

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

---

*Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису*

Телька Марія Василівна

УДК 577.352.54:611.891.3:615.217.22

**ЗМІНИ ЕЛЕКТРИЧНОЇ АКТИВНОСТІ НЕЙРОНІВ  
ГАНГЛІЯТРІЙЧАСТОГО НЕРВА ПРИ НОРАДРЕНЕРГІЧНІЙ  
МОДУЛЯЦІЇ КАЛЬЦІЄВИХ СТРУМІВ**

Спеціальність 03.00.02 – Біофізика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Телька М. В. \_\_\_\_\_

Науковий керівник: Федулова Світлана Анатоліївна, д.б.н., професор

**Київ – 2020**

## АНОТАЦІЯ

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

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

Дисертаційна робота присвячена виявленню особливостей норадренергічної модуляції електричної активності та струмів через потенціалкеровані кальцієві канали (ПКК) нейронів ганглія трійчастого нерва (ГТН). Електрофізіологічні дослідження проводилися на первинній культурі клітин ГТН. У роботі використані методи фіксації потенціалу/струму в конфігурації «ціла клітина» та локальної суперфузії норадреналіну (НА) та селективних блокаторів ПКК і адренорецепторів (АР). Аплікація НА на сому культивованих нейронів ГТН моделює симпато-сенсорну взаємодію в провідних шляхах трійчастого нерва. Показано, що у цих нейронах зміни у викликаній електричній активності здійснюються за рахунок зв'язку АР з потенціалкерованими каналами: ПКК та активованих гіперполяризацією. Вперше на нейронах ГТН був проведений аналіз впливу НА на струми через ПКК. Виявлено, що у більшості нейронів (91%) НА пригнічує кальцієвий струм, при цьому виділяються два електрофізіологічно відмінні типи модуляції: зменшення лише амплітуди струму без змін у кінетиці (62%) та зменшення амплітуди, яке супроводжувалося уповільненням кінетики (29%). Встановлено, що модуляція другого типу здійснюється за рахунок впливу  $G\beta\gamma$ -субодиниці АР на ПКК. Показано, що норадренергічна модуляція струмів через ПКК нейронів ГТН лише частково (на 60%) опосередковується  $\alpha_2$ -АР. Сумарний модуляторний вплив НА реалізується у значній мірі через ПКК N-типу (52% від сумарного ефекту), середній внесок R- та P/Q каналів складає відповідно 35 та 13%.

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

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

## SUMMARY

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

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

The aim of this study was to reveal properties of noradrenergic modulation of electrical activity and calcium currents in cultured trigeminal ganglion (TG) neurons. Noradrenaline (NA)-induced changes of electrophysiological characteristics were investigated using patch-clamp whole-cell technique in current/voltage clamp modes. NA application on the TG neuron soma simulates sympatho-sensory interaction in the trigeminal pathways. It was shown that changes in evoked electrical activity occur due to adrenoceptors interactions with hyperpolarization-activated cationic and calcium channels. In the first time NA influence on calcium currents in TG neurons was analyzed. It was found that the adrenergic effect is present in majority of the neurons (92%) and two electrophysiologically different types of the modulatory effect are present: a decrease in the current amplitude with no kinetic changes (62%, I type) and kinetic-slowness decreasing of the amplitude (29%, II type). It was established that the second type of modulation is carried out by coupling of G $\beta\gamma$ -subunit with calcium

channel. It was shown that noradrenergic modulation of calcium currents partially (60%) mediates by  $\alpha_2$ -adrenoceptors activation. It was found that NA effect on calcium currents realizes mainly via N-type channels (52% of the total effect), R- and P/Q-type channels contribute respectively 35 and 13%.

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

Key words: trigeminal ganglion neurons, noradrenaline, electrical activity, calcium currents.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### В яких опубліковані основні наукові результати:

1. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Електрофізіологічні властивості нейронів трійчастого ганглія в первинній культурі. Нейрофізіологія / Neurophysiology. 2013; 1 (45): 92-6. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*
2. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Характеристика електричної активності нейронів ганглія трійчастого нерва в первинній культурі. Фізіологічний журнал 2016; 2 (62): 24-34. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*
3. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Зміни в адренергічній модуляції кальцієвих струмів нейронів ганглія трійчастого нерва, викликані фактором росту нервової тканини. Фізіологічний журнал. 2017; 4 (63):17-23 *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень,*

*статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*

4. **Телька МВ**, Маслов ВЮ, Федулова СА, Веселовський МС. Вплив норадреналіну на електричну активність культивованих нейронів ганглія трійчастого нерва. *Фізіологічний журнал*. 2019; 6 (65): 22-9. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*
5. **Телька МВ**, Маслов ВЮ, Веселовський МС, Федулова СА. Адренергічна модуляція високопорогових потенціал-керованих кальцієвих струмів у нейронах ганглія трійчастого нерва. *Фізіологічний журнал*. 2020; 1 (66): 75-82 *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*

#### **Додаткові**

6. **Телька МВ**, Пурнинь ОЕ, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Електрофізіологічні властивості симпатичних нейронів у первинній культурі верхнього шийного ганглія щура. *Нейрофізіологія / Neurophysiology*; 2011; №3 (43): 261-264. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*

#### **НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ:**

1. **Telka MV**, Veselovsky NS. Electrophysiological properties of cultured rat trigeminal ganglion neurons, II International Symposium “Molecular Mechanisms of Synaptic transmission regulation” in memory of Prof. Vladimir Skok, 6 – 9 October 2012, Kyiv, Ukraine.

2. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Модулюючий вплив норадреналіна на електричну активність нейронів ганглія трійчастого нерва, VI Конгрес Українського товариства нейронаук, 4 – 8 червня 2014, Київ, Україна
3. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Вплив фактору росту нервової тканини на адренергічну модуляцію високопорогових кальцієвих струмів нейронів ганглія трійчастого нерва, VII Конгрес Українського Товариства Нейронаук, 7 – 11 червня 2017, Київ, Україна
4. **Telka MV**, Veselovsky NS. Influence of adrenergic stimulus on excitability of cultured trigeminal ganglion neurons, International neuroscience graduate summer workshop and practical training “Gazi-EgeBINGSS” in honor of Prof. Gonul O. Peker “Neuroinflammation: a sneaky FOE or a reliable FRIEND”, 25 – 29 June 2018, Ankara, Turkey
5. **Telka MV**, O.V. Ryhalsky OV, Veselovsky NS. NGF-induced augmentation of adrenergic modulation of calcium currents in cultured trigeminal ganglion neurons; Abstract book of FENS Regional Meeting, Belgrade, Serbia, July 10-13, 2019 P.674
6. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Пурнинь ОЕ, Веселовський МС. Роль А2-адренорецепторів у потенціалкерованих кальцієвих струмів нейронів ганглія трійчастого нерва, XX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка, 27 – 30 травня 2019, Київ, Україна Фізіологічний журнал Т.65, №3 Додаток, С.27
7. **Телька МВ**, Маслов ВЮ, Веселовський МС, Федулова СА Моделювання адренергічного впливу на нейрони ганглія трійчастого нерва, VIII Національний конгрес патофізіологів України присвячений 120-річчю Одеської патофізіологічної школи, 13 – 15 травня 2020, Одеса Україна, Збірка тез, С. 202-203

## ДОДАТКОВІ

1. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Пурнинь ОЕ, Веселовський МС. Утворення синаптичних зав'язків нейронами первинної культури верхніх шийних гангліїв, конференція молодих учених «Фізіологія: від молекул до організму», 20 – 21 жовтня 2011, Київ Фізіологічний журнал Т.65, №3 Додаток, С.27
2. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Пурнинь ОЕ, Веселовський МС. Електрофізіологічні дослідження симпатичних нейронів первинної культури верхнього шийного ганглія щура, V Конгрес Українського товариства нейронаук, 6 – 10 червня 2011, Київ, Україна
3. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Пурнинь ОЕ, Веселовський МС. Швидкі синаптичні відповіді культивованих нейронів верхнього шийного ганглія, V з'їзд Українського Біофізичного Товариства 2011, Луцьк, Україна

## **ЗМІСТ**

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....</b>	<b>11</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>12</b>
<b>РОЗДІЛ 1 .....</b>	<b>17</b>
<b>ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....</b>	<b>17</b>
1.1 СТРУКТУРА ТА ФУНКЦІЇ ГАНГЛІЯ ТРІЙЧАСТОГО НЕРВА .....	17
1.1.1 Будова та фізіологічні властивості нейронів ганглія трійчастого нерва.....	17
1.1.2 Класифікація нейронів ГТН.....	17
1.2 ХАРАКТЕРИСТИКИ АДРЕНЕРГІЧНОЇ МОДУЛЯЦІЇ ЕЛЕКТРИЧНОЇ АКТИВНОСТІ В НЕЙРОНАХ СЕНСОРНИХ ГАНГЛІЇВ .....	19
1.2.1 Морфологія симпатичного впливу на сенсорні ганглії.....	20
1.3 ТИПИ АДРЕНОРЕЦЕПТРІВ, ЩО БЕРУТЬ УЧАСТЬ У АДРЕНЕРГІЧНІЙ МОДУЛЯЦІЇ.	21
1.4 АДРЕНЕРГІЧНИЙ ВПЛИВ НА ПОТЕНЦІАЛКЕРОВАНІ ІОННІ КАНАЛИ .....	24
1.5 АДРЕНЕРГІЧНА МОДУЛЯЦІЯ КАЛЬЦІЄВИХ КАНАЛІВ .....	24
1.5.1 Електрофізіологічні характеристики низько- та високопорогових ПКК.....	25
1.5.2 Будова ПКК.....	25
1.5.3 Класифікація ПКК на основі біофізичних та фармакологічних характеристик .....	27
1.5.4 Роль субодиниць ПКК у функціонуванні та електрофізіологічних параметрах струмів .....	28
1.5.5 Характеристики струмів через ПКК в нейронах сенсорних гангліїв	28
1.5.6 Електрофізіологічні характеристики адренергічної модуляції ПКК в нейронах.....	29
1.5.7 Внутрішньоклітинні шляхи, що індукуються АР.....	30
<b>РОЗДІЛ 2 .....</b>	<b>32</b>
<b>МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>32</b>



2.1	ПЕРВИННА КУЛЬТУРА НЕЙРОНІВ ГТН .....	32
2.2	РОЗЧИНИ ТА РЕАКТИВИ, ЩО ВИКОРИСТОВУВАЛИСЬ У ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ.....	33
2.3	ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА УСТАНОВКА .....	35
2.3.1	Реєстрація та аналіз викликаної електричної активності .....	37
2.4	РЕЄСТРАЦІЯ СТРУМІВ В РЕЖИМІ ФІКСАЦІЯ ПОТЕНЦІАЛУ .....	38
2.5	МЕТОД ЛОКАЛЬНОЇ СУПЕРФУЗІЇ.....	39
2.6	СХЕМА ЕКСПЕРИМЕНТУ .....	42
2.7	СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА ДАННИХ .....	42
<b>РОЗДІЛ 3 .....</b>		<b>43</b>
<b>РЕЗУЛЬТАТИ.....</b>		<b>43</b>
3.1	НОРАДРЕНЕРГІЧНА МОДУЛЯЦІЯ ВИКЛИКАНОЇ ЕЛЕКТРИЧНОЇ АКТИВНОСТІ НЕЙРОНІВ ГТН.....	43
3.1.1	Поділ нейронів ГТН за типом електричної активності.....	43
3.1.2	Пасивні електрофізіологічні характеристики нейронів ГТН .....	43
3.1.3	Активні електрофізіологічні характеристики нейронів ГТН .....	46
3.1.4	Відмінності у електрофізіологічних показниках між чутливими та резистивними до тетродотоксину нейронами ГТН .....	51
3.1.5	Вплив НА на пасивні показники нейронів ГТН .....	51
3.1.6	Норадренергічна модуляція електричної активності нейронів ГТН .	56
3.2	ВПЛИВ НА НА СТРУМИ ЧЕРЕЗ ПОТЕНЦІАЛКЕРОВАНІ КАЛЬЦІЄВІ КАНАЛИ .....	56
3.2.1	Роль іонів кальцію у електричній активності нейронів ГТН .....	59
3.2.2	Характеристики струмів через потенціалкеровані кальцієві канали нейронів ГТН .....	60
3.2.3	НА-індуковане пригнічення струмів через кальцієві канали .....	67
3.2.4	Типи норадренергічної модуляції струмів через ПМК нейронів ГТН	68
3.2.5	Вплив високоамплітудної деполяризації на НА-викликане пригнічення струмів через кальцієві канали. ....	72

3.2.6	Потенціалзалежність НА-індукованого пригнічення струму через ПКК у нейронах ГТН.....	76
3.2.7	Вплив НА на стаціонарну інактивацію барієвих струмів через ПКК	78
3.3	УЧАСТЬ $A_2$ -АР У АДРЕНЕРГІЧНІЙ МОДУЛЯЦІЇ ПКК НЕЙРОНІВ ГТН.....	79
3.4	УЧАСТЬ РІЗНИХ ТИПІВ ВИСОКОПОРОГОВИХ ПКК У АДРЕНЕРГІЧНІЙ МОДУЛЯЦІЇ	79
3.4.1	Роль N-типу високопорогових ПКК у адренергічній модуляції.....	80
3.4.2	Участь P/Q типу ПКК у адренергічній модуляції в нейронах ГТН...	82
3.4.3	Участь L типу ПКК у адренергічній модуляції у нейронах ГТН.....	83
3.4.4	Чутливість токсин-резистивного кальцієвого струму до НА.....	83
3.5	ВПЛИВ ІОНІВ КАЛЬЦІЮ НА МОДУЛЯЦІЮ НА СТРУМІВ ЧЕРЕЗ ПКК.....	86
3.6	ВПЛИВ ФРНТ НА НОРАДРЕНЕРГІЧНУ МОДУЛЯЦІЮ СТРУМІВ ЧЕРЕЗ ПКК	
	НЕЙРОНІВ ГТН.....	89
<b>РОЗДІЛ 4 .....</b>		<b>91</b>
<b>ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ .....</b>		<b>91</b>
4.1	ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕЙРОНІВ ГТН .....	91
4.2	НА-ІНДУКОВАНІ ЗМІНИ У ЕЛЕКТРИЧНІЙ АКТИВНОСТІ НЕЙРОНІВ ГТН.....	93
4.3	ШЛЯХИ ВПЛИВУ НА ПКК ПРИ АКТИВАЦІЇ АДРЕНОРЕЦЕПТОРІВ .....	94
4.4	УЧАСТЬ $A_2$ -АДРЕНОРЕЦЕПТОРІВ У НА-ІНДУКОВАНІЙ МОДУЛЯЦІЇ СТРУМІВ	
	ЧЕРЕЗ ПКК.....	96
4.5	ЧУТЛИВІ ДО НОРАДРЕНЕРГІЧНОГО ВПЛИВУ ТИПИ ПКК НЕЙРОНІВ ГТН .....	98
<b>ВИСНОВКИ .....</b>		<b>100</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>		<b>101</b>
<b>ДОДАТОК 1.....</b>		<b>121</b>
<b>СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ .....</b>		<b>121</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГТН	ганглії трійчастого нерва
ГДК	ганглії дорсальних корінців
АР	адренорецептор
цАМФ	циклічний аденозинмонофосфат
ПКС	протеїназа С
ПКК	потенціалкеровані кальцієві канали
EGTA	етилєнглїколь-біс(2-аміноєтиловий ефір)-тетраоцтова кислота
HEPES	4-(2-гідроксієтил) піперазин-1-етансульфонова кислота
TEA	тетраєтиламонія
G-білок	гуанїннуклеотид зв'язуючи білок
$\alpha_2$ -АР	$\alpha_2$ адренорецептор
4-АР	4-амінопіридин
ВАХ	Вольт-амперна характеристика
ПД	потенціал дії
НА	норадреналін
ФРНТ	фактор росту нервової тканини

## ВСТУП

### Актуальність теми

Первинна сенсорна інформація надходить з периферії до центральної нервової системи по псевдоуніполярними нейронами, соми яких утворюють сенсорні ганглії: ганглії дорсальних корінців (ГДК) (проводять імпульси від шкірних покривів тіла, епітеліальних тканин, м'язів, кісток та суглобів, входять до складу периферичних нервів) та ганглії трійчастого нерва (ГТН) (передають сенсорну інформацію від механорецепторів, ноцицепторів та терморецепторів голови та шиї, рогівки ока, епітелію носової та ротової порожнини і входять до складу V пари черепних нервів). Соми сенсорних нейронів мають адренергічні рецептори (АР), що відіграють важливу роль у модуляції сенсорних сигналів при нормі та за умов патологічних станів, у які залучена симпатична нервова система (аллодінія та/або гіпералгезія). При порушеннях периферичних нервів запускаються процеси проростання постгангліонарних симпатичних волокон, які утворюють кошикоподібні структури (арборизації) навколо сом сенсорних нейронів [1-3]. Норадреналін (НА) вивільнюється з симпатичних волокон і активує АР нейронів сенсорних гангліїв. Це зумовлює модуляцію електричної активності, опосередковану впливом на потенціалкеровані іонні канали. [4-7]. Сучасні уявлення про адренергічну модуляцію електричної активності первинних аферентів базуються на даних, отриманих на клітинах ГДК, тоді як нейрони ГТН у цьому аспекті залишаються недослідженими. Також слід відзначити, що патологічні зміни у системі трійчастого нерва мають морфологічні та фізіологічні відмінності у порівнянні з такими у периферичних [8, 9]. Вплив НА на електричну активність нейронів ГТН за умов культивування може бути розглядати як *in vitro* моделлю симпатичного впливу на передачу сенсорного сигналу на рівні первинних аферентів.

НА після зв'язування з АР активують G-білок, субдиниці, якого ( $G\alpha$  та  $G\beta\gamma$ ) запускають каскади внутрішньоклітинних процесів. Модуляція електричної активності може здійснюватися як внаслідок прямого  $G\beta\gamma$  впливу на іонні канали, так із залученням вторинних посередників (цАМФ, РКС) [10-12]. Головною мішенню в нейронах адренергічного впливу є потенціал-керовані кальцієві канали (ПКК). У нейронах сенсорних гангліїв ПКК не лише беруть участь у кальцієвій сигналізації, а й відіграють у формі потенціалу дії (ПД). Активація АР викликає конформаційні зміни ПКК, які можуть відбуватися за рахунок різних внутрішньоклітинних процесів [10]. Характеристики модулюючого впливу НА на ПКК в нейронах ГТН залишилися недослідженими.

### **Мета та завдання дослідження**

**Мета роботи:** визначення механізмів впливу норадреналіну на електричну активність культивованих нейронів ГТН

**Предмет досліджень:** модуляція викликаної електричної активності та струмів через ПКК нейронів ГТН під впливом НА.

**Об'єкт досліджень:** викликана електрична активність та струми через ПКК нейронів ГТН.

Для досягнення мети було поставлено такі **завдання**:

1. охарактеризувати вплив НА на електрофізіологічні показники культивованих нейронів ГТН;
2. визначити НА-індуковані зміни у характеристиках струмів через ПКК;
3. ідентифікувати типи ПКК, задіяні у норадренергічній модуляції кальцієвих струмів нейронів ГТН;
4. визначити роль  $\alpha_2$ -АР у НА-індукованій модуляції струмів через ПКК.

Для вирішення вищезгаданих задач були застосовані наступні **методи**:

- культивування дисоційованих нейронів ГТН;
- реєстрація електричної активності та іонних струмів від окремих нейронів за умов фіксації потенціалу/струму в конфігурації “ціла клітина”;
- локальна перфузія для аплікації фармакологічно активних речовин;
- статистичний аналіз отриманих результатів.

### **Наукова новизна отриманих результатів**

У дисертаційній роботі досліджена і охарактеризована норадренергічна модуляція електрофізіологічних характеристик та струмів через ПКК у культивованих нейронах ГТН. Вперше показано, що вплив НА на електричну активність нейронів ГТН реалізується внаслідок взаємодії АР з високوپороговими ПКК та іонними каналами, що активуються гіперполяризацією. Вперше на нейронах ГТН виявлено два відмінні за електрофізіологічними характеристиками типи норадренергічної модуляції струмів через ПКК. Кількісно визначено середній внесок ПКК різних типів у сумарний струм при дії НА. Отримані експериментальні дані доповнюють уявлення про механізми адренергічної модуляції сенсорних нейронів, які відіграють важливу роль у нормі та за умов нейропатичних станів, у які залучена симпатична нервова система.

### **Особистий внесок пошукувача**

Особисто здобувачем були опрацьовано літературні джерела по темі, приготування первинної культури дисоційованих клітин ГТН, проведено електрофізіологічні дослідження та обробку отриманих результатів. Налагодження установки для електрофізіологічних досліджень виконано за співучасті м.н.с. Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ О.В.

Рихальського. Розробка плану дисертаційної роботи та аналіз отриманих результатів проводилися здобувачем за участі наукового керівника та ст.н.с. В.Ю. Маслова. Здобувачем було здійснено написання всіх розділів дисертації та підготовка її до друку..

### **Апробація результатів дисертації**

Результати досліджень були представлені на наступних наукових конференціях: FENS Regional Meeting (10-13 липня 2019 р., Белград, Сербія); XX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка (27-30 травня 2019р., Київ, Україна); VII Конгрес Українського Товариства Нейронаук (7-11 червня 2017 р., Київ, Україна); International neuroscience graduate summer workshop and practical training “Gazi-EgeBINGSS” in honor of Prof. Gonul O. Peker ( 25-29 червня 2018 р., Анкара, Туреччина); VI Конгрес Українського товариства нейронаук (4-8 червня 2014 р., Київ, Україна); II International Symposium “Molecular Mechanisms of Synaptic transmission regulation” in memory of Prof. Vladimir Skok (6-9 October 2012 р., Kyiv, Ukraine); VIII Національний конгрес патофізіологів України присвячений 120-річчю Одеської патофізіологічної школи (13-15 травня 2020 р., Одеса, Україна).

### **Теоретичне та практичне значення отриманих результатів**

Дослідження НА-індукованих змін у характеристиках викликаної електричної активності та кальцієвих струмів нейронів ГТН мають фундаментальне значення, оскільки розширюють уявлення про модуляторні взаємодії між різними відділами периферичної нервової системи. Практичне значення отриманих результатів зумовлено роллю симпато-сенсорних взаємодій у розвитку нейропатичних станів.

У наших дослідженнях виявлено, що в нейронах ГТН НА-індуковані зміни електричної активності обумовлені впливом на ПКК та канали, що активуються

гіперполяризацією. Показано, що норадренергічний вплив на ПКК - лише частково, на відмінну від ГДК реалізується завдяки активації  $\alpha_2$ -АР. Виявлено два електрофізіологічно відмінні типи впливу НА на струми через ПКК, які розрізняються дією на кінетику струму. Ці результати доповнюють уявлення про вплив симпатичної нервової системи на передачу сенсорного сигналу в системі трійчастого нерва та можуть бути використані у неврологічній клінічній практиці при застосуванні антагоністів ПКК та адренолітиків/адреноміметиків. Отримані дані також можуть бути корисні при викладанні курсів біофізики, фізіології та патофізіології.

## **Публікації**

Матеріали дисертації представлено у 11 публікаціях: 5 статей у рекомендованих ДАК України фахових журналах та 7 тез доповідей наукових конференцій.



## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

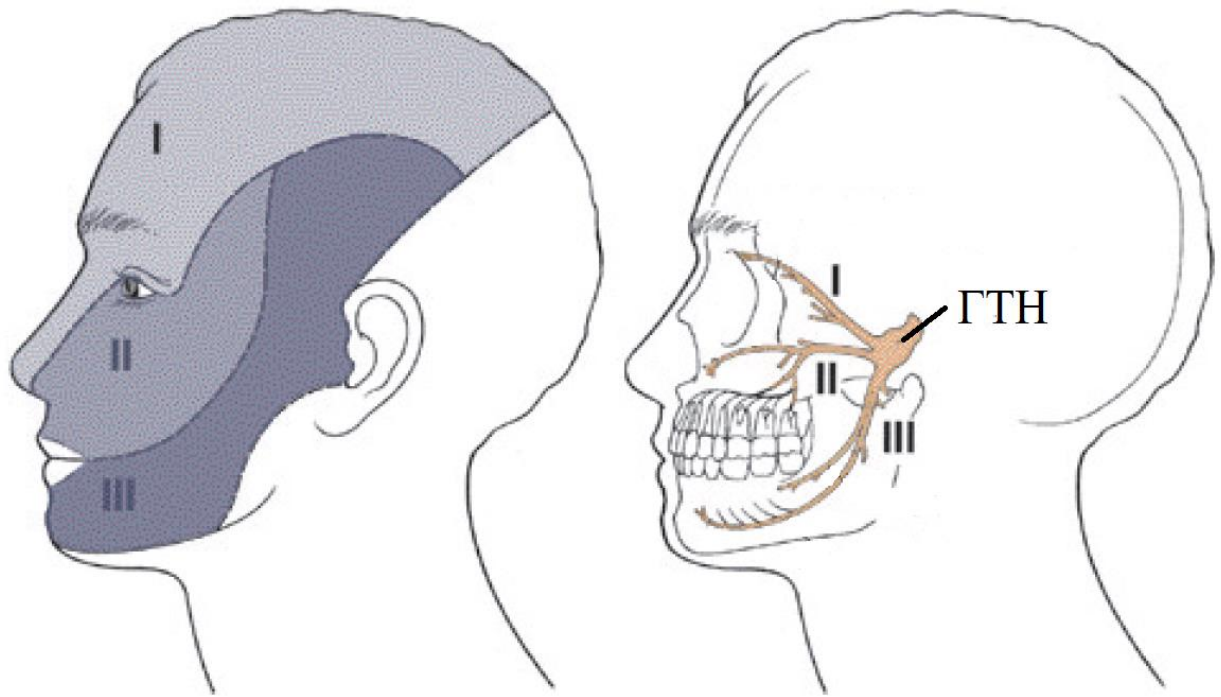
#### **1.1 Структура та функції ганглія трійчастого нерва**

##### **1.1.1 Будова та фізіологічні властивості нейронів ганглія трійчастого нерва**

Ганглії трійчастого нерва (ГТН) або гассерів вузол містить соми псевдоуніполярних нейронів, аксони яких формують афферентні волокна гілок трійчастого нерва. ГТН є аналогом гангліїв дорсальних корінців спинного мозку (ГДК). Він знаходиться на вершині пірамідки скроневої кістки в розщепленні твердої мозкової оболонки. Периферичні закінчення утворюють три гілки: очний, верхньо- та нижньощелеповий нерви (Рис. 1.1). Очний нерв забезпечує чутливу іннервацію шкіри ділянки лоба, переднього відділу волосистої частини голови, верхньої повіки, внутрішнього кута ока, спинки носа, кон'юнктиви та верхньої частини слизової оболонки носа. Верхньощелеповий нерв іннервує шкірні покриви нижньої повіки, бічної поверхні носа, щік, верхньої губи, нижню частину слизової оболонки носа, верхню щелепу і її зуби. Нижньощелеповий нерв іннервує шкіру нижньої щелепи, щік, нижньої губи, підборіддя, нижню щелепу та її зуби, слизову оболонку щік, нижні частини порожнини рота та язика [13, 14]. Центральні частини аксонів терміналей утворюють корінець трійчастого нерва, який входить до стовбура мозку і робить проєкції на ядрах трійчастого нерва (головне, спинномозкове, середньомозкове) [15]. Третинні нейрони шляхів трійчастого нерва розташовані в таламусі, від яких сигнали доходять до тригімінальних центрів головного мозку [16, 17].

##### **1.1.2 Класифікація нейронів ГТН**

Нейрони ГТН є різні за ембріогенним походженням, тому відрізняються морфологічними та електрофізіологічними параметрами [18-20].



**Рис.1.1. Анатомічна схема іннервації трійчастим нервом. *Ліворуч* розподіл іннервації шкірних покривів гілками трійчастого нерва. *Праворуч* периферична частина трійчастого нерва, у якій аксони псевдоуніполярних нейронів формують три гілки I – очний нерв; II – верхньощелеповий нерв; III – нижньощелеповий нерв (модифіковано з Fried K. Et al., 2001).**

Нейрони ГТН, як і ГДК, поділяють на три групи за розміром соми: маленькі (20-30мкм), середні (30-50 мкм) та великі (50-80мкм) [21, 22]. Аксони цих груп нейронів за рахунок різного рівня мієлінізації відрізняються за швидкістю передачі сигналу і класифікуються як  $A\alpha\beta$ ,  $A\delta$  та  $C$  волокна [14]. Сильно мієлінізовані волокна  $A\alpha\beta$  у більшості випадків проводять імпульси від низькопорогових механорецепторів, що розташовані на шкірних покривах.  $C$ -волокна та  $A\delta$ - у переважно проводять імпульси від ноцицепторів [23]. Окремо класифікують волокна, які проводять сенсорну інформацію від рогівки ока, іннервація якої здебільшого здійснюється слабомієлінізованими або немієлінізованими полімодальними та механочутливими нейронами [23, 24]. У роботах на ГТН миші показано, що нейрони  $A\delta$  та  $C$  волокна рогівки ока

відрізняються за електрофізіологічними показниками та чутливістю до ТТХ від таких, що проводять сенсорну імпульсацію від шкірних покривів. Відповідність між розміром соми, електрофізіологічних показників нейронів та швидкістю проведення сигналу дозволила в експериментах *in vitro* ідентифікувати ноцицептивні нейрони [23, 25-27]. Насамперед, більшість цих нейронів мають найменший розмір соми [28].

Відмінності електрофізіологічних показників викликані експресією різного набору потенціал- та хемокерованих іонних каналів [29]. Наприклад, нейрони А $\delta$  та С волокон генерують ПД з тривалішою фазою реполяризації [23, 25, 27]. Нейрони С волокон відрізняються від інших меншим деполяризаційним вигином при гіперполяризації мембрани, який виникає при активації каналів, що активуються гіперполяризацією [23, 24]. Показано, що в значній мірі (87%) клітинні тіла С-волокон ГТН є частково або повністю нечутливими до ТТХ, що дозволяє в експериментах *in vitro* ідентифікувати даний тип нейронів [30].

Отже, диференціація субпопуляцій нейронів ГТН в експериментах *in vitro* зазвичай ґрунтується на кореляціях по декількох електрофізіологічних параметрах, розміром соми, чутливість до різних нейромодуляторів.

## **1.2 Характеристики адренергічної модуляції електричної активності в нейронах сенсорних гангліїв**

Сенсорна інформація, що надходить до ЦНС модулюється вже на рівні первинних аферентних нейронів. Зміни у проведенні сенсорного сигналу до вторинних нейронів можуть виникати при впливі на потенціал- та хемокеровані іонні канали соми клітини, тому що не ідентифіковано синаптичних контактів між нейронами сенсорних гангліїв. Важливий є вплив на нейрони ГТН з боку симпатичної нервової системи. Симпатосенсорні взаємодії реалізуються за рахунок активації АР, що розташовані на сомі нейронів сенсорних гангліїв, при вивільненні НА з постгангліонарних симпатичних закінчень. НА-індуковані

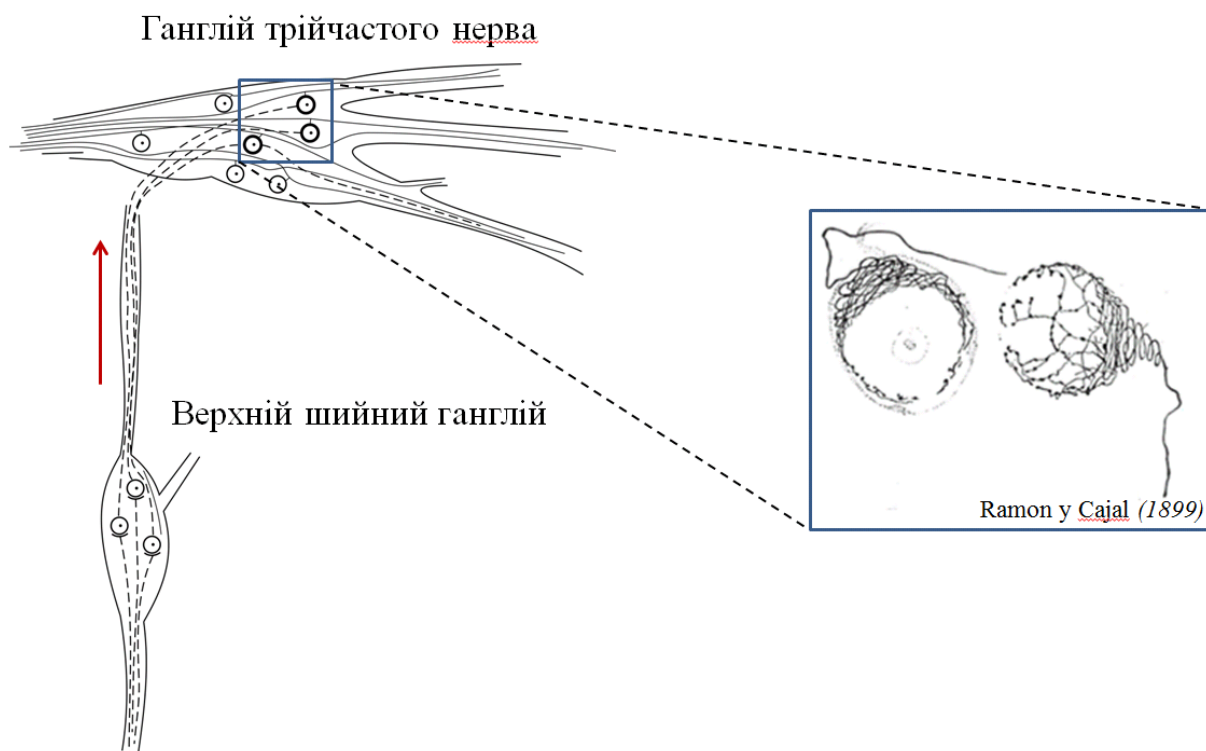
зміни у електричній активності ініціюються внаслідок впливу АР на потенціалкеровані іонні канали.

