест Стьюдента).

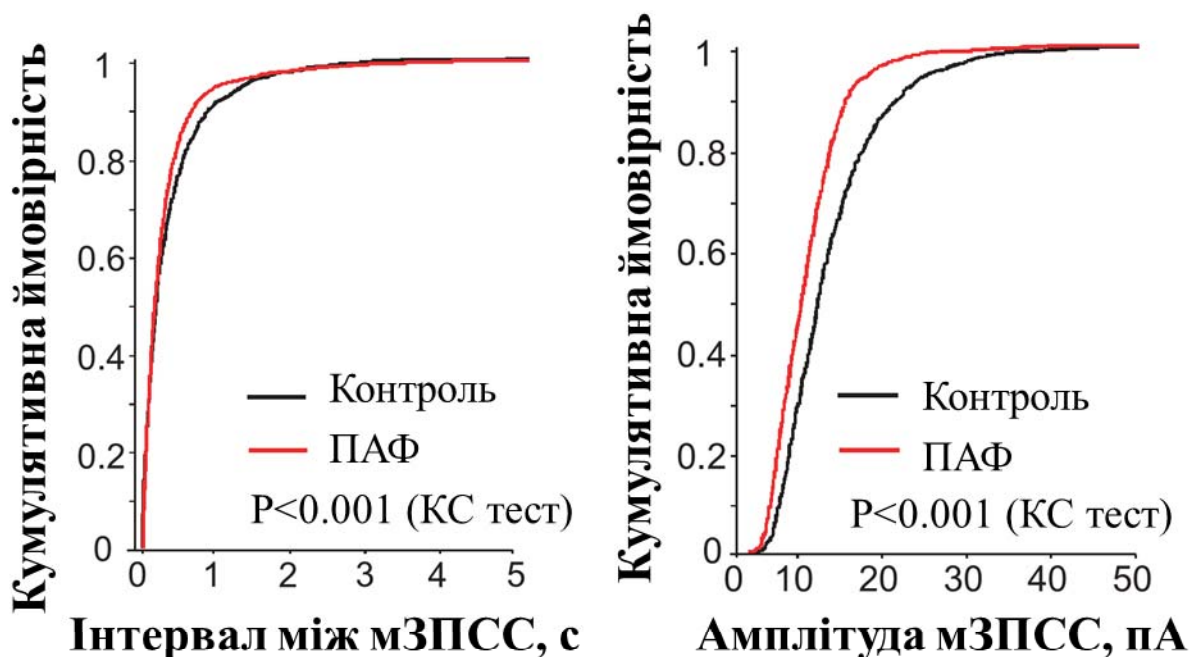


Рисунок 3.15. Графіки кумулятивних ймовірностей інтервалів та амплітуд мЗПСС в тонічних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та в умовах периферичного запалення.

В тонічних нейронах медіанні амплітуди мЗПСС, розраховані по вибіркам подій, достовірно зменшувалися при хронічному запаленні (~23%, $p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.15), хоча статистична значимість не була доведена аналізом середніх амплітуд, розрахованих по вибіркам клітин ($11,0 \pm 1,5$ пА, $n=6$ в контрольних умовах та $9,6 \pm 1,3$ пА, $n=5$ через 1 добу після ін'єкції ПАФ, $p > 0,5$ непарний t-тест Стьюдента).

Таким чином дослідження частотних та амплітудних характеристик мініатюрної спонтанної активності дає практично ті самі результати, що й аналіз спонтанних ЗПСС, і вказує на викликану периферійним запаленням тенденцію до зниження сили збуджуючих синаптичних входів в переважно гальмівних тонічних нейронах.

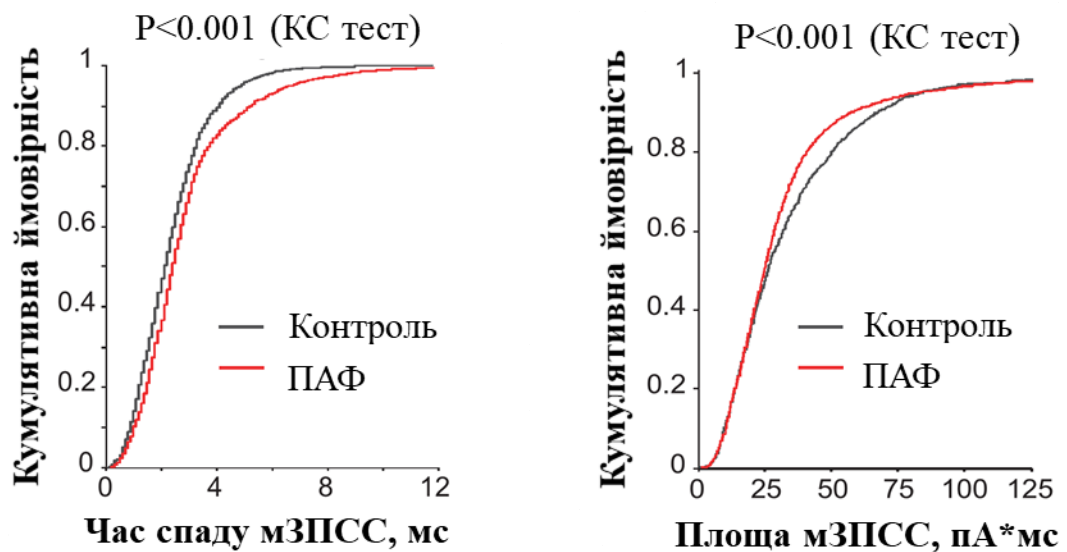


Рисунок 3.16. Графіки кумулятивних ймовірностей часу спаду та площі мЗПСС в тонічних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та в умовах периферичного запалення.

Периферичне запалення викликало зміни кінетичних характеристик мініатюрних АМРА-рецептор-опосередкованих постсинаптичних струмів.

Медіанне значення часу спаду мЗПСС, розраховане по вибіркам подій, збільшувалося на 23% у порівнянні з фізіологічними умовами ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.16). Незважаючи на подовження кінетики, загальний струм, що викликався мініатюрними подіями зменшувався, що виражалося у зменшенні площі мЗПСС ($\sim 7\%$, $p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.16).

Проте такі зміни заряду, що протікає через мембрану під час мЗПСС, скоріше за все пов'язані з тенденцією до зменшення амплітуд мініатюрних подій.

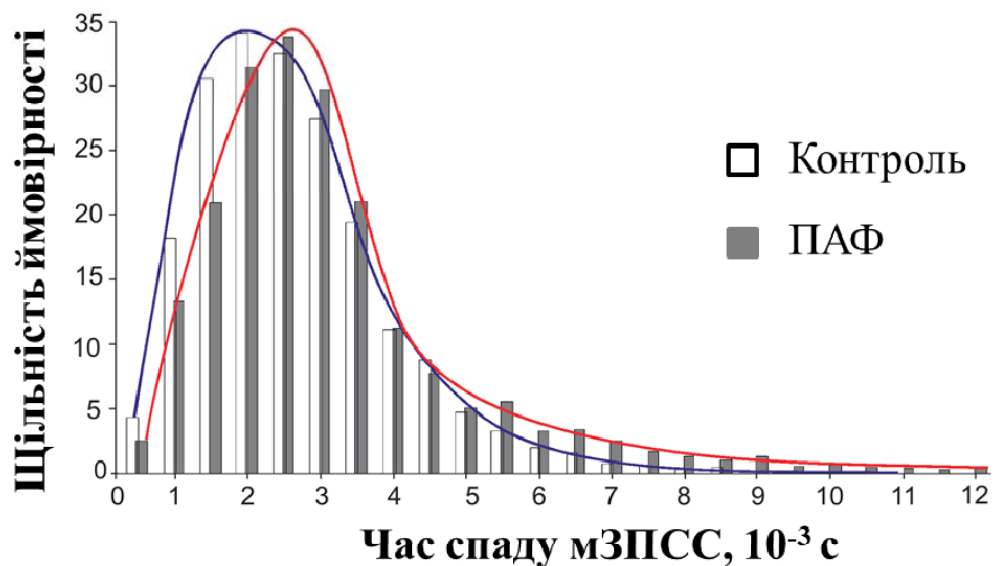


Рисунок 3.17. Розподіли часів спаду мЗПСС у контрольних умовах та при периферичному запаленні в тонічних нейронах ПП ДР.

Аналіз щільностей ймовірності часу спаду мЗПСС підтвердив подовження кінетики, проте на відміну від адаптивних нейронів, форма розподілу зберігалася, а сама функція щільності ймовірності зміщувалася вправо в сторону довших значень часу спаду мЗПСС (Рис. 3.17).

Отже, периферичне запалення призводить до клітиноспецифічних змін збуджуючої синаптичної передачі в ПП ДР. В переважно збуджуючих

адаптивних нейронах як ПД-залежне, так і ПД-незалежне синаптичне збудження значно посилюється, що видно з аналізу частотних та амплітудних характеристик спонтанних та мініатюрних ЗПСС, відповідно. Результати досліджень переважно гальмівних тонічних нейронів демонструють принципово інакші результати: синаптичне збудження змінюється слабо і навіть має тенденцію до зменшення.

Механізми, що відповідають за зміни збуджуючої активності в мережі ПП ДР, також проявляють клітиноспецифічність. Якщо в адаптивних нейронах синаптичне збудження посилюється, ймовірно, завдяки вбудовуванню додаткових кальційнепроникних AMPA-рецепторів в синапси, то відмінності в профілі розподілу мЗПСС за часом спаду в тонічних нейронах наштовхують на гіпотезу про принципово інакші зміни у трафікінгу AMPA-рецепторів.

3.2.2. Зміни гальмівної синаптичної передачі та балансу збудження гальмування в мережі ПП ДР при периферичному запаленні.

Клітиноспецифічність впливу периферичного запалення була також характерна і для гальмівної синаптичної передачі (Рис. 3.18), однак вона була різноспрямованою в порівнянні зі змінами у синаптичному збудженні.

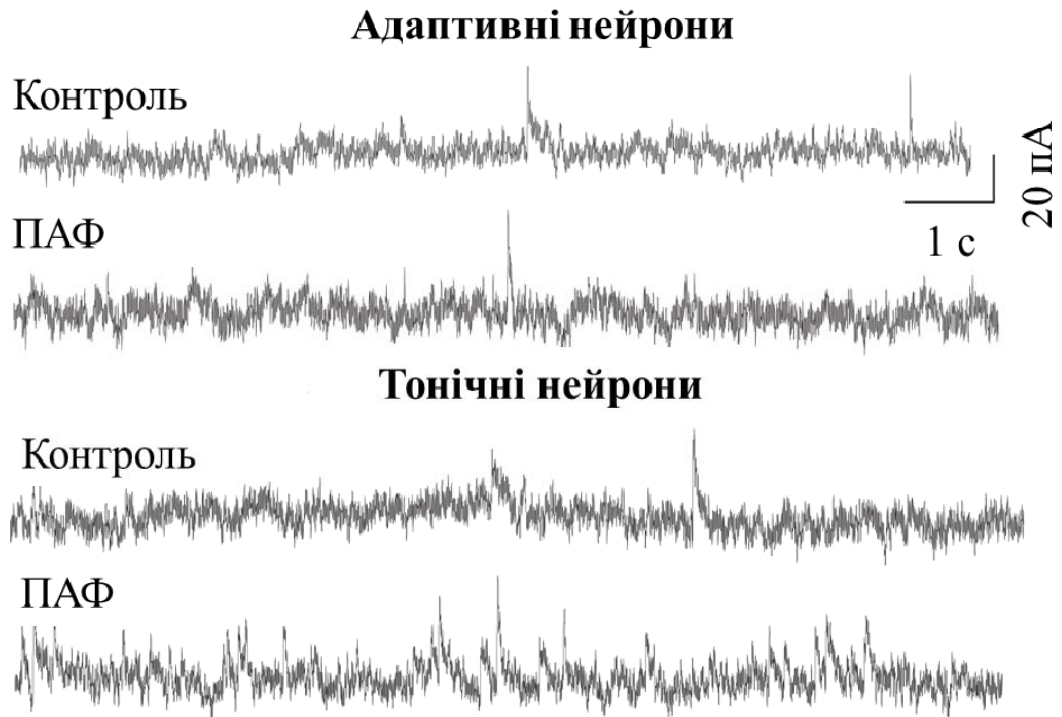


Рисунок 3.18. Приклади спонтанних гальмівних постсинаптичних струмів в тонічних та адаптивних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах і через 1 добу після ін'єкції ПАФ.

3.2.2.1. Зміни спонтанної гальмівної синаптичної активності в адаптивних нейронах при периферичному запаленні.

В адаптивних нейронах периферичне запалення збільшувало розрахований за вибіркою подій медіанний інтервал між спонтанними ГПСС на 22% ($p < 0,05$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.19).

Проте розрахунки, проведені по вибіркам клітин, не виявили жодних змін медіанної частоти сГПСС, що дорівнювала 0,06 Гц як в фізіологічних умовах ($n=15$), так і при хронічному запаленні ($n=15$, $p=0,91$, тест Манна-Вітні).

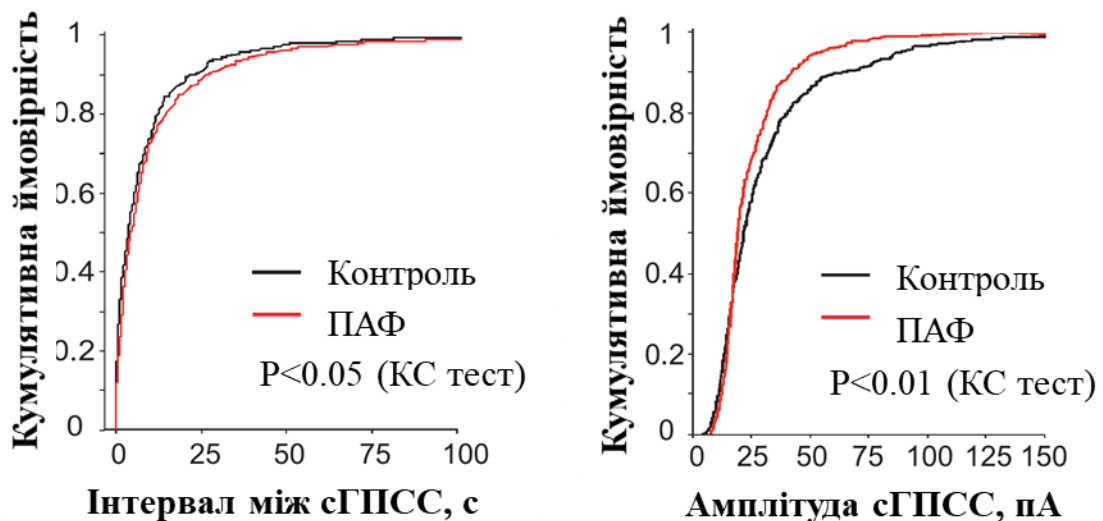


Рисунок 3.19. Графіки кумулятивні ймовірностей інтервалів та амплітуд сГПСС в адаптивних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та в умовах периферичного запалення.

Статистичний аналіз показав достовірне зменшення медіанної величини амплітуд сГПСС після ін'єкції ПАФ на 21% при розрахунках по вибірці подій ($p < 0,05$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.19) та тенденцію до їх зменшення ($\sim 15\%$) при розрахунках по вибірці клітин: 22,6 пА ($n=15$) у контролі та 19,6 пА ($n=17$) через 1 добу після ПАФ ($p=0,39$, тест Манна-Вітні).

Разом, підрахунки частотних та амплітудних характеристик спонтанних гальмівних подій свідчать про спровоковане периферичним запаленням зниження синаптичного гальмування, яке отримують адаптивні нейрони в мережі ПП ДР.

3.2.2.2. Зміни спонтанної гальмівної синаптичної активності в тонічних нейронах при периферичному запаленні.

В тонічних нейронах периферичне запалення на відміну від адаптивних навпаки зменшувало розрахований за вибіркою подій

медіанний інтервал між спонтанними ГПСС на 59% ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.20), що свідчило про збільшення частоти сГПСС медіанне значення якої, розраховане по вибірці клітин, суттєво зросло (~433%), але статистично достовірно не відрізнялося від контрольного ($p = 0,12$, тест Манна-Вітні).

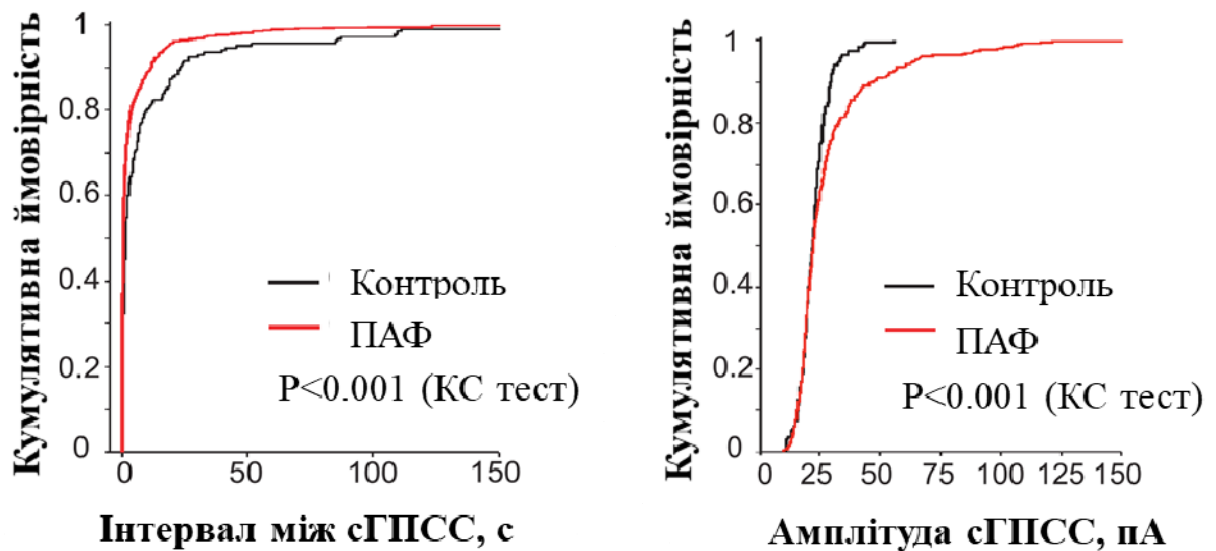


Рисунок 3.20. Графіки кумулятивних ймовірностей інтервалів та амплітуд сГПСС та амплітуд сГПСС в тонічних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та в умовах периферичного запалення.

Медіанна амплітуда сГПСС, розрахована по вибірці подій, збільшувалася на 28% після індукування запалення ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.20). Розрахунок за вибіркою клітин також показав збільшення медіанної амплітуди (~37%), але статистична достовірність відмінності від контрольного значення не була досягнута ($p = 0,057$, тест Манна-Вітні).

Таким чином периферичне запалення збільшує синаптичне гальмування тонічних нейронів ПП ДР.

3.2.2.3. Зміни балансу збудження та гальмування в нейронах ПП ДР.

Баланс збудження та гальмування, виражений відношенням частот сЗПСС та сГПСС також був клітинно специфічним (Рис. 3.21).

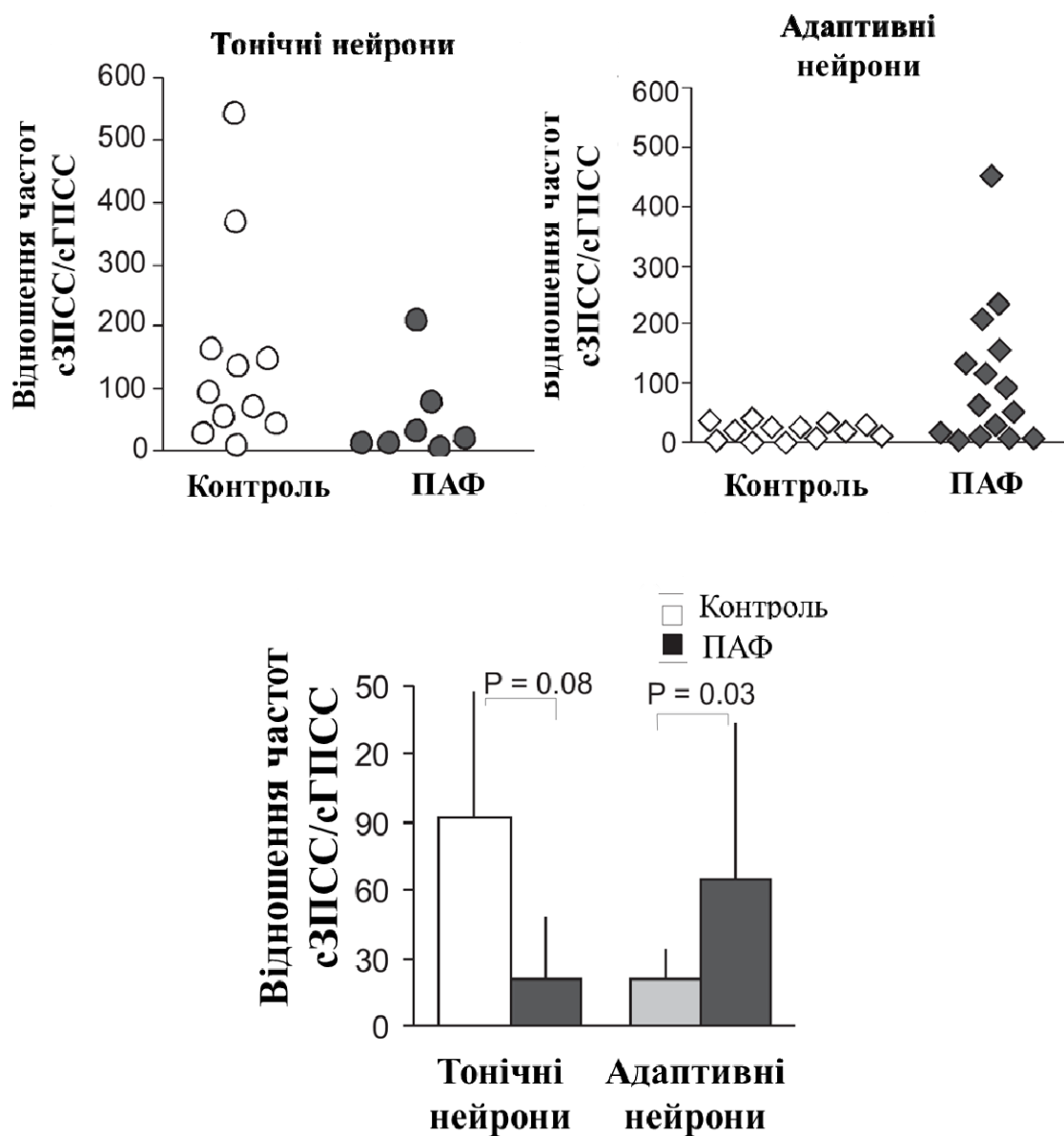


Рисунок 3.21. Індивідуальні (зверху) та медіанні значення відношення частоти сЗПСС до сГПСС в контрольних умовах та в умовах хронічного периферичного запалення в адаптивних та тонічних нейронах ПП ДР.