### **1.2.1 Морфологія симпатичного впливу на сенсорні ганглії**

Перші припущення щодо зав'язків симпатичних волокон та нейронів ГТН було зроблено гістологом С.Рамон-і-Кахалем, у роботах якого виявлено кошикоподібні структури навколо нейронів ГТН [31] (Рис.1.2). У подальшому було доведено їх симпатичне походження і катехоламінергічний вплив, що здійснюється за рахунок вивільнення НА [32]. Нейрони ГТН отримують постгангліонарні симпатичні входи від верхнього шийного ганглія (ВШГ) [33, 34]. Імунноцитохімічні дослідження на лінії мишей зі збільшеним рівнем нейротрофіну, фактора росту нервової тканини (ФРНТ), показали, що саме симпатичні волокна проростають до сом ФРНТ-позитивних нейронів [35].

При нейропатіях периферичних нервів зареєстровано полегшення при блокуванні передачі симпатичних імпульсів [36-39], і саме при цих патологіях зареєстровано інтенсивне проростання симпатичних волокон в сенсорні ганглії. Такі процеси у ГДК спостерігаються при ушкодженні периферичних нервів і відіграють ключову роль у патогенезі нейропатичних станів, що підтримуються симпатичною нервовою системою [1, 2, 40]. Тригерним механізмом проростання симпатичних волокон є підвищення рівня нейротрофінів та пептидів, таких як ФРНТ [41, 42] та цитокіни (інтерлейкін-6, ЛЕК), які значною мірою виділяються при запаленні [43-46].

На відмінну від ГДК, при пошкодженні трійчастого нерва збільшення кошикоподібних структур в ГТН не було зареєстровано [8, 9, 47]. Проте проростання постгангліонарних волокон ВШГ було зареєстровано у відповідь на введення ФРНТ [48, 49].



**Рис. 1.2. Схема симпатосенсорних зв'язків в ганглії трійчастого нерва (модифіковано з Matthews B. та Robinson P.P.)**

М.Девор зі співавторами показали у експериментах *in vivo* зв'язок між постгангліонарними симпатичними волокнами та нейронами ГДК щурів з механічним пошкодженням сідничного нерва [50]. Результати електронної мікроскопії не виявили наявності симпато-аксональних контактів між нейронами сенсорних гангліїв та симпатичних закінчень [51]. Лише окремі роботи доводять наявність функціональних синаптичних контактів [52, 53].

### **1.3 Типи адренорецептрів, що беруть участь у адренергічній модуляції**

АР – це трансмембранні G-білкоспряжені білки, які відносяться до родопсинової родини метаботропних рецепторів [54]. Лігандом цих рецепторів є нейрогормони норадреналін та адреналін. Вони локалізовані на нейронах, гладенькій мускулатурі внутрішніх органів та серці. У нейронах через АР

відбувається модуляція електричної активності [55, 56] та синаптичної передачі [57-60].

АР поділяються на  $\alpha$ - та  $\beta$ - типи, які відрізняються між собою будовою та фармакологічною чутливістю [61]. У свою чергу, кожний тип поділяється на підтипи  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  та  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  [62]. Ядро цього рецептора складається з семи трансмембранних доменів (ТМІ-VII), що зв'язані між собою трьома внутрішньо- та трьома зовнішньоклітинними петлями з зовнішньоклітинною N- та внутрішньоклітинною C- терміналами [63]. Місце зв'язування ліганда АР знаходиться всередині ТМ-III [64, 65] (Рис.1.3). Конформаційні зміни у ядрі АР запускають G-білок залежні та незалежні внутрішньоклітинні процеси. Останні ініціюються за рахунок спеціальних кіназ, таких як GRK (G protein-coupled receptor kinases), які через  $\beta$ -аррестіни можуть призводити до десенситизації або інтерналізації АР [66].

У стані спокою G-білок є гетеротримером, що складається з  $\alpha$ - та  $\beta$ -  $\gamma$ - субодиниць. Ці субодиниці зв'язані з гуанозиндифосфатом. Конформаційні зміни у 7-ТМ структурі відбуваються внаслідок обміну гуанозиддифосфату (ГДФ) на гуанозинтрифосфат (ГТФ) на  $\alpha$ -субодиниці G-білка, що призводить до дисоціації  $G\alpha$  та  $\beta\gamma$ . Відокремлені субодиниці G-білка можуть впливати на іонні канали прямо або через вторинні посередники. Найчастіше вплив на канали здійснюється внаслідок фосфорилування, яке запускається протеїнкіназами, активність яких залежить від сигнальних шляхів.

Кожний із АР зв'язаний з відповідним G-білком  $\alpha_1$ -АР з  $G_q$ ,  $G_{11}$ , та  $G_h$  [67-70];  $\alpha_2$ -АР з  $G_{i/o}$  та  $G_s$  [71, 72];  $\beta$ -АР з  $G_s$ ,  $G_i$  [73, 74]. Відповідно до типу G білка запускається певний сигнальний шлях. Наприклад, активація  $G_q$  призводить до активації фосфоліпази C,  $G_{i/o}$  та  $G_s$  - до пригнічення та активації аденілатциклази, що відповідно знижує або підвищує рівень циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ).

$\alpha$ -АР відіграють важливу функціональну роль у центральній та периферичній нервових системах. Саме через ці рецептори здійснюється вплив на потенціалкеровані іонні канали в нейронах сенсорних гангліїв, гангліях симпатичної та парасимпатичної нервових систем [57, 75, 76]. Ключова роль  $\alpha_2$ -АР полягає у модуляції в нормі та при нейропатіях електричної активності нейронів сенсорних гангліїв [56, 77, 78], верхнього шийного ганглія [79] та деяких центрів ЦНС [76, 80]. Відносний рівень експресії між  $\alpha_2$ -АР та  $\alpha_1$ -АР може змінюватися при збільшенні ФРНТ у міжклітинному просторі [81]. За рахунок впливу  $\alpha_2$ -АР на кальцієві та калієві канали (Kir3) здійснюється модуляція синаптичної передачі [82, 83].

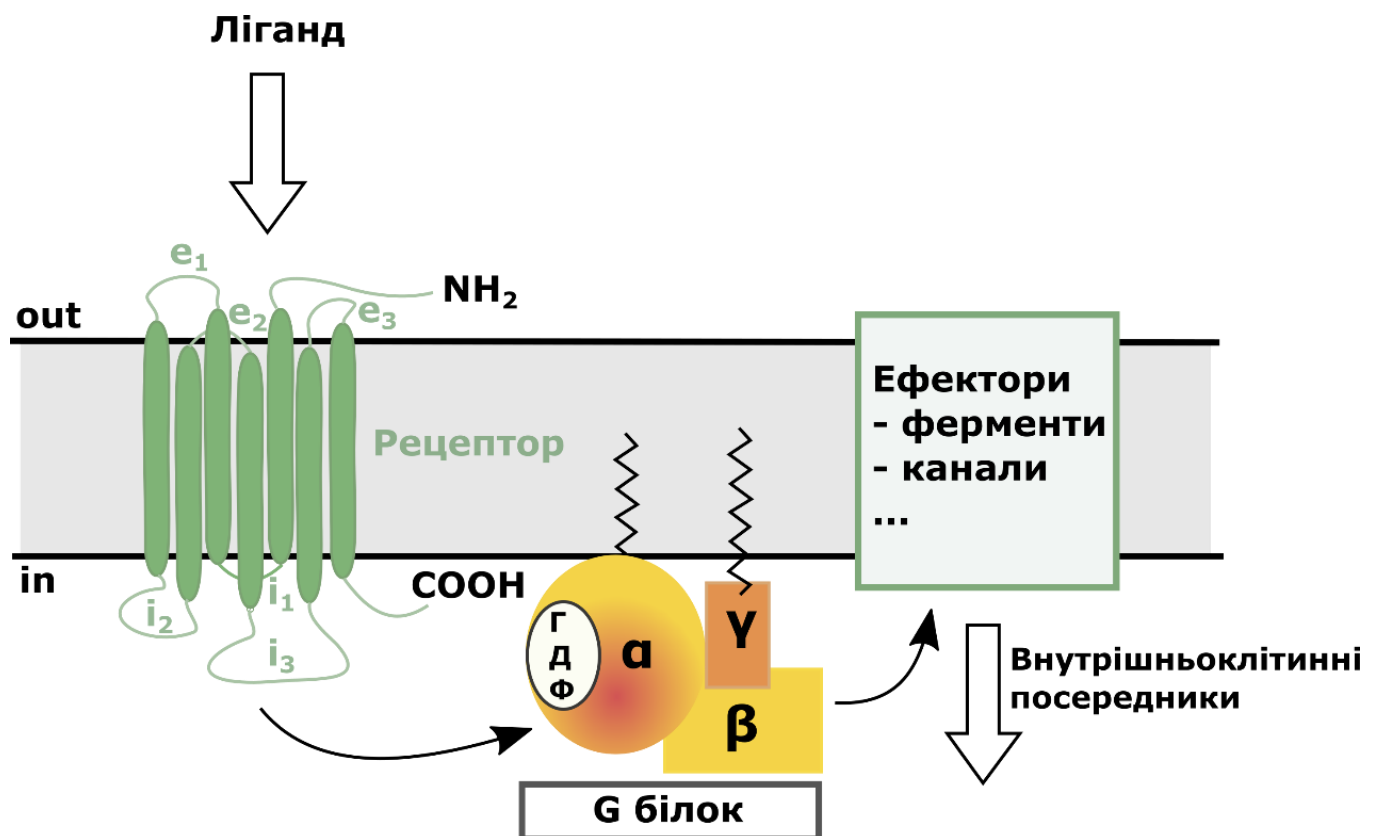


Рис. 1.3. Схема будови G-протеїн-зв'язаного рецептора. Всі метаботропні рецептори мають головне ядро, що складається з семи трансмембранних доменів, які з'єднані між собою трьома зовнішніми та трьома внутрішніми

петлями. У ядрі відбувається зв'язування з лігандом, внаслідок чого активується G-білок (модифіковано з Boskaert J. та Pin P.)

#### **1.4 Адренергічний вплив на потенціалкеровані іонні канали**

НА, що вивільнюється з симпатичних волокон призводить до модулюючого ефекту на збудливість сенсорних нейронів внаслідок зв'язування цього катехоламіна з АР, які розташовані на мембрані нейронів сенсорних гангліїв [84-86]. Аналіз НА-індукованих змін в електричній активності дозволяє зробити припущення щодо участі певних типів каналів у адренергічній модуляції.

$\beta$ -АР впливають на кальцієві канали L-типу та калієві канали (вхідного випрямлення та  $K_v4$ ) через цАМФ залежний внутрішньоклітинний шлях [87-89]. У нейронах амігдали дорослих мишей (P21-28) аплікація агоніста АР призводила до підвищення генерації ПД, це вказує на участь потенціал-залежних калієвих каналів [90].

Активация  $\alpha_2$ -АР призводить до гіперполяризації мембрани, ці зміни пов'язані з впливом  $G\beta\gamma$  на калієві канали, керування якими здійснюється через G-білок ( $K_{ir3}$ ) [91]. Однак, активация  $\alpha_1$ -АР за участі вторинних посередників призводить до пригнічення цих іонних каналів [92]. При взаємодії  $\alpha_2$ -АР з каналами, що активуються гіперполяризацією ( $HCN_{1-4}$ ), спостерігається пригнічення електричної активності, а саме зниження частоти генерації ПД [4, 77, 78].

#### **1.5 Адренергічна модуляція кальцієвих каналів**

Потенціал-керовані кальцієві канали (ПКК) є основним джерелом надходження кальцію у внутрішньоклітинне середовище, з подальшим впливом на кальційзалежні процеси (активация кальцій залежних ферментів, вивільнення гормонів або нейротрансмітерів) [93-95]. Окрім внутрішньоклітинної регуляції у



нейронах сенсорних гангліїв ПКК беруть участь у генерації електричної активності [95, 96].

Добре відомо, що ПКК є головною мішенню впливу метаботропних рецепторів, в тому числі АР. На нейронах центральної та автономної нервової систем показано, що дія агоністів АР призводить до змін у функціонуванні ПКК за рахунок прямих механізмів, які реалізуються при приєднанні субодиниць G-білка, та шляхів з залученням вторинних посередників. Адренергічний вплив на нейрони різних відділів нервової системи визначається типом ПКК та АР.

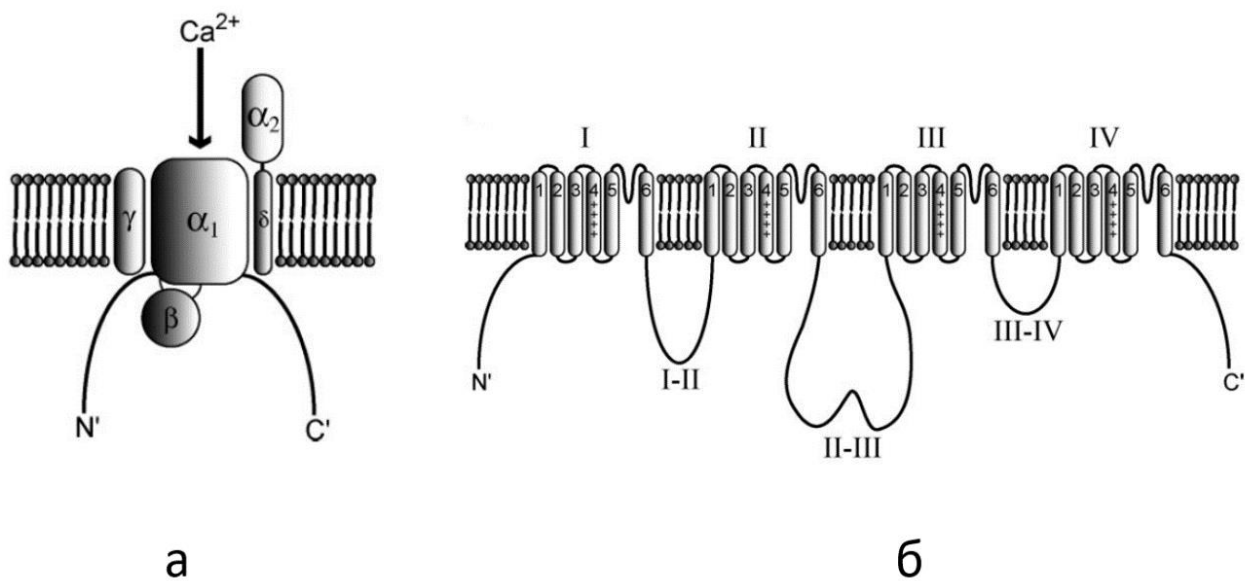
### **1.5.1 Електрофізіологічні характеристики низько- та високопорогових ПКК**

ПКК відрізняються за порогом активації, потенціалзалежністю своїх характеристик [97, 98], фармакологічною чутливістю до неорганічних та органічних речовин [99-107]. За порогом активації ПКК поділяють на низько та високопорогові [98]. Поріг активації низькопорогових кальцієвих струмів може становити від -70 до -50 мВ, а у високопорогових цей параметр становить -30 мВ і вище [98, 108, 109]. Для низькопорогового струму через ПКК характерна швидка інактивація, яка зумовлює протягом 100 мс деполяризації зменшення струму практично до нуля (на відмінну від високопорогового струму) [97, 98]. Інактивація високопорогових струмів через ПКК є кальцій- та потенціалзалежний процес [110, 111]. У електрофізіологічних експериментах з фіксацією потенціалу головна ознака наявності низькопорогового ПКК це наявність вигину на низькій частині ВАХ інтегрального кальцієвого струму [98]. За рахунок відмінностей у ряді селективності при еквімолярній заміні кальцію на барій високопорогові струми збільшуються приблизно вдвічі, а низькопорогові залишаються без змін [112].

### **1.5.2 Будова ПКК**

Молекулярні дослідження показали відмінності у будові та субодиничному складі ПКК.  $\alpha_1$  субодиниця є ключовою для функціонування

каналу, вона також визначає підтип ПКК. Ця субодиниця складається I - IV доменів, які зв'язані між собою відповідними I-II, II-III та III - IV цитоплазматичними петлями і мають N та C термінали. Кожний домен складається з шести  $\alpha$ -спіральних трансмембранних сегментів S1..S6. Пору знаходиться між S5 та S6 доменами, саме вони утворюють іон-селективний фільтр каналу. S4 домен містить позитивно заряджені амінокислотні залишки, що являють собою сенсор потенціалу [113] (Рис. 1.1). У високопорогових ПКК  $\alpha_1$  – субодиниця зв'язана з допоміжними  $\beta$ ,  $\gamma$  та  $\alpha_2$ - $\delta$  субодиницями, які відсутні у низькопорогових ПКК. (Рис. 1.2).



**Рис. 1.4** Схема будови ПКК. Канал складається з чотирьох субодиниць  $\alpha_1, \beta, \gamma$ , та  $\alpha_2\delta$  (а).  $\alpha_1$ - субодиниця формує каналну пору. I, II, III та IV домени з'єднані між собою відповідними петлями та N', C' термінали. Знак + на сегменті S4 указує розташування сенсору потенціалу (модифіковано з Tedford HW. та Zamponi W).

### 1.5.3 Класифікація ПКК на основі біофізичних та фармакологічних характеристик

Високопорогові ПКК за фармакологічними та електрофізичними характеристиками поділені на L-, N-, P/Q та R типи. Всі типи та підтипи ПКК відрізняються між собою за амінокислотною послідовністю  $\alpha_1$  – субодиниці [105, 114]. У електрофізіологічних дослідженнях ідентифікація певного типу високопорогових ПКК відбувається на основі їх біофізичних властивостей та фармакологічної чутливості до селективних органічних блокаторів [105, 115]. L-тип ПКК утворює родину  $Ca_v1.1-4$ , ці канали чутливі до дигідропіридинів. Наприклад, ніфедипін в концентрації 10 мкМ ефективно блокує струми через ПКК L-типу [99]. Даний тип ПКК експресується на сомі нейронів, а також на міоцитах та кардіоміоцитах [116]. Для L-типу ПКК характерна висока провідність (20-25 пС) та повільна інактивація [117].

P/Q ( $Ca_v2.1$ )-, N ( $Ca_v2.2$ )- типи ПКК здебільшого розповсюджені у нервовій тканині. Вони розташовані на сомі та пресинаптичних закінченнях центральних та периферичних нейронів, де відіграють важливу роль у процесах вивільнення нейротрансмітера та модуляції електричної активності [118-120]. Родини P та Q ( $Ca_v2.1$ ) об'єднані через їхню чутливість до  $\omega$  - агатоксину-IVA, виділеного із отрути павука *Agelenopsis aperta* пептид [2]. Якщо P-тип кальцієвих струмів блокується у наномолярних концентраціях цього токсину (20-30 нмоль/л), то для блокування Q-типу необхідна концентрація в 10-100 разів більша [120]. Біофізичною властивістю струмів через ці ПКК є низький поріг активації, який становить -50 - -40 мВ. Також P-тип, на відміну від Q-типу, вирізняється повільною інактивацією, яка може тривати 1 с.

ПКК N-типу експресуються винятково у нейронах [121], вони ефективно (у наномолярних концентраціях) блокуються  $\omega$ -конотоксином-GVIA (пептидний токсин моллюска *Conus geographus*) [14, 115, 225]. Ці канали вирізняються швидкою часовою інактивацією, яка залежить від потенціалу на мембрані. Для

даного типу характерна залежність від метаболічних внутрішньоклітинних процесів [122].

R (C<sub>v</sub>2.3)-тип ПКК донедавна характеризувався як залишковий струм після аплікації всіх селективних блокаторів каналів інших типів [123]. Проте на сьогоднішній день відомий селективний блокатор, що блокує цей тип ПКК, це пептид отрути тарантула SNX-482.

#### **1.5.4 Роль субодиниць ПКК у функціонуванні та електрофізіологічних параметрах струмів**

Як було зазначено раніше,  $\alpha_1$  є головною одиницею ПКК, структура якої повністю визначає потенціалзалежні, селективні характеристики каналу. На ній є місця фосфорилування вторинними посередниками, рівень яких регулюється внутрішньоклітинними процесами. Всі типи ПКК відрізняються за молекулярною структурою цієї субодиниці [113, 124].

Додаткові субодиниці ( $\beta$  та  $\alpha_2$ - $\delta$ ) модулюють біофізичні характеристики ПКК, також вони беруть участь у процесах експресії цих каналів [125-127]. Блокування генів, що кодують  $\beta$  субодиницю призводить до зменшення амплітуди та уповільнення кінетики струмів через ПКК [89, 128]. У COS-7 клітинах, у яких експресувалася лише  $\alpha_1$ -субодиниця, реєструвалися низькоамплітудні струми через Ca<sub>v</sub> 2.1-3, які в 10 разів підвищувалися при наявності екзогенних  $\beta$ -субодиниць [129-131].  $\beta$ -субодиниця ПКК зв'язана з  $\alpha_1$  субодиницею внутрішньоклітинно на петлі між I та II доменами [132]. Для N-типу ПКК ця субодиниця визначає такі біофізичні характеристики струмів, як активація та інактивація, полегшення струму при попередній деполяризації, а також бере участь у ефектах, що опосередковуються активацією G- білків [133].

#### **1.5.5 Характеристики струмів через ПКК в нейронах сенсорних гангліїв**

На сомі нейронів периферичних гангліїв (ДКГ та ГТН) молекулярними методами виявлено більшість типів ПКК та електрофізіологічними методами

продемонстровано їхню функціональну роль [112, 134, 135]. Для цих клітин характерна генерація швидких ТТХ-чутливих, а також ТТХ-нечутливих та чутливих до кадмію ПД [96]. Таким чином продемонстровано, що ПКК разом з натрієвими каналами залучені у генерацію електричної активності нейронів ГТН. Для даних гангліїв показано, що високопороговий інтегральний кальцієвий струм є чутливим до ніфідіпину та  $\omega$ -конотоксину GVIA [112, 134]. Після прикладання селективних блокаторів L-, P/Q та N типів ПКК залишається 10-20% від інтегрального струму. Показано, що у переважній більшості нейронів ГТН кальцієвий струм викликаний активацією каналів L-, N,- та R типу.

### **1.5.6 Електрофізіологічні характеристики адренергічної модуляції ПКК в нейронах.**

ПКК є мішенню для адренергічної модуляції електричної активності нейронів сенсорних гангліїв. НА-індуковане пригнічення струмів через ПКК здебільшого здійснюється через активацію G-білків внаслідок зв'язування ліганда з метаботропним рецептором. Адренергічний вплив на ПКК здійснюється згідно механізмів, які властиві метаботропним рецепторам, таким як GABA<sub>B</sub>, серотонінові (5-HT) та опіодні рецептори [136-138]. Вперше дію НА на кальційзалежні зміни у електричній активності виявлено у нейронах ГДК курчати [137, 139]. Характерна ознака адренергічного впливу - це пригнічення струмів через ПКК та сповільнення кінетики їх активації. При цьому пригнічення залежить від потенціалу на мембрані, а також спостерігається відновлення струму після сильної короткотривалої деполяризації [6, 85] або високочастотної стимуляції [140]. Для аналізу цього НА-індукованого ефекту використовували модель, у якій відбувалася зміна стану ПКК від готового до активації ("willing") до не готового до активації ("reluctant") [85]. Поряд з вищеописаним механізмом модуляції струмів через ПКК у нейронах ГДК ідентифіковано ще один тип адренергічного впливу, для якого характерне зменшення амплітуди струму зі збереженням кінетичних параметрів, попередня короткотривала деполяризація не призводила до відновлення струмів [141-143].

Дослідження адренергічної модуляції в центральних [144-146] та периферичних нейронах продемонстрували різноманіття процесів, які залежать від активації АР [6, 55, 137, 147]. Два біофізично відмінні типи модуляції пов'язані з різними внутрішньоклітинними процесами, які запускаються при активації різних типів АР [141].

Таким чином, адренергічний вплив на ПКК проявляється у зміні струмів через ПКК двома електрофізіологічно відмінними способами: для першого характерно уповільнення кінетики активації, яка не змінюється при другому типі модуляції [141, 142]. Головна особливість для цих двох механізмів модуляції – це реакція на попередню деполяризацію, яка призводить до відновлення кінетики та амплітуди при першому типі та відсутність змін – при другому [141, 142, 148]. Рівень відновлення струму при короткотривалій деполяризації визначає частку прямого впливу АР на ПКК. Наприклад, у нейронах ВШГ застосування вищезгаданого протоколу призводило до повного відновлення струму, що доводить присутність лише одного шляху модулюючого впливу на ПКК [148].

### **1.5.7 Внутрішньоклітинні шляхи, що індукуються АР**

НА-індуковане пригнічення струмів через ПКК здебільшого здійснюється через активацію G-білків при зв'язуванні ліганда з метаботропним рецептором. У перших дослідженнях ефекту НА на ПКК було зареєстровано потенціалзалежне пригнічення струму зі змінами його кінетичних параметрів [1, 85]. Цей ефект є наслідком впливу субодиниць G-білка (прямий вплив) без участі вторинних посередників. Це було доведено експериментами методом фіксації потенціалу в конфігурації cell-attached, у яких показано НА-індуковане пригнічення при наявності агоніста в петч піпетці [149]. Такий тип модуляції характерний для N- та P/Q-типів ПКК та відіграє ключову роль у пресинаптичних механізмах синаптичної передачі [150-152]. Він здійснюється за рахунок активації АР, що зв'язані з  $G_{i/o}$ -білками. Цей метаботропний рецептор є чутливими до токсину кашлюку. На нейронах ВШГ показано, що більший внесок

у НА-індуковані процеси уповільнення кальцієвих струмів здійснюється внаслідок зв'язування  $G\beta\gamma$  субодиноці з  $\alpha_1$  субодиноцею ПКК, що призводить до зменшення вірогідності відкритого стану каналу при деполяризації [153, 154]. Цей тип адренергічного впливу визначається наявністю відповідних місць зв'язування на субодиноцях ПКК. Виявлено, що місця  $G\beta\gamma$ -зв'язування локалізовані на I-II петлі  $\alpha_1$ -субодиноці ПКК [155-157], а також на N- [155, 158] та C-терміналях [159, 160].

Електрофізіологічні дослідження на рівні цілої клітини довели участь  $\beta$  - субодиноці у НА-індукованих змінах струмів через ПКК зі зміною кінетики [161]. При активації AP  $G\beta\gamma$  зв'язується з місцем на внутрішній петлі I-II, яке водночас є сайтом зв'язування з допоміжною  $\beta$ -субодиноцею ПКК, таким чином відбувається вплив на взаємодію між цими субодиноцями каналу (Рис. 1.4) [11, 12].

В основі іншого адренергічного ефекту, що не призводить до кінетичних змін у струмах через ПКК, лежать внутрішньоклітинні процеси з залученням вторинних посередників. Роботи на L-типі ПКК кардіоміоцитів показали, що вплив НА реалізується метаботропним шляхом опосередкованим цАМФ-залежними протеїнкіназами [124]. Інший внутрішньоклітинний процес, який залучений у адренергічний вплив на ПКК, це активація протеїн кінази C (ПКС) [162, 163].

Таким чином, нейрони сенсорних гангліїв можуть зазнавати впливу з боку симпатичної нервової системи. В його основі лежать зміни у потенціалзалежних іонних каналах при активації AP. Сигнальні шляхи визначаються типом G-білка, що сполучений з метаботропним рецептором.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Первинна культура нейронів ГТН

Електрофізіологічні дослідження проводили на нейронах первинної культури дисоційованих клітин ГТН. Всі використані в роботі реактиви, якщо не зазначено інше, були вироблені фірмою "Sigma" (США). Для приготування первинної культури використовували щурів віком один день. Тварин декапітували, голову зафіксували медичними голками на предметному столику, після розкривали черепну коробку та видаляли головний мозок. За допомогою пінцета з тонкими кінчиками та мікроножиць виділяли ГТН і розміщували у розчин, що містив буфер HEPES, мінімальне середовище Ігла та антибіотики. ГТН обережно, щоб не пошкодити оболонки, під бінокулярним мікроскопом очищали від сполучних тканин та залишків крові, після чого ножицями відрізали нерви. Пастерівськими піпетками очищені ганглії переносили у флакон об'ємом 2 мл з 0,2%-м розчином пронази. Флакон розміщували у термостат на 16 хв, для покращення ферментативної обробки здійснювали легкі помішування 1 раз на 2-3 хв. Після завершення цього етапу приготування ГТН промивали 3-4 рази розчином для культивування наступного складу: мінімальне середовище Ігла з додаванням 10% кінської сироватки ("Gibco", США), 6 мкг/мл інсуліну та антибіотиків. Для отримання однорідної суспензії клітин здійснювали механічну дисоціацію: ГТН поступово пропускали через пастерівські піпетки різного діаметра (650 мкм, 530 мкм, 360 мкм). Отриману суспензію клітин розподіляли по 200 мкл у скляні кільця діаметром 6 мм, які були розміщені на покривних скельцях. Вони попередньо були оброблені розчином полі-L-орнітину для покращення адгезії клітин з їх поверхнею. Клітини осідали в інкубаторі ("Jouan", Франція) 45 хв, після чого кільця за допомогою пінцета забирали і скельця у чашках Петрі ставили у інкубатор з контрольованими вмістом двоокису вуглецю (5% CO<sub>2</sub>) в повітряно-газовій



суміші, температурі 37°C та постійному пасивному зволоженні. Проліферацію гліальних клітин зупиняли додаванням на другу добу культивування цитозин- $\beta$ -D-арабіно-фуранозиду (ARA-C, 7 мкмоль/л), заміну розчину робили на наступну добу. Електрофізіологічні дослідження проводили на 10-15 день культивування. У електрофізіологічні дослідження бралися нейрони з розміром до 30 мкм, оскільки вони є оптимальними для фіксації потенціалу на всій поверхні клітини і за нативних умов найвірогідніше приймають участь у передачі ноцицептивного сигналу.

## **2.2 Розчини та реактиви, що використовувались у електрофізіологічних дослідженнях**

Всі розчини були зроблені на деіонізованій воді з високим питомим опором (близько 18 МОм \*см). Рівень pH кожного розчину контролювали за допомогою pH-метра pH526 ("WTW", Німеччина). pH до необхідного значення доводили за допомогою додавання концентрованого розчину соляної кислоти або відповідного лугу (CsOH, NaOH), точність становила 0,01 од. кислотності.

Для проведення електрофізіологічних досліджень скельце з культивованими клітинами ГТН розташовували у камері, яку заповнювали розчином I (таб.1). Петч-піпетку заповнювали внутрішньоклітинним розчином II (Таб1). Визначення кальцій-залежних модифікацій в електричній активності нейронів проводили у номінально безкальцієвому розчині (розчин № V, таб1). У разі необхідності блокування нарієвих каналів у зовнішньоклітинний розчин I додавали тетродотоксин (ТТХ) в концентрації 500 нмоль/л.

Норадренергічний вплив здійснювався аплікацією НА у відповідній концентрації. Попередньо НА-бітарtrat був розчинений у воді в концентрації 15 ммоль/л та розподілений по контейнерах. Він зберігався в морозильній камері при температурі -20 °C, уникаючи тривалого контакту зі світлом. Перед кожним експериментом додавали необхідну кількість матричного розчину у розчин I або III.

При реєстрації кальцієвих струмів у зовнішньоклітинному розчинні натрій був заміщений холіном у еквівалентній концентрації (розчин III, таблиця 1), а калій був замінений на  $\text{Cs}^{+1}$  у внутрішньоклітинному розчинні (розчин IV, таблиця 2). Для блокування калієвих каналів у ці розчини додавали ТЕА та 4-АР. Ідентифікація типу ПКК здійснювалася прикладанням селективних блокаторів, які додавалися в контрольний розчин III.

**Таблиця 1. Склад внутрішньоклітинних та зовнішньоклітинних розчинів для відведення електричної активності (I), (II) та кальцієвих струмів (III), (IV) відповідно, що застосовувалися в експерименті. (V) — склад розчину безкальцієвого розчину.**

Реагент	Концентрація ммоль/л				
	I	II	III	IV	V
NaCl	140	-	-	-	140
KCl	3	-	-	-	4
CaCl <sub>2</sub>	2		2	-	-
MgCl <sub>2</sub>	2	2	4	5	3
HEPES	20	20	20	20	20
D-глюкоза	10	-	10	-	10
K-глюконат	-	130	-	-	-
MgATФ	-	2	-	5	-
EGTA	-	5	-	10	0.2
NaГТФ	-	0,5	-	0.5	-

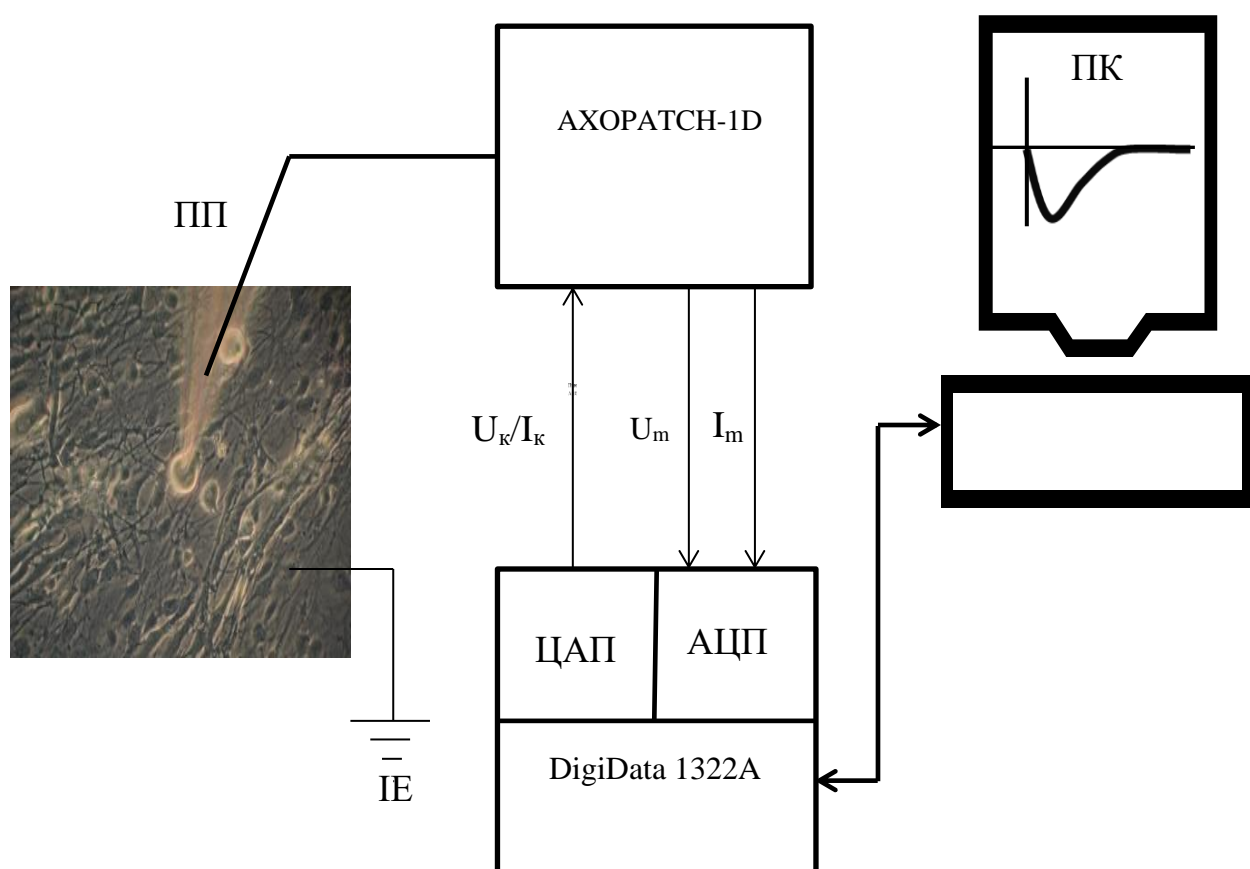
холинCl	-	-	140	-	-
TEACl	-	-	20	20	-
4-AP	-	-	3	-	-
Na <sub>2</sub> АТФ	-	-	-	3	-
NaАДФ	-	0,5	-	0.5	-
CsAcetat	-	-	-	90	-
CsCl	-	-	-	20	-

У дослідженнях по вивченню впливу нейротрофіну ФРНТ на струми через ПКС нейронів ГТН у частині чашок за 4 доби до проведення експерименту замінювали розчин на такий, що містив надлишкову концентрацію ФРНТ (100 нг/мл), а у інших — замінювали середовище на ідентичне. У нашій роботі використовувався ФРНТ типу 2.5 S виділений з підщелепної залози миші. Для всіх експериментів, згідно рекомендацій виробника, ФРНТ був розведений у середовищі для культивування, розподілений по контейнерах об'ємом 50 мкл з концентрацією 10 мкг/мл та зберігався при -20°C уникаючи контакту зі світлом.

### 2.3 Експериментальна установка

Дослідження проводилися установці, зробленої на базі інвертованого мікроскопа Axiovert 200 ("Zeiss", Німеччина) (Рис.2.1). Між конденсором та об'єктивом мікроскопа розташований предметний столик, на якому розміщали камеру з препаратом. Експерименти виконували при кімнатній температурі (21-24 °C). Покривні скельця з культивованими клітинами поміщали у камеру з відповідним зовнішньоклітинним розчином. Пошук нейрона для відведення здійснювали за допомогою переміщенням камери відносно предметного столика, між якими було нанесено тонкий шар вазеліну. Для відведення методом петч-клемп в конфігурації «ціла клітина» при фіксації струму/потенціалу

використовували підсилювач Axopatch-1D ("Axon Instruments", США), на якому встановлювали полюсу пропускання на рівні 5кГц (Рис.2.1). Рух петч-піпетки встановленої в тримач головки підсилювача, здійснювали за допомогою мікроманіпулятора. Сигнали оцифровували і записували за допомогою аналогово-цифрового перетворювача DigiData 1322A та програмного пакета WinWCP V 5.5.4 ("University of Strathclyde", Шотландія) з частотою оцифровки 10 кГц. Для подальшої обробки використовували програмний пакет pClamp 9.0 («Axon instrument», США). Петч-піпетки з боросилікатного скла витягували на вертикальній витяжці PC-10 («NARISHIGE», Японія), діаметр отвору якої становив 1-1.5 мкм.



**Рис. 2.1. Блок схема установки для реєстрації викликаної електричної активності та струмів через ПКК культивованих нейронів ГТН. Позначення на схемі:  $U_m/I_m$  – електрична активність або струми, які реєстрували при прикладанні команди  $U_k/I_k$ ; ЦАП, АЦП – цифро-аналоговий/аналого-**

цифровий перетворювач; ПК – персональний компютер; АХОРАТСН-1D – петч-клемп підсилювач; ПП- петч-клемп піпетка; ІЕ – індиферентний електрод.

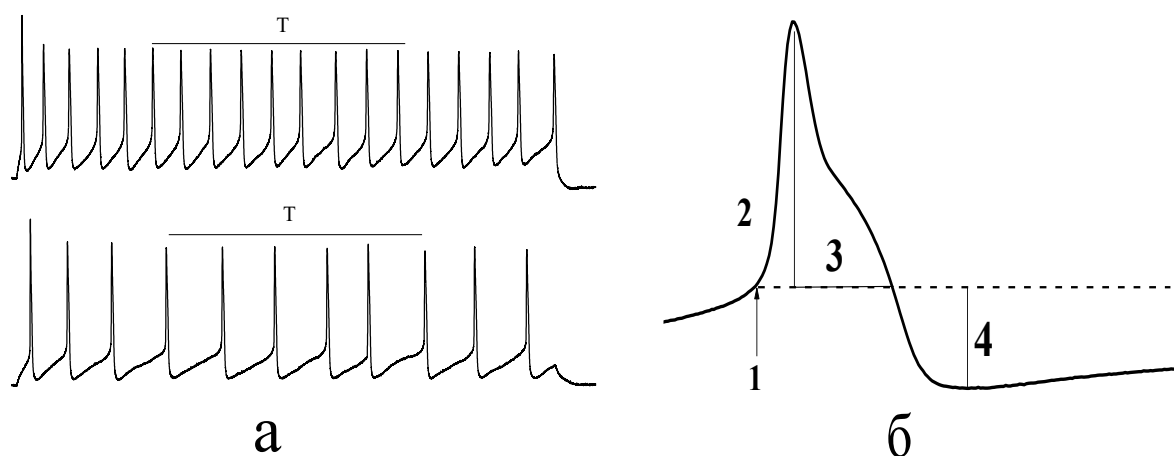
### 2.3.1 Реєстрація та аналіз викликаної електричної активності

Відведення електричної активності нейронів ГТН здійснювали в режимі фіксації струму. Мембранний потенціал спокою визначали одразу після прориву мембрани за відсутності стимуляції. Протягом досліду його підтримували на рівні -50 мВ, постійно пропускаючи через клітину необхідний струм.

Пасивні властивості мембрани визначали у режимі фіксації струму або потенціалу. Для оцінки вхідного опору мембрани використовували гіперполяризуючий імпульс струму невеликої амплітуди 5-10 пА, щоб запобігти виникненню нелінійних ефектів. Опір мембрани згідно закону Ома визначали як відношення зсуву мембранного потенціалу до величини поштовху струму, яким цей зсув було викликано. Реєстрації проводили від нейронів зі стабільним потенціалом спокою більш негативним ніж -40 мВ та внутрішнім опором не нижчим за 200 МОм. Ємність мембрани оцінювали у режимі фіксації потенціалу автоматичним інтегруванням площі під кривою струму перезаряду мембрани (Q). Її вираховували з рівняння  $Q = C \cdot \Delta\phi$ , де  $\Delta\phi$  зміна командного потенціалу, яке командно задавалося. Стимуляцію нейрона здійснювали від потенціалу -50 мВ прямокутними імпульсами струму тривалістю 1-2с з інкрементом 10 пА. Спершу клітини гіперполяризували до потенціалу на мембрані -120...-110 мВ для аналізу ефекту вхідного випрямлення, потім здійснювали деполяризацію на фоні якої виникала генерація ПД.

Аналіз викликаної електричної активності здійснювали за параметрами ПД, для тонічних нейронів додатково визначали частотні характеристики генерації ПД. Параметри ПД (поріг генерації, амплітуда, тривалість) визначали з реєстрацій з поодиноким ПД. Якщо при стимуляції нейрона одразу ж виникала

серія ПД, то враховували параметри першого з них. У якості порогу визначали мембранний потенціал при якому похідна сигналу перевищувала рівень шуму на 2 стандартних відхилення, а амплітуду ПД — як різницю між порогом та його піком. За тривалість фази спаду брали проміжок часу, за який потенціал зменшувався від 90 до 10% максимального значення. Амплітуду слідової гіперполяризації обчислювали як різницю між порогом та мінімальним значенням мембранного потенціалу після піку (Рис.2.2 б). Для тонічних нейронів у контролі та при аплікації НА середню частоту генерації ПД вимірювали як обернений середній період між піками ПД (Рис.2.2 а).



**Рис. 2.2.** Вимірювання параметрів окремого ПД нейронів ГТН. а – частотна імпульсація характеризувалася зміною середньої частоти генерації ПД. б – показники ПД: 1 – поріг виникнення ПД, 2 – амплітуда ПД, 3 – тривалість фази реполяризації, 4- амплітуда слідової гіперполяризації.

#### 2.4 Реєстрація струмів в режимі фіксація потенціалу

Для аналізу характеристик струмів через ПКК було проведено окрему серію окремих дослідів у режимі фіксації потенціалу. Камеру з препаратом заповнювали зовнішньоклітинним розчином III, опір петч піпетки з

внутрішньоклітинним розчином IV становив 4-5 МОм. Ємність піпетки компенсували після отримання гігаомного контакту безпосередньо перед проривом мембрани. Під час експерименту постійно здійснювали контроль струму витоку, допустимі значення якого становили до -100 пА та ємнісні струми не перевищували 5% від значень на початку реєстрації.

Вольтамперні характеристики інтегральних кальцієвих струмів проводили від підтримуваного потенціалу -100 мВ, який змінювався серією потенціалів з інкрементом 5 мВ до 35 мВ. Оцінка щільності кальцієвих струмів визначалася як відношення амплітуди максимального кальцієвого струму до ємності досліджуваної ділянки мембрани, яка є пропорційною її площі. Серії експериментів для оцінки параметрів спаду високопорогових кальцієвого струмів проводили на реєстраціях, у яких струм викликався поштовхом потенціалу від -70 мВ до 0 мВ, тривалістю 500 мс. Період між реєстраціями складав 30 с. У більшій частині експериментів у якості переносника заряду використовували барій, що дозволяло уникнути впливу кальційзалежних процесів.

## **2.5 Метод локальної суперфузії**

Аплікацію фармакологічно активних речовин проводили за допомогою методу швидкої локальної суперфузії зі швидкостями, що дозволяло швидко прикладати та видаляти розчини [164]. Система локальної суперфузії складається двох скляних піпеток для відведення та аплікації розчину з діаметрами 20–40 мкм, при чому діаметр відвідної піпетки дещо більший за діаметр аплікуючої (рис. 2.3). У середині піпетки для аплікації знаходяться дві трубки, одна з яких подає, а інша відводить розчин. Це дає можливість постійно видаляти розчин з «мертвої зони» всередині піпетки. Трубка, яка подає розчин, з'єднана з циліндрами заповненими робочими розчинами. До трубки, що відводить приєднано клапан, який дозволяє швидко перемикає тиск (з більшого

$-P_2$  на менший  $-P_3$  і навпаки) (Рис.2.3 б, в). Робота клапана дозволяє швидко і локально аплікувати необхідний розчин на поверхню досліджуваної клітини.

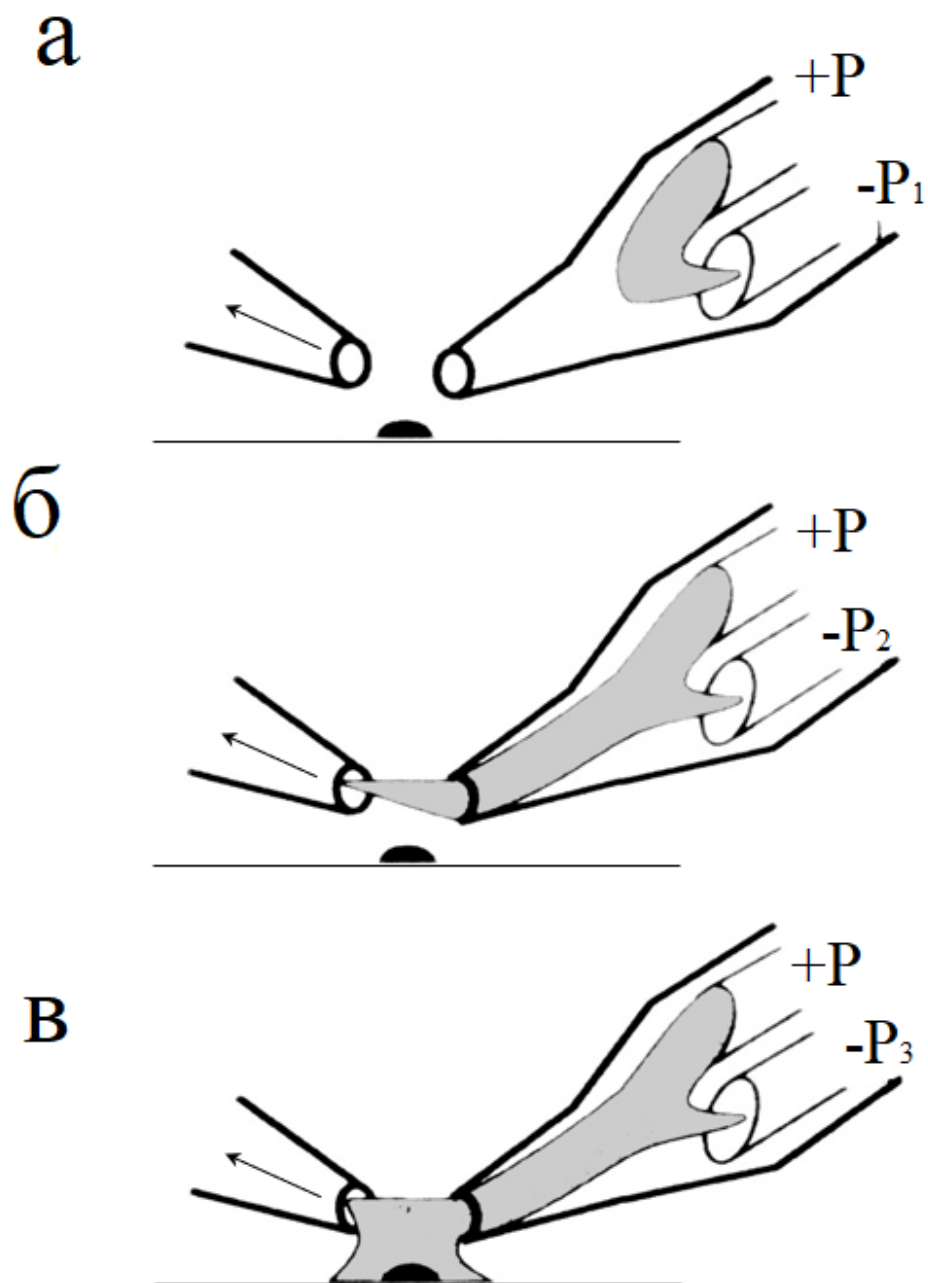


Рис. 2.3. Система швидкої локальної суперфузії речовин.  $+P$  – позитивний тиск,  $-P_1$ ,  $-P_2$ ,  $-P_3$  – три різних рівня негативного тиску ( $P_1 > P_2 > P_3$ ); а – настройка аплікації, 2 – аплікація на клітину відключена, 3 – аплікація на



клітину включена. На а-в подаюча піпетка розташована справа, відвідна (відсмоктуюча) – зліва. Стрілкою вказано напрямок руху потоку розчину (модифіковано з Veselovsky N.S. et al., 1996)

При налаштуванні системи суперфузії аплікації, розчин з трубки, що подає, потрапляє напругу в трубку, що відводить. При вимкненні аплікації, після спрацювання клапана і зміні негативного тиску з  $-P_1$  на  $-P_2$ , розчин витікає з аплікуючої піпетки і потрапляє у відсмоктуючу (Рис.2.3 а, б). При включенні аплікації негативний тиск  $P_3$ , гідростатичний позитивний тиск розчину та негативний тиск відвідної піпетки підібрані таким чином, що розчин з аплікуючої піпетки покриває лише зону навколо клітини (Рис.2в). Піпетки розміщали на відстані 25–50 мкм вище досліджуваної клітини, при цьому розчин, який аплікують повністю омиває її поверхню. Відстань між піпетками складала 300–550 мкм.

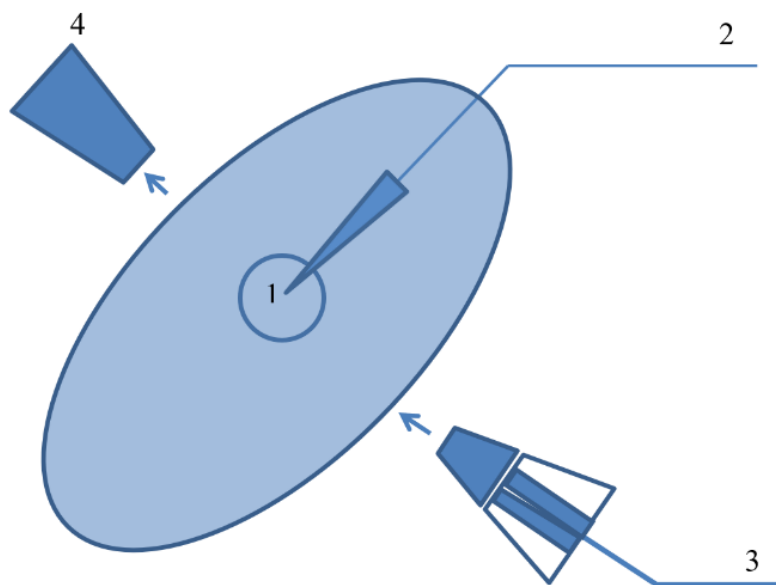


Рис. 2.4. Схема експерименту адренергічного впливу на нейрон ГТН: 1 – досліджуваний нейрон ГТН; 2 – петч-піпетка; 3 – подаюча та відсмоктуюча піпетка (4).

## **2.6 Схема експерименту**

Симпатичний вплив моделювали локальною аплікацією НА на сому нейрона. Перед подачею розчину з НА на нейрон аплікували контрольний розчин протягом 10 хв, за цей період відслідковували рівень спаду кальцієвого струму (rundown) (Рис.2.4). У дослід брали нейрони, у яких зменшення струму було менше 10% за 10 хв. Аплікацію НА, блокаторів кальцієвих каналів та AP здійснювали протягом часу необхідного для досягнення стаціонарного значення струму доти поки величини не набували стаціонарних значень, після чого здійснювали заміну розчину. Після аплікації блокаторів здійснювалася аплікація контрольного розчину.

## **2.7 Статистична обробка даних**

Параметри імпульсації ГТН та кальцієвих струмів визначали за допомогою програмного пакета Clampfit 9.2 (Axon Instruments, США). Подальша обробка і представлення результатів, включаючи статистичний аналіз, проводилась за допомогою електронних таблиць Excel (Microsoft, США) та пакета Origin8Pro (OriginLab, США).

Вибірки перевіряли на нормальність розподілу за критерієм Шапіро – Уїлка. Результати представлені як середнє арифметичне  $\pm$  стандартне похибка середнього, після чого наведено в дужках наведено об'єм вибірки, за якою проведено усереднення. Достовірність різниці середніх встановлювали з використанням парного t-тесту Ст'юдента. Статистичні гіпотези перевіряли на рівні значущості 0.05

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ

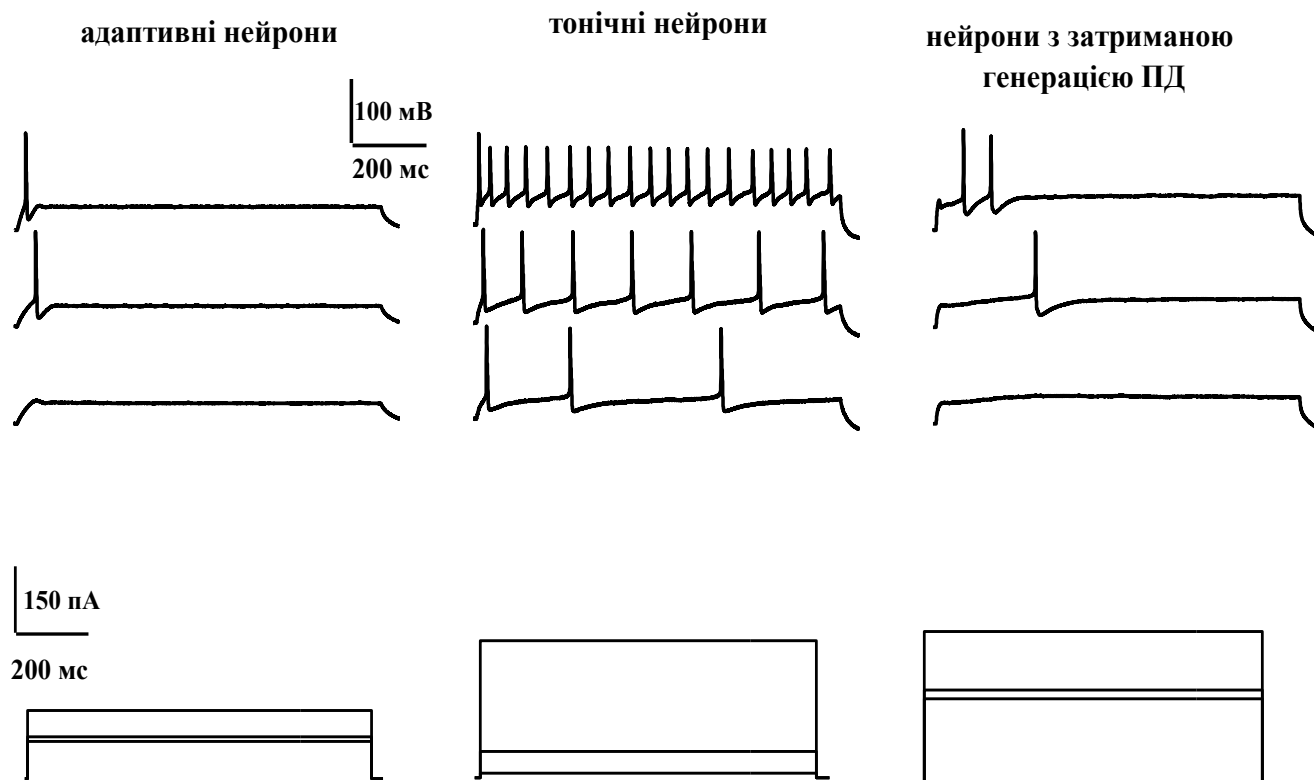
#### **3.1 Норадренергічна модуляція викликаної електричної активності нейронів ГТН**

##### **3.1.1 Поділ нейронів ГТН за типом електричної активності**

Усі нейрони ( $n = 74$ ) були поділені на три групи за характером відповіді на тривалу (1-2с) деполяризацію: адаптивні, тонічні та з затриманою генерацією потенціалів дії (ПД) (рис.3.1). Тонічні нейрони (68%,  $n = 52$ ) у відповідь на деполяризуючі імпульси струму генерували серію ПД протягом усього стимулу. Адаптивні нейрони, частка яких становила 28% ( $n = 21$ ), у відповідь на деполяризуючі імпульси струму генерували декілька (від 1 до 3) ПД на початку стимулу. У 4% ( $n = 7$ ) нейронів електрична активність характеризувалася затримкою генерації ПД на початку стимулу (Рис.3.1).

##### **3.1.2 Пасивні електрофізіологічні характеристики нейронів ГТН**

Пасивні електричні характеристики нейронів ГТН, такі як потенціал спокою ( $V_m$ ), вхідний опір ( $R_{in}$ ) та ємність мембрани ( $C_m$ ), наведені в таблиці 3.1. Ці характеристики клітин з різними типами імпульсної активності достовірно не відрізнялися, окрім клітини з тонічною імпульсною активністю, які мали найбільше значення вхідного опору, що відображалось у малому значенні реобазис (Табл. 3.1). При гіперполяризації мембрани від'ємними імпульсами струму тривалістю 1 та 2 с мембранний потенціал нейронів ГТН спершу досягав максимального по модулю значення ( $U_{peak}$ ), після чого спостерігалася релаксація до стаціонарного значення ( $U_{steady}$ ) (Рис.3.2).



**Рис. 3.1. Типи викликаної електричної активності в культивованих нейронах ГТН. Репрезентативні відповіді нейронів ГТН: адаптивні (а), тонічні (б) та нейрони з затриманою генерацією потенціалів дії (в).**

Даний ефект називають вхідним випрямленням, тому що за деполяризаційний вигин, який спостерігається при гіперполяризації мембрани відповідають іонні канали, що активуються гіперполяризацією [165-169]. Ці канали є потенціалзалежними, а струмам, що протікають через них властиве вхідне випрямлення [166, 170, 171].

Характеристика	Тонічні нейрони	Адаптивні нейрони	Нейрони затриманої генерації
Вхідний опір, МОм	$1104 \pm 300$ (n = 16)	$746 \pm 200$ (n = 10)*	$716 \pm 82$ (n = 6)*
Потенціал спокою, мВ	$-42 \pm 6$ (n = 16)	$-46 \pm 7$ (n = 10)	$-44 \pm 8$ (n = 6)
Діаметр соми, мкм	$19 \pm 1$ (n = 16)	$19 \pm 2$ (n = 10)	$20 \pm 1$ (n = 6)
Ємність, пФ	$32 \pm 8$ (n = 16)	$28 \pm 7$ (n = 10)	$27 \pm 5$ (n = 6)
Коефіцієнт аномального випрямлення, %	$44 \pm 9$ (n = 37)	$24 \pm 7$ (n = 16)*	$20 \pm 7$ (n = 6)*

**Таблиця 3.1. Пасивні характеристики нейронів ганглія трійчастого нерва з різними типами електричної активності. \* P < 0,05.**

Ці процеси кількісно оцінюється за коефіцієнтом вхідного випрямлення:

$$\eta = \frac{U_{peak} - U_{steady}}{U_{peak}} \bullet 100\% \quad [168, \quad 172].$$

Його значення залежало від рівня гіперполяризації (Рис. 3.2, б). Для кількісного порівняння вхідного випрямлення обчислення цього коефіцієнта розраховувалося для тих реєстрацій, у яких значення  $U_{peak}$  було в межах від -120 до -100 мВ [172]. Вважають, що даній клітині притаманне вхідне випрямлення, якщо значення цього коефіцієнта перевищує 5% [172]. Результати експериментів показали, що найбільше

значення цього коефіцієнта характерне для нейронів з тонічною електричною активністю (Рис. 3.2).

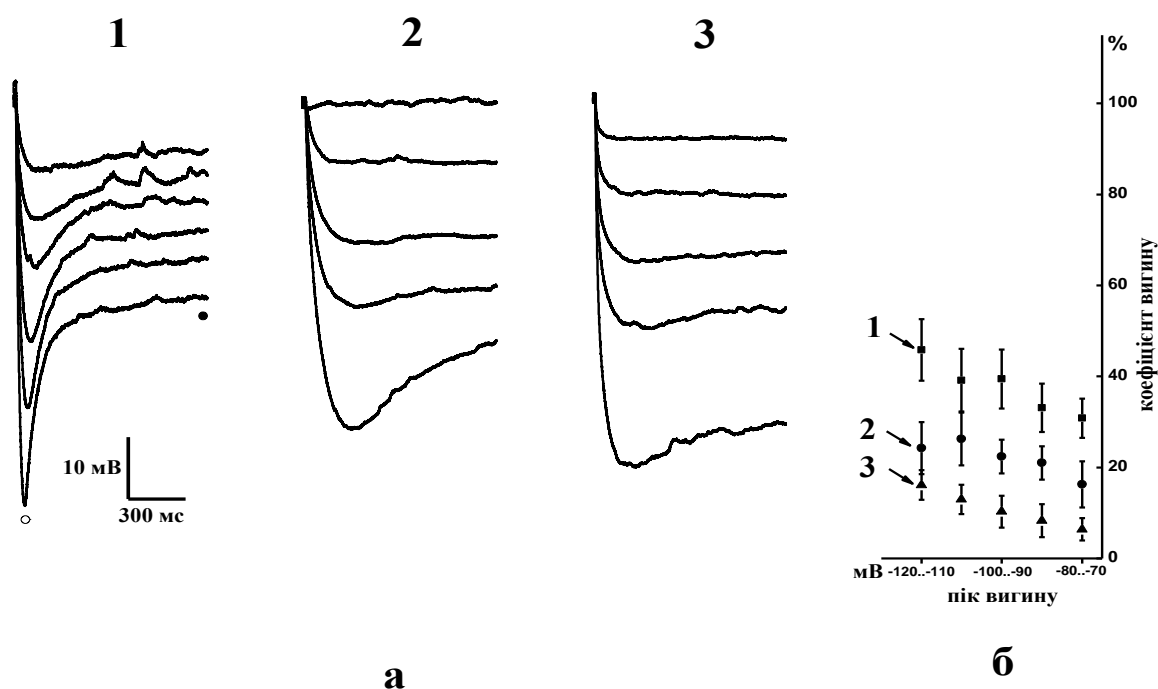
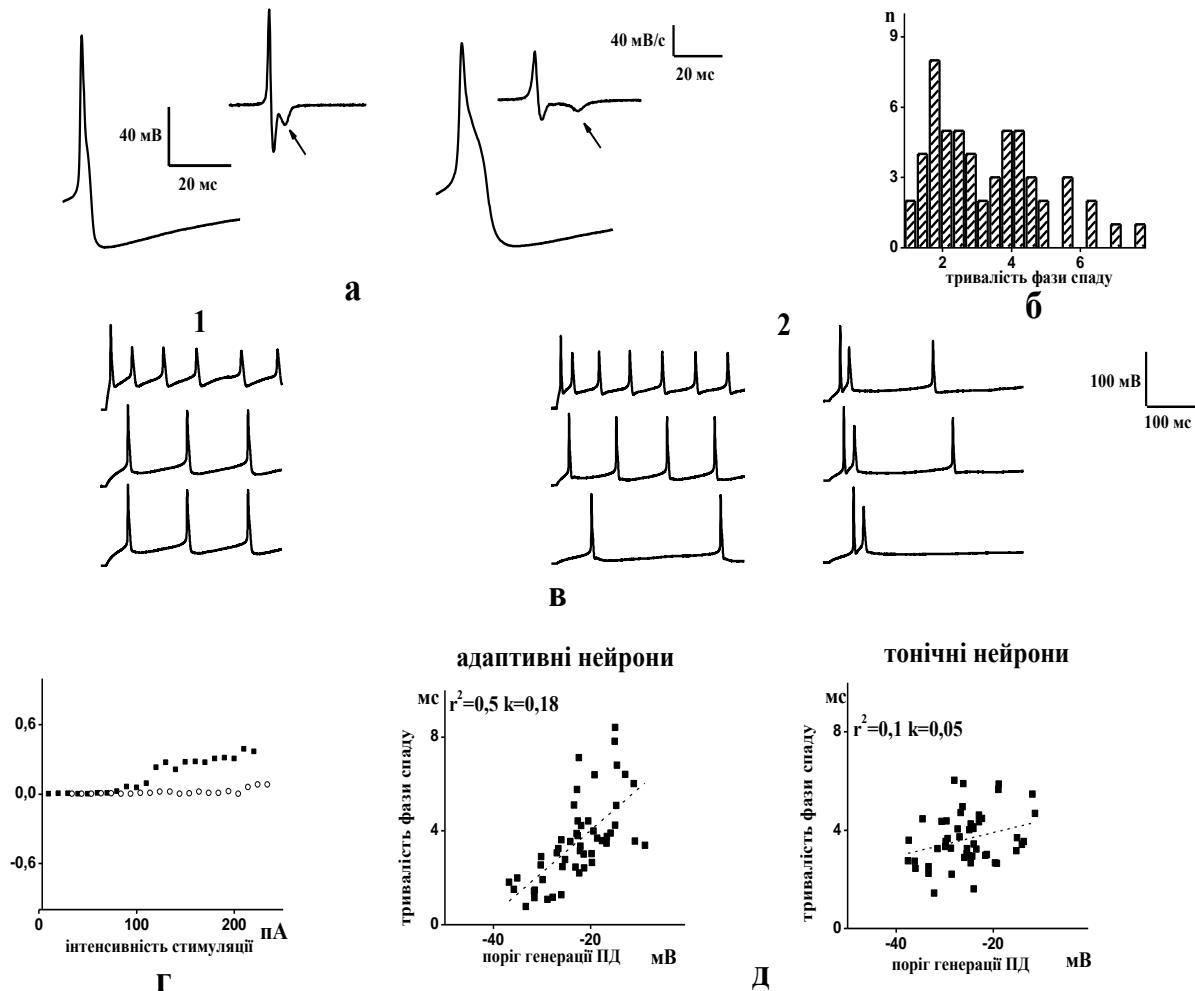


Рис. 3.2. Зміни мембранного потенціалу у відповідь на гіперполяризуючі імпульси струму: а – нейрони тонічні (1), адаптивні (2) та з затриманою генерацією ПД (3). На а позначено  $U_{\text{peak}}$  ( $\circ$ ) та  $U_{\text{steady}}$  ( $\bullet$ ); б – значення коефіцієнтів входного випрямлення при різних рівнях гіперполяризації для тонічних ( $n = 11$ ), адаптивних ( $n = 7$ ) та нейронів з затриманою генерацією ПД ( $n = 3$ )

### 3.1.3 Активні електрофізіологічні характеристики нейронів ГТН

Більша частина нейронів ГТН генерувала ПД характерної форми з "горбом" на фазі реполяризації. Криві похідних мембранного потенціалу по часу для таких ПД містили додаткову від'ємну компоненту (Рис.3.3 а). Тривалість ПД

нейронів варіювалася від 2 до 10мс. Гістограма розподілу цієї величини для адаптивних та тонічних нейронів містила два піки, що свідчить про негомогенність цієї популяції нейронів ГТН (Рис. 3.3 б). Для тонічних нейронів спостерігалася аналогічна неоднорідність (гістограми розподілу не представлені).