В адаптивних нейронах медіанна величина дорівнювала 21 ($n=13$) в контролі та збільшувалася до 65 ($n=15$, $p<0,05$, тест Манна-Вітні) при запаленні, в той час як в тонічних нейронах проявлялася тенденція до зменшення відношення частот збуджуючих та гальмівних подій: 92 в фізіологічних умовах ($n=11$) та 21 при запаленні ($n=7$, $p=0,085$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.21).

Таким чином, в адаптивних нейронах ПП ДР периферичне запалення підвищувало амплітудні та частотні характеристики синаптичного збудження, слабо впливаючи або навіть зменшуючи відповідні характеристики гальмування. В тонічних нейронах ситуація була діаметрально протилежною. В результаті відбувалося одночасне зміщення балансу у бік збудження в переважно збуджуючих адаптивних нейронах та в бік гальмування в переважно гальмівних тонічних нейронах. Синергічність вищеназваних змін і призводила до гіперзбудливості ноцицептивних мереж спинного мозку та розвитку хронічного больового синдрому.

Результати даного розділу опубліковані у статті (Korach et al., 2015).

3.3. Зміни мережевої синаптичної активності в нейронах поверхневих пластин дорсального рогу при травмі спинного мозку.

Враховуючи, що центральна сенситизація та гіперзбудливість поверхневих пластин дорсального рогу лежить в основі будь-якого хронічного больового синдрому незалежно від генезу, не дивно, що зміни синаптичного збудження та гальмування, викликані травмою спинного мозку, принципово не відрізнялися від викликаних периферійним запаленням. Їм також була характерна клітиноспецифічність та

різноспрямованість як змін балансу синаптичного збудження та гальмування, так і механізмів, які їх опосередковують.

3.3.1. Зміни збуджуючої синаптичної передачі в мережі ПП ДР при травмі спинного мозку.

3.3.1.1. Зміни спонтанної збуджуючої синаптичної активності в адаптивних нейронах при травмі спинного мозку.

TSM викликало значне збільшення, як частоти, так і амплітуди спонтанних збуджуючих постсинаптичних струмів (Рис. 3.22).

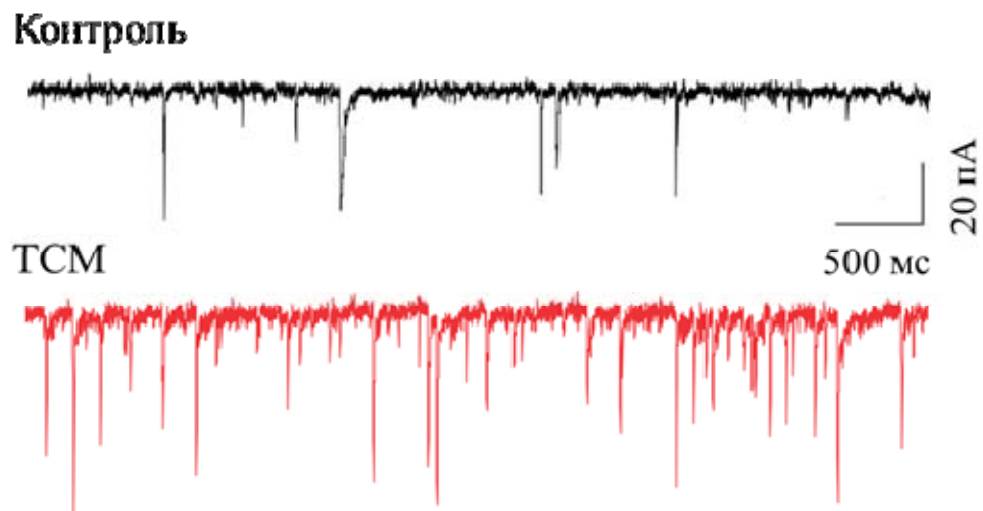


Рисунок 3.22. Приклади сЗПСС в адаптивних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та після травми спинного мозку.

Інтервал між сЗПСС, розрахований по вибірці подій, зменшувався в ~ 3 рази ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.23А), що свідчило про значне збільшення частоти, медіанні значення якої, розраховані по вибіркам клітин дорівнювали 0,83 Гц в контролі та 7,6 Гц при TSM ($p < 0,01$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.23Б).

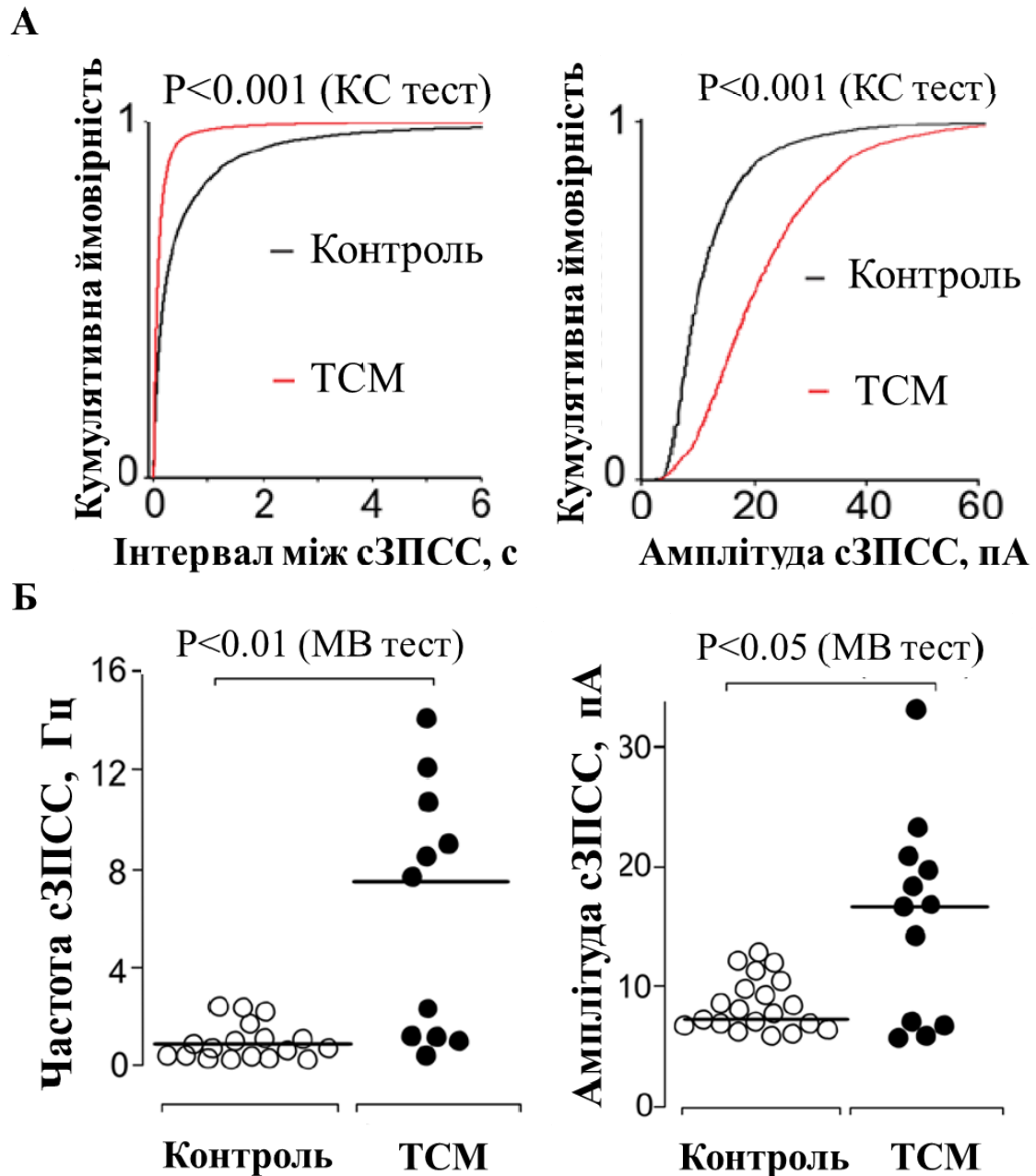


Рисунок 3.23. Графіки кумулятивних ймовірностей інтервалів та амплітуд сЗПСС (А) та індивідуальні значення (Б) частот та амплітуд сЗПСС в контрольних умовах та при ТСМ в адаптивних нейронах ПП ДР.

Медіанні значення амплітуд сЗПСС, як розраховані по вибірці подій ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.23А), так і розраховані по вибірці клітин, суттєво зростали (7,2 пА в контрольних умовах та 16,6 пА після ТСМ, $p < 0,05$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.23Б).

Зміни частот та амплітуд спонтанної збуджуючої активності в адаптивних нейронах ПП ДР при ТСМ були скорельваними: 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.3.24), що може свідчити на користь залежної від активності ап-регуляції глутаматних рецепторів в синапсах адаптивних нейронів

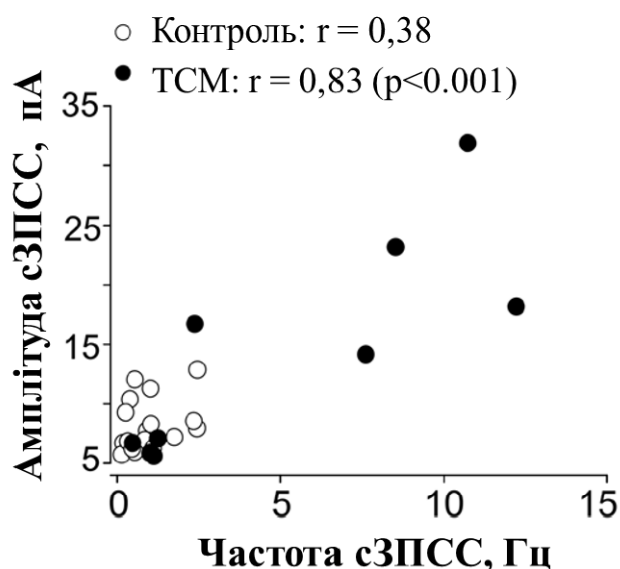


Рисунок 3.24. Кореляція між значеннями частот та амплітуд сЗПСС у контрольних умовах та при ТСМ в адаптивних нейронах ПП ДР.

3.3.1.2. *Зміни мініатюрної збуджуючої синаптичної активності в адаптивних нейронах при травмі спинного мозку.*

Травма спинного мозку змінювала частотні, амплітудні та кінетичні характеристики мЗПСС в адаптивних нейронах, при чому характер цих змін співпадав зі спровокованою ТСМ варіацією в параметрах спонтанних ЗПСС і виражався у збільшенні синаптичного збудження (Рис. 3.25).

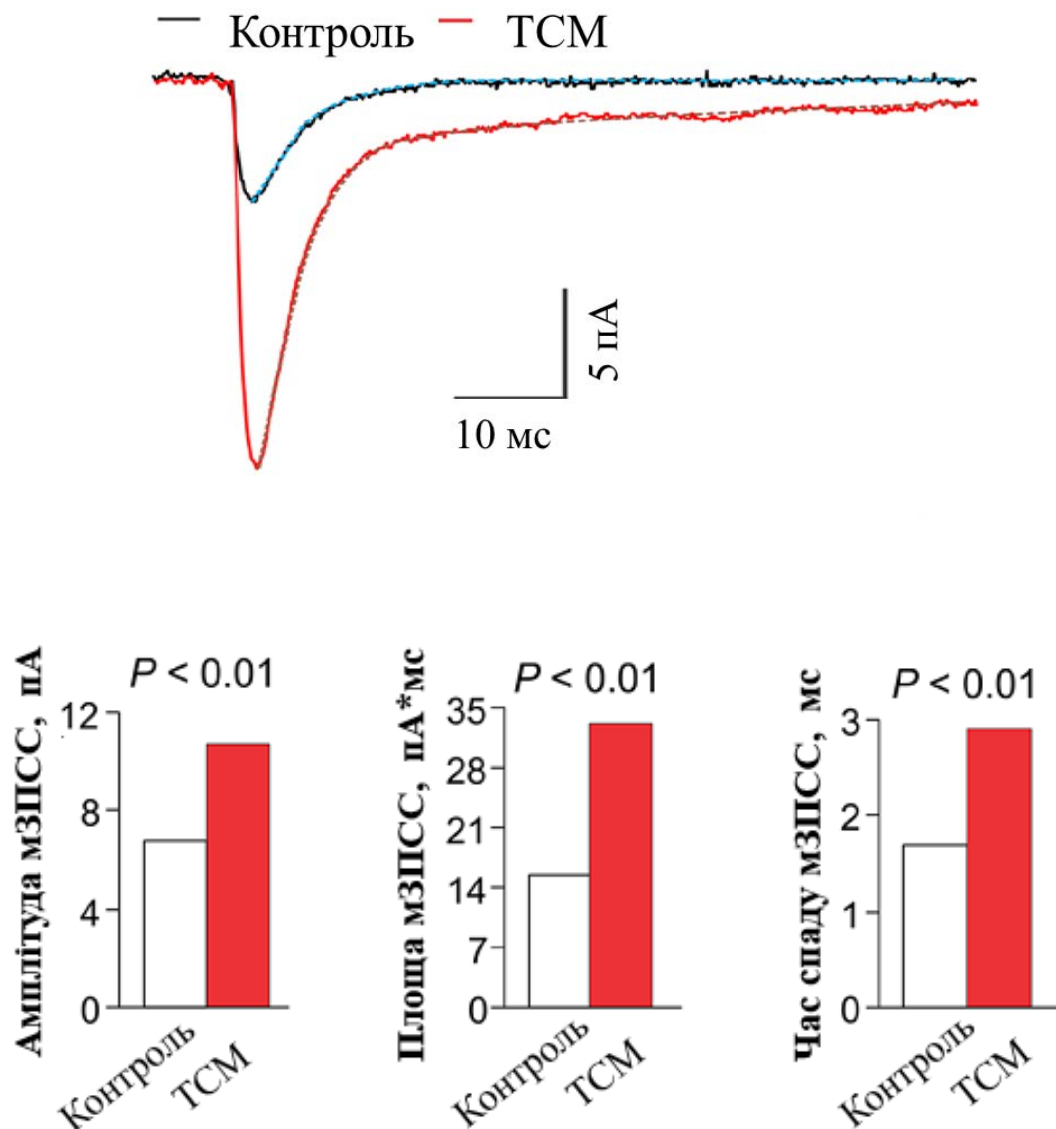


Рисунок 3.25. Зверху: усереднені мініатюрні АМРА-опосередковані ЗПСС в адаптивних нейронах у фізіологічних умовах та після ТМС. Знизу: Розраховані по вибіркам клітин медіанні значення амплітуди, площі та часу спаду мЗПСС в адаптивних нейронах у фізіологічних умовах та після ТМС.

Медіанна амплітуда мЗПСС, розрахована по вибіркам клітин, зростала при ТМС на ~60% ($p < 0,01$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.25). Медіанна площа мЗПСС, розрахована по вибіркам клітин, збільшувалася при ТМС на

~113% ($p < 0,01$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.25). Медіанна величина часу спаду мЗПСС, розрахована по вибіркам клітин, збільшувалася при ТМС на ~71% ($p < 0,01$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.25).

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 довших значень кінетики АМРА-рецептор-опосередкованих мініатюрних подій ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.26).

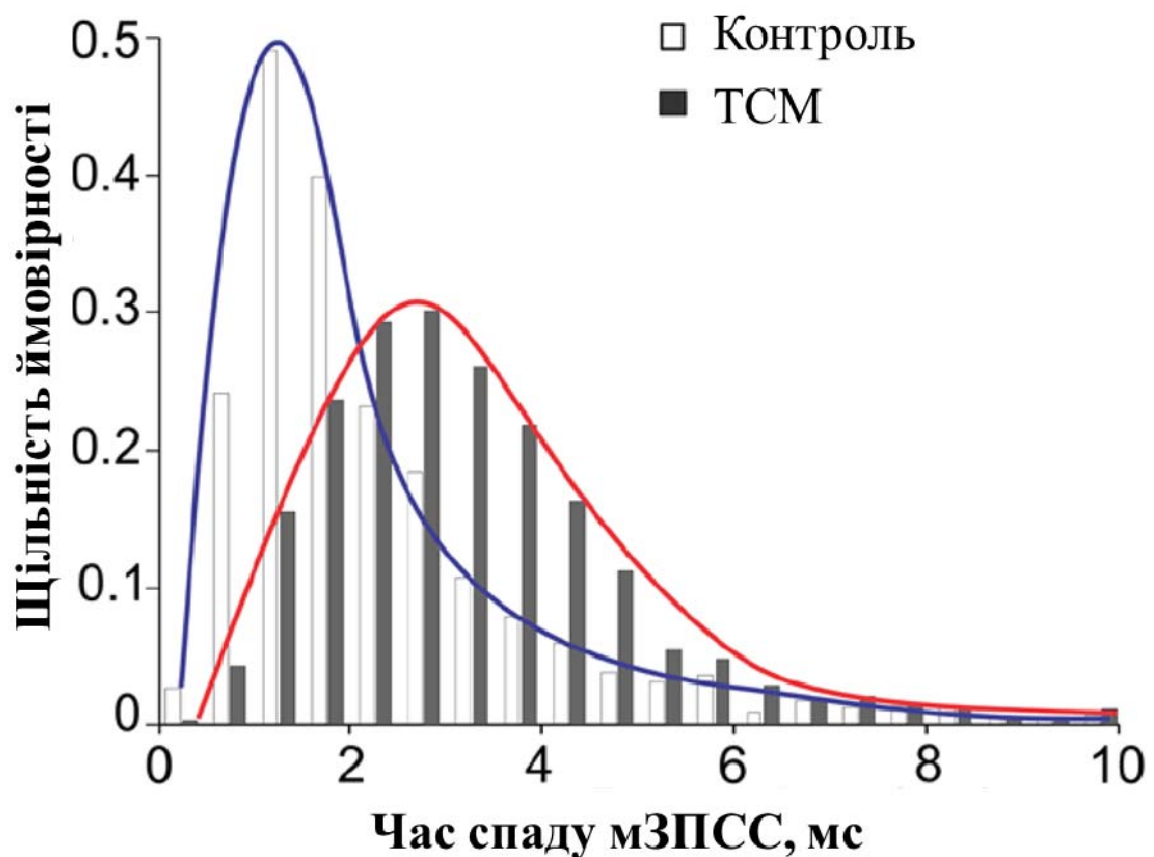


Рисунок 3.26. Розподіли часів спаду мЗПСС у контрольних умовах та при периферичному запаленні в адаптивних нейронах ПП ДР.

Подовження кінетики спаду мЗПСС давало змогу гіпотезувати, 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 нестаціонарним флуктуаційним аналізом АМРА-опосередкованих мЗПСС, який показав достовірно зменшену провідність цих постсинаптичних каналів (19.9 пСм в контрольних умовах та 6,1 пСм при ТСМ, Рис. 3.27), характерну саме для GluA2-вмісних кальційнепроникних АМРА-рецепторів.

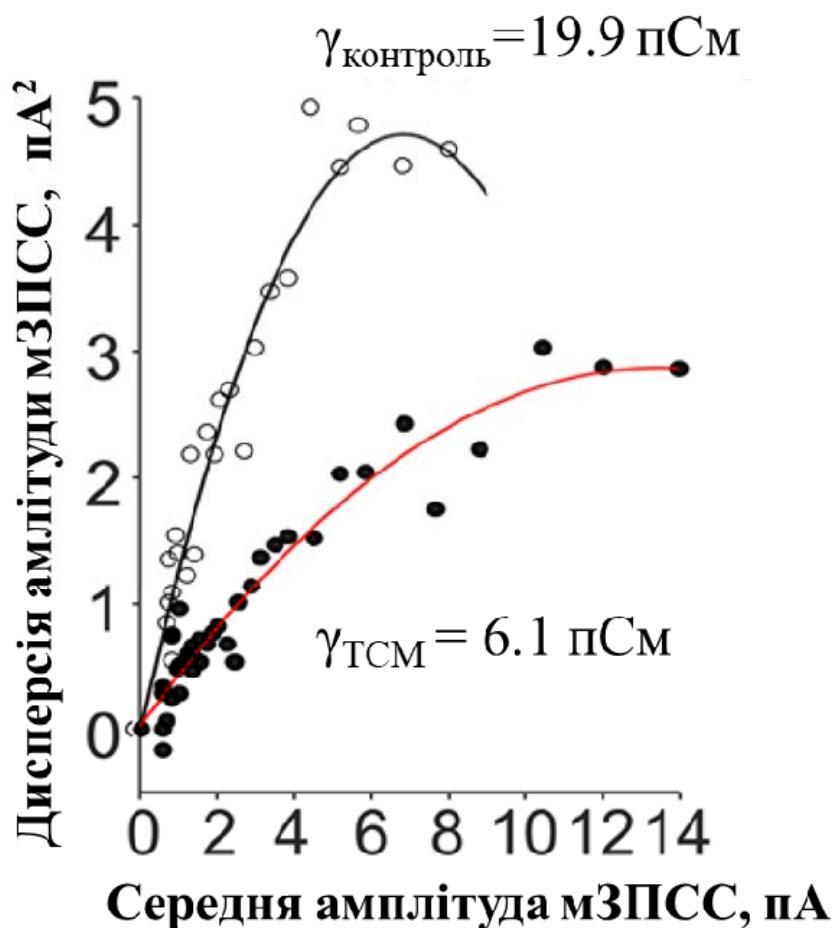


Рисунок 3.27. Провідності одиночних синаптичних АМРА-каналів, розраховані з використанням нестаціонарного флуктуаційного аналізу шуму, в адаптивних нейронах ПП ДР у контролі та після ТСМ.