**Рис. 3.3. Особливості активних електрофізіологічних характеристик нейронів ГТН: а – форми ПД для двох різних адаптивних нейронів. Для кожного ПД наведено похідну зміни мембранного потенціалу, стрілкою позначено додаткову від'ємну компоненту; б – розподіл значень тривалостей ПД для адаптивних нейронів ( $n = 55$ ); в – початкова фаза відповіді тонічного нейрона на деполяризацію, за якими їх поділено на дві підгрупи 1 та 2; г – залежності коефіцієнта  $\beta$  від інтенсивності деполяризації мембрани для тонічних нейронів двох підгруп; д – діаграми розсіювання для**

значень тривалості фази спаду та порогу генерації ПД для адаптивних та тонічних нейронів. На (д) наведено графіки лінійної регресії та значення коефіцієнта детермінації ( $r^2$ ).

У тонічних нейронів зареєстровано два типи відповідей на деполяризацію, які мали відмінності на початку реєстрації, відповідно цю групу було поділено на дві підгрупи [169, 173]. Нейрони першої підгрупи на початку стимулу генерували серію ПД з різною амплітудою (Рис. 3.3 г). Для числової характеристики такої імпульсації використовували коефіцієнт  $\beta = \frac{AP_2(I) - \langle AP \rangle (I)}{AP(I)} \cdot 100\%$  де  $AP_2$ ,  $\langle AP \rangle$  – амплітуда другого та усередненого ПД в середині реєстрації,  $I$  – сила струму, що пропускали через мембрану нейрона. Для першої групи значення  $\beta$  залишалося незмінним, на відмінну від другої, де зі збільшенням струму це значення зростало (Рис. 3.3 г).

Характеристика	Тонічні нейрони підгрупа 1	Тонічні нейрони підгрупа 2	Адаптивні нейрони	Нейрони з затриманою генерацією ПД
Реобаза, пА	$17 \pm 2$ (n = 57)	10 (n = 56)*	$81 \pm 28$ (n = 74)*, **	$68 \pm 14$ (n = 8)*, **
Поріг генерації ПД, мВ	$-25 \pm 7$ , (n = 35)	$-32 \pm 5$ , (n = 56)*	$-22 \pm 7$ , (n = 74)*, **	$-17 \pm 7$ (n = 7)*, **, ****
Амплітуда ПД, мВ	$102 \pm 2$ , (n = 57)	$112 \pm 9$ , (n = 45)	$96 \pm 11$ , (n = 74)*, **	$86 \pm 19$ , (n = 8)*, **, ****



Амплітуда слідової гіперполяризації, мВ	$-29 \pm 6$ , (n = 57)	$-18 \pm 6$ (n = 56)*	$-32 \pm 8$ , (n = 74)*, **	$-40 \pm 5$ , (n = 8)*, **, ***
-----------------------------------------------	---------------------------	--------------------------	--------------------------------	------------------------------------

**Таблиця 3.2. Характеристики першого ПД у відповіді на деполяризуючий імпульс струму, отримані для відповідних підгруп тонічних нейронів, адаптивних нейронів та нейронів з затриманою генерацією**

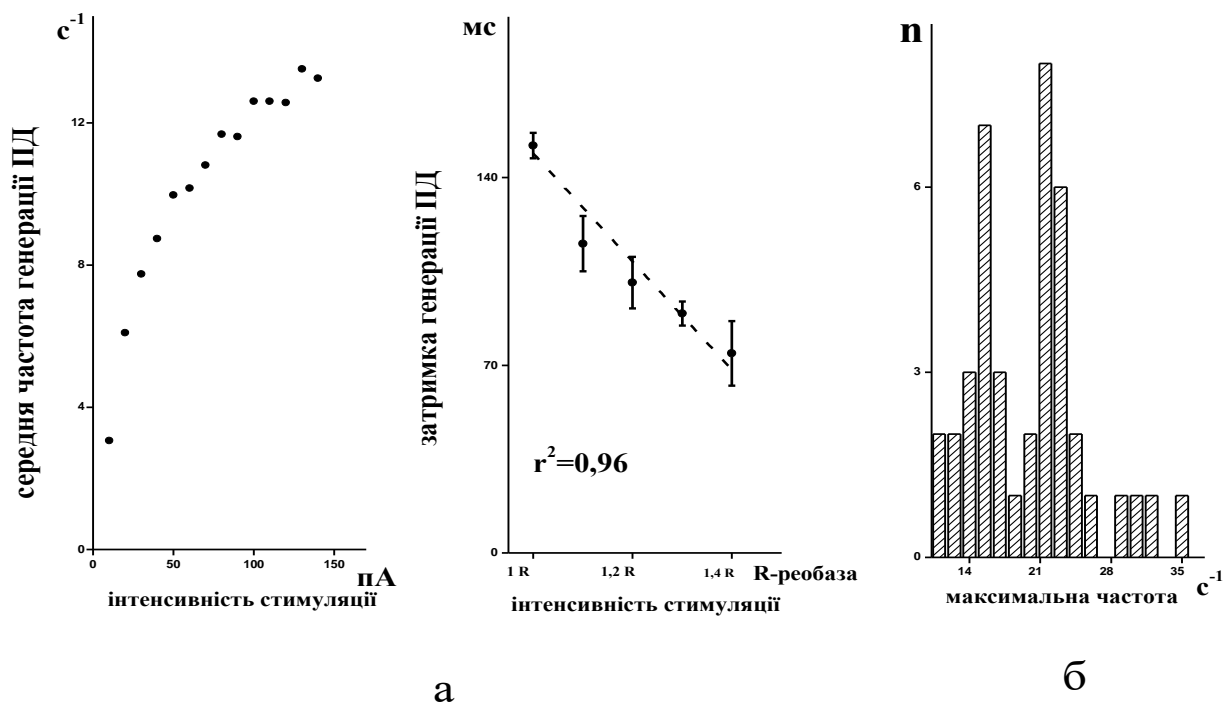
**\* P < 0,05 відносно першої підгрупи тонічних нейронів; \*\* P < 0,05 відносно другої підгрупи групи тонічних нейронів; \*\*\*P < 0,05 відносно групи адаптивних нейронів.**

Решта характеристик окремого ПД клітин з різною електричною активністю означених груп достовірно відповідали нормальному розподілу, при цьому середні значення цих розподілів відрізнялися (Табл. 3.2).

У літературі форму ПД пов'язують з типом сенсорного сигналу, оскільки ноцицепторам властиво генерувати більш тривалі ПД [25, 174]. За результатами наших досліджень використання цієї ознаки для ідентифікації типу модальності, притаманного таким нейронам, недостатньо. Тому у даному аналізі було використано іншу властивість: нейронам С-волокон характерний найнижчий поріг генерації і триваліший ПД [10, 11]. Саме тому було проаналізовано залежність тривалості фази спаду від порогу генерації ПД. Було встановлено, що нейрони з найнижчим порогом мають триваліший ПД. Ця тенденція спостерігається для всіх типів нейронів. Однак у адаптивних нейронів відповідний коефіцієнт нахилу відрізнявся від тонічних на порядок, і діапазон значень тривалостей ПД був значно ширший (Рис. 3.3 д).

Важливою характеристикою для сигнальної функції нейрона є залежність «вхід–вихід». У тонічних нейронів при збільшенні сили струму середня частота генерації ПД лінійно зростала до максимального стаціонарного значення, а

подальша деполяризація призводила припинення генерації (Рис. 3.4 а). Значення максимальної частоти генерації ПД для різних клітин становили від 8 до 21 Гц. Гістограма розподілу цього показника містить два піки, що доводить наявність принаймні двох популяцій тонічних нейронів (рис.3.4 б). Більшість адаптивних нейронів на деполяризацію генерували окремі ПД. У нейронів третьої групи ПД затримка на початку відповіді при деполяризації мембрани зменшувалася за лінійним законом (Рис. 3.4 а).



**Рис. 3.4. Властивості електричної активності тонічних нейронів та нейронів з затриманою генерацією ПД: а – залежність середньої частоти ПД тонічних нейронів (ліворуч) та затримки генерації ПД для нейронів з затриманою генерацією ПД (праворуч) від інтенсивності деполяризації. Для нейронів з затриманою генерацією ПД наведено середні значення затримки генерації ПД залежно від різних значень реобазиса ( $n = 4$ ); б – розподіл максимальних частот генерації ПД у тонічних нейронах ( $n = 42$ ).**

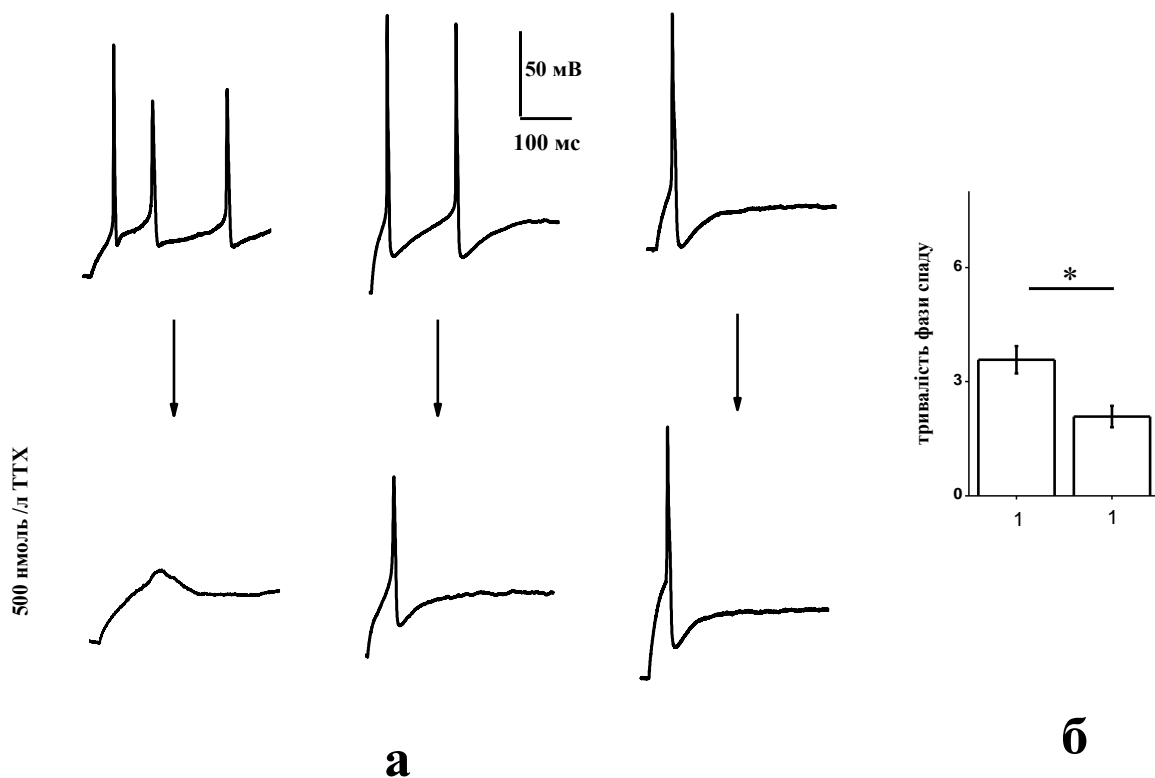
### **3.1.4 Відмінності у електрофізіологічних показниках між чутливими та резистивними до тетродотоксину нейронами ГТН**

Для нейронів ГТН, що формують А $\delta$  або С волокна, характерна часткова або повна резистивність до тетродотоксину (ТТХ) [30]. Таким чином, чутливість до ТТХ є важливим маркером для характеристики таких нейронів. Дію ТТХ (в концентрації 500 нмоль/л) на імпульсну активність було перевірено у 20 нейронах. Показано, що у тонічних нейронах ( $n = 7$ ) спостерігалось повне пригнічення імпульсної активності (Рис. 3.5 а). У адаптивних ( $n = 1$ ) та тонічних нейронах ( $n = 5$ ) аплікація ТТХ частково пригнічувала імпульсну активність (Рис. 3.5 а). Аплікація цього токсину не змінювала електричну активність адаптивних нейронів ( $n = 4$ ) та нейронів з затриманої генерацією ( $n = 3$ ) (Рис. 3.5 а). Часткова або повна нечутливість до цього токсину вказує на експресію у мембрані натрієвих каналів нечутливих до ТТХ. У наших дослідженнях було виявлено відмінність між нейронами з різною чутливістю до ТТХ: клітини, що повністю або частково нечутливі до цього токсину, генерували триваліший ПД, ніж ті, у яких імпульсна активність пригнічувалася його дією (Рис. 3.5 б). Відповідність між чутливістю до ТТХ та тривалістю фази реполяризації вказує на приналежність нейронів ГТН з даними параметрами до ноцицепторів.

### **3.1.5 Вплив НА на пасивні показники нейронів ГТН**

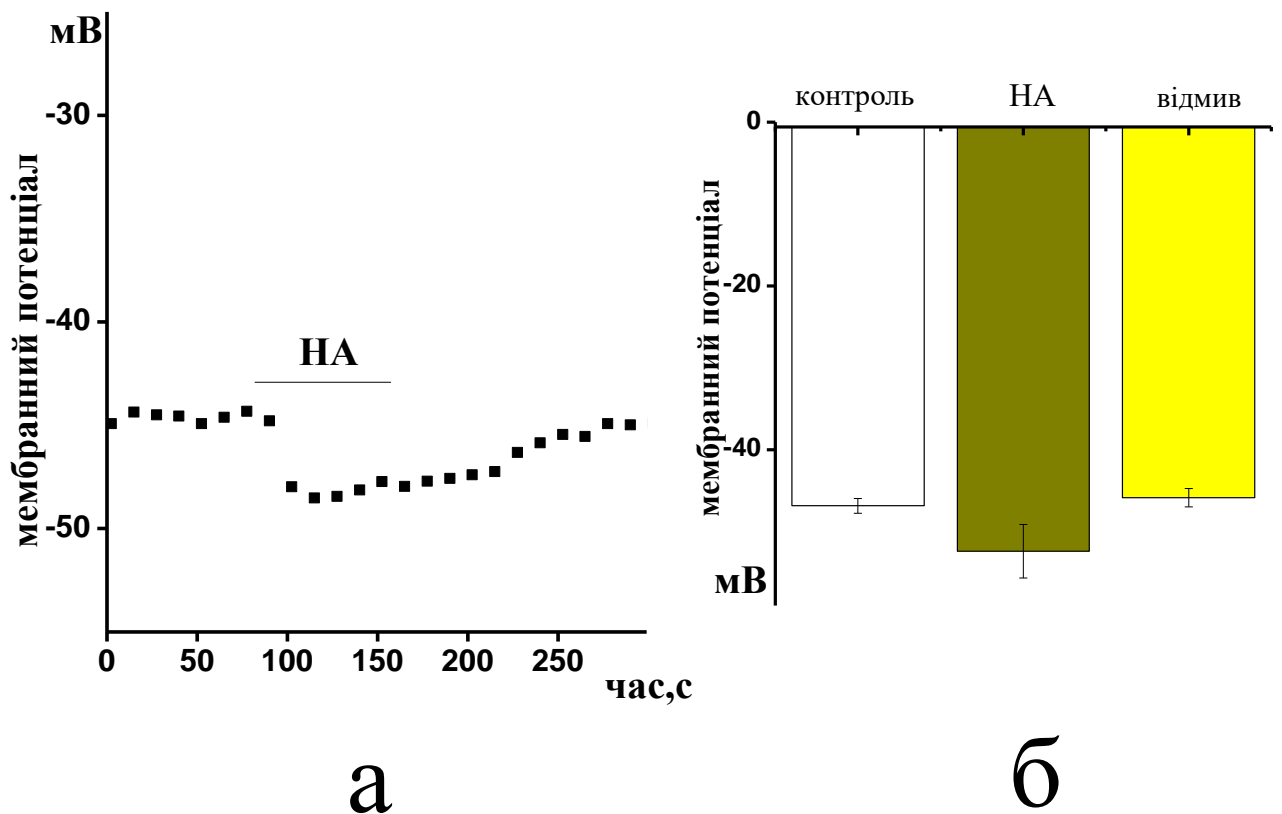
Для оцінки механізмів, що лежать в основі адренергічної модуляції електричної активності, проведено аналіз змін у характері генерації ПД нейронами ГТН при аплікації норадреналіну (НА).

Дія НА призводила до змін у наступних електрофізіологічних характеристиках: мембранний потенціал спокою, вхідне випрямлення, параметри ПД, слідова гіперполяризація та характер імпульсації.



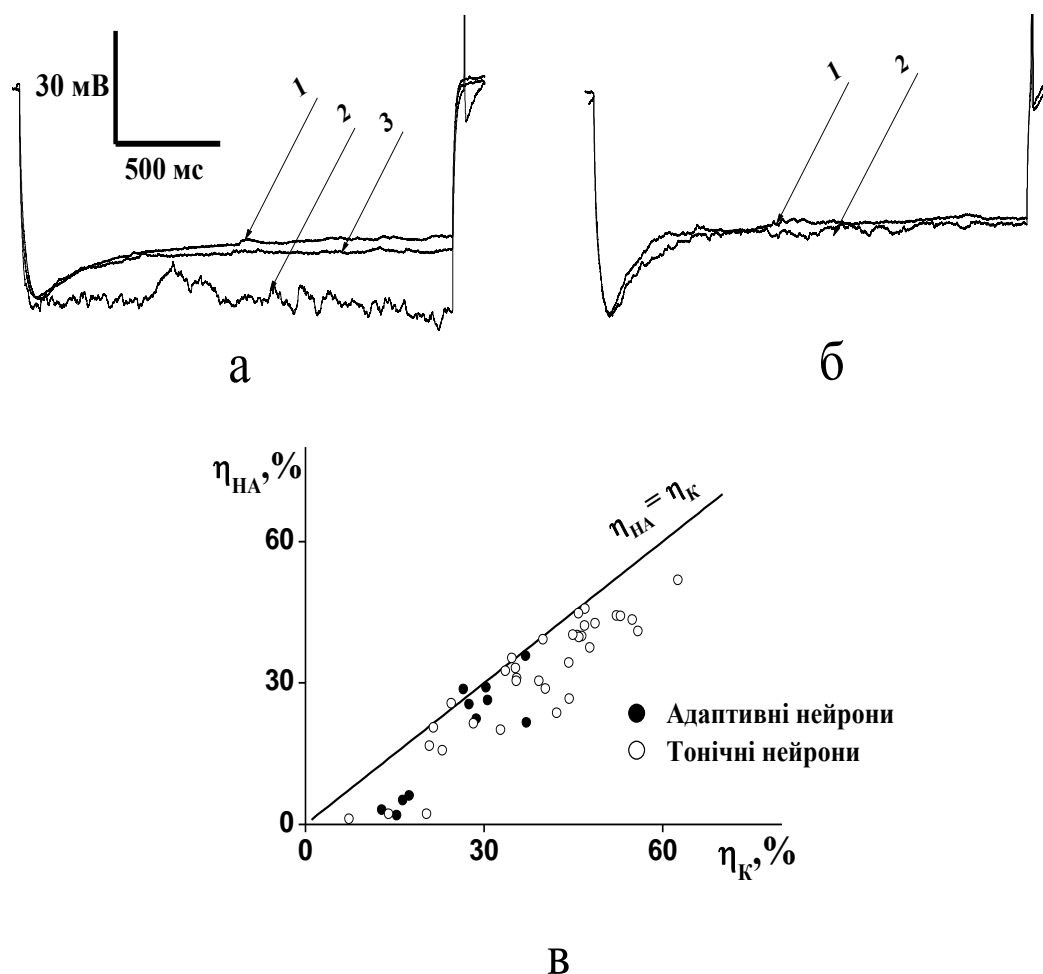
**Рис. 3.5. Дія ТТХ (500нмоль/л) на електричну активність нейронів ГТН а – дія ТТХ на електричну активність нейронів ГТН; б – порівняння тривалостей фаз спаду ПД нейронів, у яких аплікація ТТХ не призводила до змін електричної активності або пригнічення було частковим (n = 10) з тими, у яких спостерігалася повна нівеляція електричної активності (n = 7); \*P< 0,05 між тривалостями фаз спаду (U тест Манна–Уїтні).**

Вплив НА на мембранний потенціал спокою було перевірено у 17 нейронах ГТН. У 9 клітин (53%) (6 з тонічною, 2 з адаптивною та 1 з затриманою генерацією ПД) зміни не були виявлені. Зміщення на  $5 \pm 2$  мВ до більш негативних значень зареєстровано у 8 нейронах (47%) (6 з тонічною та 2 з адаптивною відповіддю) (Рис.3.6).



**Рис. 3.6 Дія норадреналіну (НА) на мембранний потенціал спокою. а – приклад зміни мембранного потенціалу при аплікації НА у адаптивного нейрона. б – порівняння усереднених значень мембранного потенціалу у 5 нейронів з різним типом електричної активності в контролі, при дії НА та відмиві.**

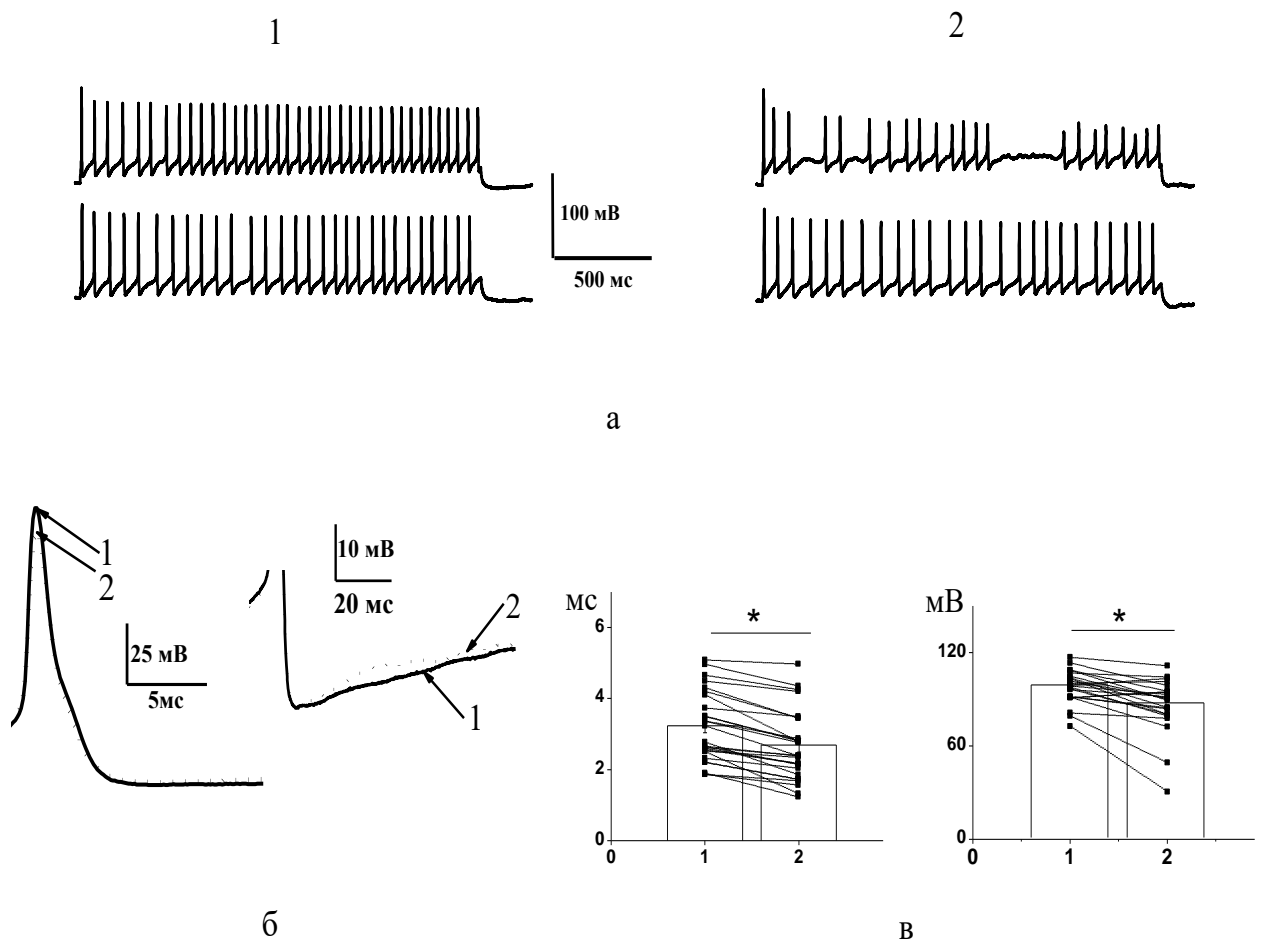
Проаналізовано норадренергічний вплив на ефект вхідного випрямлення на основі змін відповідного коефіцієнта ( $\eta$ ) в контролі та при аплікації НА. Для нейронів з усіма типами активності було визначено зміни у коефіцієнті вхідного випрямлення при аплікації НА. Значення цього коефіцієнта для тонічних нейронів ( $38 \pm 2\%$ ;  $n = 34$ ) було більшим у порівнянні з адаптивними нейронами ( $25 \pm 3\%$ ;  $n = 11$ ).



**Рис. 3.7. Вплив НА (100 нмоль/л) на ефект вхідного випрямлення нейронів ГТН. Представлено зміни мембранного потенціалу при гіперполяризації мембрани двох різних нейронів ГТН з вираженими змінами (а) та з відсутнім ефектом при аплікації НА (б). 1 – контроль, 2 – при аплікації НА (100 мкмоль/л), 3 – відмив. в – діаграма розсіювання для значень коефіцієнта вхідного випрямлення ( $\eta$ ), де вісь абсцис – контроль ( $\eta_K$ ), вісь ординат – дія НА ( $\eta_{HA}$ ). За відсутності у нейрона НА-індукованих змін  $\eta$  відповідна точка діаграми розташована на прямій з одиничним коефіцієнтом нахилу ( $\eta_{HA} = \eta_K$ ).**

У нейронів з затриманою генерацією ( $n = 3$ ) даний ефект практично був відсутнім. Аплікація НА призводила до зменшення коефіцієнта вхідного

випрямлення (Рис. 3.7 а), відповідні середні значення склали  $(32 \pm 2)\%$  для тонічних та  $(19 \pm 4)\%$  для адаптивних нейронів. Вплив НА у цих двох групах не відрізнявся (Рис. 3.7 в), середні відповідних відносних значень  $\eta$  склали:  $0,84 \pm 0,1$  та  $0,76 \pm 0,04$  для тонічних та адаптивних нейронів відповідно. У 10% нейронів дія НА не призводила до пригнічення деполяризаційного вигину (Рис.3.7 б)



**Рис. 3.8. Зміни електрофізіологічних параметрів нейронів ГТН, що зберігали здатність до тонічної імпульсації при аплікації НА.**

**а – відповіді тонічного нейрона ГТН на деполяризацію мембрани пороговим та максимальним імпульсом струму в контролі та при аплікації НА. б –**

реєстрації ПД та слідової гіперполяризації. Статистичне порівняння значень амплітуди (*ліворуч*) та фази спаду ПД (*праворуч*). 1 – контроль, 2 – при аплікації НА (100 мкмоль/л). На а та б представлені реєстрації від одного нейрона ГТН.

### 3.1.6 Норадренергічна модуляція електричної активності нейронів ГТН

Для усіх трьох груп нейронів було досліджено НА-індуковані зміни у викликаній електричній активності. Аплікація НА призводила до змін у характері імпульсації та параметрів ПД (Рис. 3.8, Рис. 3.9) у 71% ( $n = 37$ ) тонічних нейронів, решта тонічних клітин (29%,  $n = 15$ ) були резистивними до норадренергічного впливу. Зареєстровано модифікації у характері активності: у частині нейронів (65%, 24 з 37) тонічна імпульсна активність зберігалася, однак зрив генерації наставав при меншому стимулі (Рис. 3.8 а). Ці зміни супроводжувалися статистично значимими змінами параметрів ПД: зниження амплітуди та тривалість фази спаду (Рис. 3.8 б, в). У решти тонічних нейронів (35%, 13 з 37) при дії НА спостерігалася припинення частотної генерації ПД (Рис. 3.9 а). Також було зареєстровано статистично значиме зниження амплітуд ПД та слідової гіперполяризації (Рис. 3.9 в).

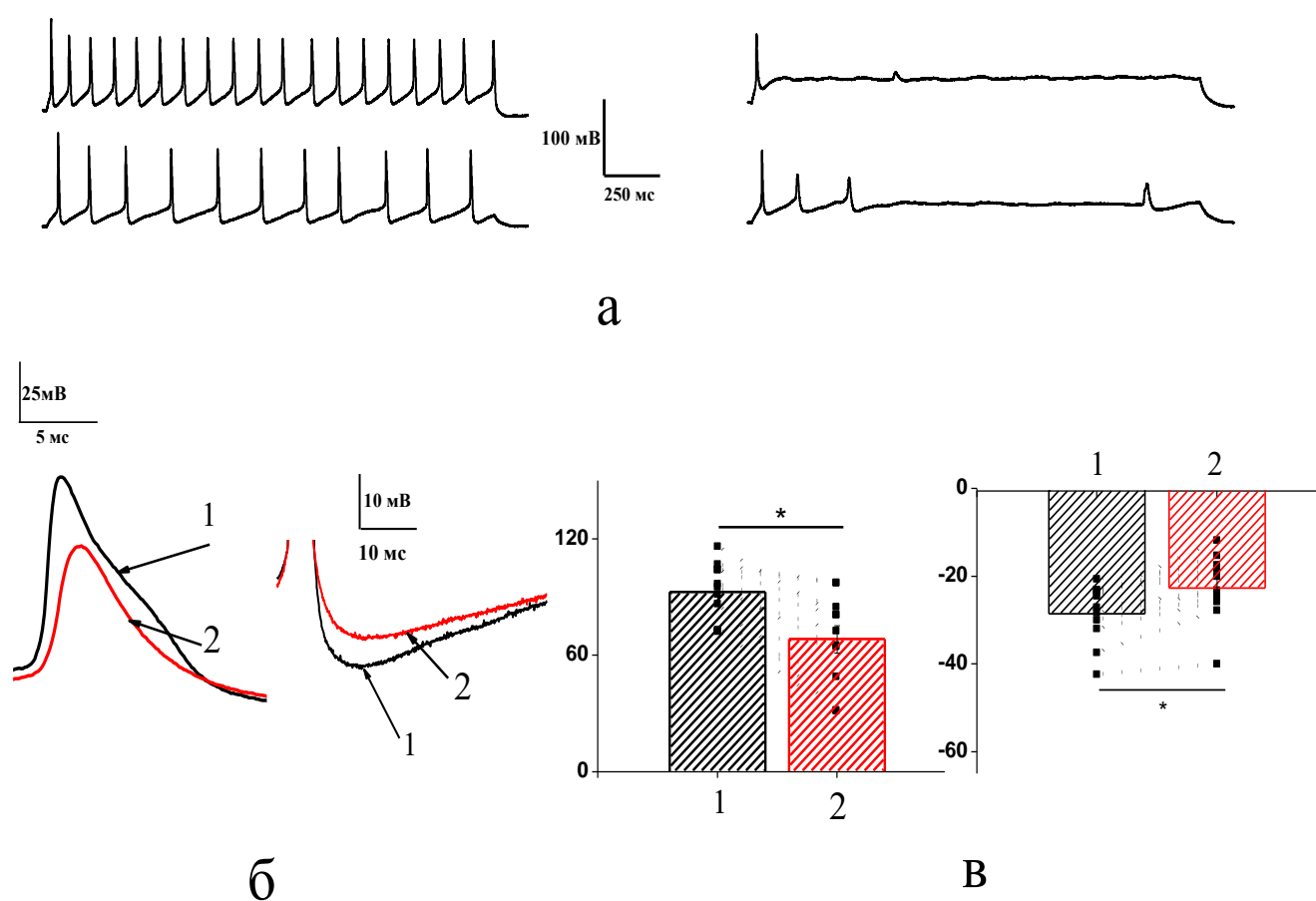
У адаптивних нейронах частка НА-чутливих клітин становила 67% ( $n = 14$ ). Аплікація НА в адаптивних нейронах та нейронах з затриманою генерацією ПД ( $n = 3$ ) призводила до зменшення амплітуди та тривалості фази спаду ПД (Рис. 3.10 а, в та г). Зміни у слідовій гіперполяризації не були зареєстровані. У всіх клітин з затриманою генерацією зменшувалася затримка виникнення ПД (Рис. 3.10 б).

## 3.2 Вплив НА на струми через потенціалкеровані кальцієві канали

Аналіз НА-індукованих змін у викликаній електричній активності показав участь ПКК та каналів, що активуються гіперполяризацією. Раніше було показано, що у свіжодисоційованих нейронах ГТН, активація  $\alpha_2$ -АР призводить



до пригнічення генерації ПД та до повної нівеляції деполяризаційного вигину при гіперполяризації мембрани. Відомо, що ці зміни пов'язані з потенціалзалежними іонними каналами, що активуються при негативному зміщенні потенціалу [77, 175]. Проте характеристики адренергічної модуляції ПКК у нейронах ГТН залишалися недослідженими.

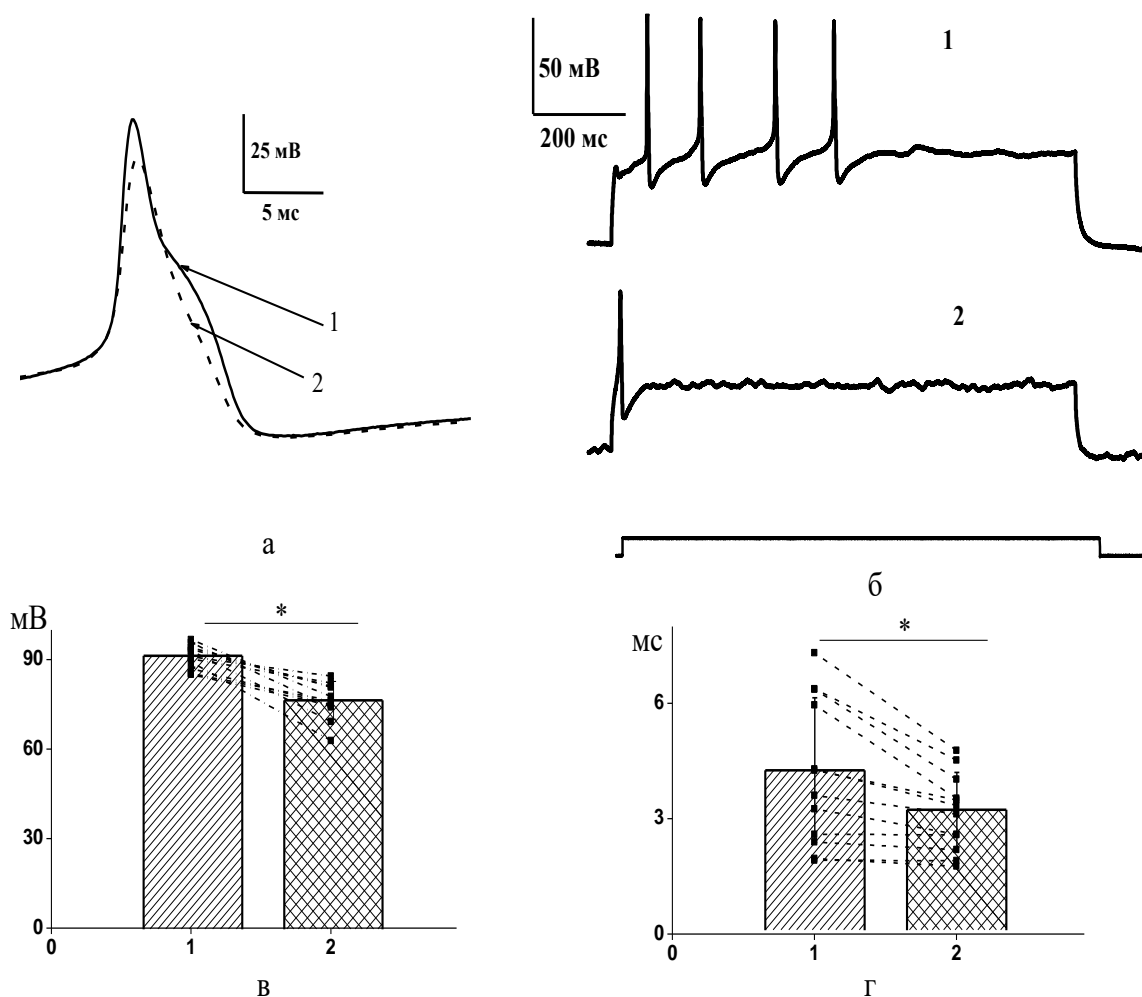


**Рис. 3.9** Зміни електрофізіологічних параметрів нейронів ГТН, які при дії НА втрачали здатність до тонічної генерації ПД.

**а** – відповіді тонічного нейрона ГТН на деполяризацію мембрани пороговим та максимальним імпульсом струму в контролі та при аплікації НА.

**б** – реєстрації ПД та слідової гіперполяризації в контролі та при дії НА. Статистичне порівняння значень амплітуди ПД (*ліворуч*) та слідової

гіперполяризації (*праворуч*). 1 – контроль, 2 – при аплікації НА (100 мкмоль/л). На а та б представлені реєстрації від одного нейрона ГТН.



**Рис. 3.9.** Вплив НА на електрофізіологічні характеристики адаптивних нейронів та нейронів з затриманою генерацією ПД.

**а** – реєстрації ПД адаптивного нейрона.

**б** – відповідь на деполяризацію нейрона з затриманою генерацією. Статистичне порівняння амплітуди (в) та тривалості фази спаду (г) ПД в адаптивних нейронах та нейронах з затриманою генерацією. 1 – контроль, 2 – при аплікації НА (100 мкмоль/л).

### 3.2.1 Роль іонів кальцію у електричній активності нейронів ГТН

Аплікація безкальцієвого розчину (розчин №V) призводила до зменшення амплітуди, тривалості фази спаду (Рис. 3.11 а, б) та збільшення частоти генерації ПД (Рис. 3.11 в, г). У меншій мірі ці зміни проявлялися і при аплікації НА. Це вказує на участь ПКК у модуляції електричної активності нейронів ГТН.

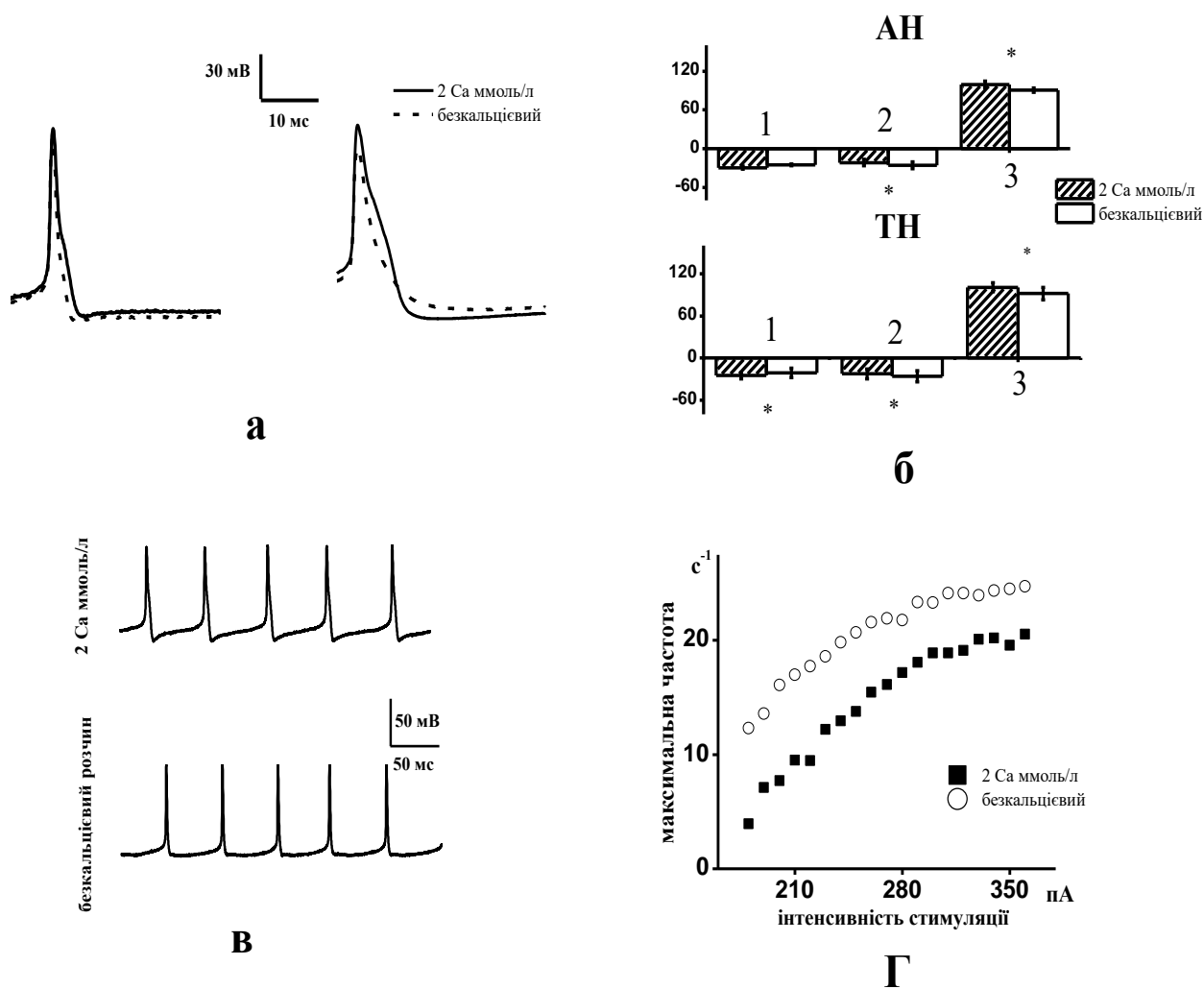


Рис. 3.11. Дія безкальцієвого розчину на електричну активність нейронів ГТН.

а – зміни форми ПД при зменшенні концентрації зовнішньоклітинного кальцію. б – порівняння параметрів ПД адаптивних та тонічних нейронів при 2 ммоль/л кальцію та безкальцієвому розчині: 1 – амплітуда слідової

гіперполяризації ( $n = 10$ ), 2 – поріг генерації ПД ( $n = 17$ ), 3 – амплітуда ПД ( $n = 11$ ). \*  $P < 0,05$ . в – Репрезентативні відповіді тонічних нейронів на деполяризацію мембрани при зменшені кальцію у зовнішньоклітинному розчині г – залежність середньої частоти від амплітуди деполяризуючого поштовху струму при зменшені кальцію у зовнішньоклітинному розчині.

### 3.2.2 Характеристики струмів через потенціалкеровані кальцієві канали нейронів ГТН

У нейронах з розміром соми до 30 мкм в режимі фіксації потенціалу при зовнішньоклітинному розчині №III та внутрішньоклітинному №IV у відповідь на послідовні зміщення потенціалу з інкрементом 5 мВ від підтримуваного потенціалу -80 мВ зареєстрований вхідний струм, ВАХ якого досягала максимуму при -10-0 мВ. Аплікація розчину №III з додаванням 100 мкмоль/л кадмію призводила до повного пригнічення цього вхідного струму (Рис. 3.12).

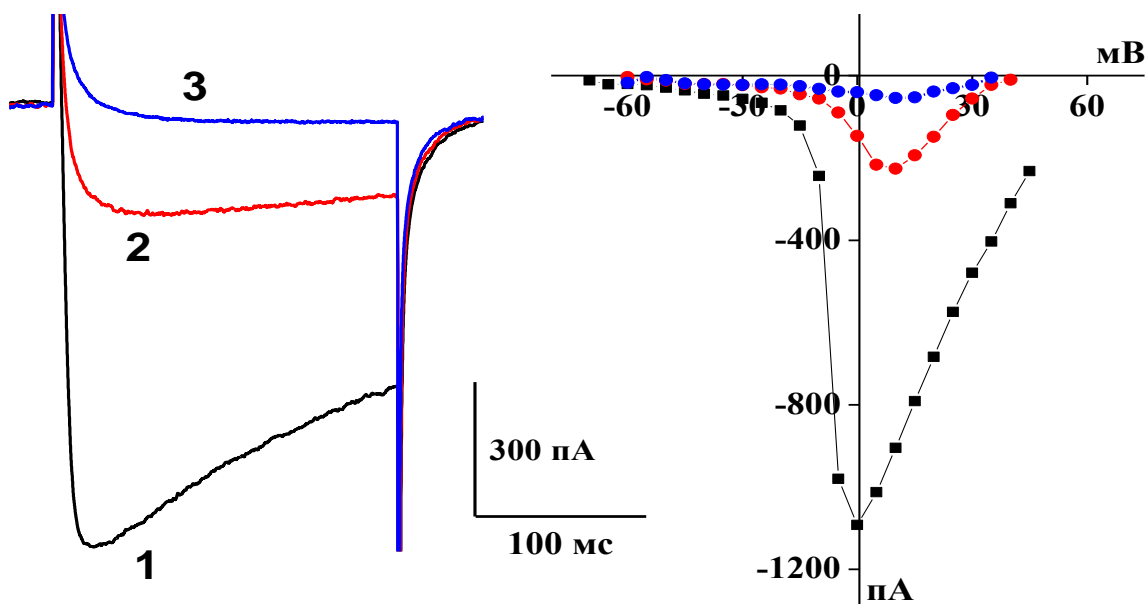
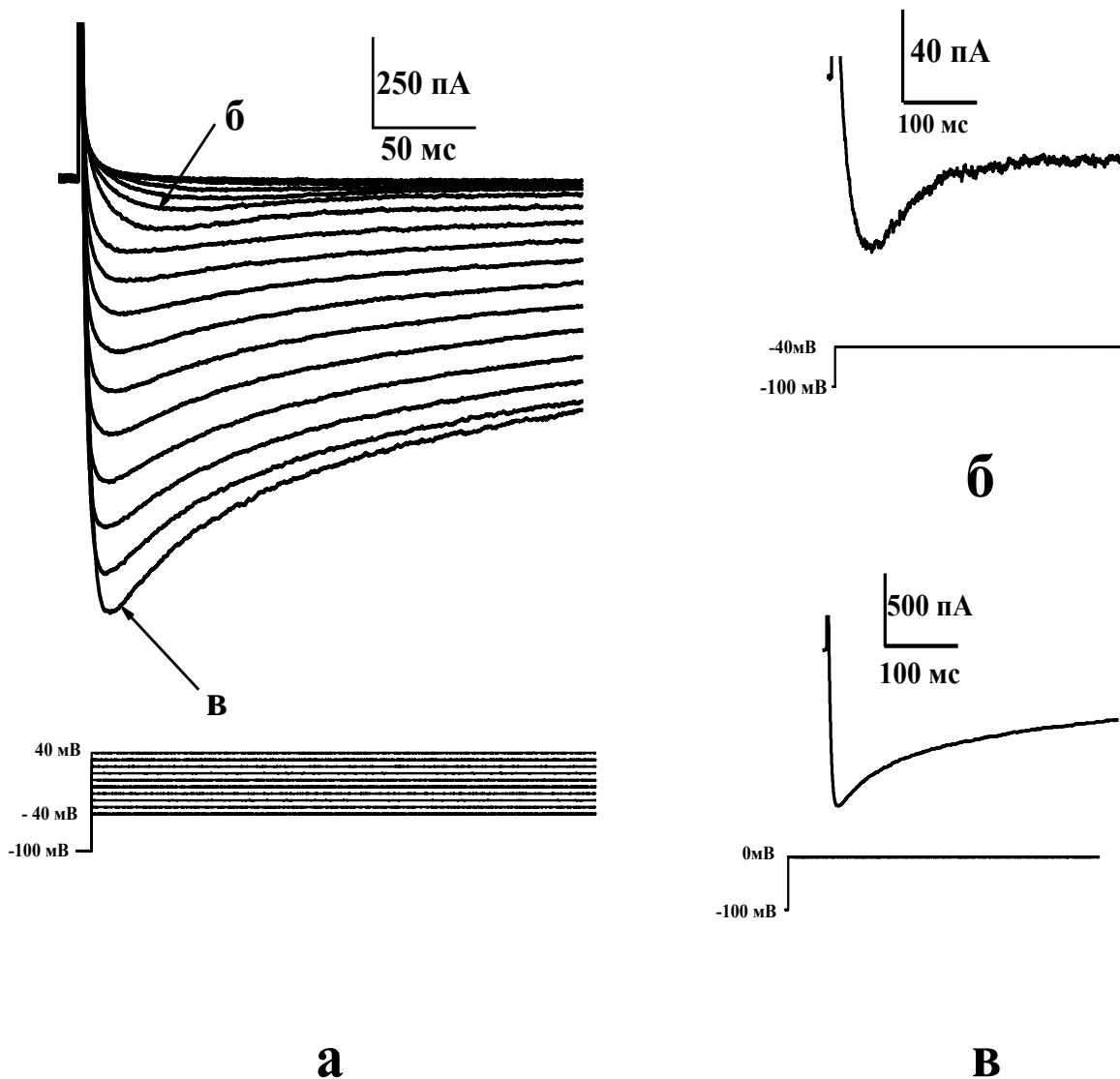


Рис. 3.12. Блокування кадмієм кальцієвих струмів. а –ресстрації вхідного струму у відповідь на зміну потенціалу від -80 мВ до 0 мВ з внутрішньо- №IV

**та зовнішньоклітинним розчином №III, при контролі (1) 30 мкмоль/л (2) та 100 мкмоль/л (3) кадмію. б – ВАХ піку кальцієвого струму.**

У 60% ( $n = 40$ ) нейронів ідентифіковано низько- та високопорогові кальцієві струми, решта демонструвала лише високопорогові. Низькопорогові кальцієві струми, яким властива швидка кінетика реєстрували при зміні потенціалу від -100 мВ до -40 мВ (Рис.3.13 а, б). У деяких клітин при деполяризації мембрани до 0 мВ внеском низькопорогового струму у інтегральний струм можна було знехтувати, бо високопороговий струм міг досягати 1 нА (Рис. 3.13 а, в). ВАХ піку інтегрального струму нейронів з низькопороговим кальцієвим струмом відрізнялися від тих, у яких він був відсутній (Рис. 3.14).

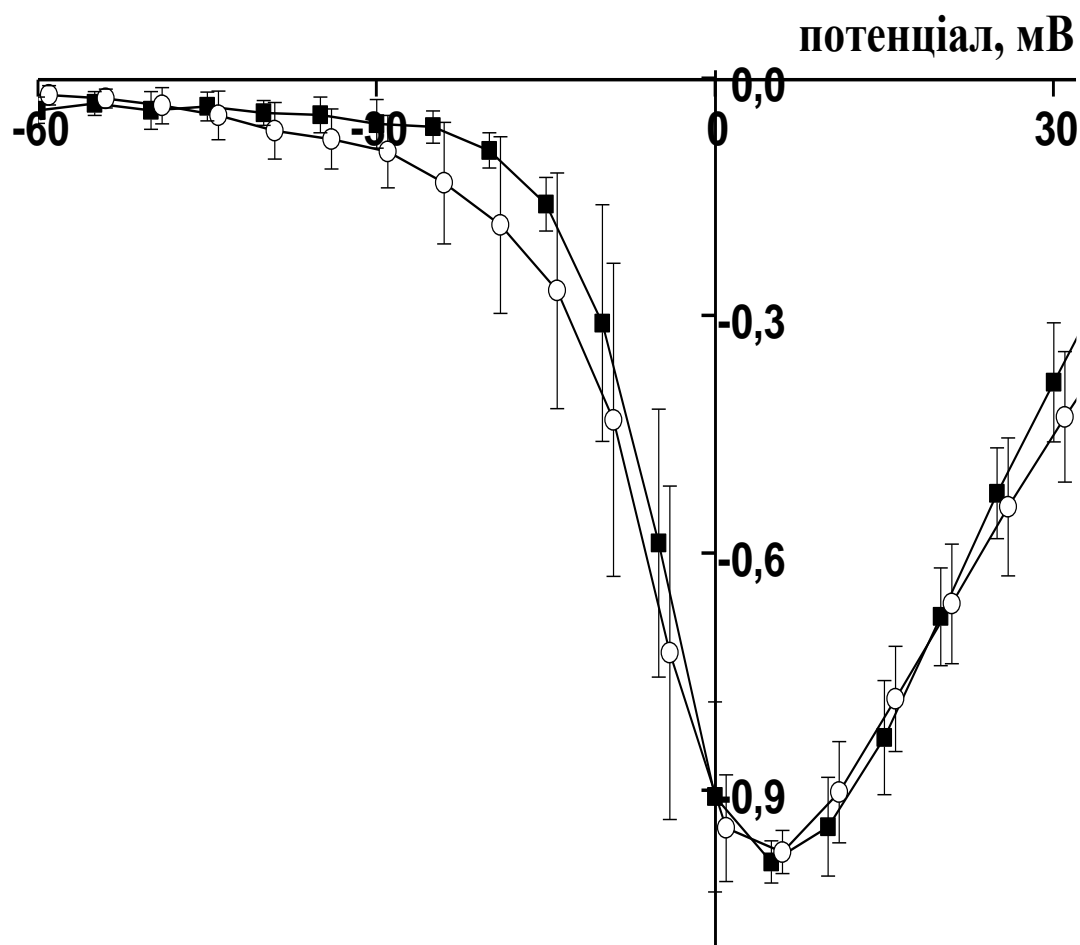
У більшій частині досліджень струмів через ПКК у якості носія струму було використано барій, оскільки вхід іонів кальцію здатні насамперед впливати безпосередньо на кальцієві канали, так і активувати різні кальційзалежні процеси. Було оцінено можливі зміни у струмах через ПКК залежно від проникаючого іону. При еквімолярній заміні іонів кальцію на іони барію у зовнішньоклітинному розчині №III амплітуда струму збільшувалася (середнє відношення склало  $1,73 \pm 0,12$ ;  $n = 5$ ) (Рис.3.15 а, б). Інактивація струмів через ПКК експоненційно апроксимувалася з сталою часу ( $120 \pm 16$  мс,  $n = 7$ ) та ( $141 \pm 13$  мс,  $n = 9$ ) при 2 ммоль/л кальцію та барію в зовнішньоклітинному розчині, відповідно (Рис.3.15 в). Отже, більшій частині нейронів часова інактивація не залежала від проникаючого катіону, що свідчить про присутність потенціалзалежної інактивації високопорогового кальцієвого струму.



**Рис. 3.13. Кальцієві струми нейронів ГТН. а –реєстрації кальцієвих струмів у відповідь на командні потенціали від -100 мВ до 40 мВ з інкрементом 5 мВ (а). Два види кальцієвих струмів у нейронах ГТН: низькопороговий кальцієвий струм, що зареєстрований у відповідь на зміну потенціалу від -100мВ до -40мВ (б) та високопороговий кальцієвий струм викликаний зміною потенціалу від -100 до 0 мВ (в).**

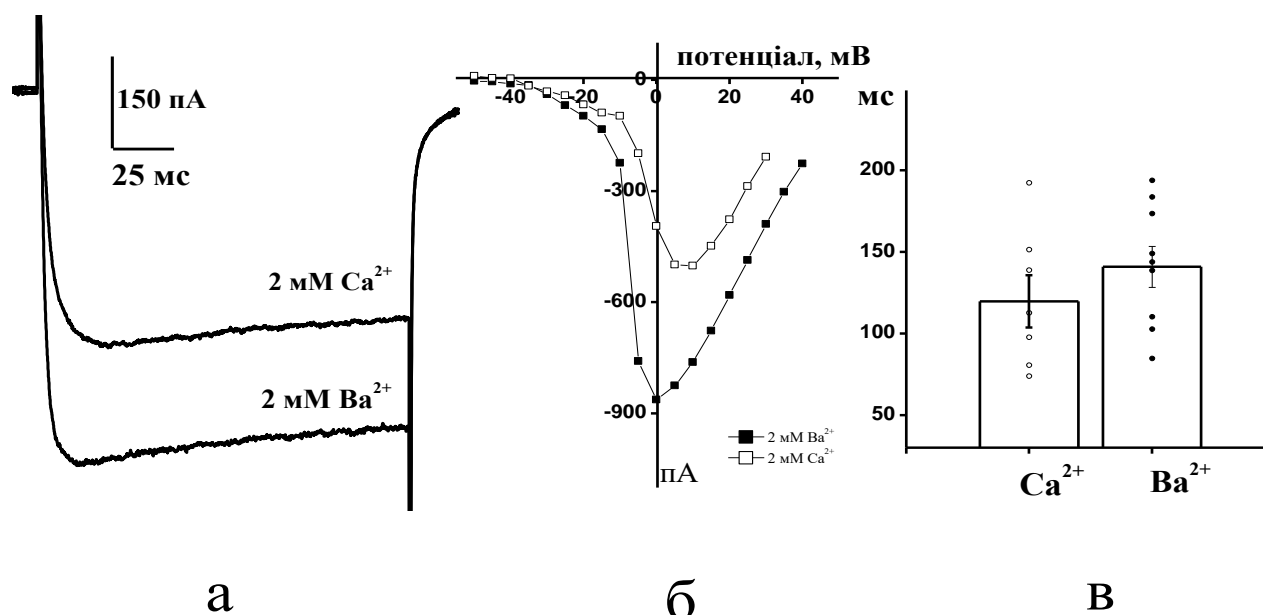
Кальційзалежна інактивація представляє собою швидкий примембранний механізм з від'ємним зворотнім зв'язком [110, 111, 176]. Для оцінки цього ефекту використовується двухімпульсний протокол: запускаються кондиціонуючі

деполяризуючі поштовхи від -80 до -40 з інкрементом 10 мВ, які контролюють вхід кальцію, через 15 мс після кожного кондиціонуючого поштовху прикладається тестуючий стимул від підтримуваного потенціалу -80 мВ до значенню потенціалу, що відповідає максимальному значенню струму через ПКК.



**Рис. 3.14.** Нормовані усереднені ВАХ піку кальцієвого струму нейронів ГТН, з (○) та без низькопорогового (■) компоненту.

Кальційзалежна інактивація оцінюється по її залежності від кількості кальцію, що входить у нейрон при кондиціонуючому імпульсі. Для нейронів ГТН при максимальному вході кальцію це зменшення в середньому становило  $(10 \pm 2\%; n = 15)$ . (Рис.3.16)



**Рис. 3.15. Збільшення струму через кальцієві канали нейронів ГТН при еквімолярній заміні іонів кальцію на барій. а – приклад реєстрацій кальцієвих та  $\text{Ba}^{2+}$  струмів, що отримані від однієї клітини при зміні потенціалу від  $-70 \text{ мВ}$  до  $0 \text{ мВ}$ . б – залежність струму від потенціалу на мембрані нейрона ГТН при зміні іонів кальцію на барій. в – порівняння часових сталих апроксимованих кривих спаду струму через ПКК.**



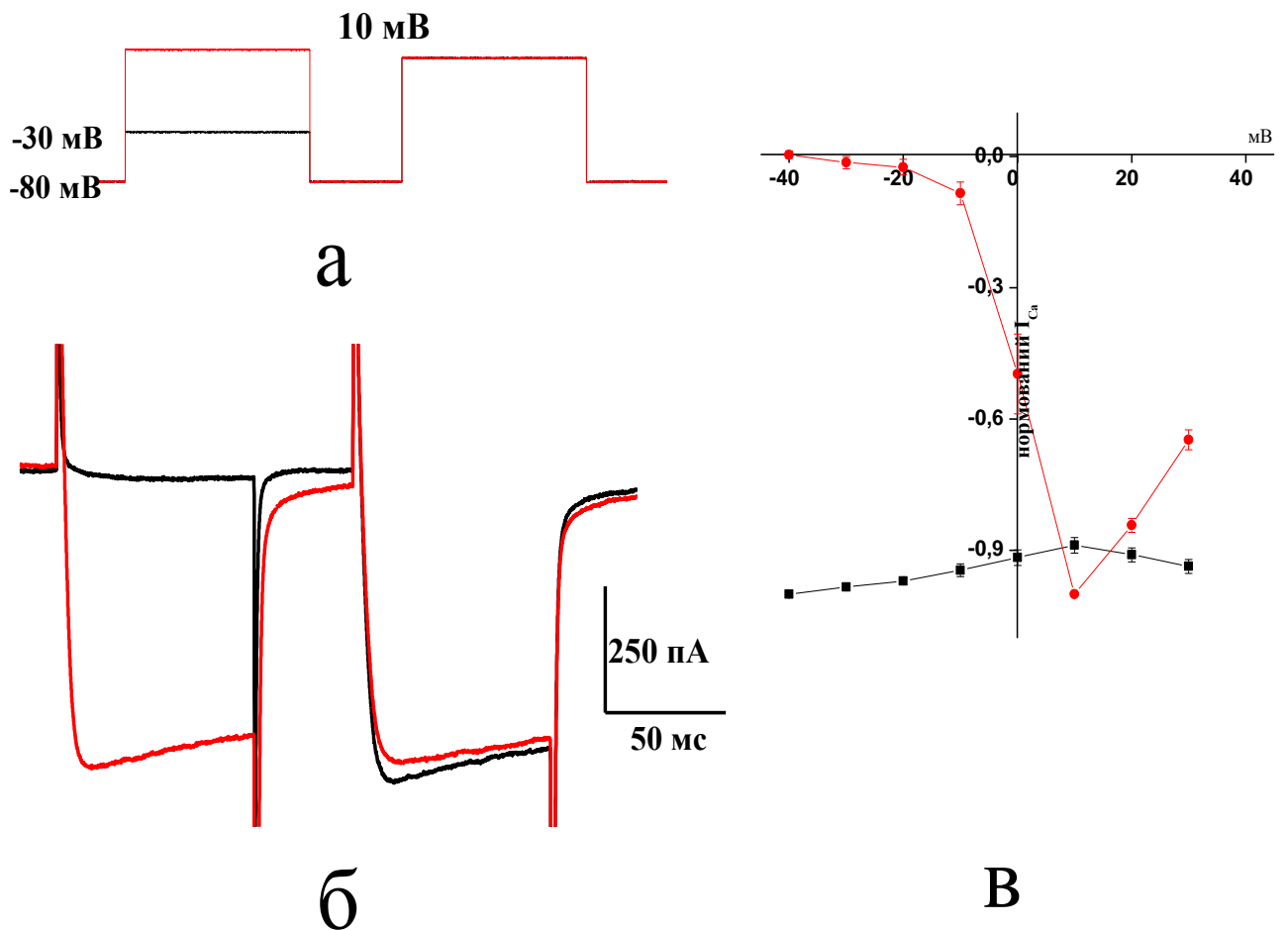


Рис. 3.16 Кальційзалежна інактивація потенціал-залежних кальцієвих струмів нейронів ГТН. а – схема двохімпульсного протоколу який застосовують, для визначення кальційзалежної інактивації нейронів. Кондиціонуючий імпульс прикладали від підримованого потенціалу - 80 до - 40 мВ, а потім з інкрементом 10 мВ і періодом 30 с продовжувалася деполяризація до 30 мВ. Кожний поштовх продовжувався тестовим стимулом до 10 мВ, при якому виникав струм. б- реєстрації струмів у відповідь на прикладання двохімпульсного протоколу. в – залежності зменшення піку кальцієвого струму (•), що реєструвався при тестовому імпульсі напруги від значення струму (•), що активувався при прикладанні кондиціонуючого імпульсу.

Стаціонарна потенціалзалежна інактивація струмів через ПКК нейронів ГТН, (з іонами барію у якості носія) була визначена згідно протоколам Ходжкіна і Хакслі

для потенціалкеронаих іонних каналів [177, 178]. Зменшення струму при зміні рівня підтримуваного потенціалу відбувалося за законом Больцмана з параметрами ( $V_{0,5} = -35 \pm 1$  мВ та  $k = 9 \pm 0,4$ ;  $n = 8$ ) (Рис.3.28).