3.3.1.3. Зміни спонтанної збуджуючої синаптичної активності в тонічних нейронах при травмі спинного мозку.

На відміну від адаптивних нейронів ТСМ викликала зменшення синаптичного збудження переважно гальмівних тонічних нейронів (Рис. 3.28).

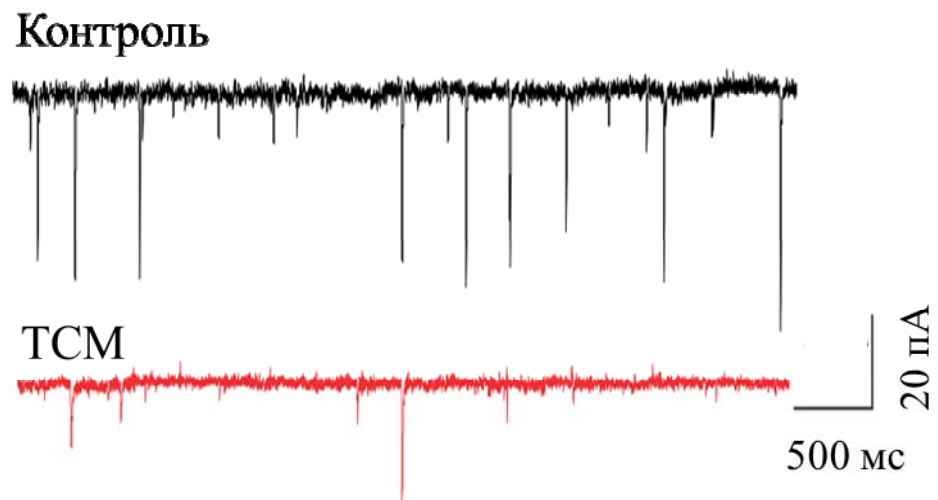


Рисунок 3.28. Приклади сЗПСС в тонічних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та після травми спинного мозку.

Інтервал між сЗПСС, розрахований по вибірці подій, збільшувався на 49% ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.29), що свідчило про зменшення частоти сЗПСС.

Медіанні значення амплітуд сЗПСС, як розраховані по вибірці подій ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.29), так і розраховані по вибірці клітин, зменшувалися ($\sim 20\%$, $p < 0,05$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.29).

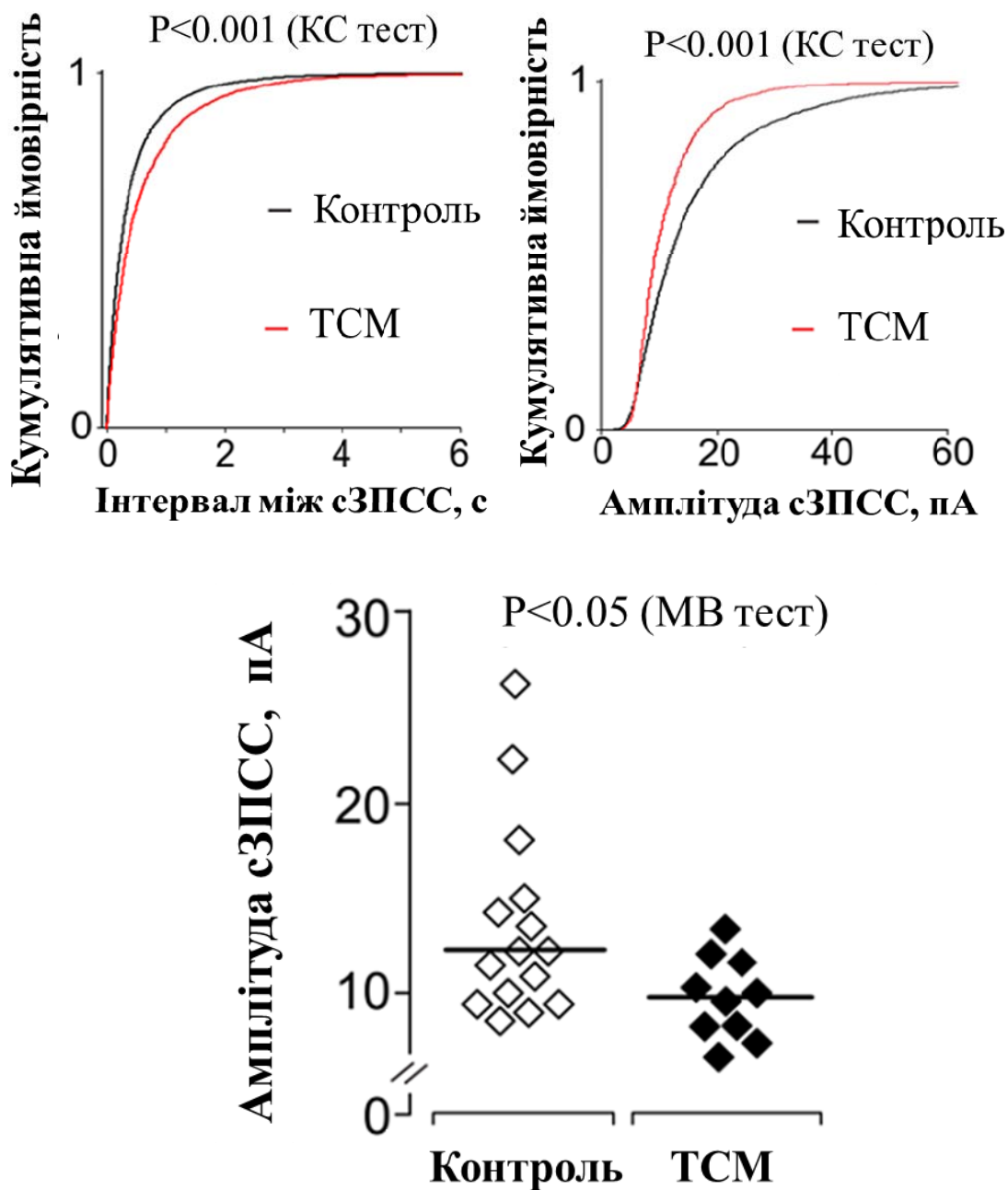


Рисунок 3.29. Зверху: Графіки кумулятивних ймовірностей інтервалів та амплітуд сЗПСС в тонічних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та в умовах ТСМ. Знизу: індивідуальні значення амплітуд сЗПСС в контрольних умовах та при ТСМ у тонічних нейронах ПП ДР.

Отже, ТСМ, так само як і периферичне запалення, зменшувала синаптичне збудження в переважно гальмівних тонічних нейронах, що,

ймовірно, впливало на їх здатність підтримувати належний гальмівний тонус у мережі ПП ДР і призводило до розгальмування останньої, ще більше посилюючи гіперзбудливість, викликану зростанням синаптичного збудження переважно збуджуючих адаптивних нейронів.

3.3.1.4. Зміни мініатюрної збуджуючої синаптичної активності в адаптивних нейронах при травмі спинного мозку.

Характер змін мініатюрної синаптичної активності в тонічних нейронах співпадав зі змінами спонтанних ЗПСС та здебільшого не відрізнявся між ТСМ та хронічним запаленням.

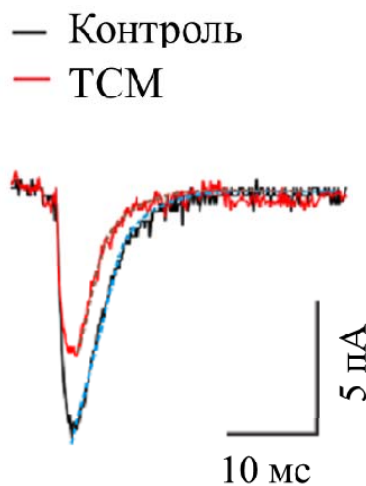


Рисунок 3.30. Усереднені мініютюрні АМРА-рецептор-опосередковані ЗПСС в тонічних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та після ТСМ.

Амплітуда мЗПСС зменшувалася після ТСМ, що було видно як з графіків усереднених постсинаптичних струмів (Рис. 3.30), так і з аналізу медіанних величин амплітуд по вибіркам клітин (зменшення на 32%, $p < 0,01$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.31).

Медіанна площа мЗПСС, розрахована по вибіркам клітин, збільшувалася при ТМС на ~26% ($p < 0,01$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.46), при чому ці зміни швидше за все були пов'язані зі зменшенням амплітуд мЗПСС, оскільки медіанна величина часу спаду мЗПСС, розрахована по вибіркам клітин, при ТМС проявляла тенденцію до збільшення (~9%, $p < 0,01$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.31).

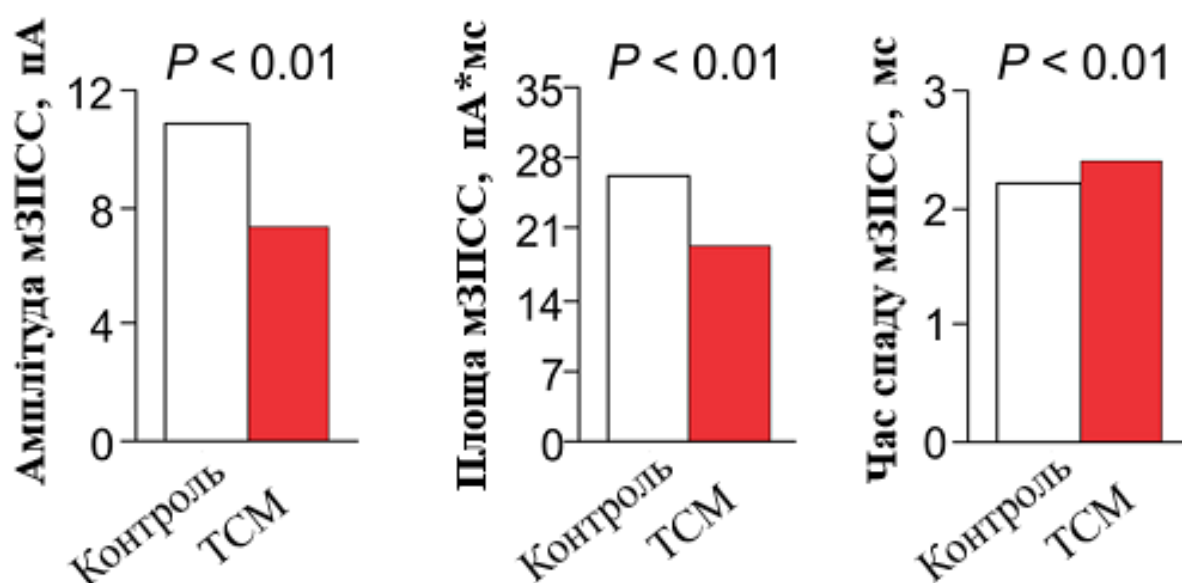


Рисунок 3.31. Розраховані по вибіркам клітин медіанні значення амплітуди, площі та часу спаду мЗПСС в тонічних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та після ТМС.

Зміни частот та амплітуд мЗПСС вказують на те, що при ТМС як пре-, так і постсинаптичні механізми опосередковують зниження збуджуючої синаптичної передачі на переважно гальмівні тонічні нейрони, а, отже, і зменшення гальмування в мережі ПП ДР.

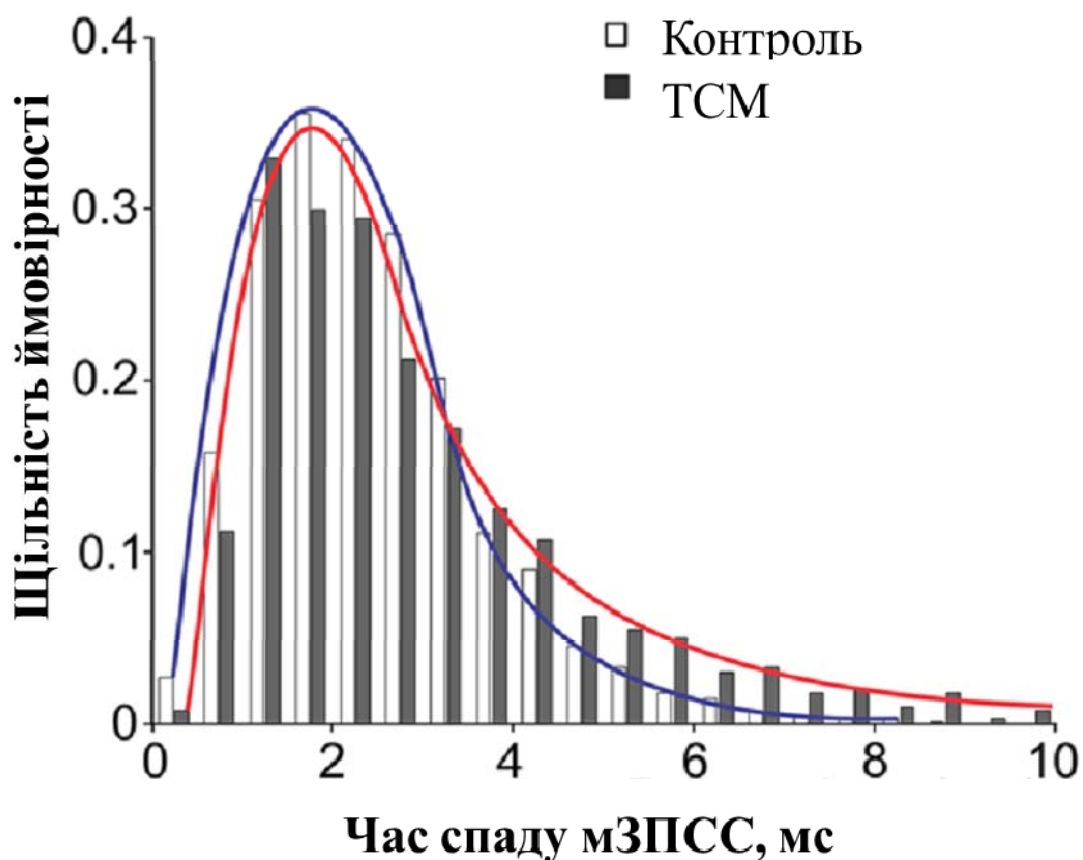


Рисунок 3.32. Розподіл часу спаду мЗПСС в тонічних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та при ТСМ.

Додатковий аналіз щільностей ймовірностей показав, що розподіл мЗПСС за часом спаду не зазнавав суттєвих змін (Рис. 3.32). Аналіз провідностей постсинаптичних АМРА-рецепторів також не виявив суттєвих відмінностей: в контрольних умовах величина провідності дорівнювала 11,0 пСм, а при ТСМ – 9,1 пСм (Рис. 3.33). Враховуючи ці факти, а також зниження амплітуди мЗПСС, логічно було б припустити ТСМ-опосередковане зменшення кількості постсинаптичних АМРА-рецепторів в тонічних нейронах, тобто зміни трафікінгу, пов'язані з підвищеною інтерналізацією рецепторів.

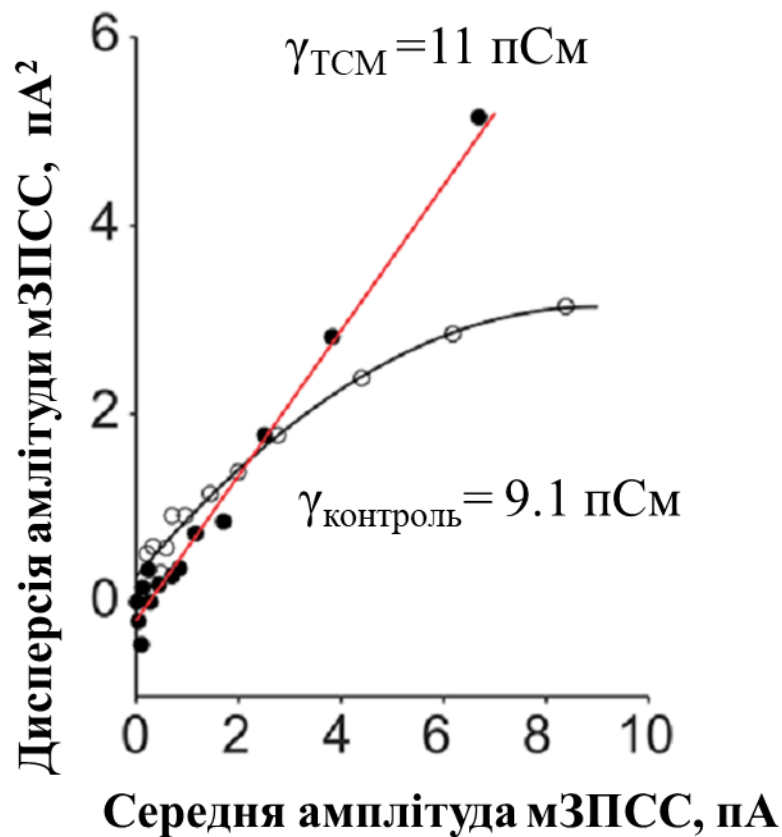


Рисунок 3.33 Провідності одиночних синаптичних АМРА-каналів, розраховані з використанням нестационарного флуктуаційного аналізу шуму, в тонічних нейронах ПП ДР у контролі та після ТСМ.

Таким чином, зміни синаптичного збудження, викликані травмою спинного мозку синергічно впливають на виникнення гіперзбудливості мережі ПП ДР: синаптична збуджуюча передача збільшується в переважно збуджуючих адаптивних нейронах та одночасно зменшується в переважно гальмівних тонічних нейронах. В свою чергу відмінності у варіації трафікінгу постсинаптичних АМРА-рецепторів у вищеназваних нейронних популяціях підтверджують не лише клітиноспецифічність самих змін збуджуючої синаптичної, але й клітиноспецифічність механізмів, що опосередковують ці зміни.

3.3.2. Зміни гальмівної синаптичної передачі та балансу збудження гальмування в мережі ПП ДР при травмі спинного мозку.

Клітиноспецифічність була також характерна і для гальмівної синаптичної передачі, однак після ТСМ, як і при периферичному запаленні, вона була різноспрямована в порівнянні зі змінами у синаптичному збудженні.

3.3.2.1. Зміни спонтанної гальмівної синаптичної активності в адаптивних нейронах при травмі спинного мозку.

В адаптивних нейронах ТСМ збільшувала розрахований за вибіркою подій медіанний інтервал між спонтанними ГПСС ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис.3.34А), що свідчило про зміну частоти подій, медіанна величина якої зменшувалася, що було підтверджено аналізом по вибірці клітин (~43% зменшення, $p < 0,001$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.34Б).

Амплітуда сГПСС в адаптивних нейронах також знижувалася. Статистично достовірне зменшення амплітуд було продемонстроване порівнянням як по вибіркам подій ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис.3.34А), так і по вибіркам клітин (~25% зменшення, $p < 0,001$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.34Б).