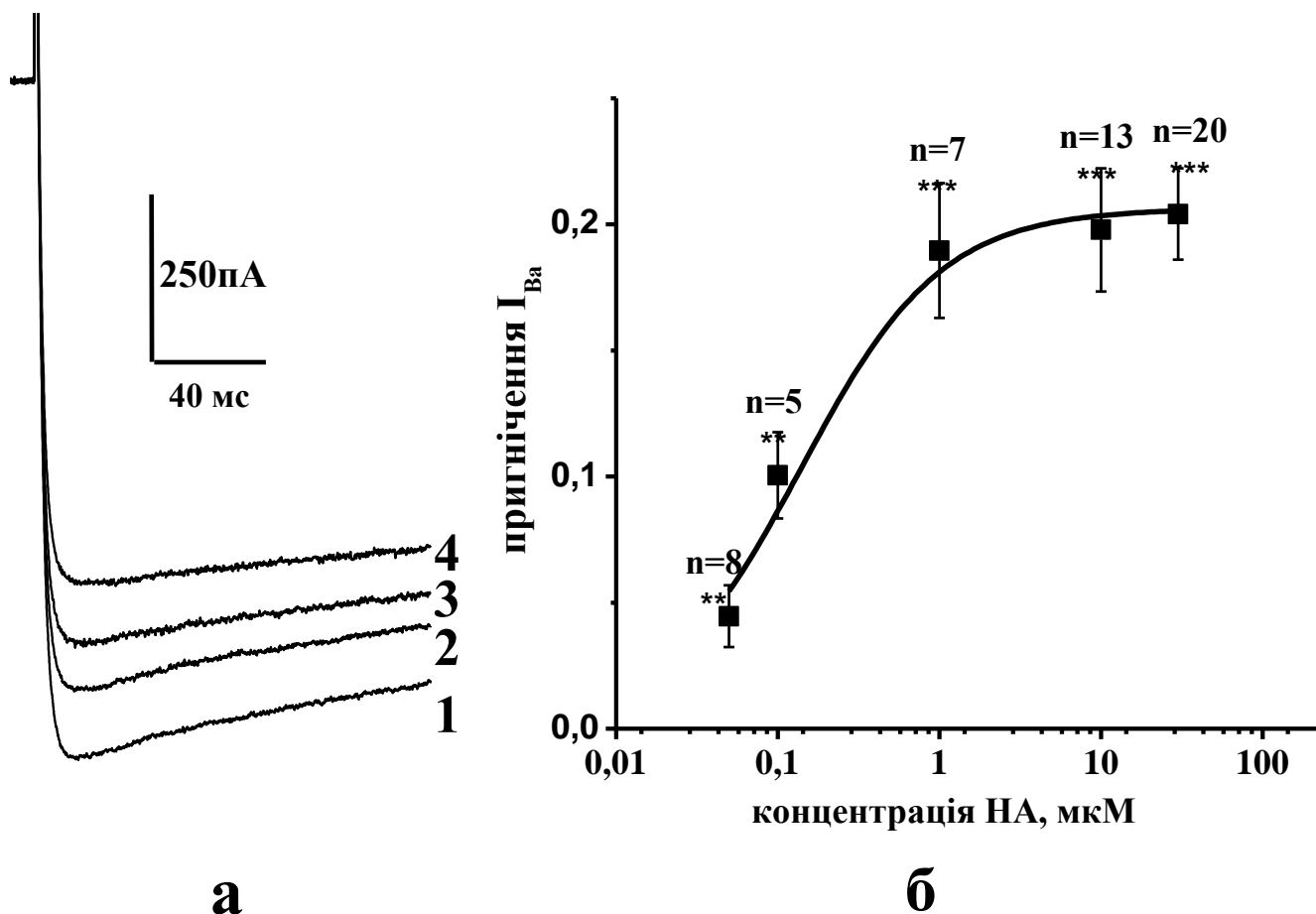
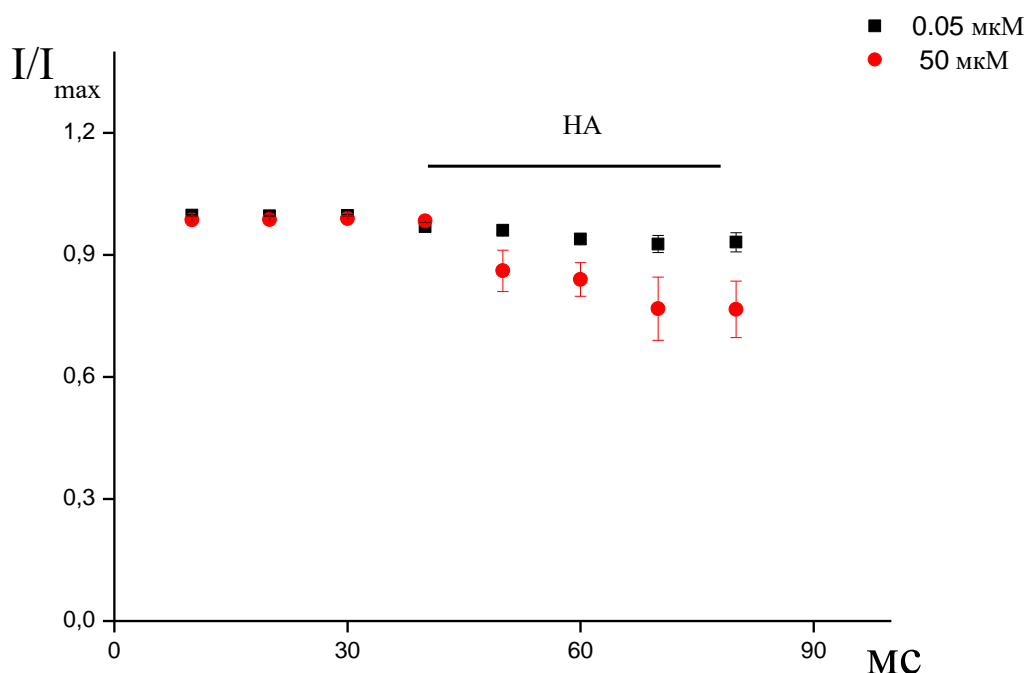


Рис. 3.17. НА-індуковане пригнічення струму через ПКК нейронів ГТН. а – репрезентативні реєстрації в контролі (1); при аплікації 0.1 мкмоль/л (2); 1 мкмоль/л (3) та 10 мкмоль/л НА (4). б – крива доза-ефект пригнічення струму через ПКК. Експериментальні значення апроксимовано кривою Міхаеліса-Ментен  $I = I_{max} / (EC_{50} + [HA])$  з визначеними параметрами  $I_{max} = 0,21$  та  $EC_{50} = 0,139$  мкмоль/л. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  – порівняно з контролем.

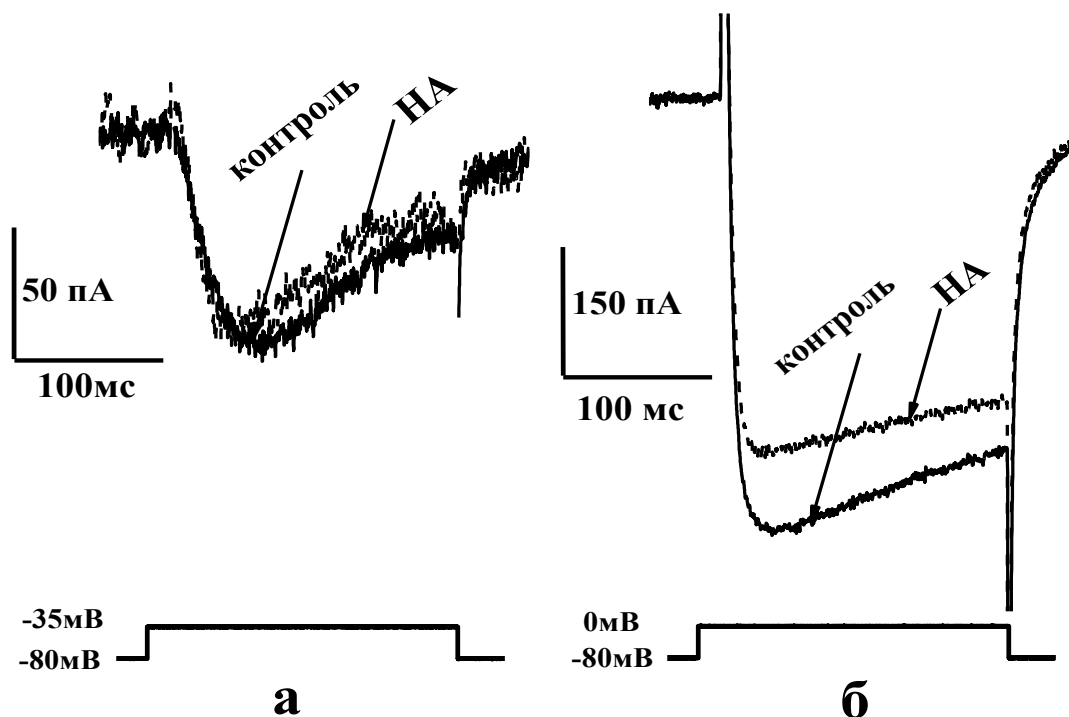
### 3.2.3 НА-індуковане пригнічення струмів через кальцієві канали

Аплікація НА призводила до дозо-залежного пригнічення струму через ПКК, який виникав у відповідь на зміну потенціалу від -70 мВ до 0-10 мВ (Рис. 3.17). Дія НА досягала стаціонарного значення через 20 с після початку аплікації і практично не залежала від концентрації НА (Рис.3.18).



**Рис. 3.18.** Зменшення амплітуди струму через кальцієві канали при аплікації НА в концентрації 0,005 мкмоль/л ( $n = 5$ ) та 50 мкмоль/л ( $n = 6$ ).

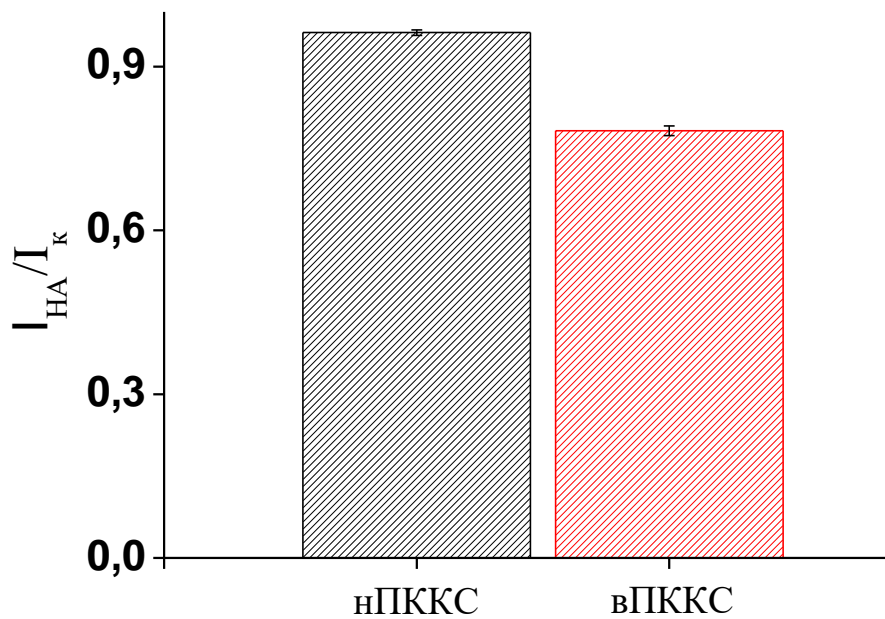
Аплікація НА (25 мкмоль/л) не викликала ніяких змін у кальцієвих струмах при деполяризації мембрани від -100 до -35 мВ і призводила до істотного пригнічення при зміні потенціалу на мембрані від -80 до 0 мВ (Рис. 3.19). Порівняння пригнічення при вищезгаданих змінах потенціалу показало, що модуляція НА властива лише високопороговим ПКК (Рис.3.20).



**Рис. 3.19.** Дія НА на низько- та високопорогові кальцієві струми нейронів ГТН. Зміни вхідного струму, що був викликаний зміною потенціалу від -80 до -35мВ були відсутні (а), пригнічення кальцієвого струму спостерігалися при зміні потенціалу від -80 до 0 мВ (б).

### **3.2.4 Типи норадренергічної модуляції струмів через ПКК нейронів ГТН**

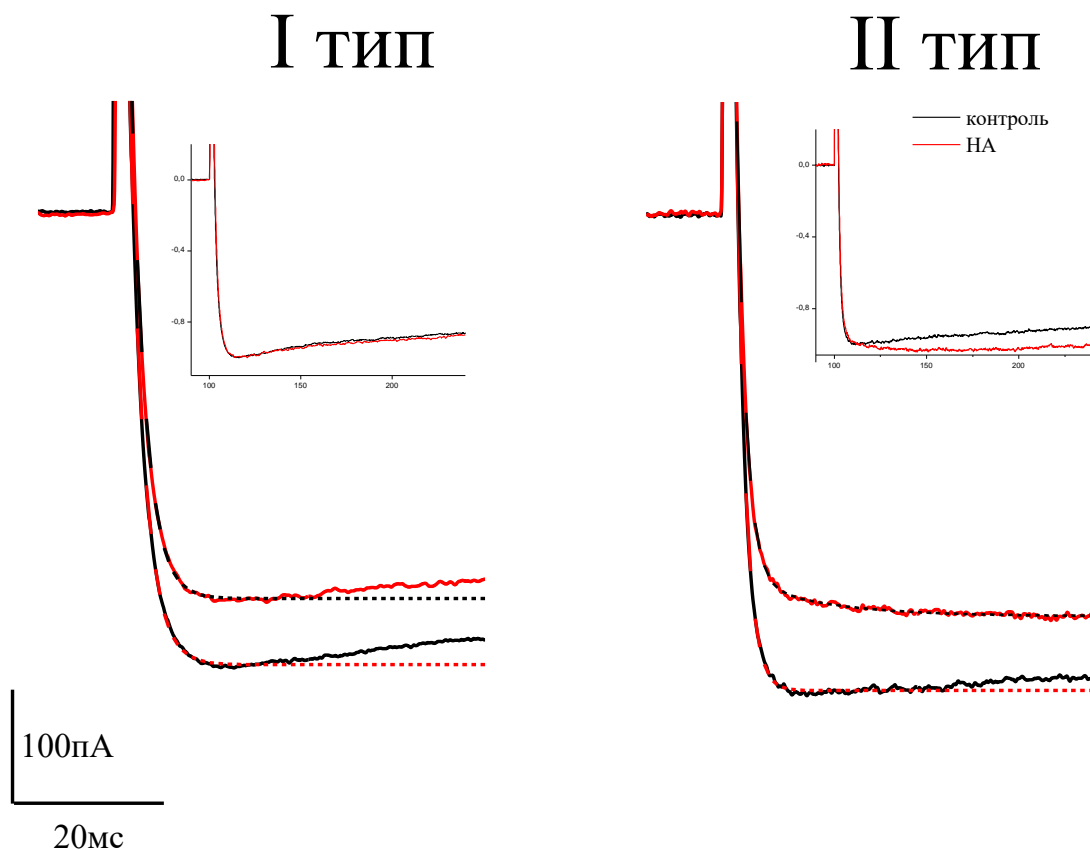
У 91% ( $n = 96$ ) нейронів аплікація НА призводила до пригнічення вхідного струму через високопорогові ПКК і лише 9% ( $n = 9$ ) нейронів виявилися нечутливими до дії цього катехоламіну. Дія НА призводила до зменшення вхідного струму через ПКК зі збереженням кінетичних параметрів у 62% ( $n = 65$ ) нейронів ГТН (І тип модуляції).



**Рис. 3.20.** НА-викликані зміни у низько- та високопороговому кальцієвому струмі ( $n = 6$ ).

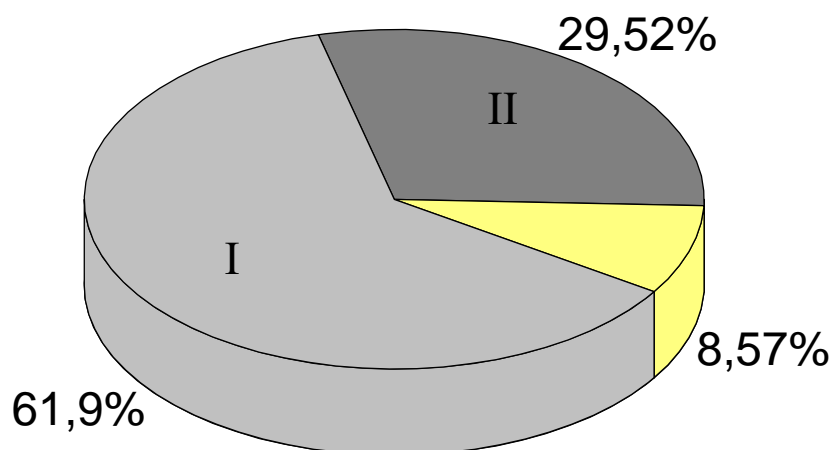
У решти (29%,  $n = 31$ ) нейронів ГТН норадренергічний ефект призводив до достовірних змін у кінетиці струмів через ПКК (Рис. 3.21; Рис. 3.22) (II тип модуляції). Ці зміни ідентифікувалися при аналізі нормованих реєстрацій в контролі та при наявності НА (Рис. 3.21, Рис.3.23). Зміни у кінетиці статистично проявлялися у зміщенні піку струму через кальцієві канали від  $12 \pm 1,5$  мс до  $48 \pm 9$  мс. Фаза наростання в контролі апроксимувалася моноекспоненційною кривою з постійною часу спаду  $\tau_1$ , середнє значення якої склало  $2,6 \pm 0,4$  мс ( $n = 12$ ). При аплікації НА помітно уповільнювалася фаза часової інактивації струму, а фаза його наростання модифікувалася додатковою компонентною з часовою константою  $\tau_2$ , яка дорівнювала  $20,6 \pm 3,5$  мс ( $n = 12$ ), при цьому швидка компонента достовірно не відрізнялася від контролю і постійна часу  $\tau_1$  становила  $2,9 \pm 0,5$  мс ( $n = 12$ ) (Рис.3.21; Рис.3.23). Оскільки відбувалася зміна кінетики вхідного струму при II типі модуляції, то рівень пригнічення внаслідок впливу

НА оцінювали по зміні заряду, який переносився при деполяризації мембрани прямокутним імпульсом тривалістю 150мс (Рис. 3.23).



**Рис. 3.21. Норадренергічний вплив на форму струмів через ПКК нейронів ГТН. Реєстрації вхідних струмів у відповідь на зміну потенціалу від -70 мВ до 0 мВ, у яких аплікація НА не призводила до змін у кінетиці (I тип модуляції) та викликала уповільнення струму (II тип модуляції). У нейронів з I типом модуляції струмів через ПКК фронт наростання апроксимувався моноекспоненційно з постійною часу  $\tau_1 = 2,4$  мс та  $\tau_1 = 2,5$  мс в контролі та при дії НА відповідно. Для II типу модуляції НА характерні були до зміни у кінетиці: фронт наростання вхідного струму при аплікації НА апроксимувався двома експонентами з часовими сталими  $\tau_1 = 1,2$  мс та  $\tau_2 = 10,7$  мс (у контролі  $\tau_1 = 1,2$  мс). У вкладці наведено нормовані струми через ПКК.**

Середній рівень пригнічення амплітуди струму для нейронів з I та II типів ноадренергічної складав  $13 \pm 2\%$  ( $n = 23$ , діапазон значень 5% до 22%) та  $22 \pm 3\%$  ( $n = 16$  від 5% до 40%) відповідно. НА-індукований ефект був зворотній, відновлення становило в середньому  $80 \pm 5\%$  від контролю та тривало 40 та 25 с для I та II типів модуляції НА відповідно.



**Рис. 3.22.** Діаграма розподілу між типами НА-модуляції струмів через кальцієві канали в нейронах ГТН I-тип модуляції – при аплікації НА зміни у кінетиці струму відсутні II-тип – дія НА призводила до уповільнення кінетики струмів через ПКК. Жовтим сектором позначено частку нечутливих до НА нейронів

### 3.2.5 Вплив високоамплітудної деполяризації на НА-викликане пригнічення струмів через кальцієві канали.

Механізми впливу НА на кінетику струму було досліджено з застосуванням короткотривалої високоамплітудної деполяризації, яка призводить до від'єднання  $\beta\gamma$ -субодниці G білка від ПКК та збільшення амплітуди струму [141, 148, 161, 179]. Цю властивість використовують для ідентифікації модуляції ПКК, що здійснюється таким прямим впливом. Деполяризація мембрани здійснювалася шляхом прикладання кондиціонуючого предімпульсу тривалістю 50 мс від -80 мВ до 80 мВ, який через 15 мс змінювався тестуючим імпульсом від -80 мВ до 5 мВ.

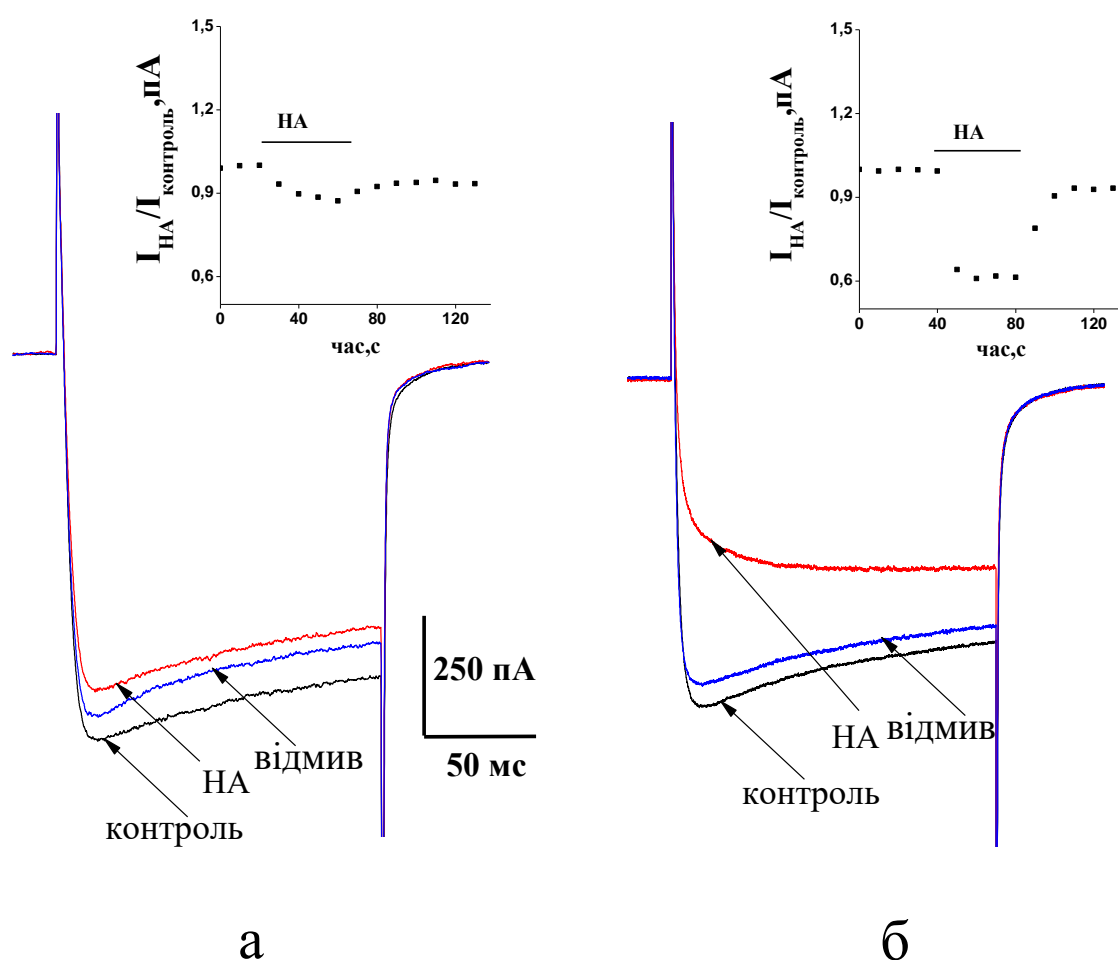


Рис. 3.23. Два типи НА-індукованої модуляції струмів через кальцієві канали: I тип, якому властиво відсутність змін кінетиці струму (а) та II тип,



у якому ефект НА призводив до уповільненням кінетики (б). На вкладках для кожного прикладу представлено зміну амплітуди вхідного струму у часі.

Для виявлення цього ефекту в нейронах ГТН спочатку було визначено вплив високоамплітудної деполяризації на вхідні струми через кальцієві канали. Стимуляція клітини таким протоколом не призводила до змін у амплітудних та кінетичних показниках струму (Рис. 3.24). У нейронах з І типом модуляції НА (без змін у кінетиці струмів через ПКК) прикладання кондиціонуючого предімпульсу при наявності НА не відновлювало параметрів струмів. (Рис 3.25).

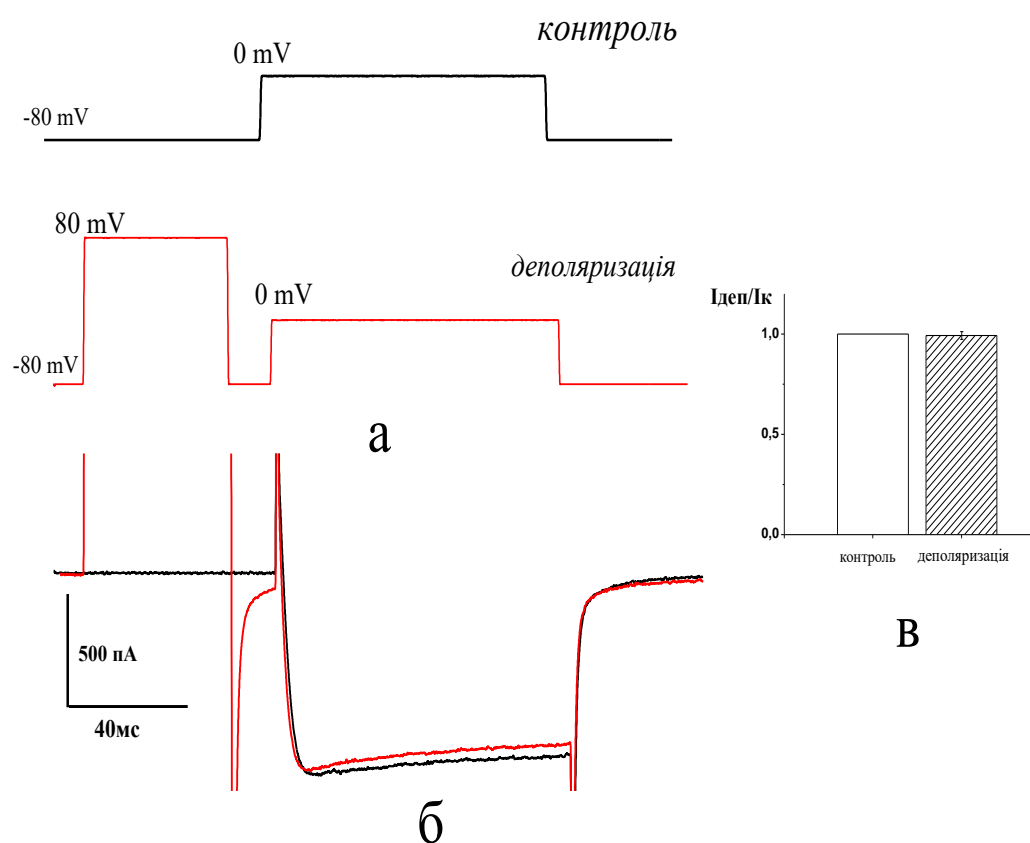


Рис. 3.24. Вплив високоамплітудної деполяризації мембрани на струми через ПКК. а – схема протоколу: спочатку здійснювалася реєстрація струму при зміні потенціалу -80 до 0 мВ, а потім попередньо прикладали високоамплітудну деплояризацію (кондиціонуючий предімпульс) від -80 до 80 мВ). б – реєстрації відповідей під час застосування даних протоколів. в –

порівняння відносних значень максимумів амплітуд струму в контролі та при попередній деполяризації ( $n = 10$ ).

У нейронах з II типом (зі змінами у кінетиці струмів через ПКК) попередня деполяризація призводила до відновлення кінетики та (частково) амплітуди струму (Рис. 3.26). Після деполяризації дія НА відновлювалася.

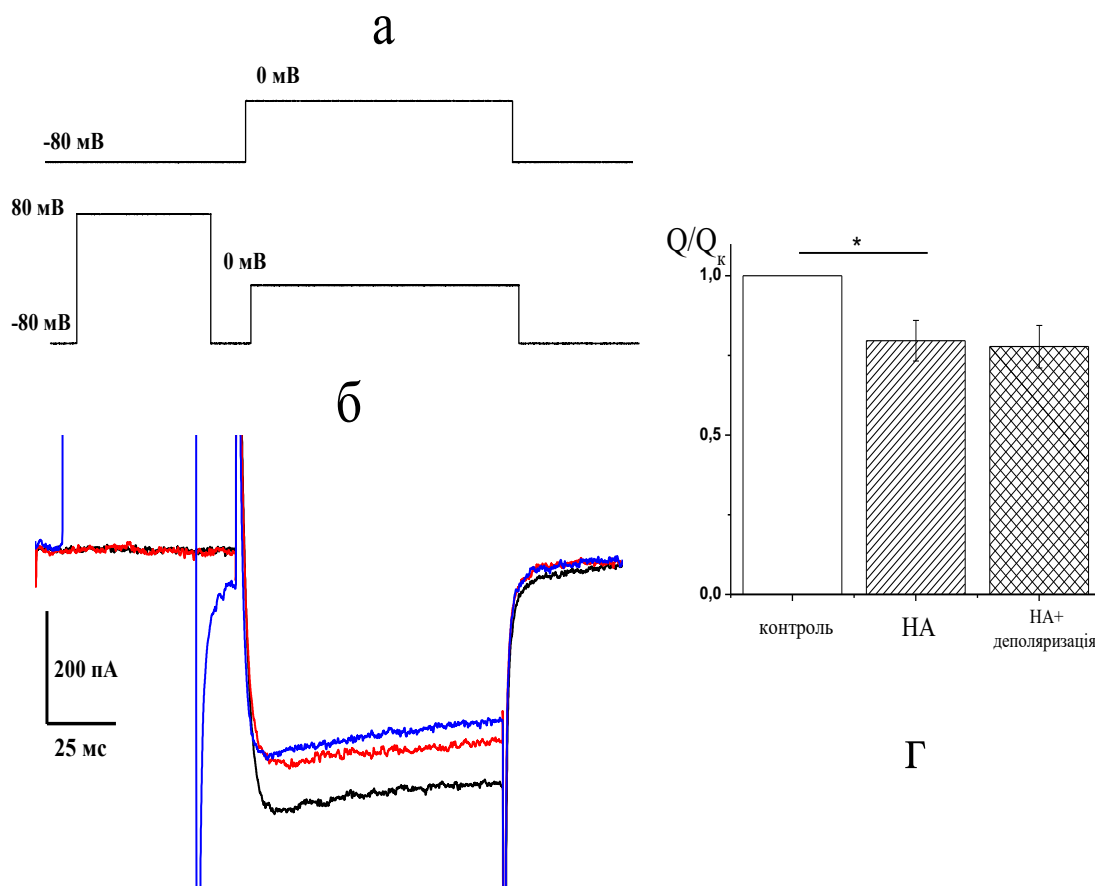
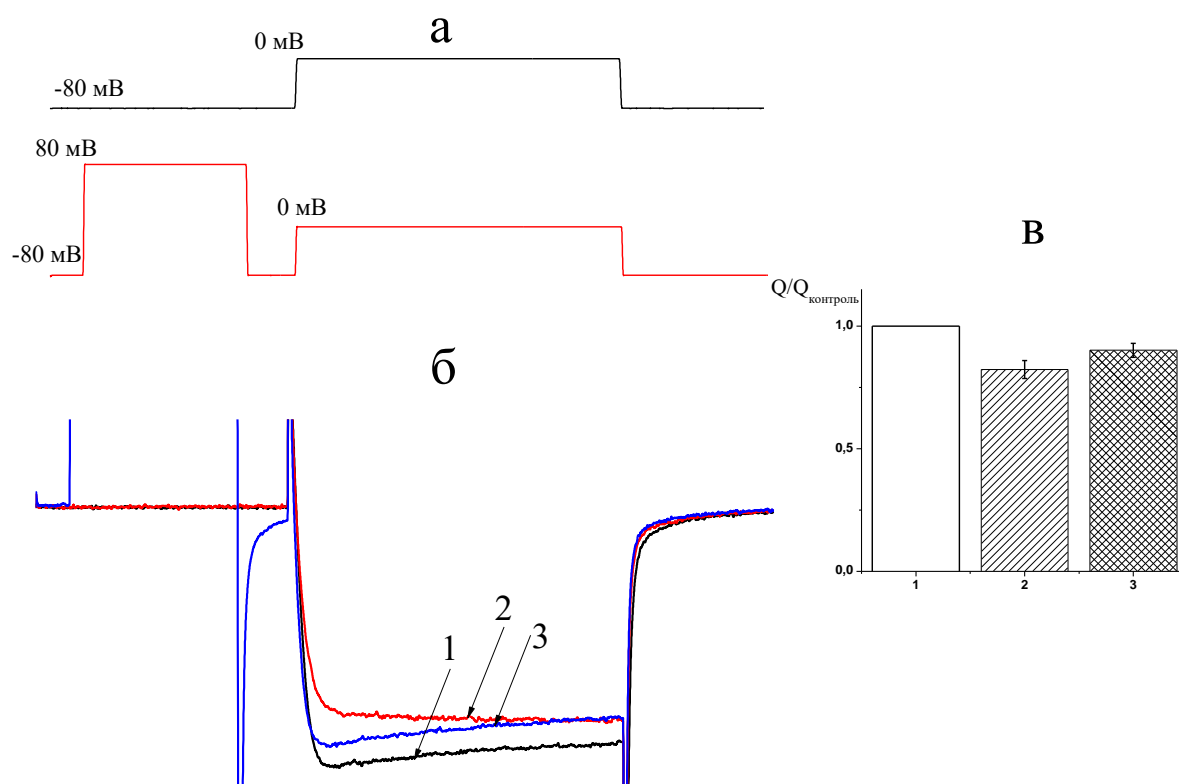


Рис. 3.25. Нечутливість норадренергічної модуляції струмів через ПКК I типу до високоамплітудної деполяризації а – схема стимуляції нейрона: спочатку здійснювалася реєстрація струму зміні потенціалу -80 до 0 мВ в контролі та при аплікації НА, а потім попередньо прикладали високоамплітудну деплояризацію (кондиціонуючий предімпульс) від -80 до 80 мВ) у присутності НА. б – реєстрації відповідей в контролі, при аплікації НА та після деполяризації. в – порівняння змін перенесеного заряду в контролі, при дії НА та після деполяризуючого предімпульсу.