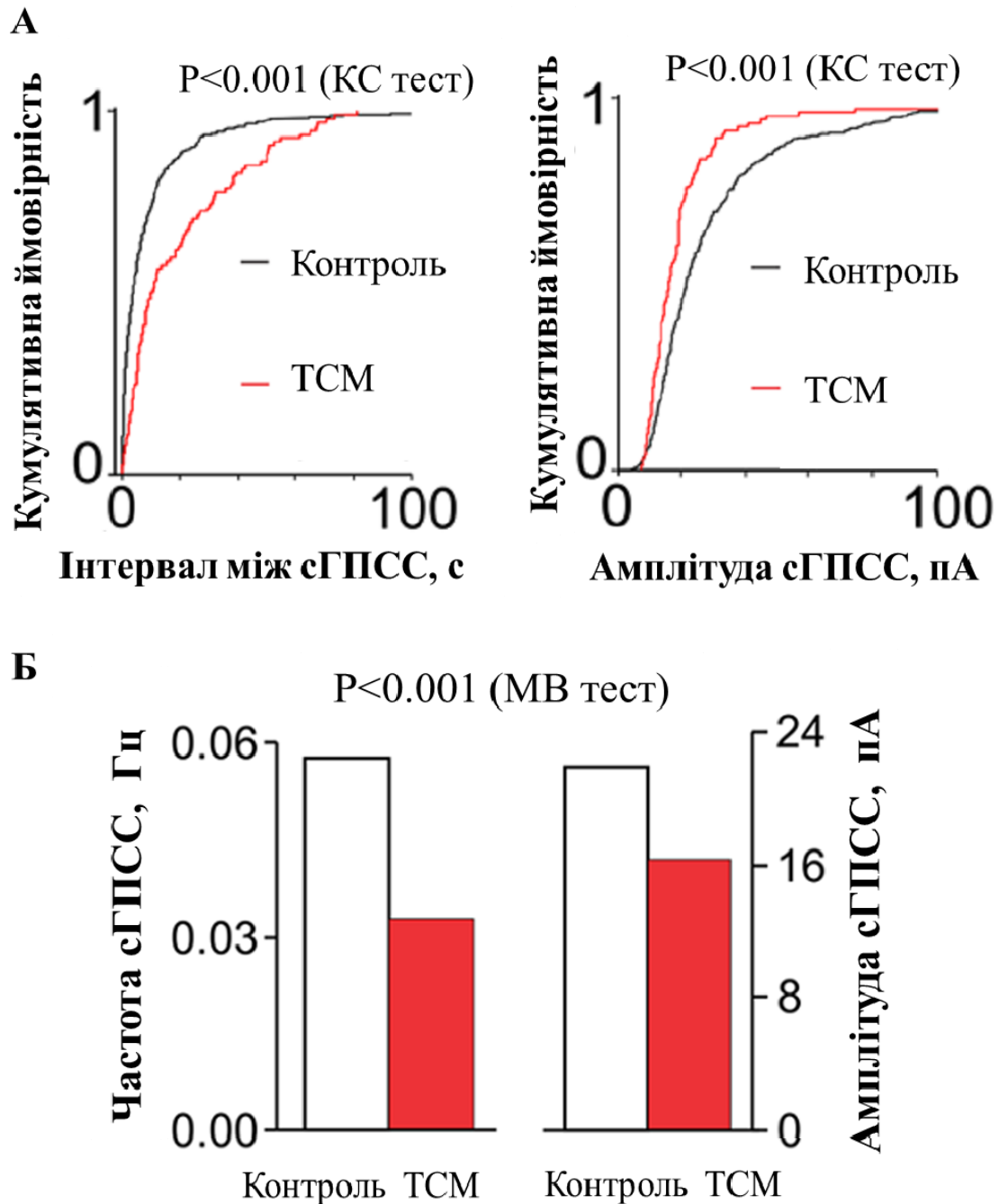


Рисунок 3.34. А. Графіки кумулятивних ймовірностей інтервалів та амплітуд сГПСС в адаптивних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та після TCM. Б. Медіанні значення частот й амплітуд сГПСС в адаптивних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та після TCM.

Спонтанні синаптичні події були також проаналізовані за кінетикою їх спаду. Результати даного аналізу показали, що після TCM зменшення

частоти є приблизно однаковим як для «швидких» (гліцин-опосередкованих), так і для «повільних» (ГАМК-опосередкованих подій), оскільки їх пропорція не відрізнялися (відповідно 77% та 23% в контролі та 78% та 22% при TCM, $p>0.7$, точний тест Фішера, Рис. 3.35).

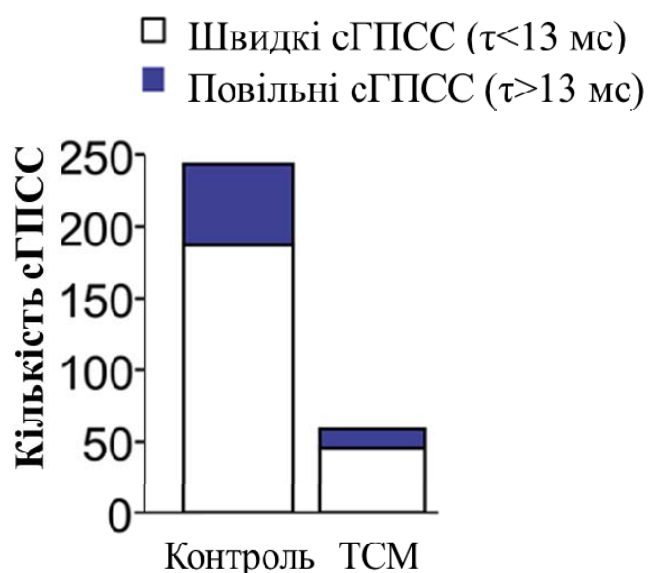


Рисунок 3.35. Розподіл сГПСС за кінетикою спаду в адаптивних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та після TCM.

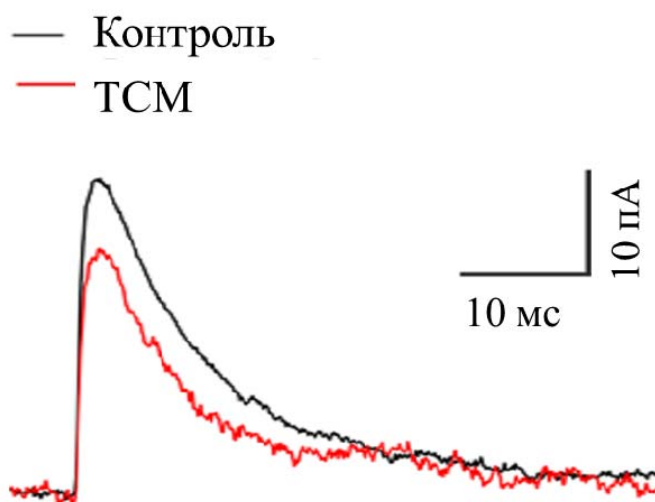


Рисунок 3.36. Усереднені «швидкі» сГПСС в адаптивних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та після TCM.

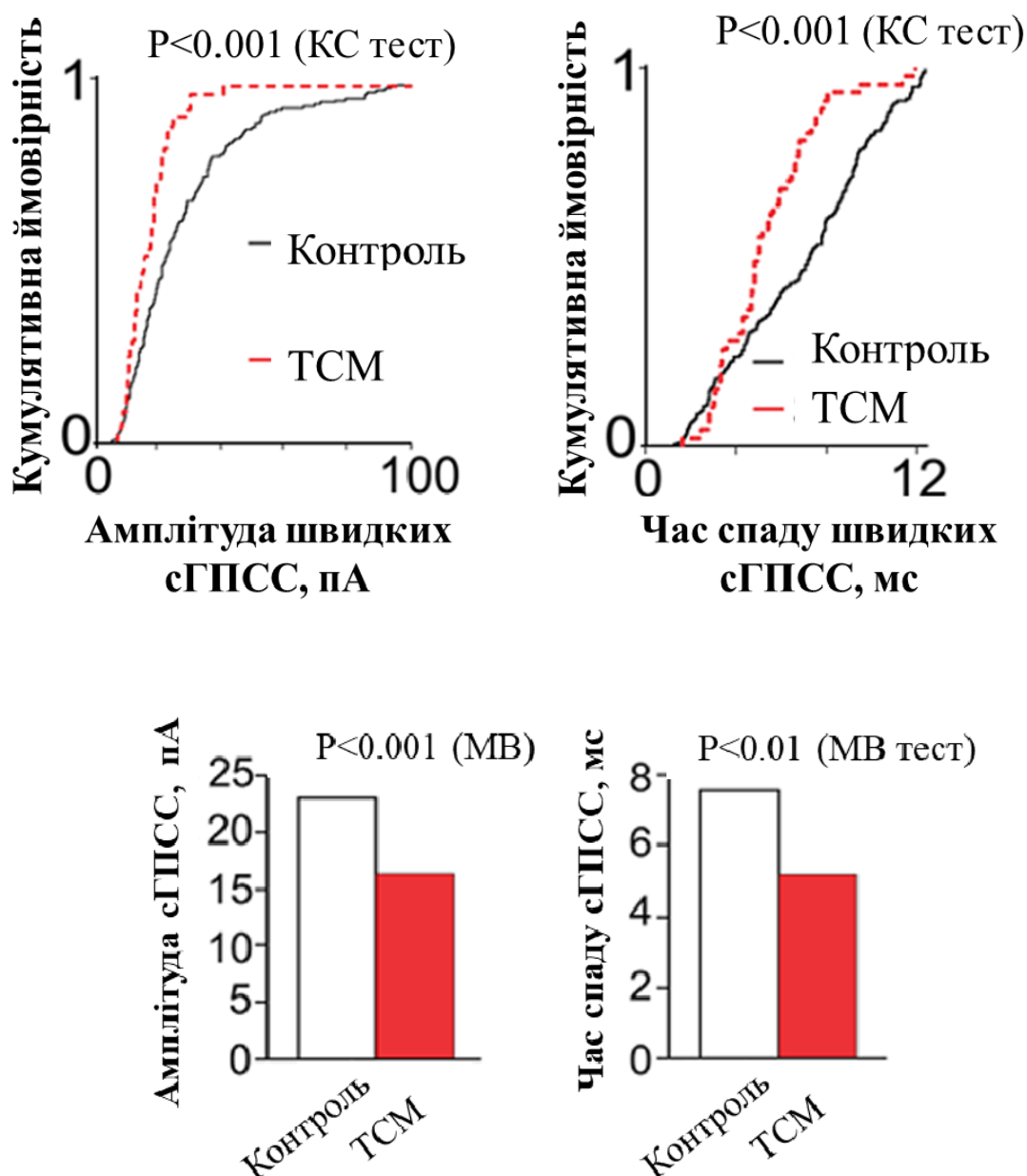


Рисунок 3.37. Зверху: графіки кумулятивних ймовірностей амплітуди та часу спаду швидких сГПСС в адаптивних нейронах ПП ДР в фізіологічних умовах та після ТСМ. Знизу: медіанні значення амплітуди та часу спаду швидких сГПСС в адаптивних нейронах ПП ДР в фізіологічних умовах та після ТСМ.

Розгорнутий аналіз характеристик швидких подій показав зменшення їх амплітуди, що було видно з графіків усереднених швидких сГПСС (Рис.

3.37) та зі статистичних порівнянь по вибіркам подій ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.37) та по вибіркам клітин.

Розрахована по вибірці клітин медіанна амплітуда швидких сГПСС дорівнювала 23 пА в контрольних умовах та зменшувалася до 16 пА після TCM ($p < 0,001$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.37).

ТСМ також змінювала розподіл швидких сГПСС за часом спаду ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.37), який виражався у зменшенні медіанної величини часу спаду сГПСС з 7,6 мс в контрольних умовах до 5,2 мс після ТСМ ($p < 0,01$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.37).

Амплітуди та кінетики спаду швидких сГПСС були скорельованими, причому коефіцієнт кореляції Спірмена достовірно знижувався з 0,6 ($p < 0,01$) в фізіологічних умовах до 0,38 ($p < 0,05$) при ТСМ ($p < 0,01$, Рис. 3.38).

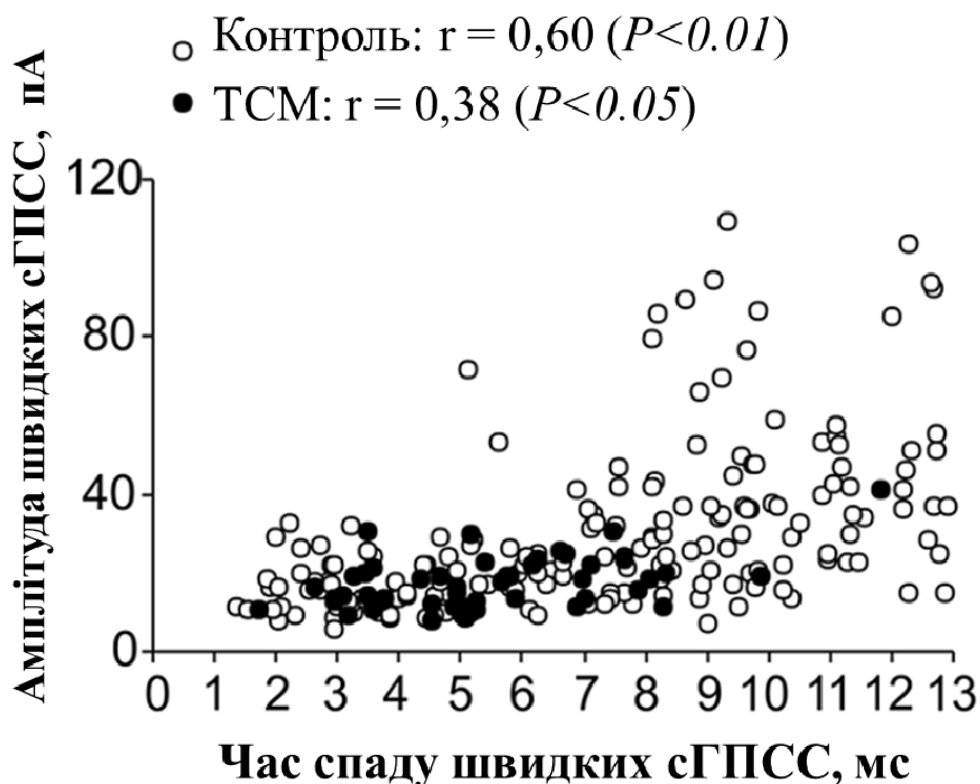


Рисунок 3.38. Кореляція між значеннями часу спаду та амплітуд швидких сГПСС в адаптивних нейронах ПП ДР у контрольних умовах та при ТСМ.

Ці факти, ймовірно, свідчать на користь зміни трафікінгу та зміни субодиничного складу синаптичних гліцинових рецепторів, які опосередковують гальмівні постсинаптичні струми зі швидкою кінетикою.

Таким чином, травма спинного мозку, як і периферичне запалення, провокує зменшення синаптичного гальмування, яке отримують яке отримують переважно збуджуючі адаптивні нейрони в мережі ПП ДР.

3.3.2.2. Зміни спонтанної гальмівної синаптичної активності в тонічних нейронах при травмі спинного мозку.

В тонічних нейронах зміни гальмівної синаптичної активності не були настільки яскраво вираженими, як в адаптивних нейронах, а статистичний аналіз давав суперечливі результати. З одного боку інтервали між сГПСС, проаналізовані по вибіркам подій достовірно відрізнялися ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.39).

Кумулятивні ймовірності амплітуд також значимо розрізнялися ($p < 0,001$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.39).

Проте, аналіз за вибірками клітин не виявив достовірної різниці в медіанних значеннях частоти та амплітуди ($p = 0,8$ та $p = 0,4$ для частоти та амплітуди відповідно, тест Манна-Вітні. Рис. 3.39).

Аналіз кінетик спаду спонтанних гальмівних синаптичних подій показав суттєву відмінності між змінами, які ТСМ спричиняє різних популяціях нейронів ПП ДР.

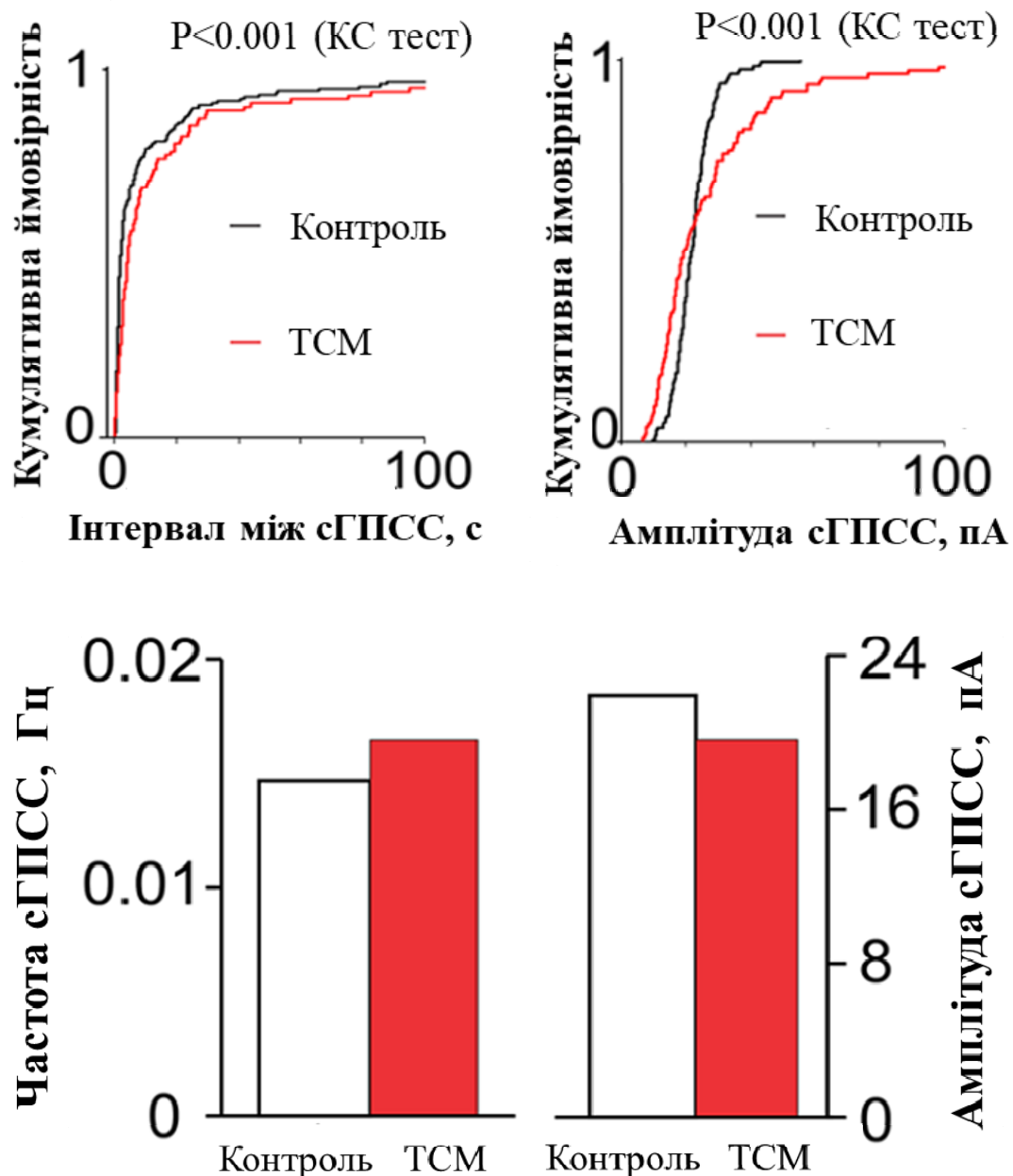


Рисунок 3.39. Зверху: графіки кумулятивних ймовірностей інтервалів та амплітуд сГПСС в тонічних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та після ТСМ. Знизу: медіанні значення частоти та амплітуди сГПСС в тонічних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та після ТСМ.

Як вже було сказано, в тонічних нейронах не було кардинальних змін в частоті сГПСС, проте, на відміну від адаптивних нейронів, був присутній

значний та статистично достовірний ($p < 0,001$, точний тест Фішера) перерозподіл пропорції «швидких» та «повільних» синаптичних подій.

Зі схожих відсоткових часток (42% проти 58%) в контрольних умовах пропорція зміщувалася на користь швидких синаптичних подій (Рис. 3.40), що свідчить про збільшення вкладу гліцин-опосередкованого гальмування.

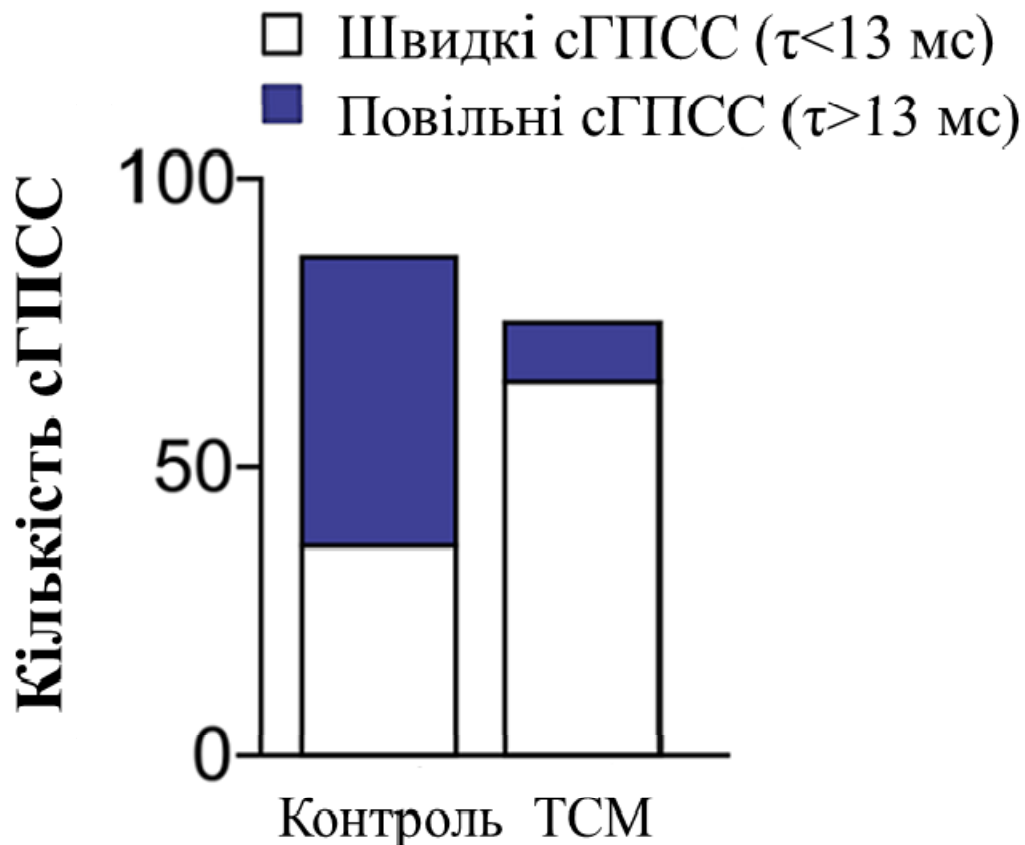


Рисунок 3.40. Розподіл сГПСС за кінетикою спаду в тонічних нейронах ПП ДР в фізіологічних умовах та після ТСМ.

Розгорнутий аналіз характеристик швидких подій показав збільшення їх амплітуди, що було видно з графіків усереднених швидких сГПСС та зі статистичних порівнянь по вибіркам подій ($p < 0,05$, тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 3.41).

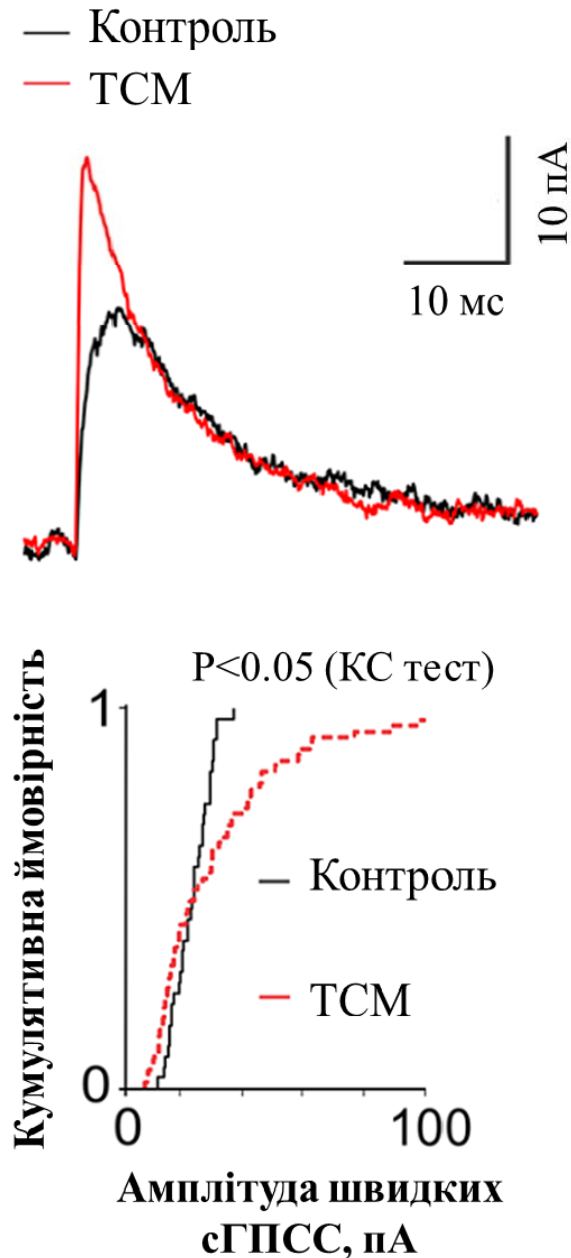


Рисунок 3.41. Зверху: усереднені «швидкі» сГПСС в тонічних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та після ТСМ. Знизу: графіки кумулятивних ймовірностей амплітуд «швидких» сГПСС в тонічних нейронах ПП ДР у фізіологічних умовах та після ТСМ.

При ТСМ час спаду швидких сГПСС та їх амплітуди ставали скорельваними: коефіцієнт кореляції Спірмена дорівнював 0,44 ($p<0,001$), в той час як в контрольних умовах він складав 0,09 ($p=0,6$, Рис. 3.42).

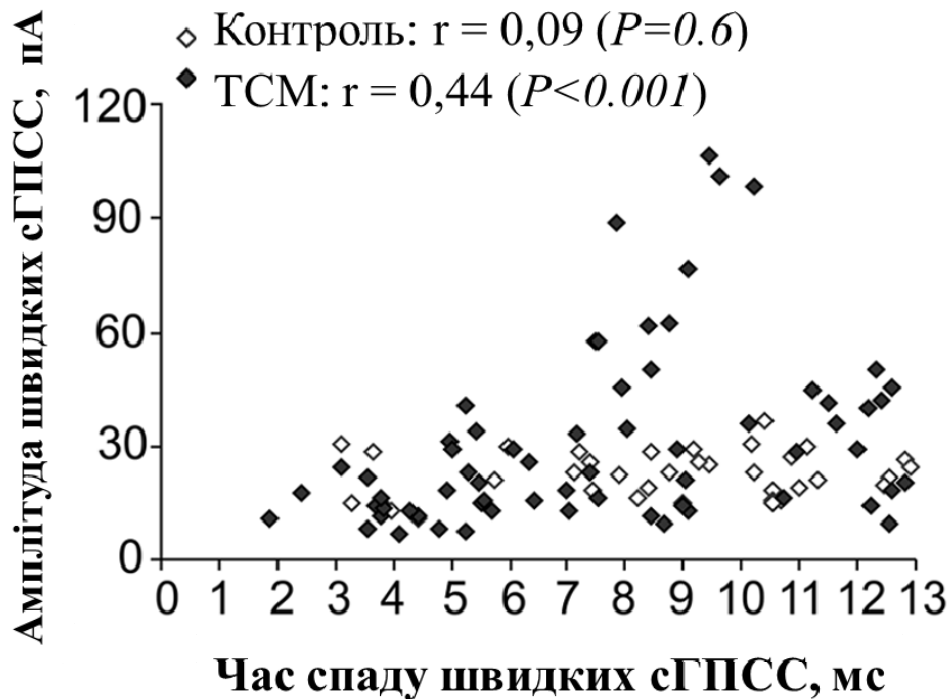


Рисунок 3.42. Кореляція між значеннями часу спаду та амплітуд «швидких» сГПСС в тонічних нейронах ПП ДР у контрольних умовах та при TCM.

Цей факт може вказувати на залежну від активності зміну трафікінгу гліцинових рецепторів в синапсах тонічних нейронів ПП ДР при травмі спинного мозку.

3.3.2.3. Зміни балансу збудження та гальмування в нейронах ПП ДР при травмі спинного мозку.

При травмі спинного мозку, як і при периферичному запаленні, баланс збудження та гальмування, виражений відношенням частот сЗПСС та сГПСС також був клітинно специфічним. В адаптивних нейронах медіанна величина відношення частот сЗПСС до сГПСС збільшувалася майже в 11

разів з 20 (n=14) в контролі до 228 (n=10, $p < 0,01$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.62) при TCM.

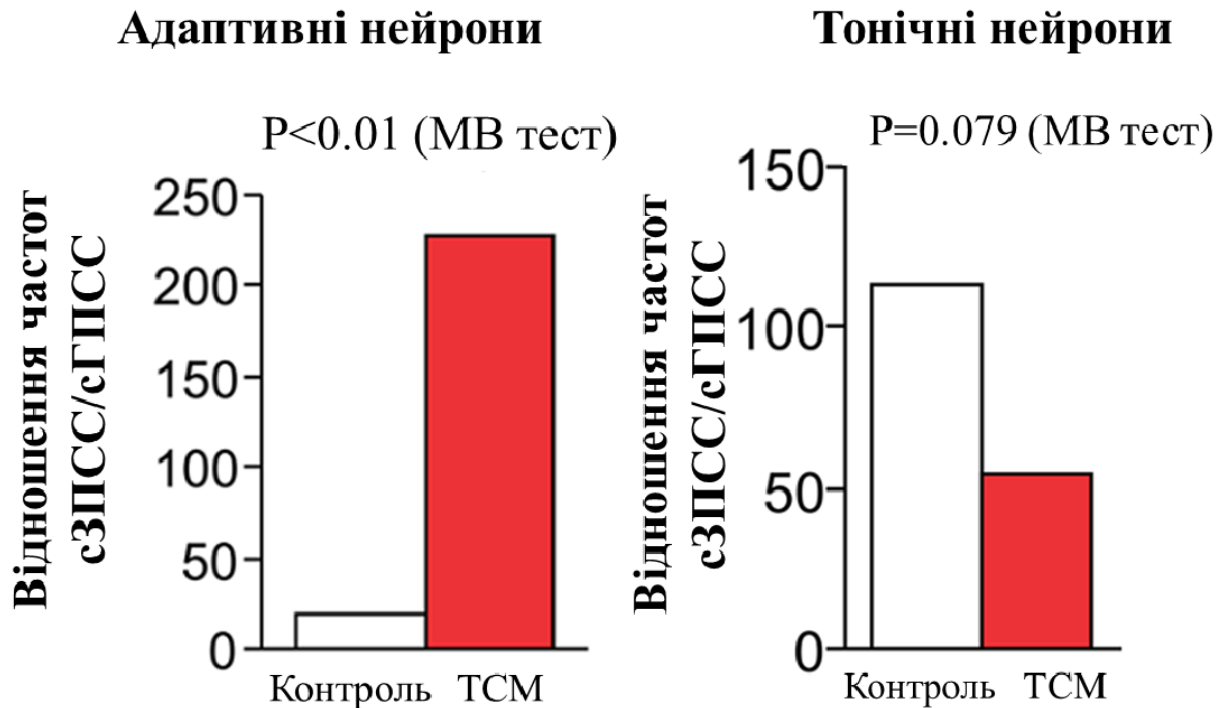


Рисунок 3.43. Розраховані по вибірці клітин медіанні значення відношення частот сЗПСС до сГПСС у контрольних умовах та після ТСМ в адаптивних та тонічних нейронах ПП ДР.

В тонічних нейронах ситуація була протилежною - відношення частот збуджуючих та гальмівних подій проявляло тенденцію до зменшення: 113 в фізіологічних умовах (n=10) та 55 при ТСМ (n=9, $p = 0,079$, тест Манна-Вітні, Рис. 3.43).

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 та в сторону гальмування переважно гальмівних тонічних нейронів (Рис. 3.44).

Це дає змогу стверджувати, що клітиноспецифічні зміни балансу збудження та гальмування є універсальним механізмом розвитку гіперзбудливості ноцицептивних мереж поверхневих пластин спинного мозку та опосередковує хронічні больові синдроми будь-якого генезу.

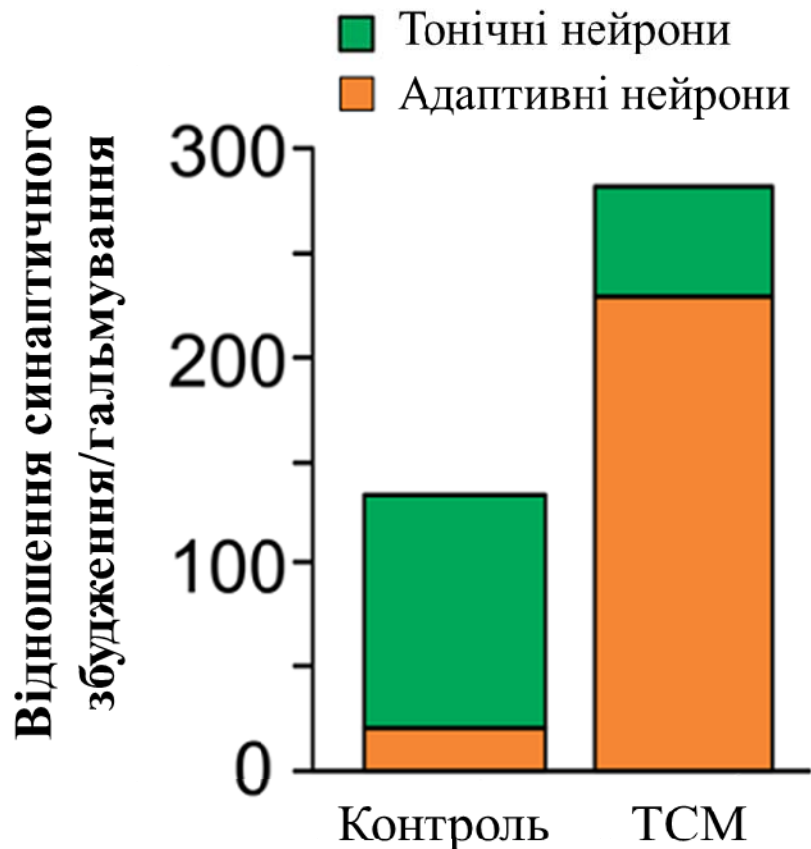


Рисунок 3.44. Гістограми зміни балансу збудження та гальмування в контрольних умовах та після ТСМ в адаптивних та тонічних нейронах ПП ДР.

Результати даного розділу опубліковані у статті (Korach et al., 2017).

3.4. Вплив інгібування кальційзалежних АМРА-рецепторів на больовий синдром, викликаний периферичним запаленням.

Дослідження мініатюрних збуджуючих постсинаптичних подій при хронічному болю показали, що в адаптивних нейронах відбувається

подовження часу спаду постсинаптичних струмів та зменшення провідності одиночних AMPA-каналів. Обидві ці характеристики є характерними для кальційнепроникних GluA2-вмісних AMPA-рецепторів, тому, враховуючи зростання амплітуди спонтанних та мініатюрних ЗПСС, логічно припускати додаткове вбудовування саме цих AMPA-каналів у постсинаптичні мембрани адаптивних нейронів при периферичному запаленні та травмі спинного мозку. Однак, літературні дані свідчать про те, що хронічний біль супроводжується вбудовуванням кальційпроникних AMPA-рецепторів в постсинаптичні мембрани (Hartmann et al., 2004b; Vikman et al., 2008; Sullivan et al., 2017). Для розв'язання цих протиріч була проведена серія поведінкових дослідів з використанням блокаторів кальційпроникних AMPA-рецепторів та інгібіторів протеїнкінази C - ферменту, один з підтипів якого (PKC α) є відповідальним за інтерналізацію GluA2 субодиниці, яка і обумовлює кальцієву непроникність AMPA-каналів (Park et al., 2009). Припускалося, що інтратекальне введення вищеназваних речовин не мало б призводити до значного полегшення больового синдрому, у випадку якщо основним іонним механізмом гіперзбудливості мережі ПП ДР є вбудовування GluA2 вмісних кальційнепроникних рецепторів в постсинаптичні мембрани.

3.4.1. Антиноцицептивний ефект інтратекального введення блокаторів кальційпроникних AMPA-рецепторів IEM 1460 та IEM 1925 при хронічному запаленні.

IEM 1460 та IEM 1925 – це дікатіонні сполуки, які ефективно блокують саме кальційнепроникні AMPA-канали, що було доведено *in vitro* та *in situ* (Tikhonov et al., 2000; Tikhonova et al., 2008; Zaitsev et al.,

2011). Це пригнічення є залежним від потенціалу та активності, що є великою перевагою цих сполук, оскільки дозволяє блокувати не весь набір АМРА-каналів, а лише ті, які є функціонально активними, що зменшує ймовірність виникнення побічних ефектів.

В наших досліджах дікатіонні сполуки ІЕМ 1460 та ІЕМ 1925 вводилися інтратекально через 2 години після індукування периферичного запалення ін'єкцією ПАФ.

Введення ІЕМ 1460 призводило до значного полегшення больового синдрому, що виражалось у збільшенні латентності між ноцицептивним термічним стимулом і характерною больовою реакцією відсмикування кінцівки при підшовному тесті Харгрівса, що в свою чергу свідчило про зниження термічної гіперчутливості. Цей ефект спостерігався вже через 1-2 години після введення ІЕМ 1460 та був наявним на протязі кількох днів після інтратекальної ін'єкції (Рис. 3.45).

Антиноцицептивний ефект введення ІЕМ 1460 мав концентраційну залежність (Рис. 3.45). ІЕМ 1460 мав найбільшу анальгезивну дію при введенні мікромольних (3-300 мкмоль/л) концентраціях цієї дікатіонної сполуки. Зменшення термічної гіперчутливості було найшвидшим при застосуванні ІЕМ 1460 у концентрації 3 мкмоль/л, яка є дуже близькою до IC_{50} для специфічного блокування саме кальційпроникних рецепторів (Buldakova et al., 1999). Зокрема при введенні такої концентрації термічна чутливість відновлювалася до 60% від рівня, який спостерігався до індукування запалення, що свідчить про значний та тривалий анальгезивний ефект.

Менша - 1 мкмоль/л - або значно більша - 1 ммоль/л [IC_{50} для блокування кальційнепроникних АМРА-рецепторів (Buldakova et al., 1999)] концентрації ІЕМ 1460 зменшували антиноцицептивний ефект за амплітудою та тривалістю.

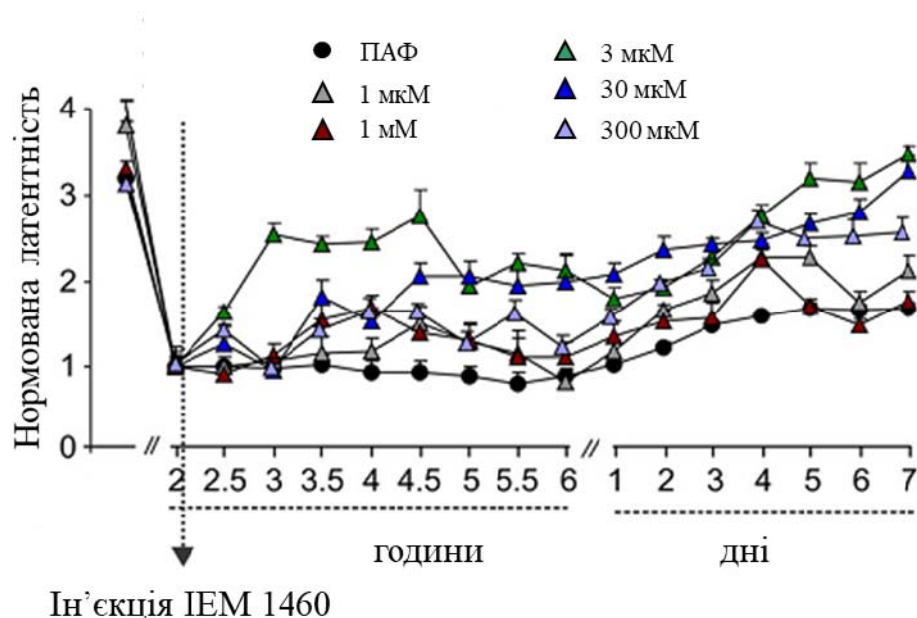
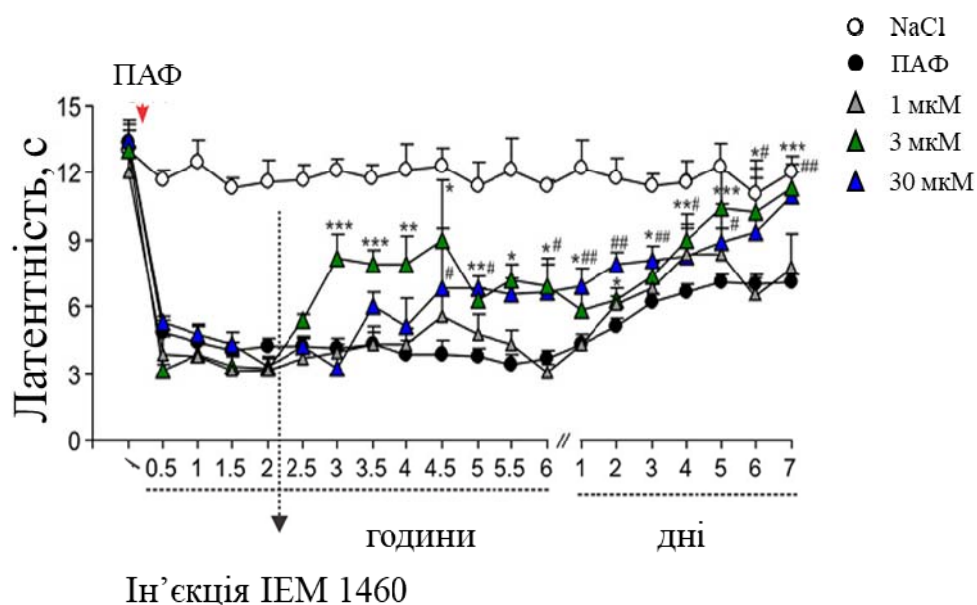


Рисунок 3.45. Збільшення латентності (зверху) та нормалізованої латентності (знизу) між стимулом та больовою реакцією при підшовному тесті Харгрівса, що вказує на зниження термічної гіперчутливості тварин при інтратекальному введенні ІЕМ 1460.

ІЕМ 1925, так само як і ІЕМ 1460, знижував термічну гіперчутливість, причому антиноцицептивний ефект мав концентраційну залежність та був найбільшим при 5-300 мкмоль/л (Рис. 3.46).

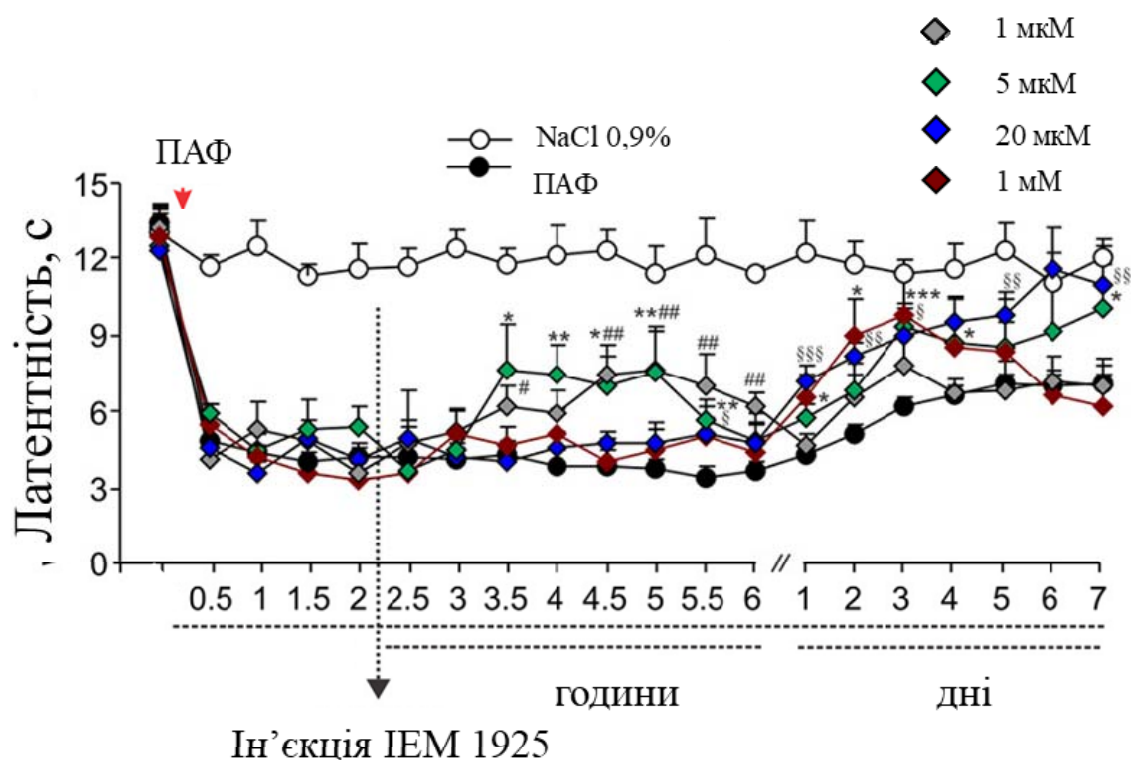


Рисунок 3.46. Латентність між стимулом та больовою реакцією при підшовному тесті Харгрівса при інтратекальному введенні ІЕМ 1925.