**Рис. 3.26. Часткове відновлення при високоамплітудній деполяризації мембрани II типу модуляції НА струму через ПКК у нейронах ГТН. а – схема протоколу: спочатку здійснювалася реєстрація струму зміні потенціалу -80 до 0 мВ в контролі та при аплікації НА, а потім попередньо прикладали високоамплітудну деполяризацію (кондиціонуючий передімпультс від -80 до 80 мВ) у присутності НА. б – репрезентативні реєстрації відновлення струму через ПКК при застосуванні попередньої деполяризації. в – порівняння нормованих на контрольні значення заряду, тперенесеного через ПКК. 1 – контроль, 2 – при аплікації НА, 3 – аплікація НА при попередній деполяризації.**

Часткове відновлення амплітудних та кінетичних параметрів після прикладання деполяризації вказує на присутність в нейронах ГТН модуляції ПКК, в основі якої лежить взаємодія  $G\beta\gamma$  субодиниці з  $\alpha_1$  субодиницею ПКК.

### 3.2.6 Потенціалзалежність НА-індукованого пригнічення струму через ПКК у нейронах ГТН

У наступній серії експериментів досліджено ефект НА на струми через ПКК від мембранного потенціалу. Нейронам, яким характерний норадренергічний вплив I типу межі пригнічення становили від -20 мВ до 30 мВ (Рис. 3.27). Для аналізу II типу модуляції НА струмів через ПКК аналіз ВАХ проводили для значень струму при 15 мс та 95 мс після прикладання деполяризуючого імпульсу. Межі пригнічення для двох випадків були однакові і лежали між -35 та 40 мВ (Рис.3.28).

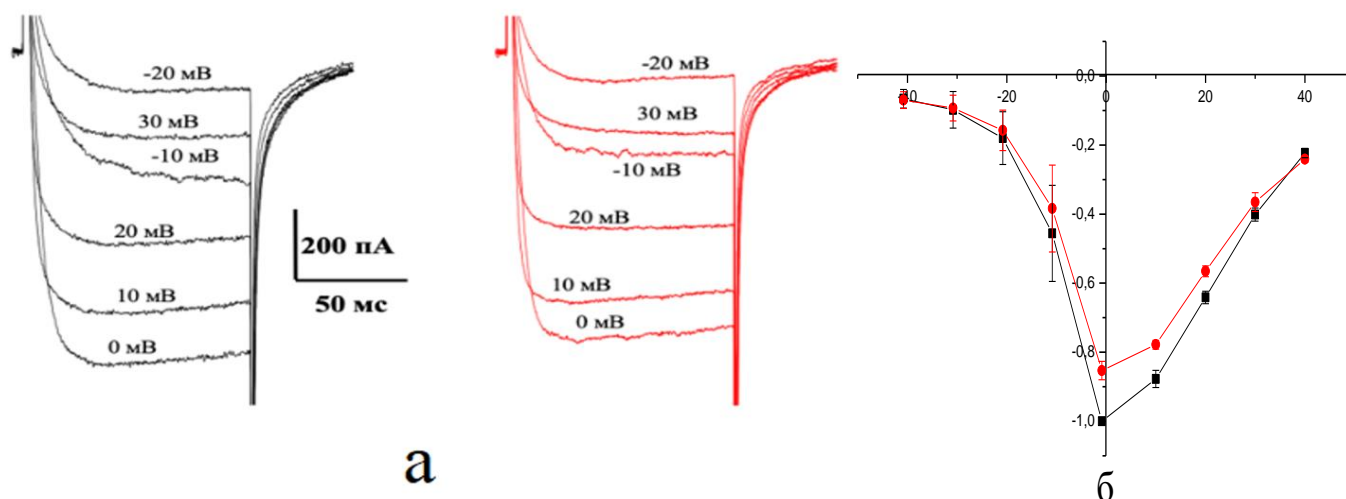
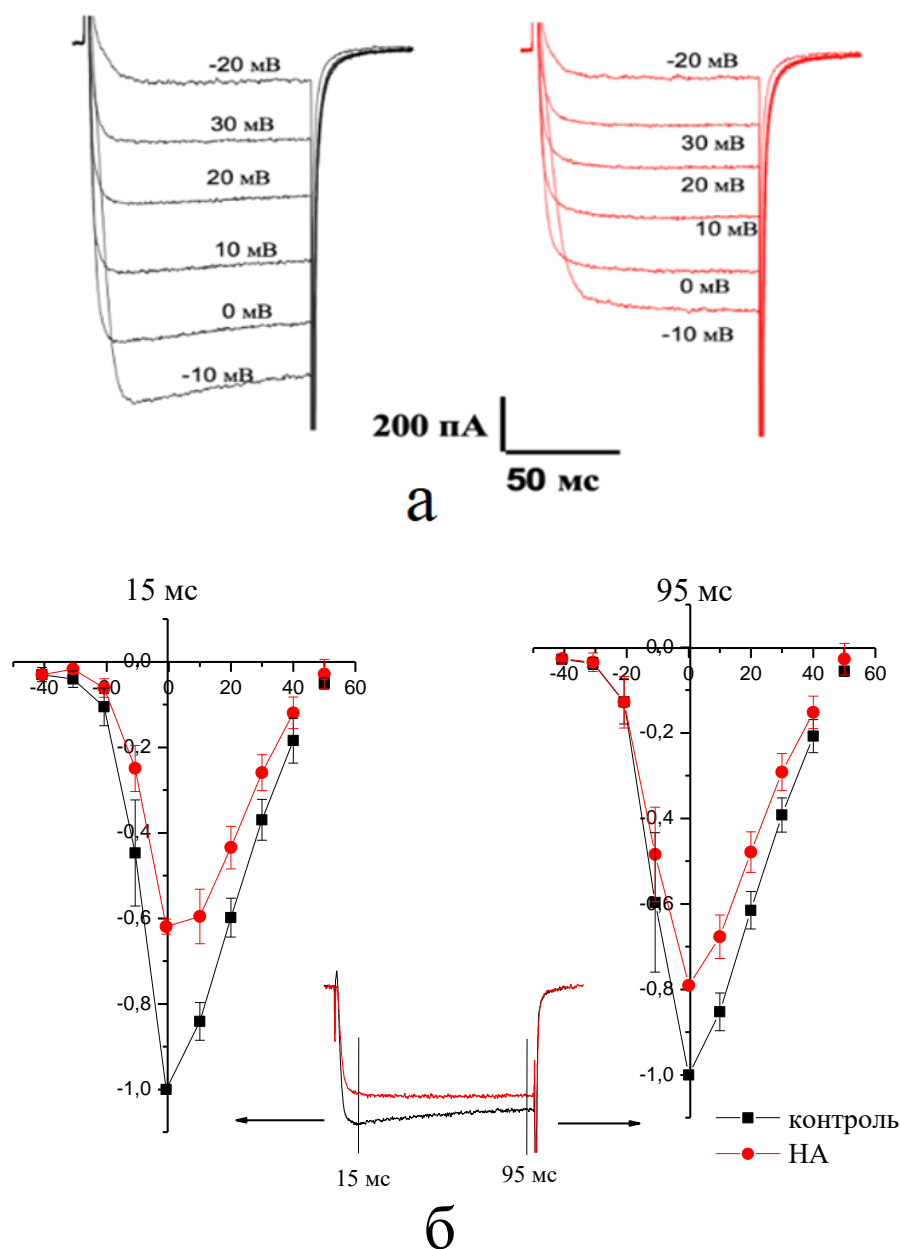


Рис. 3.27. Норадренергічний вплив I-го типу при різних значення мембранного потенціалу. а –репрезентативні реєстрації струмів через ПКК. Нормовані усереднені ВАХ піку входного струму через ПКК в контролі та при аплікації НА для I типу модуляції (n = 5).



**Рис. 3.28. Норадренергічний вплив II типу при різних значеннях мембранного потенціалу. а – приклад реєстрацій струмів через ПКК в контролі та при аплікації НА. б – Нормовані усереднені ВАХ значень струму через кальцієві канали при 15 мс та 95 мс після прикладання командного потенціалу. На вкладці позначено значення потенціалу, які бралися для аналізу.**

Результати експериментів показали, що ефект НА в нейронах ГТН для різних типів модуляції проявляється при різних діапазонах мембранного потенціалу.

### 3.2.7 Вплив НА на стаціонарну інактивацію барієвих струмів через ПКК

Було проаналізовано норадренергічний вплив на характеристики стаціонарної інактивації ПКК. Оцінка цього параметру здійснювалося за зміною амплітуди струму через ПКК при різних підтримуваних потенціалах в контролі та при дії НА (Рис.3.28 а). Потенціал на мембрані змінювали з інтервалом 30 с. Незалежно від типу модуляції присутність НА не призводила до достовірних змін у кривій стаціонарної інактивації струмів через ПКК (Рис.3.28 б).

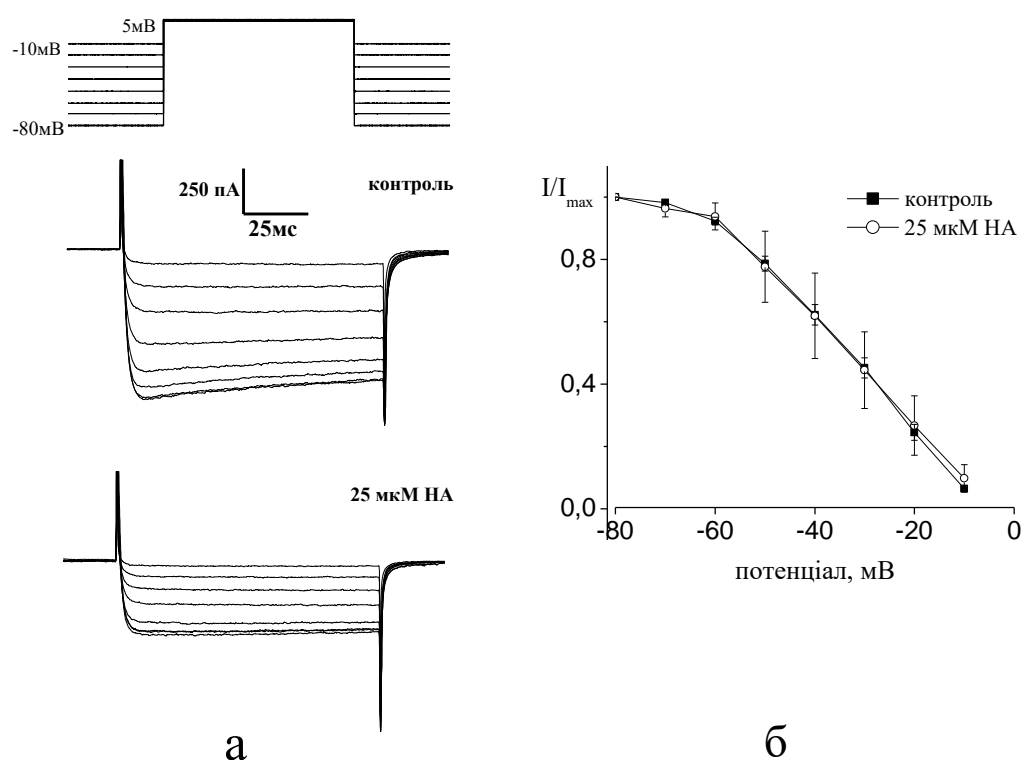


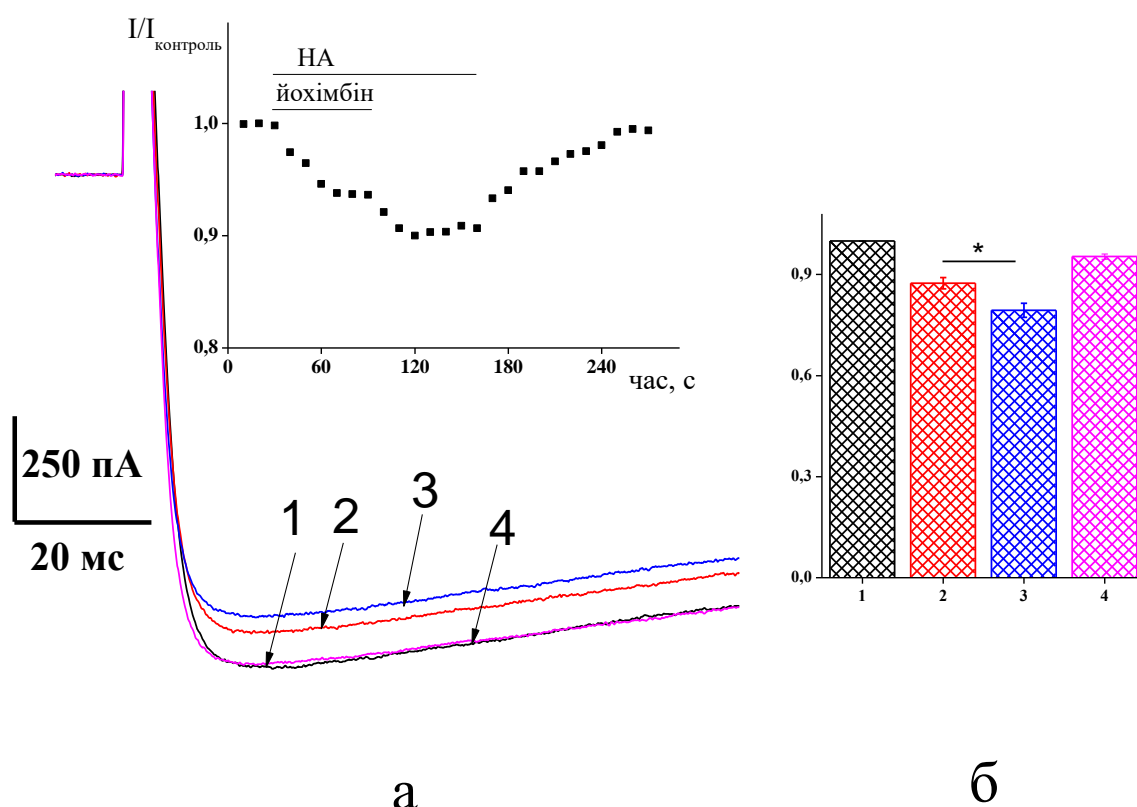
Рис. 3.29. НА не призводить до змін у стаціонарній інактивації струмів через ПКК нейронів ГТН. а – (зверху) протокол зміни підтримуваного потенціалу від -80 до -10 мВ. Реєстрацій струмів через ПКК у контролі (посередині) та при аплікації НА (знизу). б – криві стаціонарної інактивації, залежність значення усереднених нормованих струмів від підтримуваного потенціалу в контролі та при аплікації НА.

### **3.3 Участь $\alpha_2$ -АР у адренергічній модуляції ПКК нейронів ГТН**

Адренергічна модуляція кальцієвих каналів у багатьох центральних та периферичних нейронах здійснюється за рахунок активації  $\alpha_2$ -АР [56, 79, 180]. Відомо, що у нейронах ГТН ці рецептори також експресуються, а їх активація призводить до пригнічення електричної активності [77]. Однак вплив даного типу АР на ПКК у нейронах ГТН раніше не досліджувався. Аплікація селективного антагоніста  $\alpha_2$ -АР йохімбіну (10 мкмоль/л) разом з НА (10 мкмоль/л) (Рис. 3.30) призводила до пригнічення струму через кальцієві канали в середньому на  $13 \pm 2\%$  ( $n = 7$ ), тоді як при прикладанні лише НА пригнічення збільшувалося до  $21 \pm 2\%$  ( $n = 7$ ). Отримані результати свідчать, що НА-індуковане пригнічення кальцієвих струмів лише частково (близько 60%) опосередковується  $\alpha_2$ -АР. Вірогідно, що у цей процес також залучені  $\alpha_1$ -АР типу.

### **3.4 Участь різних типів високопорогових ПКК у адренергічній модуляції**

Високопороговий кальцієвий струм відповідно до електрофізіологічних та фармакологічних (чутливість до неорганічних та органічних блокаторів) характеристик поділяють на N-, L- P/Q- та R- підтипи. У наших експериментах було оцінено рівень експресії кожного підтипу ПКК та визначено наявність НА-індукованого пригнічення за присутності відповідного селективного блокатора.

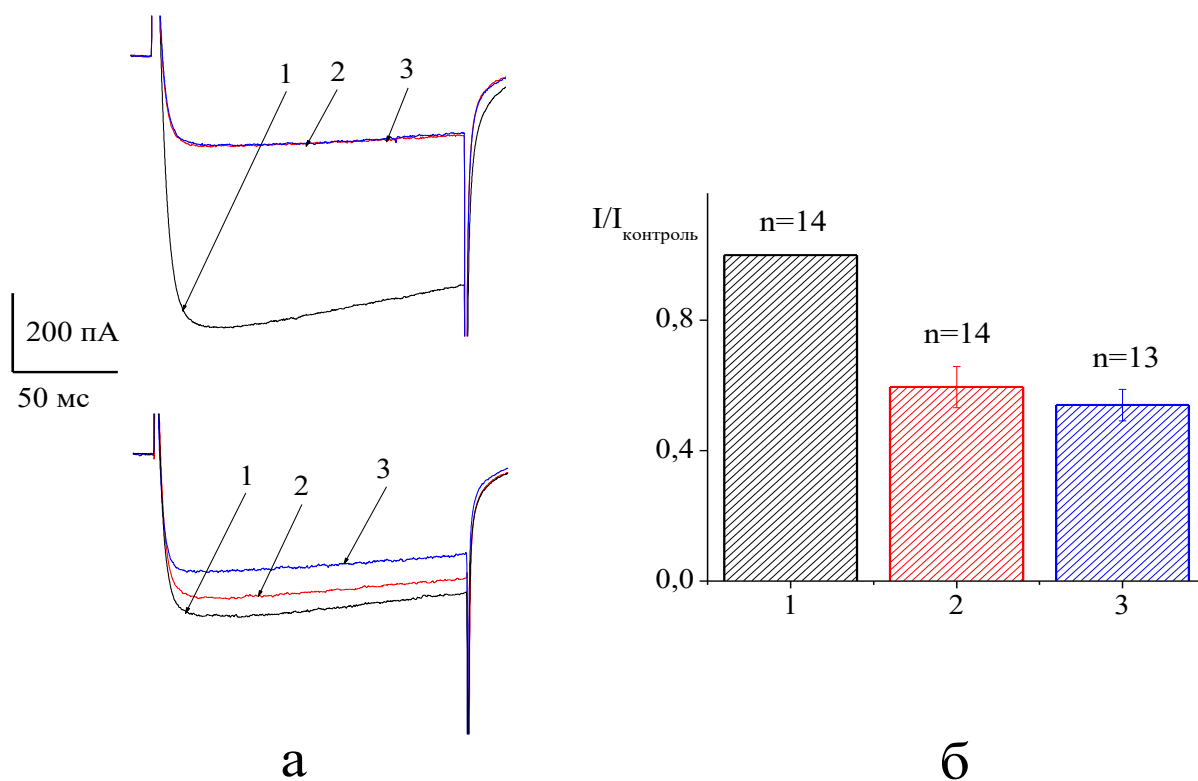


**Рис. 3.30. Роль  $\alpha_2$ -АР у норадренергічній модуляції струмів через ПКК нейронів ГТН. а – зміни нормованих на контроль (1) струмів при дії НА разом з йохімбіном (2), при дії лише НА (3) та при відмиві (4). б – порівняння нормованих середніх значень в контролі (1) при сумісній дії НА з йохімбіном (2), при дії лише НА (3) та при відмиві (4).**

### 3.4.1 Роль N-типу високопорогових ПКК у адренергічній модуляції.

Присутність високопорогових ПКК N-типу визначали по рівню пригнічення струму при аплікації  $\omega$ -конотоксину GVIA в концентрації 1 мкмоль/л, яка є концентрацією повного пригнічення для цих каналів. Максимальна амплітуда струму при аплікації блокатора у цій концентрації зменшувалася на  $(42 \pm 6)\%$ , а межі пригнічення становили від 12% до 70% (Рис. 3.31). Участь даного типу каналів у модуляції НА визначали за пригніченням струму в присутності селективного блокатора.





**Рис. 3.31. НА-індуковані зміни в струмах через ПКК нейронів ГТН в присутності селективного блокатора N-типу кальцієвих каналів  $\omega$ -конотоксину GVIA (1 мкмоль/л). а – дві репрезентативні реєстрації впливу НА на барієвий струм: *зверху* – реєстрації без впливу на конотоксину-резистивний струм, *знизу* – після аплікації селективного блокатора спостерігалось продовження пригнічення струму. б – Дія  $\omega$ -конотоксину GVIA (2) в порівнянні з контролем (1), та дія цього селективного блокатора сумісно з НА (3).**

Дія НА у частині нейронів практично не призводила до помітних змін у  $\omega$ -конотоксин-резистивному струмі, проте були нейрони у яких НА зменшував амплітуду в присутності селективного блокатора (Рис.3.31 а). Таким чином в нейронах ГТН норадренергічна модуляція може як повністю так і частково опосередковуватися ПКК N-типу.

### 3.4.2 Участь P/Q типу ПКК у адренергічній модуляції в нейронах ГТН.

Окрім ПКК N-типу до адренергічної модуляції можуть бути чутливі високопорогові канали P/Q типу [12]. Для ідентифікації експресії P/Q типу ПКК використано  $\omega$ -агатоксин у концентрації 1 мкмоль/л. У 10 нейронах аплікація  $\omega$ -агатоксину призводила до пригнічення бар'євого струму на  $(12 \pm 4\%, n = 10)$  межі становили від 37% до 2% (Рис.3.32). Аплікація НА в присутності селективного блокатора призводила до подальшого зменшення струму на  $14 \pm 3\%$  ( $n = 10$ ).

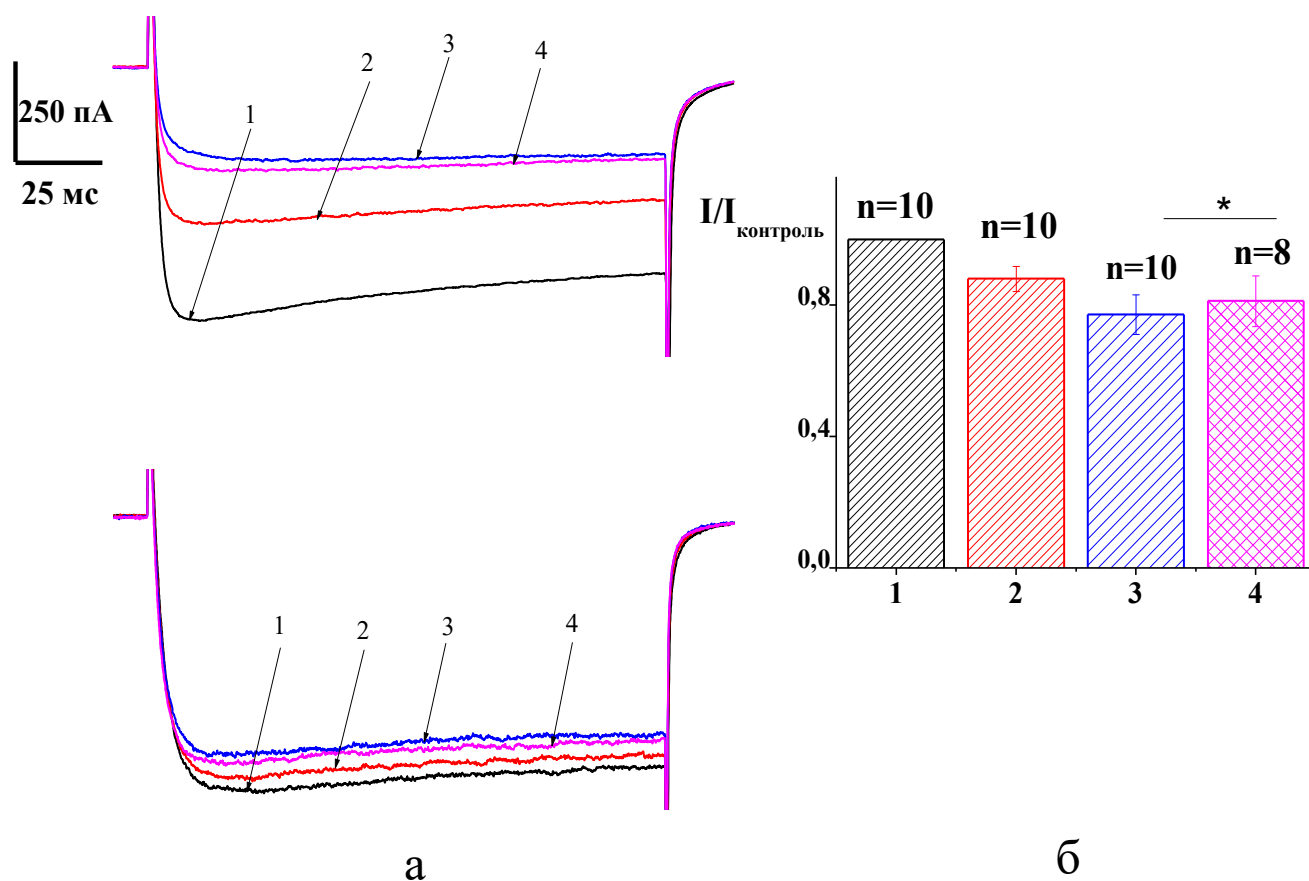


Рис. 3.32. Вплив НА на струми через кальцієві канали P/Q типу. а – два приклади реєстрацій в контролі (1), при дії  $\omega$ -агатоксину 1 мкмоль/л (2), дія НА в присутності селективного блокатора (3) та при відмиві (4): *зверху* – приклад реєстрації при значній експресії P/Q каналів, *знизу* – дія  $\omega$ -агатоксину не призводила до суттєвого пригнічення струму через кальцієві

**канали. б – усереднені нормовані значення струму в контролі (1), при дії селективного блокатора (2) та цього блокатора разом з НА (3), відмив (4).**

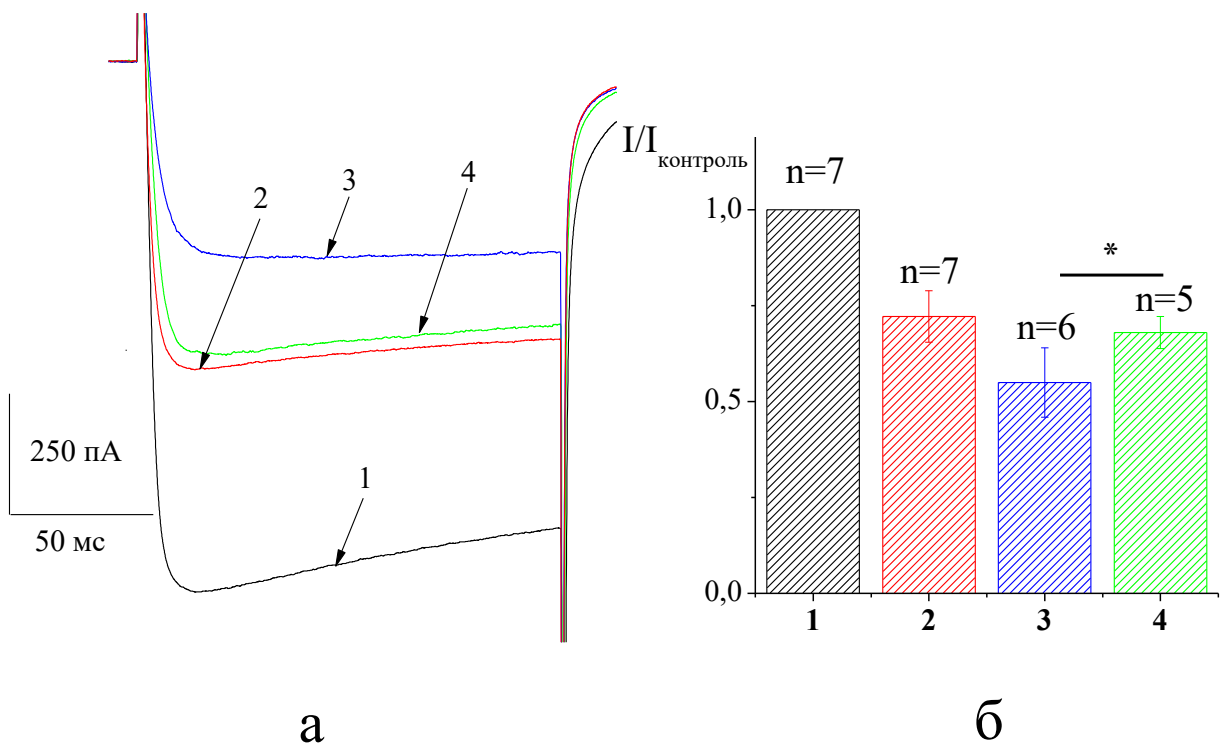
Отже показано, що вплив НА не обмежується впливом на N- та P/Q підтипи високوپорогових ПКК, які є головними мішенями адренергічної модуляції даних каналів в центральній та автономній нервових системах.

### **3.4.3 Участь L типу ПКК у адренергічній модуляції у нейронах ГТН.**

Адренергічний вплив на L-тип ПКК описаний у м'язовій тканині [113]. НА-індуковані зміни у входному струмі через ПКК L-типу здійснюється через цАМФ опосередковані процеси. Даний підтип ПКК є чутливим до дії дигідропіридинів. У наших експериментах для визначення наявності L- підтипу ПКК використано ніфедипін в концентрації 10 мкмоль/. Дія цього блокатора призводила до зменшення входного струму, рівень пригнічення коливався від 11 до 46% з середнім значенням  $28 \pm 8\%$  ( $n = 7$ ) (Рис. 3.33). Аплікація НА в присутності ніфедипіну призводила до зменшення струму на  $26 \pm 5\%$  ( $n = 6$ ), а зміна струму становила в середньому  $19 \pm 2\%$  ( $n = 7$ ) відносно значень в контролі (Рис. 3.33 б).

### **3.4.4 Чутливість токсин-резистивного кальцієвого струму до НА**

При аплікації всіх блокаторів спостерігався залишковий струм, середня частка якого становила  $27 \pm 5\%$  ( $n = 7$ ) від інтегрального високوپорогового струму через ПКК, яка варіювалася від 12% до 42% (Рис 3.34). Оскільки селективні блокатори застосовувалися при насичуючих концентраціях, тому отримані дані вказують на участь у адренергічній модуляції ПКК R-типу. НА призводив пригнічення цього струму, на  $42 \pm 10\%$ , зміна відносно контролю в середньому становила  $7 \pm 2\%$  (від 6 до 8%).



**Рис. 3.33. Пригнічення струму через кальцієві канали в присутності 10 мкмоль/л ніфедипіну. а – реєстрації в контролі (1), при аплікації ніфедипіну (2), сумісній дії ніфедипіну разом з НА, та при відмиві розчином з блокатором (4). б – ніфедипін-викликане пригнічення (2) відносно контролю (1) дія НА в присутності блокатора (3) та відмив розчином з селективним блокатором (4).**

Отже, на фоні ніфедипіну дія НА не відрізняється від такої в контролі, що свідчить про відсутність помітної адренергічної модуляції каналів L-типу на нейронах ГТН. На фоні  $\omega$ -конотоксину та  $\omega$ -агатоксину дія НА була достовірно меншою аніж за відсутності блокаторів. Таким чином, середнє пригнічення струму через кальцієві канали за відсутності блокаторів становить 20%, при дії на R та P/Q канали – 7%, на R та N – 12%, а лише на R – 7% (Рис.3.35). Отримані дані задають систему лінійних рівнянь відносно невідомих внесків каналів N- та

P/Q-типу у загальну дію НА на кальцієвий струм. Розв'язок цієї системи можна записати у наступному вигляді:  $N = 0,52$ ,  $R = 0,35$ ,  $P/Q = 0,13$ . Таким чином, в середньому близько половини модулюючого ефекту НА здійснюється за рахунок каналів N-типу, близько третини – R типу та одної шостої P/Q типу.