Введення ІЕМ 1925 супроводжувалося зменшенням термічної гіперчутливості, яка була присутньою протягом всього періоду спостереження. Аналгезивний ефект ІЕМ 1925 був швидшим ніж для аналогічних концентрацій ІЕМ 1460. Але так само як і для ІЕМ 1460, зменшення концентрації до 1 мкмоль/л або її збільшення до 1 ммоль/л призводило до менш тривалого зниження термічної гіперчутливості.

3.4.2. Антиноцицептивний ефект інтратекального введення челеритрину при хронічному запаленні.

Літературні дані свідчать про те, збільшення кількості кальційпроникних рецепторів при хронічному болю, може відбуватися за

рахунок РКС-залежної фосфориляції GluA2 субодиниць, яка викликає їхню інтерналізацію (Park et al., 2009; Korach et al., 2011, 2013), що в свою чергу призводить до збільшення пропорції кальційпроникних AMPA-рецепторів. Саме тому, для того щоб виключити вплив дікатіонних сполук на весь набір AMPA-рецепторів, було проведено серію експериментів з використанням інгібітору РКС челеритрину.

Челеритрин ефективно зменшував розвиток больового синдрому, зменшуючи термічну гіперчутливість при інтратекальному введенні за 0,5 години до індукції периферичного запалення (Рис. 3.47).

Ефект челеритрину був концентраційно-залежним (Рис. 3.47). Челеритрин запобігав розвитку термічної гіперчутливості вже за концентрації 660 нмоль/л (IC_{50} для інгібування РКС *in vitro*). Антиноцицептивний ефект виникав протягом перших 0,5 години та проявлявся в зменшенні латентності між больовим стимулом та характерною больовою реакцією в підшовному тесті Харгрівса. Однак, ефект був присутнім на протязі кількох годин після чого значно зменшувався (Рис. 3.47).

Збільшення концентрації челеритрину призводило до збільшення амплітуди та тривалості антиноцицептивного ефекту. Наприклад, латентність відсмикування запаленої кінцівки при введенні челеритрину у концентрації 39 мкмоль/л була майже вдвічі більшою ніж при інтратекальному введенні контрольного розчину 0,9 % NaCl ($p < 0.01$) та лишалася на такому рівні на протязі 6 годин. В концентрації 396 мкмоль/л челеритрин ефективно зменшував розвиток термічної гіперчутливості таким чином, що значення латентності тварин із запаленням не відрізнялися достовірно від контрольних значень ($p > 0.2$). Антиноцицептивний ефект лишався на 24 та 48 годину після введення челеритрину: збільшення ноцицептивного порогу в порівнянні з периферичним запаленням складало ~46% та ~41% ($p < 0.05$) для 39

мкмоль/л челеритрину та ~105% та ~81% ($p<0.05$) для 396 мкмоль/л відповідно (Рис. 3.47).

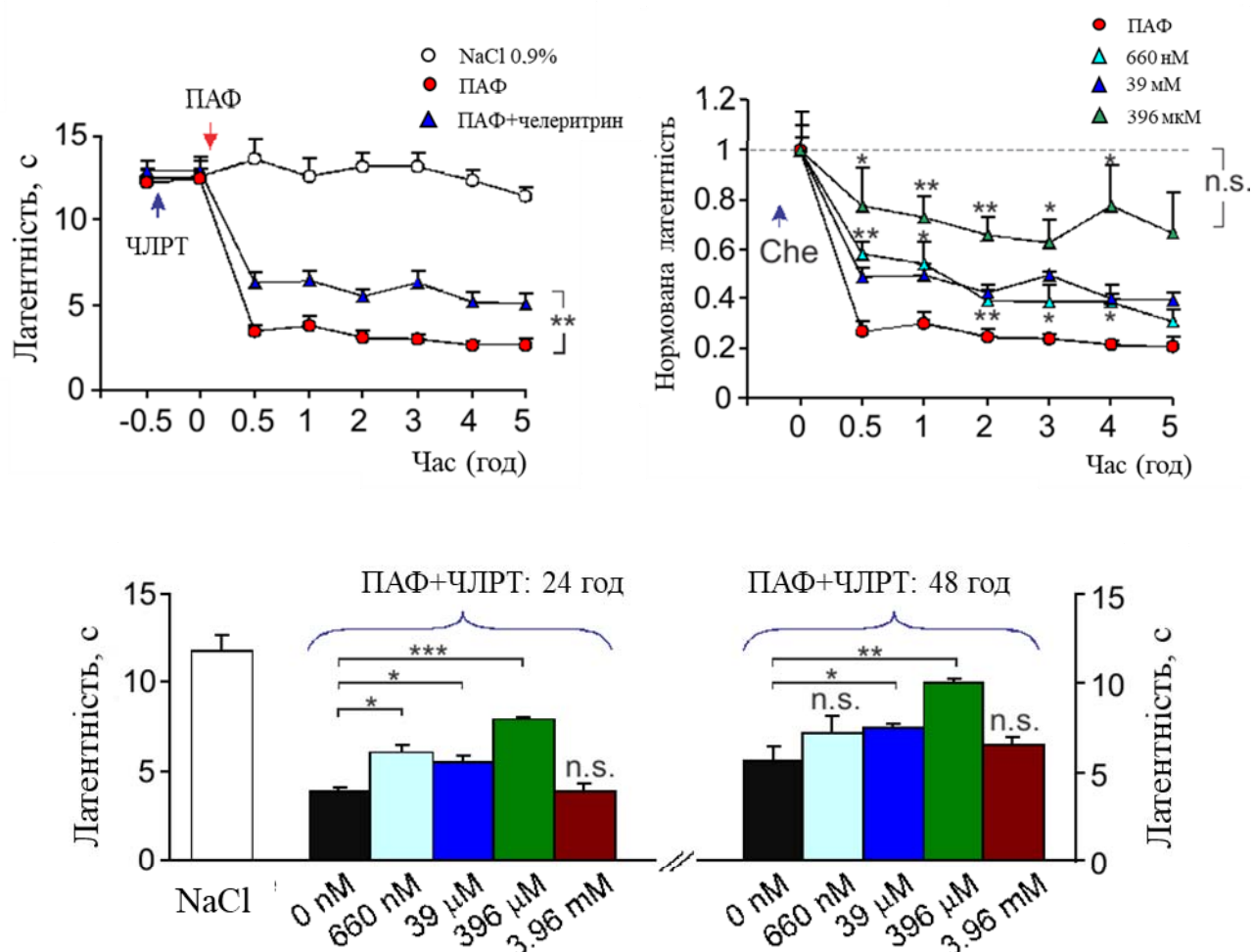


Рисунок 3.47. Антиноцицептивний ефект різних концентрацій челеритрину на термічну чутливість при периферичному запаленні в умовах введення за 0,5 години до індукування запалення.

Введення челеритрину на фазі підтримання хронічного запального болю також викликало антиноцицептивний ефект. Челеритрин у концентрації 660 нмоль/л викликав достовірне збільшення порогу термічної чутливості через 4,5-6 годин після введення ($p<0.05$, Рис. 3.48).

Збільшення концентрації челеритрину призводило до збільшення амплітуди та подовження ноцицептивного ефекту (Рис. 3.48). В

концентрації 39 мкмоль/л челеритрин поліпшував термічну гіперчутливість, причому цей ефект спостерігався вже через 0,5 години після введення ($p < 0.05$). В порівнянні з запаленням латентність відсмикування кінцівки відновлювалася на ~110% та ~128% ($p < 0.01$) на 1 та 1,5 години після введення відповідно та залишалася близькою до контрольних значень на протязі кількох годин.

Поліпшення больової чутливості спостерігалось також через 24 та 48 годин після введення челеритрину (Рис. 3.48): на другий день після введення латентності відсмикування кінцівки при підошовному тесті Харгрівса мали значення близькі до контрольних при введенні челеритрину у концентраціях 39 мкмоль/л та вище.

Таким чином, як селективні блокатори кальційпроникних АМРА-рецепторів, так і інгібітор РКС - ферменту, що відповідає за трафікінг цих рецепторів, мають яскраво виражену антиноцицептивну дію, яка проявляється у відновленні термічної гіперчутливості, викликаній периферичним запаленням. Цей факт свідчить про те, що кальційпроникні 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 в умовах хронічного болю, не є єдиним АМРА-рецепторопосередкованим іонним механізмом, що призводить до розвитку центральної сенситизації. Швидше за все хронічний біль викликає синаптоспецифічні зміни постсинаптичних АМРА-рецепторів: вбудовування кальційпроникних АМРА відбувається переважно в синапсах нейронів ПП ДР з первинними аферентами, що підтверджується літературними даними (Sullivan et al., 2017; Vikman et al., 2008), в той час як в синапсах між інтернейронами дорсального мозку відбувається додаткове вбудовування кальційнепроникних АМРА-рецепторів, що підтверджуються результатами даної роботи.

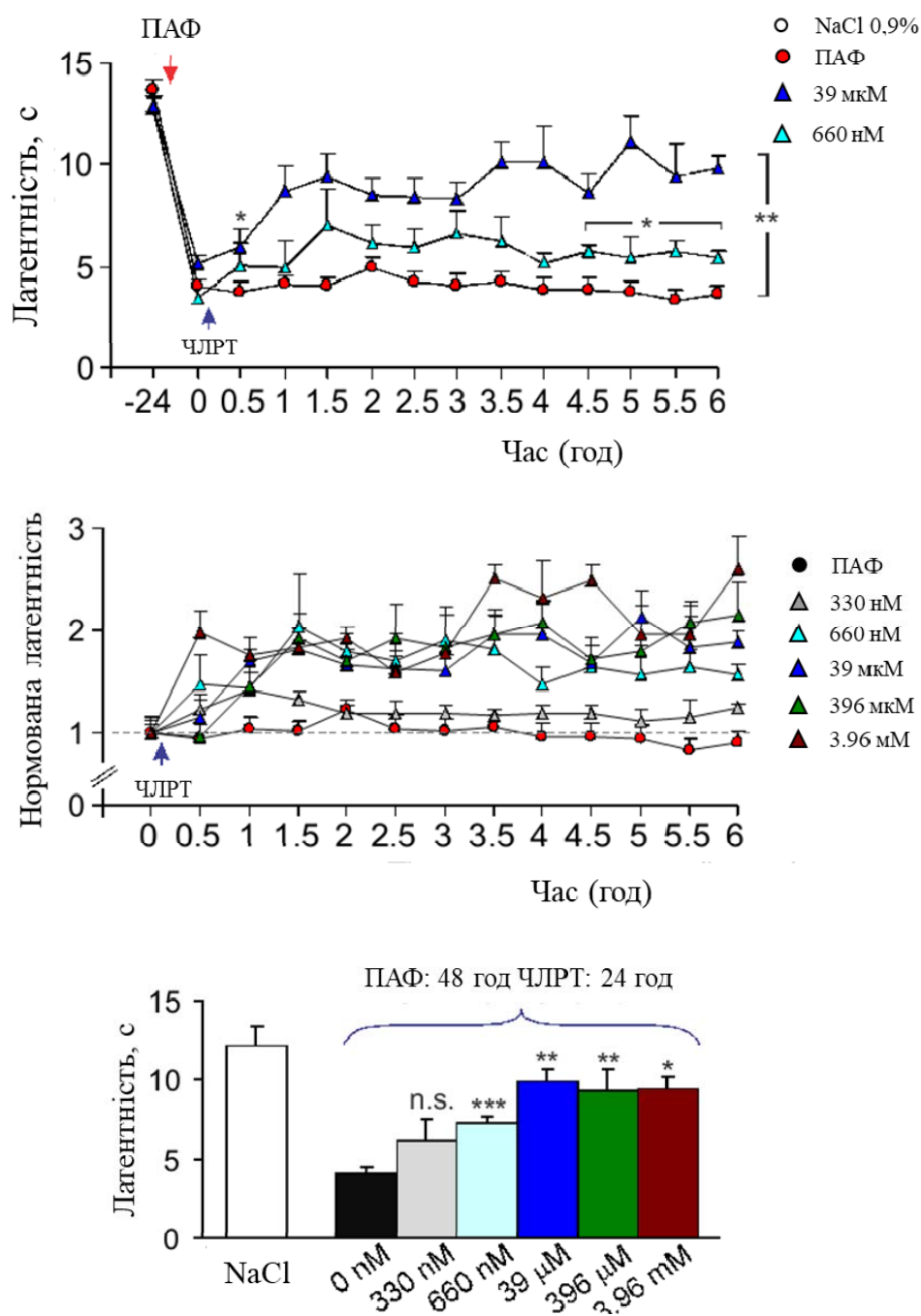


Рисунок 3.48. Антиноцицептивний ефект різних концентрацій челеритрину на термічну чутливість при периферичному запаленні в умовах введення через 24 години після індукування запалення.

Результати даного розділу опубліковані у статті (Korach et al., 2016).

РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.

4.1. Хронічний біль та центральна сенситизація. Гіперзбудливість мережі ПП ДР як прояв центральної сенситизації.

На відміну від гострого болю, який виконує важливу фізіологічну роль, сигналізуючи про наявне або потенційне пошкодження тканин, хронічний біль є патологічним. Незалежно від свого походження постійний біль не зникає навіть після усунення першопочаткових причин, викликаючи хронічні больові синдроми. Ці синдроми зачіпають близько 20% населення Європи (Breivik et al., 2006), а на боротьбу з ним тільки в Європі витрачається більше 200 мільярдів євро щорічно (Tracey and Bushnell, 2009). Та незважаючи на всю значущість даної проблеми, лікування хронічного болю є обмеженим, а терапевтичні підходи здебільшого зводяться до купіювання самого больового синдрому, а не усунення тих змін, котрі його викликали. Низька ефективність лікування хронічного болю насамперед пов'язана з недостатнім розумінням механізмів його виникнення. Саме це суттєво сповільнює розробку та впровадження ефективних засобів усунення постійного болю.

Основою хронічного болю є центральна сенситизація, яка за визначенням є підвищенням функціонального статусу нейронів та мереж ноцицептивних шляхів вздовж всієї нервової вісі, викликаного підвищенням мембранної збудливості, синаптичної ефективності і/або зменшення гальмування (Latremoliere and Woolf, 2009). В поверхневих пластинах дорсального рогу, частині спинного мозку, яка саме відповідає за обробку ноцицептивної інформації, центральна сенситизація проявляється гіперзбудливістю самої мережі ПП ДР. Ця гіперзбудливість

опосередкована підвищенням збуджуючої синаптичної активності при хронічному болю. В даній роботі було продемонстроване загальне збільшення частоти збуджуючих синаптичних подій в нейронах ПП ДР як при периферичному запаленні, так і при травмі спинного мозку. Це підвищення може бути пов'язане як зі змінами, що викликають підвищену активність інтернейронів спинного мозку на больові та не больові стимули (Hao et al., 2004; Gwak et al., 2007b), так і зі змінами потенціал-керованих натрієвих каналів (Hains et al., 2003; Lampert et al., 2006), які підвищують збудливість нейронів ДКГ та викид глутамату з їх центральних терміналей. При травмі спинного мозку гіперзбудливість дорсального рогу може бути також пов'язана з величезним зростанням зовнішньоклітинної концентрації глутамату (Liu and McAdoo, 1993), що в свою чергу викликає постійну деполяризацію нейронів. Підвищення збуджуючої синаптичної передачі в мережі ПП ДР також спостерігалось і при нейропатіях, викликаних травмою периферичного нерву (Balasubramanyan et al., 2006; Chen et al., 2009; Fukushima et al., 2011; Inquimbert et al., 2012; Yan and Weng, 2013), і вважається, що це підвищення і призводить до розвитку та підтримання довготривалого болю (Tsuda et al., 2005; Sandkühler, 2007; Scholz and Woolf, 2007).

Таким чином можна припустити, що ймовірний сценарій появи хронічного болю є наступним. Периферичне запалення або травма нерву викликають посилену генерацію пачок ПД нейронами ДКГ (Liu et al., 1997; Xie et al., 2005). Це в свою чергу збільшує викид глутамату з центральних терміналей цих нейронів та викликає збільшення збудливості інтернейронів ПП ДР, яке підтримується не тільки за рахунок пресинаптичних, але й за рахунок постсинаптичних змін, спровокованих збільшенням інтенсивності збудження. При травмі спинного мозку ситуація ще загострюється тим, що ця патологія також викликає периферійну сенситизацію, а також значно збільшує збудження мережі

дорсального рогу за рахунок вивільнення глутамату та АТФ з пошкодженої тканини СМ.

4.2. Відмінності синаптичного збудження та гальмування в різних популяціях нейронів ПП ДР.

Нейрони поверхневих пластин дорсального рогу спинного мозку є надзвичайно гетерогенними. Для їх класифікації застосовують критерії, що базуються на морфології, нейрохімічному фенотипі та електрофізіологічних властивостях (Grudt and Perl, 2002; Graham et al., 2007; Yasaka et al., 2007, 2010). В даній роботі ми розділяли нейрони ПП ДР за типом генерації потенціалів дії у відповідь на прямокутні стимули струму. Подібна класифікація непогано корелює й з нейрохімічним фенотипом: нейрони, що були здатні до тонічного генерування ПД протягом стимулу, в основному є гальмівними (Albuquerque et al., 1999; Lu and Perl, 2003; Hantman et al., 2004; Graham et al., 2007; Yasaka et al., 2010; Punnakkal et al., 2014), в той час як нейрони, які адаптувалися до струму, який ін'єктувався, були переважно збуджуючими (Punnakkal et al., 2014). Популяції тонічних та адаптивних нейронів відрізнялися за збудженням та гальмуванням, яке вони отримують в мережі ПП ДР в фізіологічних умовах. Синаптичне збудження тонічних нейронів було більш сильним, що підтверджувалося більшою частотою та амплітудою збуджуючих спонтанних постсинаптичних струмів в цих клітинах. Враховуючи, що тонічні нейрони мали також менші частотні та амплітудні параметри гальмівних постсинаптичних подій, можна припустити, що менше синаптичне збудження в синапсах адаптивних нейронів пов'язане з тонічним інгібуванням збуджуючого входу до цієї нейронної популяції в фізіологічних умовах. Спонтанні гальмівні синаптичні події, зареєстровані

в адаптивних нейронах відрізнялися більш короткою кінетикою спаду. Пропорція «швидких» (гліцинергічних) та «повільних» (ГАМК-ергічних) сГПСС також біла відмінною у вищеназваних популяціях нейронів та вказувала на те, що адаптивні нейрони в фізіологічних умовах отримують переважно гліцинергічне гальмування, в той час як для тонічних нейронів характерна змішана синаптична гальмівна активність. Цей факт підтверджується літературними даними (Punnakkal et al., 2014), а враховуючи різницю в синаптичному збудженні, ще раз свідчить про різні фізіологічні ролі, які відіграють адаптивні та тонічні нейрони в мережі поверхневих пластин дорсального рогу спинного мозку.

4.3. Клітинна специфічність змін збуджуючої синаптичної передачі за хронічного болю.

Зважаючи на різницю в збуджуючій та гальмівній синаптичній передачі в адаптивних та тонічних нейронах ПП ДР в фізіологічних умовах, логічно було припустити, що в умовах хронічного болю збудження та гальмування також буде змінюватися клітиноспецифічно. І дійсно, як в умовах периферичного запалення, так і в умовах травми спинного мозку, синаптичне збудження змінювалося протилежним чином в двох нейронних популяціях ПП ДР.

Периферичне запалення та ТСМ викликали збільшення частоти та амплітуди спонтанних та мініатюрних ЗПСС в адаптивних клітинах ПП ДР. Таке посилення збуджуючої синаптичної передачі в переважно збуджуючих нейронах безумовно мало викликати гіперзбудливість мережі дорсального рогу спинного мозку. Ідентичні зміни синаптичного збудження спостерігалися і в моделях пошкодження периферичного нерву (Balasubramanyan et al., 2006; Chen et al., 2009), що дає змогу говорити про

те, що підвищення синаптичного входу до адаптивних нейронів є характерним для хронічного болю будь-якого генезу та є одним з головних чинників виникнення та підтримання центральної сенситизації.

Зміни параметрів мЗПСС при хронічному болю говорять про те, що зміни збуджуючої синаптичної передачі носили як пре-, так і постсинаптичний характер. Збільшення частоти збуджуючих синаптичних подій чітко вказує на збільшення кількості синапсів, які спрацьовували, та/або збільшення ймовірності викиду глутамату з пресинаптичних терміналей. Збільшення кількості активних синапсів може відбуватися за рахунок активації «мовчазних» первинних аферентів при запаленні (Prato et al., 2017) та наступного викиду глутамату з їх центральних терміналей. Збільшення ймовірності викиду збуджуючого нейромедіатора відбувається через вже згадане підвищення активності ноцицептивних ДКГ нейронів, а також може бути пов'язане з ап-регуляцією кальцієвих потенціал-керованих каналів. Відомо, що N- та T-типи цих каналів ініціюють викидання синаптичних везикул (Bourinet et al., 2014), тому, враховуючи збільшення їх експресії в центральних терміналях ДКГ та синаптичних терміналях нейронів ДР як при хронічному запаленні, так і при нейропатичному болю різного походження (Cizkova et al., 2002; Yokoyama et al., 2003; Jagodic et al., 2007, 2008; Boroujerdi et al., 2011; Todorovic and Jevtovic-Todorovic, 2013), резонно припускати, що збільшення ймовірності викиду глутамату відбувається саме за рахунок вищеназваних змін. А оскільки збільшення спостерігалось і для частоти мЗПСС, і для частоти сЗПСС, то можна казати про зміни в ПД-залежному та ПД-незалежному релізі нейротрансмітера.

Збільшення амплітуди мЗПСС в адаптивних нейронах також може частково пояснюватися пресинаптичними чинниками. Відомо, що при травматичній нейропатії на 40% зростає синаптосомальний вміст аспартату та глутамату (Somers and Clemente, 2002), що в свою чергу може

пояснюватися збільшенням експресії везикулярного транспортеру глутамату VGluT2 (Izumi et al., 2015). Такі зміни сприяють збільшенню везикулярних квантів, що і призводить до збільшення амплітуди постсинаптичних глутамат-опосередкованих струмів.

Зміни амплітуди мЗПСС вказують і на постсинаптичні зміни, що й було підтверджено аналізом кінетик спаду AMPA-рецептор-залежних струмів та нестационарним флуктуаційним аналізом. І периферичне запалення, і ТСМ змінювали розподіл мЗПСС за часом спаду, збільшуючи пропорцію подій з довгими кінетиками, а також зменшували провідність постсинаптичних AMPA-рецепторів адаптивних нейронів. Довша кінетика і знижена провідність є характерними для кальцій-непрониканих AMPA-рецепторів, які містять в своєму складі GluA2 субодиницю (Burnashev et al., 1992; Geiger et al., 1995; Liu and Cull-Candy, 2000). Саме тому зміни цих параметрів свідчать про зміни трафікінгу постсинаптичних AMPA-рецепторів, які відбуваються в адаптивних нейронах ПП ДР при хронічному болю. Враховуючи факт одночасного збільшення амплітуди мЗПСС та зниження середнього значення провідності синаптичних AMPA-каналів, найбільш резонним поясненням є вбудовування додаткових кальційнепроникних рецепторів в синаптичні мембрани адаптивних нейронів. Такий механізм може забезпечувати захист збуджуваних нейронів ПП ДР від кальцій-опосередкованої ексайтотоксичності, що могла б виникнути через гіперзбудливість мережі дорсального рогу.

В тонічних нейронах характер змін спонтанної та мініатюрної синаптичної активності, спровокованих периферійним запаленням або ТСМ, різко відрізнявся в порівнянні з адаптивними нейронами: частотні та амплітудні параметри збуджувальної синаптичної передачі змінювалися слабо та навіть проявляли тенденцію до зменшення. А враховуючи те, що тонічні нейрони є популяцією переважно гальмівних клітин, тенденцію до зменшення мало проявляти загальне мережеве гальмування. Посилення

синаптичного збудження в переважно збуджуючих адаптивних нейронах та відсутність еквівалентних змін в переважно гальмівних тонічних нейронах призводила до зміни мережевого балансу на користь збудження, а, отже, до гіперзбудливості ПП ДР. Подібне до викликаного запаленням та ТСМ зниження збудження гальмівних нейронів спостерігалось і при периферичній нейропатії (Leitner et al., 2013), що ще раз підтверджує те, що клітинна специфічність змін синаптичного збудження лежить в основі хронічного болю будь-якого походження.

Механізми, які опосередковують зміни синаптичного збудження, також проявляли клітинну специфічність. Це видно з того, що в тонічних нейронах не було характерних для адаптивних змін профілю розподілу часу спаду мЗПСС та зміни провідності синаптичних АМРА-рецепторів. З тієї ж причини немає достатніх доказів для того, щоб припускати зміну трафікінгу АМРА-каналів: зміни кінетики та провідності можуть цілком пояснюватися змінами зв'язування АМРА-рецепторів з допоміжними білками, наприклад з трансмембранними регуляторними протеїнами, які експресуються в спинному мозку (Larsson et al., 2013) та впливають на параметри АМРА-опосередкованих струмів (Cho et al., 2007; Milstein et al., 2007; Jackson and Nicoll, 2011).

Клітинна специфічність може бути характерною і для змін екстрасинаптичних АМРА-рецепторів. Було показано, що на відміну від адаптивних нейронів, в яких подібний механізм не спостерігався, в тонічних нейронах відбувається ап-регуляція кальційзалежних АМРА в екстрасинаптичних мембранах (Korach et al., 2011, 2012, 2013; Korach and Voitenko, 2013), що може призводити до зміни ймовірності викиду нейромедіатору цією популяцією переважно гальмівних нейронів, а, отже, може призводити до розгальмування мережі ПП ДР.

4.4. Клітинна специфічність змін гальмівної синаптичної передачі за хронічного болю.

Зміни гальмівної синаптичної передачі в нейронах ПП ДР в умовах хронічного болю були також клітиноспецифічними, проте вони були різноспрямованими в порівнянні зі збуджуючою передачею.

В умовах периферичного запалення та травми спинного мозку в адаптивних нейронах відбувалося зменшення амплітудних та частотних характеристик гальмівної синаптичної передачі. Для невропатичного болю було також продемонстроване зменшення частоти гліцинергічних мГПСС в нейронах ПП ДР (Müller et al., 2003; Chiu et al., 2016), що свідчить про пресинаптичні механізми зменшення гальмування. Вплив постсинаптичних механізмів проявлявся в зменшенні констант часу спаду «швидких», ймовірно гліцинергічних, сГПСС, що нашоує на думку про зміни субодиничного складу постсинаптичних каналів, що викликають зменшення амплітуд гальмівних подій та можуть бути пов'язаними з фосфориляцією протеїнкіназою А гліцинових рецепторів, які містять $\alpha 3$ субодиницю (Ahmadi et al., 2002; Zeilhofer et al., 2012). Причому зниження коефіцієнту кореляції амплітуд та кінетик швидких синаптичних подій після ТСМ свідчить про активність-залежність вищезазначених змін.

В адаптивних нейронах спостерігалось також зменшення кількості «повільних», ймовірно ГАМК-ергічних, синаптичних подій. Цей факт може мати декілька пояснень. По-перше, це може бути пов'язане з відмиранням ГАМК-ергічних нейронів (Meisner et al., 2010), але це твердження справедливе лише для ТСМ, оскільки ні периферичне запалення, ні периферична нейропатія не викликають подібних змін (Polgár et al., 2003, 2004, 2005). По-друге, зменшення ГАМК-ергічного гальмування може асоціюватися зі зменшенням ГАМК синтезуючих

ферментів (Meisner et al., 2010; Gwak and Hulsebosch, 2011) або зменшенням кількості ГАМК-ергічних синаптичних терміналей в ПП ДР (Lorenzo et al., 2014), що спостерігається при нейропатії. По-третє, і ГАМК-ергічне, і гліцинергічне гальмування можуть ставати неефективним через зміну хлорного градієнту, обумовлену зменшенням експресії калій-хлорного транспортеру KCC2 (Coull et al., 2003; Jolivald et al., 2008; Lu et al., 2008; Zhang et al., 2008; Hasbargen et al., 2010; Janssen et al., 2012).

Таким чином, всі вищеперелічені факти вказують на те, що зменшення тонічного інгібування збуджуючих адаптивних інтернейронів, яке може відбуватися за рахунок різноманітних механізмів, є одним з ключових у розвитку та підтриманні гіперзбудливості мережі дорсального рогу спинного мозку.

На відміну від адаптивних в тонічних нейронах мала місце тенденція до збільшення інгібування цієї популяції переважно гальмівних нейронів, що без сумніву вносило вклад в загальну гіперзбудливість мережі ПП ДР. Різними також були і зміни гліцин- та ГАМК-ергічних складових синаптичного гальмування. В тонічних нейронах відбувався перерозподіл пропорції «швидких» (гліцинергічних) та «повільних» (ГАМК-ергічних) подій на користь перших. Цей факт, а також збільшення амплітуд «швидких» подій та їх скорельованість з часом спаду сГПСС, що з'являється в умовах травми спинного мозку, дає змогу гіпотезувати про наявність специфічної форми довготривалої потенціації гліцинергічної синаптичної передачі в синапсах тонічних нейронів. Схожий тип пластичності спостерігається в синапсах між гліцин- та ГАМК-ергічними нейронами ПП ДР при аплікації запального цитокіну інтерлейкіну 1 β (Chirila et al., 2014).

Отже, при хронічному болю відбуваються реципрокні зміни синаптичного збудження та гальмування, які вносять синергічний вклад в загальну гіперзбудливість ноцицептивних мереж дорсального рогу

спинного мозку. В адаптивних нейронах збільшується синаптичне збудження та зменшується синаптичне гальмування, що призводить до зміщення їх балансу в сторону збудження в цій популяції збуджуючих інтернейронів. В тонічних нейронах ПП ДР збудження зменшується, а гальмування підвищується, що свідчить про інгібування цієї популяції переважно гальмівних інтернейронів. Такі зміни є ключовими для виникнення та підтримання центральної сенситизації, яка і опосередковує хронічний біль. Механізми, що опосередковують зміни збуджуючої та гальмівної синаптичної передачі також демонструють клітиноспецифічність, яка має обов'язково враховуватися при розробці нових терапевтичних стратегій лікування хронічного болю.

4.5. Синаптична специфічність змін, викликаних хронічним болем.

Іонні механізми, які опосередковують хронічний біль можуть також проявляти синаптичну специфічність. Поведінкові дослідження проведені в даній роботі показують, що ап-регуляція кальційпроникних AMPA-рецепторів також є важливою складовою виникнення центральної сенситизації, що є доволі неочікуваним з огляду на продемонстроване аналізом мЗПСС підвищення пропорції кальційнепроникних AMPA-каналів в синапсах адаптивних нейронів ПП ДР. Розбіжності в результатах електрофізіологічних та поведінкових дослідів можуть пояснюватися тим, що синаптичні події, які реєструються в «гострих» зрізах без корінців відбуваються переважно в синапсах між інтернейронами спинного мозку; ці синапси можуть суттєво відрізнятися від синапсів між первинними аферентами та нейронами ПП ДР, в яких в основному і була продемонстрована ап-регуляція кальційпроникних AMPA-рецепторів (Vikman et al., 2008; Sullivan et al., 2017).

Вже обговорені зміни іонних механізмів, спровоковані хронічним болем, здебільшого демонструють синаптичну специфічність. Так нейропатичне зменшення гальмування між первинними аферентами та ГАМК-ергічними нейронами, описане в статті (Leitner et al., 2013), не спостерігалось в синапсах між ноцицепторами та збуджуючими нейронами ПП ДР, в яких на противагу було помічено збільшення викиду глутамату, опосередковане збільшенням експресії Т-типу кальцієвих каналів. Така вибіркковість змін також засвідчується одночасним виникненням довготривалої потенціації проєкційних нейронів та довготривалої депресії ГАМК-ергічних нейронів в дослідках зі високочастотною ноцицептивною стимуляцією дорсальних корінців (Kim et al., 2015). Іншим прикладом може служити різна зміна хлорного градієнту в нейронах ПП ДР та в терміналях первинних аферентів. В той час як зниження ефективності гальмування між інтернейронами відбувається за рахунок збільшення внутрішньоклітинної концентрації хлору, пов'язане з вищезгаданими змінами КСС2 калій-хлорного транспортеру, для ноцицепторів ключовою структурою, яка забезпечує аніонний гомеостаз є натрій-калій-хлорний транспортер НКСС1. Вважається, що зміщення хлорного градієнту, спричинене змінами експресії НКСС1 (Pieraut et al., 2007; Wei et al., 2013; Chen et al., 2014), призводить до порушення ГАМК-ергічної деполяризації первинних аферентів (Cervero et al., 2003; West et al., 2015), що в свою чергу не викликає потрібну інактивацію кальцієвих та натрієвих потенціалзалежних каналів, яка шунтує викид глутамату з центральних терміналей ноцицепторів в фізіологічних умовах (Zeilhofer et al., 2012; Betelli et al., 2015; West et al., 2015).

Таким чином, характерна для хронічного болю загальна гіперзбудливість ноцицептивної мережі ПП ДР спинного мозку виникає не просто через збільшення збудження або зменшення гальмування, яке отримують окремі клітини. Ця гіперзбудливість виникає за рахунок зміни

синаптичної передачі на рівні окремих синапсів. Тому, наприклад, в умовах хронічного болю для одного і того ж первинного ноцицептора може спостерігатися посилення збудження в синапсах зі збуджуючими інтернейронами ПП ДР та його одночасне зниження в синапсах з гальмівними інтернейронами. І навпаки – той самий гальмівний інтернейрон може не змінювати гальмування в синапсах зі збуджуючими клітинами ПП ДР, проте збільшувати його в синапсах з гальмівними інтернейронами. Така тонка регуляція, ймовірно, й пояснює обмежену успішність сучасних терапевтичних підходів до лікування хронічного болю, котрі не розраховані на подібну специфічність.

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 протеїнкінази 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 ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Adams MM, Hicks AL (2005) Spasticity after spinal cord injury. *Spinal Cord* 43:577–586.
- Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL, Zeilhofer HU (2002) PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci* 5:34–40.
- Albuquerque C, Lee CJ, Jackson AC, MacDermott AB (1999) Subpopulations of GABAergic and non-GABAergic rat dorsal horn neurons express Ca²⁺-permeable AMPA receptors. *Eur J Neurosci* 11:2758–2766.
- Balasubramanyan S, Stemkowski PL, Stebbing MJ, Smith PA (2006) Sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons. *J Neurophysiol* 96:579–590.
- Bedi SS, Yang Q, Crook RJ, Du J, Wu Z, Fishman HM, Grill RJ, Carlton SM, Walters ET (2010) Chronic spontaneous activity generated in the somata of primary nociceptors is associated with pain-related behavior after spinal cord injury. *J Neurosci* 30:14870–14882.
- Betelli C, MacDermott AB, Bardoni R (2015) Transient, activity dependent inhibition of transmitter release from low threshold afferents mediated by GABAA receptors in spinal cord lamina III/IV. *Mol Pain* 11:64
- Bland-Ward PA, Humphrey PPA (1997) Acute nociception mediated by hindpaw P2X receptor activation in the rat. *Br J Pharmacol* 122:365–371.
- Boroujerdi A, Zeng J, Sharp K, Kim D, Steward O, Luo ZD (2011) Calcium channel alpha-2-delta-1 protein upregulation in dorsal spinal cord mediates spinal cord injury-induced neuropathic pain states. *Pain* 152:649–655.
- Bourinet E, Altier C, Hildebrand ME, Trang T, Salter MW, Zamponi GW (2014) Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiol Rev*

94:81–140.

- Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D (2006) Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10:287–333.
- Buldakova SL, Vorobjev VS, Sharonova IN, Samoilova M V, Magazanik LG (1999) Characterization of AMPA receptor populations in rat brain cells by the use of subunit-specific open channel blocking drug, IEM-1460. *Brain Res* 846:52–58.
- Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8:189–198.
- Cairns DM, Adkins RH, Scott MD (1996) Pain and depression in acute traumatic spinal cord injury: origins of chronic problematic pain? *Arch Phys Med Rehabil* 77:329–335.
- Cardenas DD, Felix ER (2009) Pain after spinal cord injury: a review of classification, treatment approaches, and treatment assessment. *PM R* 1:1077–1090.
- Carlton SM, Coggeshall RE (1999) Inflammation-induced changes in peripheral glutamate receptor populations. *Brain Res* 820:63–70.
- Carlton SM, Du J, Tan HY, Nesic O, Hargett GL, Bopp AC, Yamani A, Lin Q, Willis WD, Hulsebosch CE (2009) Peripheral and central sensitization in remote spinal cord regions contribute to central neuropathic pain after spinal cord injury. *Pain* 147:265–276.
- Cervero F, Laird JMA, García-Nicas E (2003) Secondary hyperalgesia and presynaptic inhibition: an update. *Eur J Pain* 7:345–351 Available at:.
- Chen JT, Guo D, Campanelli D, Frattini F, Mayer F, Zhou L, Kuner R, Heppenstall PA, Knipper M, Hu J (2014) Presynaptic GABAergic inhibition regulated by BDNF contributes to neuropathic pain induction. *Nat Commun* 5:5331.

- Chen Y, Balasubramanyan S, Lai AY, Todd KG, Smith PA (2009) Effects of sciatic nerve axotomy on excitatory synaptic transmission in rat substantia gelatinosa. *J Neurophysiol* 102:3203–3215.
- Chirila AM, Brown TE, Bishop RA, Bellono NW, Pucci FG, Kauer JA (2014) Long-term potentiation of glycinergic synapses triggered by interleukin 1 β . *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:8263–8268.
- Chiu Y-C, Liao W-T, Liu C-K, Wu C-H, Lin C-R (2016) Reduction of spinal glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain. *Neurosci Lett* 611:88–93.
- Cho C-H, St-Gelais F, Zhang W, Tomita S, Howe JR (2007) Two families of TARP isoforms that have distinct effects on the kinetic properties of AMPA receptors and synaptic currents. *Neuron* 55:890–904.
- Christensen MD, Everhart AW, Pickelman JT, Hulsebosch CE (1996) Mechanical and thermal allodynia in chronic central pain following spinal cord injury. *Pain* 68:97–107.
- Christensen MD, Hulsebosch CE (1997) Chronic central pain after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 14:517–537.
- Chu KL, Faltynek CR, Jarvis MF, McGaraughty S (2004) Increased WDR spontaneous activity and receptive field size in rats following a neuropathic or inflammatory injury: implications for mechanical sensitivity. *Neurosci Lett* 372:123–126.
- Cizkova D, Marsala J, Lukacova N, Marsala M, Jergova S, Orendacova J, Yaksh TL (2002) Localization of N-type Ca²⁺ channels in the rat spinal cord following chronic constrictive nerve injury. *Exp brain Res* 147:456–463.
- Cohen M, Quintner J, Buchanan D (2013) Is chronic pain a disease? *Pain Med* 14:1284–1288.
- Coull JAM, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, S  k A, De Koninck P, De Koninck Y (2003) Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424:938–942.

- Craig AD (2003) A new view of pain as a homeostatic emotion. *Trends Neurosci* 26:303–307 Available at:.
- D’Amico JM, Condliffe EG, Martins KJB, Bennett DJ, Gorassini MA (2014) Recovery of neuronal and network excitability after spinal cord injury and implications for spasticity. *Front Integr Neurosci* 8:36.
- D’Angelo R, Morreale A, Donadio V, Boriani S, Maraldi N, Plazzi G, Liguori R (2013) Neuropathic pain following spinal cord injury: what we know about mechanisms, assessment and management. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17:3257–3261.
- Fenselau H, Heinke B, Sandkühler J (2011) Heterosynaptic long-term potentiation at GABAergic synapses of spinal lamina I neurons. *J Neurosci* 31:17383–17391.
- Ferrier J, Marchand F, Balayssac D (2016) Assessment of Mechanical Allodynia in Rats Using the Electronic Von Frey Test. *BIO-PROTOCOL* 6.
- Finnerup NB (2013) Pain in patients with spinal cord injury. *Pain* 154 Suppl:S71-6.
- Finnerup NB, Jensen TS (2004) Spinal cord injury pain--mechanisms and treatment. *Eur J Neurol* 11:73–82.
- Finnerup NB, Norrbrink C, Trok K, Piehl F, Johannesen IL, Sørensen JC, Jensen TS, Werhagen L (2014) Phenotypes and Predictors of Pain Following Traumatic Spinal Cord Injury: A Prospective Study. *J Pain* 15:40–48.
- Foster E, Wildner H, Tudeau L, Haueter S, Ralvenius WT, Jegen M, Johannssen H, Hösli L, Haenraets K, Ghanem A, Conzelmann K-K, Bösl M, Zeilhofer HU (2015) Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch. *Neuron* 85:1289–1304.
- Fukushima T, Takasusuki T, Tomitori H, Hori Y (2011) Possible involvement of syntaxin 1A downregulation in the late phase of allodynia induced by peripheral nerve injury. *Neuroscience* 175:344–357.

- Gassner M, Leitner J, Gruber-Schoffnegger D, Forsthuber L, Sandkühler J (2013) Properties of spinal lamina III GABAergic neurons in naïve and in neuropathic mice. *Eur J Pain* 17:1168–1179.
- Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15:193–204.
- Graham BA, Brichta AM, Callister RJ (2007) Moving from an averaged to specific view of spinal cord pain processing circuits. *J Neurophysiol* 98:1057–1063.
- Grudt TJ, Perl ER (2002) Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol* 540:189–207.
- Gustafson-Vickers SL, Lu VB, Lai AY, Todd KG, Ballanyi K, Smith PA (2008) Long-term actions of interleukin-1 β on delay and tonic firing neurons in rat superficial dorsal horn and their relevance to central sensitization. *Mol Pain* 4:63.
- Gwak YS, Hulsebosch CE (2011) GABA and central neuropathic pain following spinal cord injury. *Neuropharmacology* 60:799–808.
- Gwak YS, Kang J, Leem JW, Hulsebosch CE (2007a) Spinal AMPA receptor inhibition attenuates mechanical allodynia and neuronal hyperexcitability following spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res* 85:2352–2359.
- Gwak YS, Kang J, Leem JW, Hulsebosch CE (2007b) Spinal AMPA receptor inhibition attenuates mechanical allodynia and neuronal hyperexcitability following spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res* 85:2352–2359.
- Hains BC, Klein JP, Saab CY, Craner MJ, Black JA, Waxman SG (2003) Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurosci* 23:8881–8892.

- Hains BC, Saab CY, Klein JP, Craner MJ, Waxman SG (2004) Altered sodium channel expression in second-order spinal sensory neurons contributes to pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 24:4832–4839.
- Hains BC, Waxman SG (2007) Sodium channel expression and the molecular pathophysiology of pain after SCI. *Prog Brain Res* 161:195–203.
- Hantman AW, van den Pol AN, Perl ER (2004) Morphological and physiological features of a set of spinal substantia gelatinosa neurons defined by green fluorescent protein expression. *J Neurosci* 24:836–842.
- Hao J-X, Kupers RC, Xu X-J (2004) Response characteristics of spinal cord dorsal horn neurons in chronic allodynic rats after spinal cord injury. *J Neurophysiol* 92:1391–1399.
- Hartmann B, Ahmadi S, Heppenstall PA, Lewin GR, Schott C, Borchardt T, Seeburg PH, Zeilhofer HU, Sprengel R, Kuner R (2004a) The AMPA receptor subunits GluR-A and GluR-B reciprocally modulate spinal synaptic plasticity and inflammatory pain. *Neuron* 44:637–650.
- Hartmann B, Ahmadi S, Heppenstall PA, Lewin GR, Schott C, Borchardt T, Seeburg PH, Zeilhofer HU, Sprengel R, Kuner R (2004b) The AMPA receptor subunits GluR-A and GluR-B reciprocally modulate spinal synaptic plasticity and inflammatory pain. *Neuron* 44:637–650.
- Hasbargen T, Ahmed MM, Miranpuri G, Li L, Kahle KT, Resnick D, Sun D (2010) Role of NKCC1 and KCC2 in the development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci* 1198:168–172.
- Heinke B, Ruscheweyh R, Forsthuber L, Wunderbaldinger G, Sandkühler J (2004) Physiological, neurochemical and morphological properties of a subgroup of GABAergic spinal lamina II neurones identified by expression of green fluorescent protein in mice. *J Physiol* 560:249–266.
- Hulse R, Wynick D, Donaldson LF (2010) Intact cutaneous C fibre afferent properties in mechanical and cold neuropathic allodynia. *Eur J Pain*

14:565.e1-565.e10.

- Hulsebosch CE, Hains BC, Crown ED, Carlton SM (2009) Mechanisms of chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *Brain Res Rev* 60:202–213.
- Ikeda H, Stark J, Fischer H, Wagner M, Drdla R, Jäger T, Sandkühler J (2006) Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn. *Science* 312:1659–1662.
- Inquimbert P, Bartels K, Babaniyi OB, Barrett LB, Tegeder I, Scholz J (2012) Peripheral nerve injury produces a sustained shift in the balance between glutamate release and uptake in the dorsal horn of the spinal cord. *Pain* 153:2422–2431.
- Izumi Y, Sasaki M, Hashimoto S, Sawa T, Amaya F (2015) mTOR signaling controls VGLUT2 expression to maintain pain hypersensitivity after tissue injury. *Neuroscience* 308:169–179.
- Jackson AC, Nicoll RA (2011) Stargazin (TARP gamma-2) is required for compartment-specific AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity in cerebellar stellate cells. *J Neurosci* 31:3939–3952.
- Jagodic MM, Pathirathna S, Joksovic PM, Lee W, Nelson MT, Naik AK, Su P, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM (2008) Upregulation of the T-type calcium current in small rat sensory neurons after chronic constrictive injury of the sciatic nerve. *J Neurophysiol* 99:3151–3156.
- Jagodic MM, Pathirathna S, Nelson MT, Mancuso S, Joksovic PM, Rosenberg ER, Bayliss DA, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM (2007) Cell-specific alterations of T-type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons. *J Neurosci* 27:3305–3316.
- Janssen SP, Gerard S, Raijmakers ME, Truin M, Van Kleef M, Joosten EA (2012) Decreased intracellular GABA levels contribute to spinal cord stimulation-induced analgesia in rats suffering from painful peripheral neuropathy: the role of KCC2 and GABA(A) receptor-mediated inhibition.

- Neurochem Int 60:21–30.
- Janssen SP, Truin M, Van Kleef M, Joosten EA (2011) Differential GABAergic disinhibition during the development of painful peripheral neuropathy. *Neuroscience* 184:183–194.
- Ji R-R, Berta T, Nedergaard M (2013) Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? *Pain* 154 Suppl.
- Ji R-R, Nackley A, Huh Y, Terrando N, Maixner W (2018) Neuroinflammation and Central Sensitization in Chronic and Widespread Pain. *Anesthesiology*:1.
- Jolivald CG, Lee CA, Ramos KM, Calcutt NA (2008) Allodynia and hyperalgesia in diabetic rats are mediated by GABA and depletion of spinal potassium-chloride co-transporters. *Pain* 140:48–57.
- Katano T, Furue H, Okuda-Ashitaka E, Tagaya M, Watanabe M, Yoshimura M, Ito S (2008) N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) is involved in central sensitization in the spinal cord through GluR2 subunit composition switch after inflammation. *Eur J Neurosci* 27:3161–3170.
- Khan AA, Raja SN, Manning DC, Campbell JN, Meyer RA (1992) The effects of bradykinin and sequence-related analogs on the response properties of cutaneous nociceptors in monkeys. *Somatosens Mot Res* 9:97–106.
- Khan GM, Chen S-R, Pan H-L (2002) Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats. *Neuroscience* 114:291–299.
- Kim HY, Jun J, Wang J, Bittar A, Chung K, Chung JM (2015) Induction of long-term potentiation and long-term depression is cell-type specific in the spinal cord. *Pain* 156:618–625 Available at:.
- Kopach O, Kao S-C, Petralia RS, Belan P, Tao Y-X, Voitenko N (2011) Inflammation alters trafficking of extrasynaptic AMPA receptors in tonically firing lamina II neurons of the rat spinal dorsal horn. *Pain* 152:912–923.
- Kopach O, 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* 156:428–438.
- Kopach O, Krotov V, Goncharenko J, 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, Voitenko N (2017a) 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, Borisjuk A, Tsymbaliuk V, Voitenko N (2017b) 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.
- Kopach O, Viatchenko-Karpinski V, Atianjoh FE, Belan P, Tao Y-X, 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. *J Pain* 14:182–192.
- Kopach O, Viatchenko-Karpinski V, Belan P, Voitenko N (2012) Development of inflammation-induced hyperalgesia and allodynia is associated with the upregulation of extrasynaptic AMPA receptors in tonically firing lamina II dorsal horn neurons. *Front Physiol* 3:391.
- Kopach O, Voitenko N (2013) Extrasynaptic AMPA receptors in the dorsal horn: evidence and functional significance. *Brain Res Bull* 93:47–56.
- Krotov V, Tokhtamysh A, Kopach O, Dromaretsky A, Sheremet Y, Belan P, Voitenko N (2017) Functional Characterization of Lamina X Neurons in ex-Vivo Spinal Cord Preparation. *Front Cell Neurosci* 11:342.
- Lampert A, Hains BC, Waxman SG (2006) Upregulation of persistent and ramp

- sodium current in dorsal horn neurons after spinal cord injury. *Exp brain Res* 174:660–666.
- Lang E, Novak A, Reeh PW, Handwerker HO (1990) Chemosensitivity of fine afferents from rat skin in vitro. *J Neurophysiol* 63:887–901.
- Larsson M, Agalave N, Watanabe M, Svensson CI (2013) Distribution of transmembrane AMPA receptor regulatory protein (TARP) isoforms in the rat spinal cord. *Neuroscience* 248C:180–193 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23751177>.
- Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10:895–926.
- Leitner J, Westerholz S, Heinke B, Forsthuber L, Wunderbaldinger G, Jäger T, Gruber-Schoffnegger D, Braun K, Sandkühler J (2013) Impaired excitatory drive to spinal GABAergic neurons of neuropathic mice. *PLoS One* 8:e73370.
- Liu CN, Wall PD, Ben-Dor E, Michaelis M, Amir R, Devor M (2000) Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain* 85:503–521.
- Liu D, McAdoo DJ (1993) An experimental model combining microdialysis with electrophysiology, histology, and neurochemistry for exploring mechanisms of secondary damage in spinal cord injury: effects of potassium. *J Neurotrauma* 10:349–362.
- Liu F-Y, Qu X-X, Cai J, Wang F-T, Xing G-G, Wan Y (2011) Electrophysiological properties of spinal wide dynamic range neurons in neuropathic pain rats following spinal nerve ligation. *Neurosci Bull* 27:1–8.
- Liu H, Mantyh PW, Basbaum AI (1997) NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature* 386:721–724.
- Liu SQ, Cull-Candy SG (2000) Synaptic activity at calcium-permeable AMPA receptors induces a switch in receptor subtype. *Nature* 405:454–458.
- Lorenzo L-E, Magnussen C, Bailey AL, St Louis M, De Koninck Y, Ribeiro-da-

- Silva A (2014) Spatial and temporal pattern of changes in the number of GAD65-immunoreactive inhibitory terminals in the rat superficial dorsal horn following peripheral nerve injury. *Mol Pain* 10:57.
- Lu VB, Ballanyi K, Colmers WF, Smith PA (2007) Neuron type-specific effects of brain-derived neurotrophic factor in rat superficial dorsal horn and their relevance to “central sensitization”. *J Physiol* 584:543–563.
- Lu Y, Perl ER (2003) A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci* 23:8752–8758.
- Lu Y, Zheng J, Xiong L, Zimmermann M, Yang J (2008) Spinal cord injury-induced attenuation of GABAergic inhibition in spinal dorsal horn circuits is associated with down-regulation of the chloride transporter KCC2 in rat. *J Physiol* 586:5701–5715.
- Mann R, Schaefer C, Sadosky A, Bergstrom F, Baik R, Parsons B, Nalamachu S, Stacey BR, Tuchman M, Anschel A, Nieshoff EC (2013) Burden of spinal cord injury-related neuropathic pain in the United States: retrospective chart review and cross-sectional survey. *Spinal Cord* 51:564–570.
- Meisner JG, Marsh AD, Marsh DR (2010) Loss of GABAergic Interneurons in Laminae I–III of the Spinal Cord Dorsal Horn Contributes to Reduced GABAergic Tone and Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* 27:729–737.
- Melnick I V, Santos SFA, Safronov B V (2004) Mechanism of spike frequency adaptation in substantia gelatinosa neurones of rat. *J Physiol* 559:383–395.
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1–164.
- Milstein AD, Zhou W, Karimzadegan S, Bredt DS, Nicoll RA (2007) TARP subtypes differentially and dose-dependently control synaptic AMPA receptor gating. *Neuron* 55:905–918.
- Minami T, Sugatani J, Sakimura K, Abe M, Mishina M, Ito S (1997) Absence of

- prostaglandin E2-induced hyperalgesia in NMDA receptor epsilon subunit knockout mice. *Br J Pharmacol* 120:1522–1526.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ (2002) Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* 22:6724–6731.
- Morgado C, Pinto-Ribeiro F, Tavares I (2008) Diabetes affects the expression of GABA and potassium chloride cotransporter in the spinal cord: a study in streptozotocin diabetic rats. *Neurosci Lett* 438:102–106.
- Müller F, Heinke B, Sandkühler J (2003) Reduction of glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in rat spinal lamina I neurons after peripheral inflammation. *Neuroscience* 122:799–805.
- Nees TA, Finnerup NB, Blesch A, Weidner N (2017) Neuropathic pain after spinal cord injury. *Pain* 158:371–376.
- Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799–802.
- Nicol GD, Klingberg DK, Vasko MR (1992) Prostaglandin E2 increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. *J Neurosci* 12:1917–1927.
- Nielsen JB, Crone C, Hultborn H (2007) The spinal pathophysiology of spasticity--from a basic science point of view. *Acta Physiol (Oxf)* 189:171–180.
- Park J-S, Voitenko N, Petralia RS, Guan X, Xu J-T, Steinberg JP, Takamiya K, Sotnik A, Kopach O, Huganir RL, Tao Y-X (2009) Persistent inflammation induces GluR2 internalization via NMDA receptor-triggered PKC activation in dorsal horn neurons. *J Neurosci* 29:3206–3219.
- Patti GJ, Yanes O, Shriver LP, Courade J-P, Tautenhahn R, Manchester M, Siuzdak G (2012) Metabolomics implicates altered sphingolipids in chronic pain of neuropathic origin. *Nat Chem Biol* 8:232–234.

- Pieraut S, Laurent-Matha V, Sar C, Hubert T, Méchaly I, Hilaire C, Mersel M, Delpire E, Valmier J, Scamps F (2007) NKCC1 phosphorylation stimulates neurite growth of injured adult sensory neurons. *J Neurosci* 27:6751–6759.
- Polgár E, Gray S, Riddell JS, Todd AJ (2004) Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain* 111:144–150.
- Polgár E, Hughes DI, Arham AZ, Todd AJ (2005) Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *J Neurosci* 25:6658–6666.
- Polgár E, Hughes DI, Riddell JS, Maxwell DJ, Puskár Z, Todd AJ (2003) Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* 104:229–239.
- Polgár E, Todd AJ (2008) Tactile allodynia can occur in the spared nerve injury model in the rat without selective loss of GABA or GABA(A) receptors from synapses in laminae I-II of the ipsilateral spinal dorsal horn. *Neuroscience* 156:193–202.
- Prato V, Taberner FJ, Hockley JRF, Callejo G, Arcourt A, Tazir B, Hammer L, Schad P, Heppenstall PA, Smith ES, Lechner SG (2017) Functional and Molecular Characterization of Mechanoinsensitive “Silent” Nociceptors. *Cell Rep* 21:3102–3115.
- Punnakkal P, von Schoultz C, Haenraets K, Wildner H, Zeilhofer HU (2014) Morphological, Biophysical and Synaptic Properties of Glutamatergic Neurons of the Mouse Spinal Dorsal Horn. *J Physiol*.
- REXED B (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 96:414–495.
- Rintala DH, Loubser PG, Castro J, Hart KA, Fuhrer MJ (1998) Chronic pain in a community-based sample of men with spinal cord injury: prevalence,

- severity, and relationship with impairment, disability, handicap, and subjective well-being. *Arch Phys Med Rehabil* 79:604–614.
- Rybachuk OA, Lazarenko YA, Krotov V V., Voitenko N V. (2017) Structural/Functional Characteristics of Organotypic Spinal Cord Slices under Conditions of Long-Lasting Culturing. *Neurophysiology* 49:162–164.
- Safronov B V., Pinto V, Derkach VA (2007) High-resolution single-cell imaging for functional studies in the whole brain and spinal cord and thick tissue blocks using light-emitting diode illumination. *J Neurosci Methods* 164:292–298.
- Sandkühler J (2007) Understanding LTP in pain pathways. *Mol Pain* 3:9.
- Sandkühler J (2009) Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* 89:707–758.
- Schoffnegger D, Heinke B, Sommer C, Sandkühler J (2006) Physiological properties of spinal lamina II GABAergic neurons in mice following peripheral nerve injury. *J Physiol* 577:869–878.
- Scholz J, Broom DC, Youn D-H, Mills CD, Kohno T, Suter MR, Moore KA, Decosterd I, Coggeshall RE, Woolf CJ (2005) Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 25:7317–7323.
- Scholz J, Woolf CJ (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 10:1361–1368.
- Sköld C, Levi R, Seiger A (1999) Spasticity after traumatic spinal cord injury: nature, severity, and location. *Arch Phys Med Rehabil* 80:1548–1557.
- Snedecor SJ, Sudharshan L, Cappelleri JC, Sadosky A, Desai P, Jalundhwala YJ, Botteman M (2013) Systematic review and comparison of pharmacologic therapies for neuropathic pain associated with spinal cord injury. *J Pain Res* 6:539–547.
- Somers DL, Clemente FR (2002) Dorsal horn synaptosomal content of aspartate,

- glutamate, glycine and GABA are differentially altered following chronic constriction injury to the rat sciatic nerve. *Neurosci Lett* 323:171–174.
- Sullivan SJ, Farrant M, Cull-Candy SG (2017) TARP γ -2 Is Required for Inflammation-Associated AMPA Receptor Plasticity within Lamina II of the Spinal Cord Dorsal Horn. *J Neurosci* 37:6007–6020.
- Szűcs P, Pinto V, Safronov B V. (2009) Advanced technique of infrared LED imaging of unstained cells and intracellular structures in isolated spinal cord, brainstem, ganglia and cerebellum. *J Neurosci Methods* 177:369–380.
- Takazawa T, MacDermott AB (2010) Glycinergic and GABAergic tonic inhibition fine tune inhibitory control in regionally distinct subpopulations of dorsal horn neurons. *J Physiol* 588:2571–2587.
- Tikhonov DB, Samoilova M V, Buldakova SL, Gmiro VE, Magazanik LG (2000) Voltage-dependent block of native AMPA receptor channels by dicationic compounds. *Br J Pharmacol* 129:265–274.
- Tikhonova TB, Barygin OI, Gmiro VE, Tikhonov DB, Magazanik LG (2008) Organic blockers escape from trapping in the AMPA receptor channels by leaking into the cytoplasm. *Neuropharmacology* 54:653–664.
- Todd AJ (2010) Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11:823–836 Available at:.
- Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V (2013) Neuropathic pain: role for presynaptic T-type channels in nociceptive signaling. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 465:921–927.
- Torsney C, MacDermott AB (2006) Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J Neurosci* 26:1833–1843.
- Tracey I, Bushnell MC (2009) How neuroimaging studies have challenged us to rethink: is chronic pain a disease? *J Pain* 10:1113–1120.
- Traynelis SF, Silver RA, Cull-Candy SG (1993) Estimated conductance of glutamate receptor channels activated during EPSCs at the cerebellar mossy

- fiber-granule cell synapse. *Neuron* 11:279–289.
- Tsuda M, Inoue K, Salter MW (2005) Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in “small” glia. *Trends Neurosci* 28:101–107.
- Tsuda M, Masuda T, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2013) P2X4 receptors and neuropathic pain. *Front Cell Neurosci* 7:191.
- Vikman KS, Rycroft BK, Christie MJ (2008) Switch to Ca²⁺-permeable AMPA and reduced NR2B NMDA receptor-mediated neurotransmission at dorsal horn nociceptive synapses during inflammatory pain in the rat. *J Physiol* 586:515–527.
- Wang X-L, Zhang H-M, Chen S-R, Pan H-L (2007) Altered synaptic input and GABAB receptor function in spinal superficial dorsal horn neurons in rats with diabetic neuropathy. *J Physiol* 579:849–861.
- Wei B, Kumada T, Furukawa T, Inoue K, Watanabe M, Sato K, Fukuda A (2013) Pre- and post-synaptic switches of GABA actions associated with Cl⁻ homeostatic changes are induced in the spinal nucleus of the trigeminal nerve in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Neuroscience* 228:334–348.
- West SJ, Bannister K, Dickenson AH, Bennett DL (2015) Circuitry and plasticity of the dorsal horn - Toward a better understanding of neuropathic pain. *Neuroscience* 300:254–275.
- Weyer AD, Zappia KJ, Garrison SR, OHara CL, Dodge AK, Stucky CL (2016) Nociceptor Sensitization Depends on Age and Pain Chronicity. *eNeuro* 3.
- Woller SA, Hook MA (2013) Opioid administration following spinal cord injury: implications for pain and locomotor recovery. *Exp Neurol* 247:328–341.
- Xiao WH, Bennett GJ (2008) C-fiber spontaneous discharge evoked by chronic inflammation is suppressed by a long-term infusion of lidocaine yielding nanogram per milliliter plasma levels. *Pain* 137:218–228.
- Xie W, Strong JA, Meij JTA, Zhang J-M, Yu L (2005) Neuropathic pain: early

- spontaneous afferent activity is the trigger. *Pain* 116:243–256.
- Yan X, Weng H-R (2013) Endogenous interleukin-1 β in neuropathic rats enhances glutamate release from the primary afferents in the spinal dorsal horn through coupling with presynaptic N-methyl-D-aspartic acid receptors. *J Biol Chem* 288:30544–30557.
- Yasaka T, Kato G, Furue H, Rashid MH, Sonohata M, Tamae A, Murata Y, Masuko S, Yoshimura M (2007) Cell-type-specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro. *J Physiol* 581:603–618.
- Yasaka T, Tiong SYX, Hughes DI, Riddell JS, Todd AJ (2010) Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 151:475–488.
- Yokoyama K, Kurihara T, Makita K, Tanabe T (2003) Plastic change of N-type Ca channel expression after preconditioning is responsible for prostaglandin E2-induced long-lasting allodynia. *Anesthesiology* 99:1364–1370.
- Zaitsev A V, Kim KK, Fedorova IM, Dorofeeva NA, Magazanik LG, Tikhonov DB (2011) Specific mechanism of use-dependent channel block of calcium-permeable AMPA receptors provides activity-dependent inhibition of glutamatergic neurotransmission. *J Physiol* 589:1587–1601.
- Zeilhofer HU, Wildner H, Yévenes GE (2012) Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev* 92:193–235.
- Zhang H, Xie W, Xie Y (2005) Spinal cord injury triggers sensitization of wide dynamic range dorsal horn neurons in segments rostral to the injury. *Brain Res* 1055:103–110.
- Zhang W, Liu L-Y, Xu T-L (2008) Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience* 152:502–510.