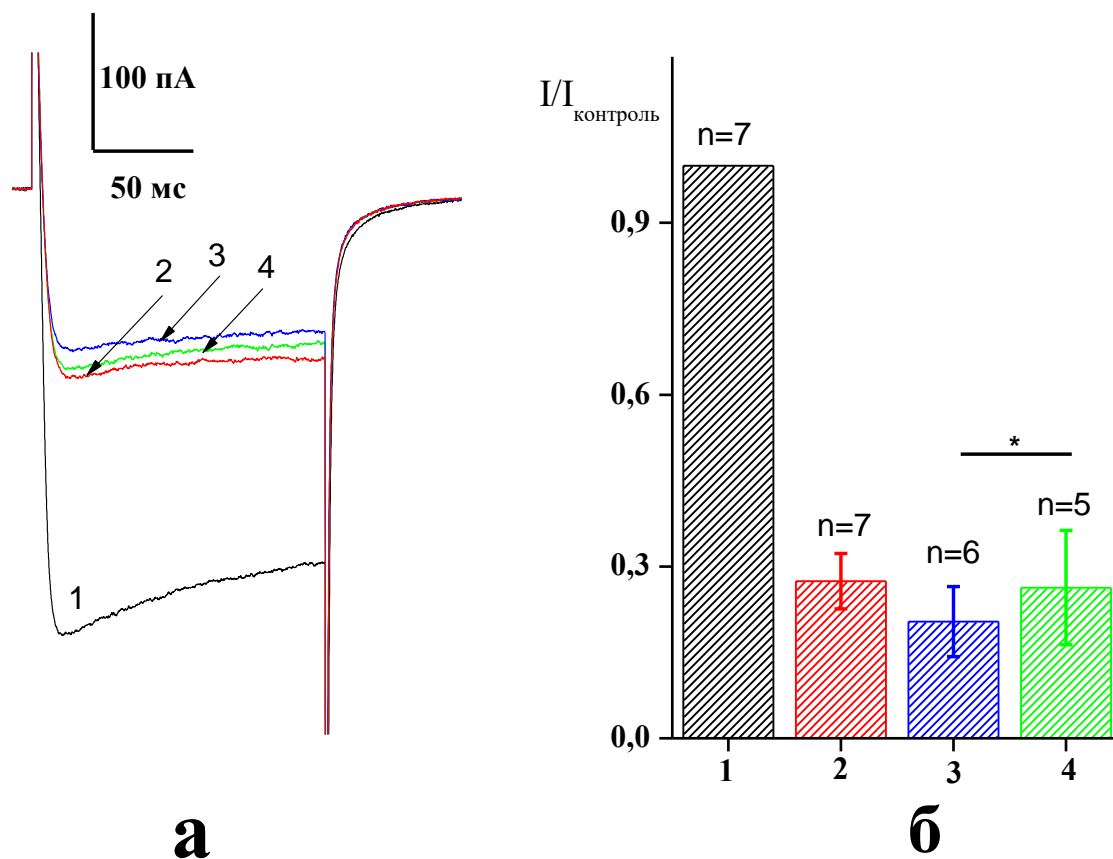
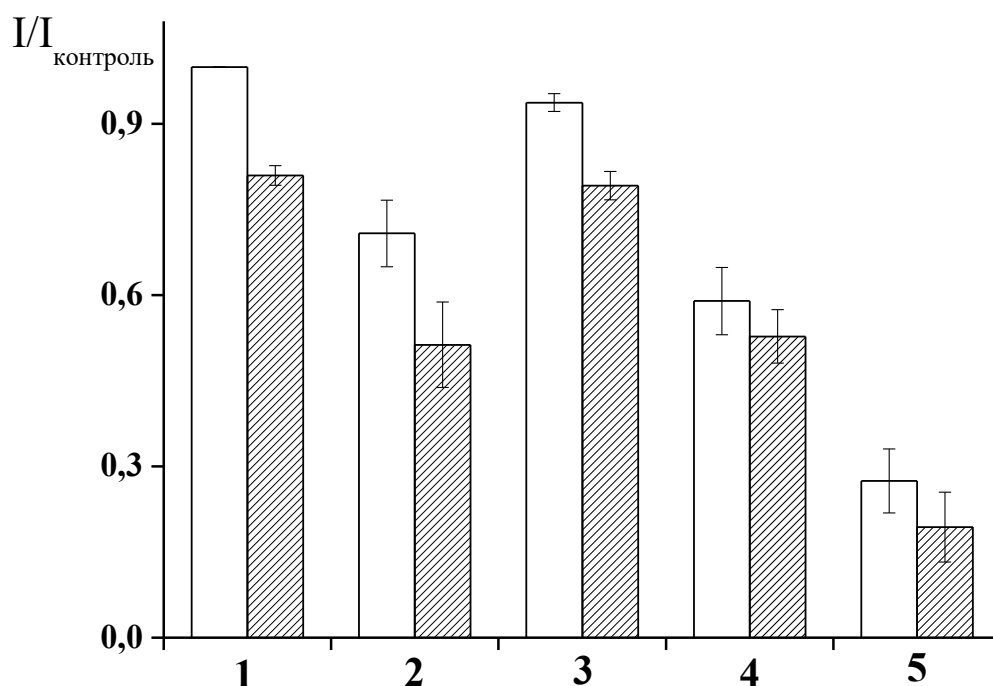


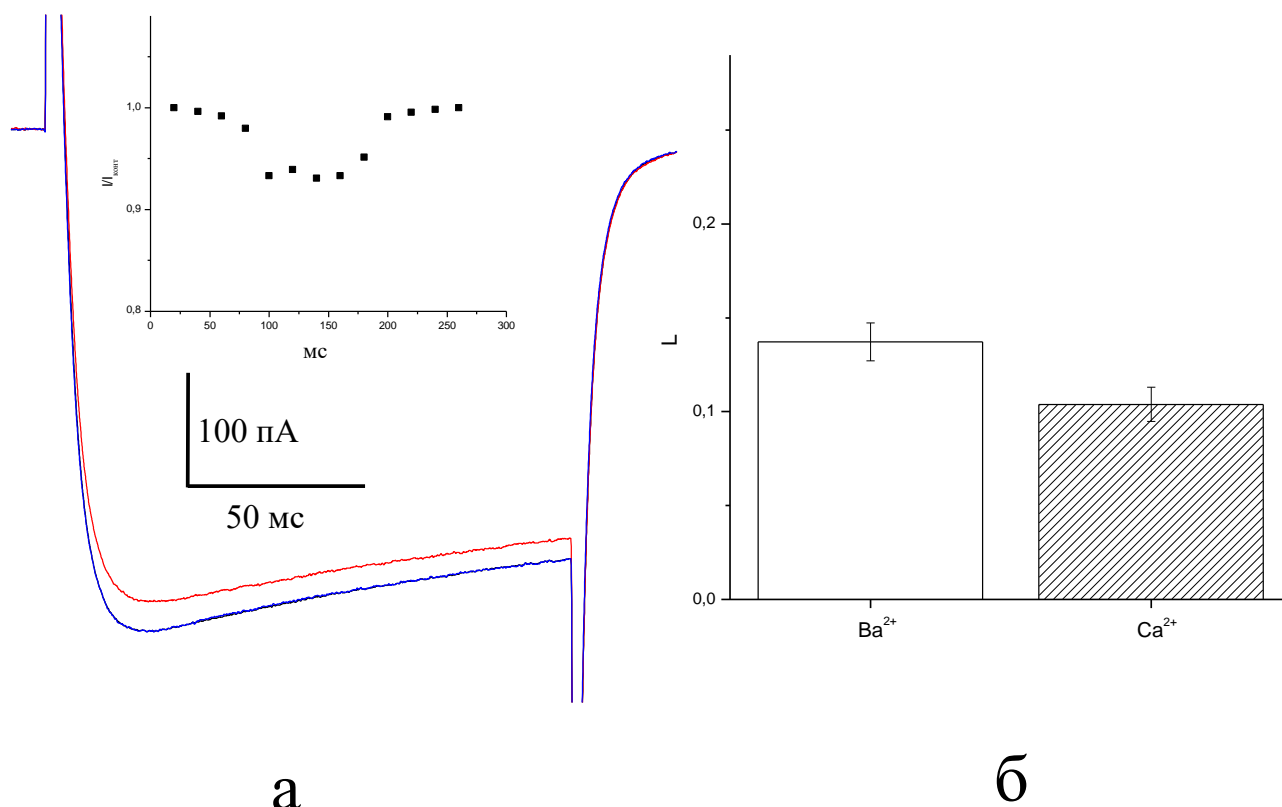
Рис. 3.34. Пригнічуючий ефект НА на токсин-резистивний струм. а – реєстрації струму через ПКК в контролі (1), при сумісній аплікації селективних блокаторів ( $\omega$ -конотоксину та  $\omega$ -агатоксину в концентрації 1 мкмоль/л, ніфедипіну в концентрації 10 мкмоль/л) високопорогових ПКК окремо (2), разом з НА (3) та після дії НА у присутності розчину з блокаторами (4). б – середні значення нормованих на значення струмів в контролі (1), залишковий струм при сумісній дії селективних блокаторів (2), додавання НА призводило до зменшення струму (3) та його відновленні при видаленні НА (4).



**Рис. 3.35.** Участь різних типів високопорогових ПКК у адренергічній модуляції нейронів ГТН. Порівняння НА-викликаного пригнічення струму в контролі (1), при наявності 10 мкмоль/л ніфедипіну (2), 1 мкмоль/л  $\omega$ -агатоксину (3), 1 мкмоль/л  $\omega$ -конотоксину (4) та суміші всіх блокаторів (5).

### **3.5 Вплив іонів кальцію на модуляцію НА струмів через ПКК**

Оскільки кальцій може брати участь у НА-індукованій модуляції струмів через ПКК, то була проведена серія експериментів для виявлення ролі кальцію у адренергічному впливі на ПКК. Дія НА на кальцієві струми, як і для барієвих, могла призводити до двох типів пригнічень.

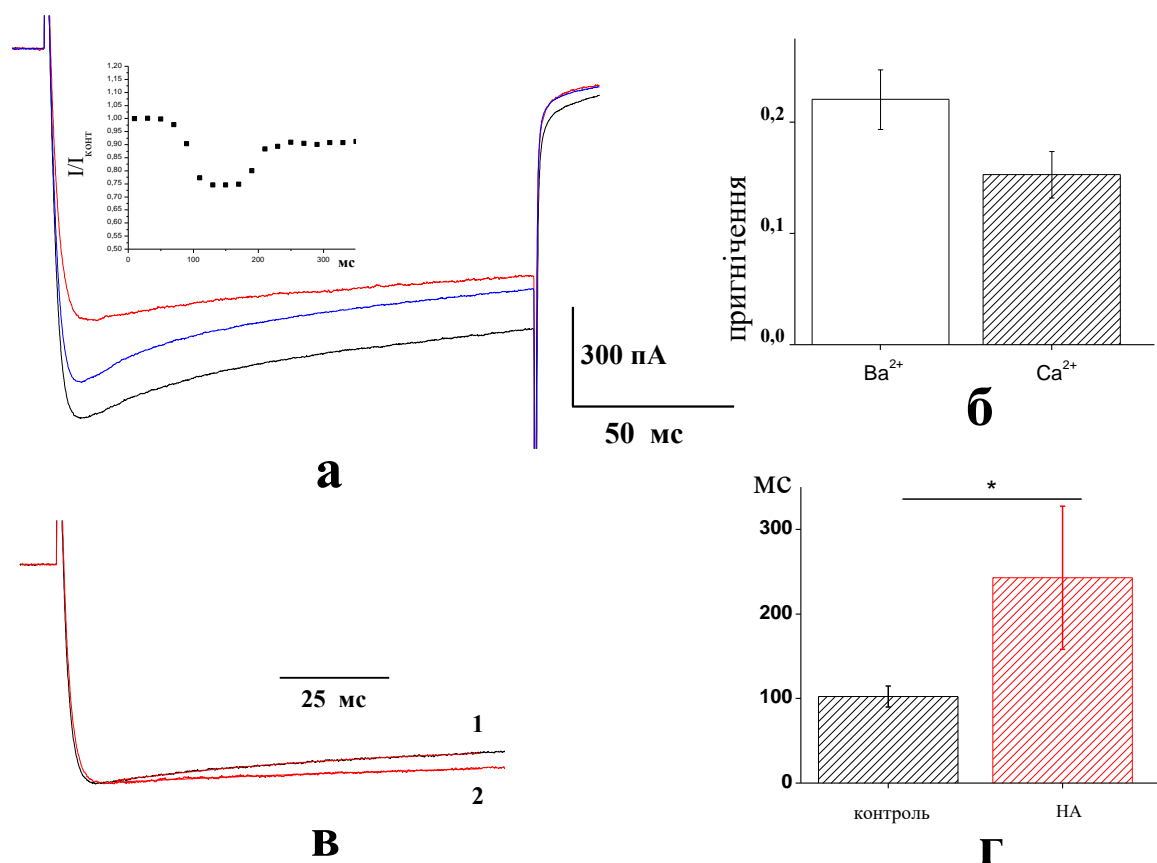


**Рис.3.36 Модуляція НА струму через ПКК у нейронах ГТН не залежить від проникаючого катіону. а – реєстрації зміни кальцієвого струму в контролі, при дії НА та відмиві для двох типів модуляції. б – порівняння пригнічень струму в присутності іонів барію та кальцію у зовнішньоклітинному розчині.**

Результати цих експериментів показали, що рівень пригнічення кальцієвих струмів становив  $(10 \pm 1\%, n = 23)$  та  $(15 \pm 2\%, n = 14)$  для впливу НА I та II типів. Ці показники достовірно не відрізняються від попередніх експериментів де основним проникаючим катіоном були іони барію.

При II типі модуляції аплікація НА практично не призводила до змін у фронті наростання струму, який апроксимувався експонентою з середньою

постійною часу  $1,65 \pm 0,2$  ( $n = 5$ ), в контролі та  $1,87 \pm 0,3$  ( $n = 5$ ) при дії НА. Норадренергічна модуляція призводила до уповільнення часової інактивації.



**Рис.3.37** Особливості норадренергічної модуляції кальцієвих струмів нейронів ГТН. **а** – реєстрації зміни кальцієвого струму в контролі, при дії НА та відмиві. У вставці наведено зміна амплітуди у часі. **б** – порівняння пригнічень струмів через ПКК з барієм та кальцієм у зовнішньоклітинному розчині. **в** – репрезентативні зміни у кальцієвих струмах в контролі та при НА. **г** – крива часової інактивації апроксимувалася експонентою з постійною часу спаду ( $102 \pm 13$ мс;  $n = 5$ ) в контролі та ( $242 \pm 85$  мс;  $n = 5$ ) при дії НА.



### 3.6 Вплив ФРНТ на норадренергічну модуляцію струмів через ПКК нейронів ГТН

Ключову роль у підтриманні впливу симпатичної нервової системи на нейрони сенсорних гангліїв належить ФРНТ. Це пептид з сімейства нейротрофінів, який виконує нейропротекторну функцію для нейронів симпатичної та периферійної нервових систем [181-183]. Однак при розвитку нейропатій (гіпералгезія, аллодонія) може виконувати роль сенситизуючого агента, дія якого може призвести до порушень передачі сенсорного сигналу [184, 185]. У роботах на ізольованих та культивованих нейронах сенсорних та симпатичних гангліїв тривала дія (від 1 до 7 днів) ФРНТ в концентрації 100 нг/мл призводить до змін у електрофізіологічних параметрах електричної активності [81, 186, 187], а після короткотривалої дії (15 хв) цього пептиду показано підсилення струму через канали родини TRPV1 [188, 189]. У нашій роботі була проведена серія експериментів по дослідженню довготривалого впливу ФРНТ на ПКК культивованих нейронів ГТН та визначена його роль у НА-індукованій модуляції кальцієвих струмів [190].

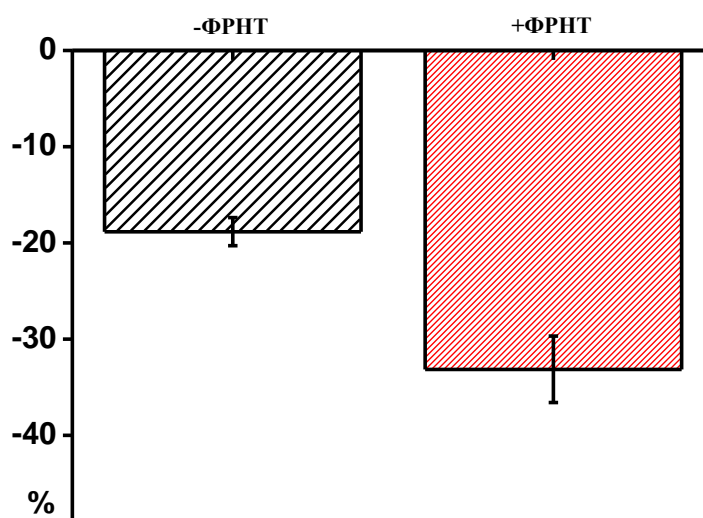


Рис. 3.38 Підсилення ефекту дії НА на кальцієвий струм через ПКК у нейронах ГТН, що культивувалися з та без ФРНТ.

Оцінка середнього значення щільності кальцієвого струму нейронів ГТН за умов культивування з та без ФРНТ становила  $-21 \pm 2$  (n = 40) та  $18 \pm 2$  пА/пФ (n = 25). У нейронах, що культивувалися в присутності ФРНТ зареєстровано підсилення ефекту НА на кальцієвий струм.

## РОЗДІЛ 4

### ОБГОВОРЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

#### 4.1 Електрофізіологічні характеристики нейронів ГТН

Відомо, що клітинні тіла первинних аферентних волокон можуть відрізнятися між собою за морфологічними, електрофізіологічними та фармакологічними показниками [29, 174]. Ідентифікована певна відповідність між цими параметрами та швидкістю проведення сенсорного сигналу. Слабомієлінізовані А $\delta$  та немієлінізовані С волокна, які проводять ноцицептивний сигнал, мають найменший розмір соми та генерують тривалі ПД []. Також ноцицепторам властива експресія специфічних хемокерованих каналів (TRP, пуринорецепторів) та окремих видів потенціалкеруючих каналів. Таким чином, аналіз властивостей електричної активності та аплікація певних фармакологічно активних речовин в експериментах *in vitro* дозволяє зробити припущення щодо участі нейрона у проведенні больового сигналу.

У даній роботі методом фіксації струму на культивованих нейронах ГТН виявлено три типи викликані електричної активності, що узгоджується з раніше отриманими даними на свіжодисоційованих клітинах ГТН [191]. Аналіз електрофізіологічних показників показав, що кожному типу відповідає певна неоднорідність в параметрах ПД та частотних характеристиках активності. Ці результати підтверджуються даними у експериментах *in vivo*, які показали що частотна генерація ПД властива більшості нейронів низькопорогових та високопорогових механорецепторів шкіри та полімодальним рецепторам рогівки ока. Адаптивна відповідь на стимуляцію характерна для немієлінізованих волокон шкіри, механорецепторів рогівки ока та низькопорогових механорецепторів волосяного покриву. Соми різних первинних аферентів відрізняються електрофізіологічними параметрами, що пояснює неоднорідність у частотних характеристиках активності та тривалості фази спаду ПД [24].

У сенсорних гангліях ТТХ-резистивні натрієві канали експресуються у нейронах, які формують С- та А $\delta$ - волокна [30, 112, 192]. Опираючись на відповідність між чутливістю до ТТХ та тривалістю фази спаду, можна вважати, що адаптивні та тонічні нейрони з тривалішим ПД беруть участь у передачі ноцицептивної інформації.

При аналізі електрофізіологічних показників достатньо уваги було приділено т.з. деполяризаційному вигину (ефект вхідного випрямлення), який виникав під час гіперполяризації мембрани. Він обумовлений експресією HCN-каналів, що активуються гіперполяризацією [172]. Даний ефект у наших дослідженнях кількісно характеризували за допомогою коефіцієнта вхідного випрямлення, аналіз значень якого показав відмінності у нейронах з різним типом електричної активності. Ці відмінності пояснюються наявністю або відсутністю різних типів HCN каналів, що відрізняються за швидкістю активації та рівнем чутливості до циклічних нуклеотидів [193, 194]. У дослідженнях *in vivo* було показано, що у значній частині нейронів, більшість яких формують С-волокна, вхідне випрямлення відсутнє [24]. Результати наших експериментів показали, що найнижчі значення коефіцієнта вхідного випрямлення та, відповідно, низький рівень експресії HCN каналів спостерігається у адаптивних нейронах.

Таким чином, нейрони ГТН з маленьким розміром соми гетерогенні за електрофізіологічними властивостями та чутливістю до ТТХ. Нейрони з певним типом імпульсної активності відрізняються електрофізіологічними показниками, що може вказувати на належність клітин до різних сенсорних шляхів. Відповідність між електрофізіологічними та фармакологічними показниками дозволяє визначити групи нейронів, що залучені у проведенні ноцицептивного сигналу

#### **4.2 *НА-індуковані зміни у електричній активності нейронів ГТН***

Відомо, що НА здійснює модулюючий вплив на збудливість нейронів центральної та периферичної нервових систем. Головним джерелом НА в організмі є симпатичні закінчення та мозкова речовина наднирників. Ефект НА на електричну активність нейронів та міжклітинні взаємодії реалізуються внаслідок впливу внутрішньоефекторних молекул на потенціал- та лігандкеровані іонні канали. Всі АР відносяться до класу G-білкоспряжених рецепторів, кожному типу АР відповідає певний каскад внутрішньоклітинних процесів [54]. Вплив на канали здійснюються прямо ( $\alpha$ - та  $\beta$ -субодиницями) або з залученням вторинних внутрішньоклітинних посередників.

У нашій роботі аналіз НА-викликаних змін дозволив оцінити чутливі до норадренергічного впливу електрофізіологічні механізми в нейронах ГТН. У наших експериментах аплікація НА призводила до змін електрофізіологічних параметрів клітин з різним типом електричної активності. Зміщення до більш негативних значень мембранного потенціалу спокою можна пояснити активацією калієвих каналів вхідного випрямлення ( $K_{ir3}$ ), керування якими здійснюється через активацію G-білка. Вплив на ці іонні канали ймовірно реалізується за рахунок прямого G $\beta\gamma$  шляху внаслідок активації  $\alpha_2$ -АР, експресія яких відбувається у ГТН [77, 91, 195, 196].

Також при аплікації НА зареєстровано зміни у відповідях на гіперполяризацію мембрани, а саме нівеляція деполяризуючого вигину. Ці зміни пов'язані з впливом НА на HCN канали, оскільки саме їх активація забезпечує цей ефект в нейронах ГТН [168, 172, 193]. Ці канали є потенціалкерованими та чутливими до циклічних нуклеотидів (цАМФ та цГМФ), рівень яких може змінюватися внаслідок норадренергічного впливу. Роботи на нейронах ДКГ та ГТН показали, що пригнічення електричної активності відбувається внаслідок взаємозв'язку  $\alpha_2$ -АР та HCN-каналів [77, 78]. Ці процеси можуть здійснюватися як за рахунок вторинних посередників так і через прямий вплив, який зафіксований при активації  $\alpha_{2a}$  [197].

Зменшення тривалості та амплітуди ПД при аплікації НА вірогідно відбуваються через зв'язок АР з ПКК, оскільки подібні зміни спостерігалися у безкальцієвому розчині. Цей іон відіграє важливу роль не тільки в запуску внутрішньоклітинних процесів, а й в генерації ПД, оскільки, як продемонстровано на свіжодисоційованих нейронах ГТН, можлива генерація ПД при заміщенні іонів натрію [96]. Результати наших експериментів показали, що у частині нейронів НА призводив до припинення здатності до генерації тонічної активності, що супроводжувалося змінами у слідовій гіперполяризації. Зміни у слідовій гіперполяризації можуть бути пов'язані з впливом на кальцій-залежні калієві канали, а припинення частотної генерації або зменшення частоти генерації ПД – з впливом на канали, що активуються гіперполяризацією [55, 198, 199].

Отже, згідно наших досліджень, проведених в режимі фіксації струму, показано, що у більшості нейронів ГТН норадренергічний вплив здійснюється через вплив АР на канали, що активуються гіперполяризацією та ПКК.

#### **4.3 Шляхи впливу на ПКК при активації адренорецепторів**

ПКК канали є основним джерелом надходження кальцію у внутрішньоклітинне середовище, де відбувається безліч кальцій залежних процесів, таких як транскрипція, проліферація, активація ферментів та вивільнення гормонів та нейротрансмітерів [200-203]. У нейронах ГТН ПКК беруть участь у генерації ПД [96, 204]. Кальцієві канали є одною з головних мішеней впливу метаботропних рецепторів, який реалізується активацією G-білка. Результати наших експериментів показали, що аплікація НА призводила до дозо-залежного пригнічення кальцієвого струму. При насичуючій концентрації середнє пригнічення становило 20% і швидкість зменшення струму не залежала від концентрації катехоламіна. Ці результати співвідносяться з впливом АР на ПКК різних центрів нервової системи [76, 80, 205]. Вплив метаботропних рецепторів на ПКК здійснюється за рахунок прямого впливу та

(або) з залученням вторинних посередників [11, 206]. Прямий вплив реалізується здебільшого на N- та P/Q канали через активацію  $G_{i/o}$ -білків, які є чутливими до токсину кашлюку [10-12, 153]. У такому впливі здебільшого відбувається зв'язування  $\beta\gamma$ -субодиниці з  $\alpha 1$  субодиницею кальцієвого каналу (Рис.4.1 а,б). Місце зв'язування знаходиться на внутрішній петлі I-II, яке є також місцем зв'язування з допоміжною  $\beta$ -субодиницею кальцієвого каналу. Таким чином, активація G-білка впливає на взаємодії між відповідними субодиницями каналу, внаслідок чого уповільнюється кінетика активації. Електрофізіологічною особливістю прямого впливу на кальцієві канали є полегшення пригнічення при прикладанні високоамплітудної деполяризації або частотної стимуляції [148, 153, 161]. Фосфориляція є другим можливим механізмом впливу на функціонування ПКК при активації G-білка [10]. Він здійснюється ПКС через опосередкований фосфоліпазою C шляхи (Рис.4.1 а, в). Проте в електрофізіологічних експериментах показано, що фосфориляція ПКК може викликати як підсилення [163, 207], так і пригнічення струму через ПКК [142, 162]. Ці відмінності пояснюються послідовністю реакцій та відмінними мішеннями на ПКК. Цей процес може здійснюватися через активацію  $G_i$  та  $G_q$ . У першому випадку активація фосфоліпази C ініціюється  $\beta\gamma$  субодиницею, у другому –  $G\alpha_q$ . Показано, що до цього типу модуляції можуть бути залучені N, P/Q та R- типи ПКК [143].

У більшості нейронів ГТН аплікація НА призводила до зменшення амплітуди струму через кальцієві канали без змін у кінетиці. Цей тип впливу виявився не чутливим до прикладання деполяризуючого предімпульсу. Також було зареєстровано інший тип модуляції НА, який викликав пригнічення струму зі зміною кінетичних параметрів. Попередня деполяризація призводила до відновлення кінетики та частково амплітуди. Ці результати доводять наявність адренергічної модуляції ПКК, яка індукована зв'язуванням  $\beta\gamma$  субодиниці з відповідною субодиницею кальцієвого каналу [154]. Таким чином, у 30% нейронів ГТН електрофізіологічно виявлено присутність впливу на струм через

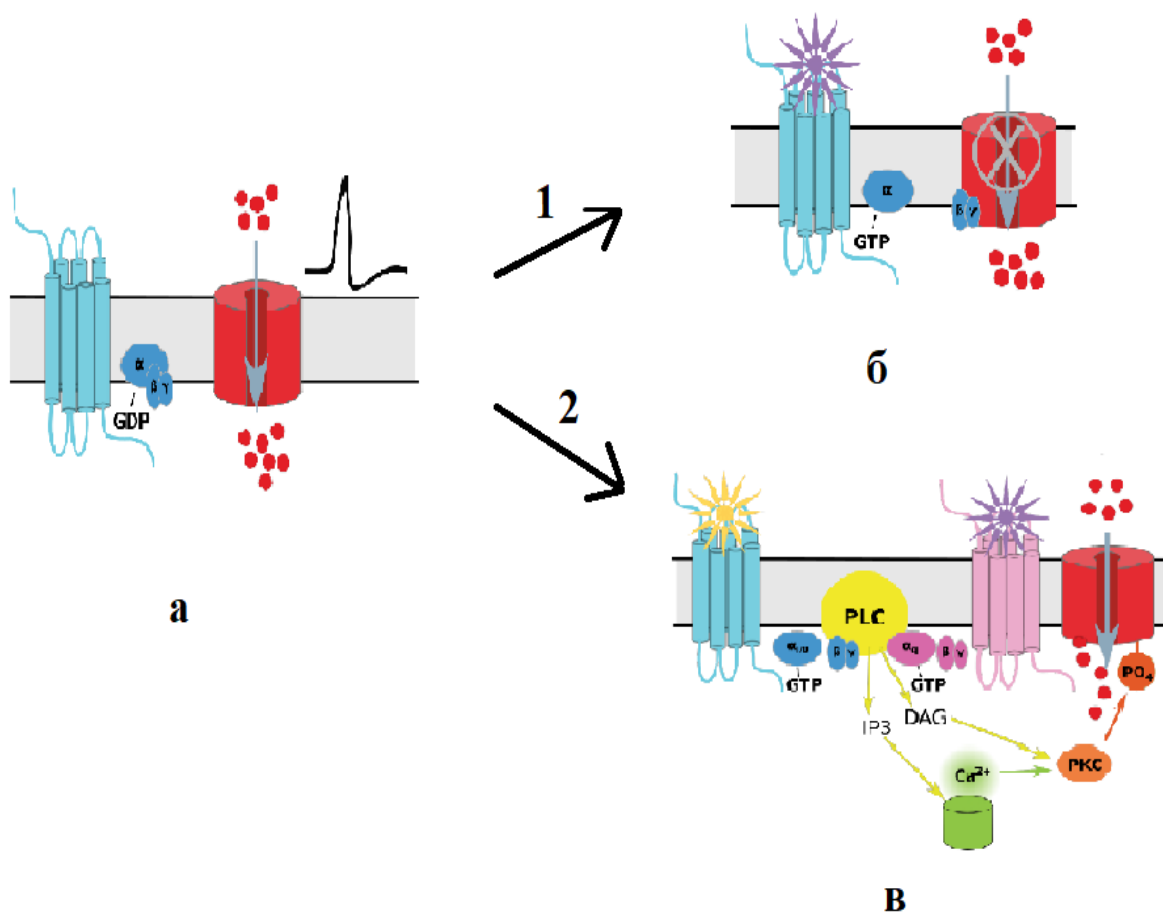
ПКК через активацію  $G_{i/o}$ -білка. Проте неповне відновлення при прикладанні деполяризації вказує на присутність ще одного внутрішньоклітинного процесу, який залучений у норадренергічну модуляцію. Він може запускатися внаслідок активації  $G_{i/o}$ -білка (Рис. 4.2 в). Конвергенція декількох внутрішньоклітинних механізмів, які ініційовані НА, виявлено на нейронах ДКГ курчат [142]. Електрофізіологічні відмінності у модуляції НА вказують на те що в нейронах ГТН запускаються одночасно різні внутрішньоклітинні механізми [142, 208-210], поєднання яких не відбувається адитивно [211].

Різний рівень пригнічення кальцієвого струму залежно від умов культивування з або без ФРНТ може відбуватися внаслідок перерозподілу різних типів АР при активації високоафінних (тирозинкінази,  $trkA$ ) або низькоафінних ( $p75$ ) рецепторів до ФРНТ. Саме вони експресуються на нейронах, які відповідають за передачу ноцицептивного сигналу [212].

#### ***4.4 Участь $\alpha_2$ -адренорецепторів у НА-індукованій модуляції струмів через ПКК***

Через взаємозв'язок  $\alpha_2$ -АР та ПКК реалізується вплив на вивільнення нейромедіатора в синаптичній передачі та модуляція електричної активності в центральних та периферичних нейронах [56, 79, 201]. Активація цих рецепторів призводить до змін у біофізичних параметрах струмів через ПКК (зменшення провідності, уповільнення кінетики активації) [80, 145]. Ці рецептори відповідають за розвиток чутливості до катехоламіну при розвитку нейропатичних станів [56]. Вплив на електричну активність шляхом активації цих рецепторів призводить до пригнічення електричної активності в нейронах ГТН за нормальних умов (без застосування моделей патологічних станів) [77].





**Рис. 4.1 Шляхи впливу НА на ПКК. а – вхід кальцію через ПКК під час розвитку ПД без активації АР; б – прямий вплив на ПКК, що реалізується через зв'язування  $\beta\gamma$ -субодиниці G-білка, який призводить до зменшення потоку кальцію через ПКК. в – вплив на ПКК шляхом фосфорилювання протеїнкіназою С (PKC). Активація АР типу  $G_{\alpha i/o}$  призводить до активації фосфоліпази С (PLC), яка через взаємодію інозитол 1,4,5 – трифосфат (IP<sub>3</sub>) рецепторів внутрішньоклітинних депо збільшує рівень кальцію. Поряд з цим може ініціюватися інший шлях при активації PLC, що призводить до збільшення діацилгліцеролу (DAG), ліпідного активатора PKC (Модифіковано з Strock J. and Diverse-Pierluzzi M. 2004).**

Результати наших експериментів продемонстрували, що НА-індуковані зміни в струмах через ПКК здійснюється через  $\alpha_2$ -АР. Ці АР сполучені з  $G_{i/o}$ -

білками, активація яких призводить до пригнічення струму ПКК шляхом прямих механізмів або через вторинні посередники. У нейронах ГТН їх внесок у норадренергічному впливі домінуючий, проте 40% припадає на інші АР.

Активація  $\beta$ -АР у даному випадку маловірогідна, оскільки вони запускають цАМФ опосередкований шлях, внаслідок якого повинні спостерігатися зміни у ПКК L- типу. У нашій роботі вплив НА на цей тип ПКК не був зареєстрований. Вірогідно, що залишковий вплив здійснюється через  $\alpha_1$ -АР, які сполучені з  $G_s$ -білками. Активація цих АР ініціює сигнальні шляхи, результатом яких є процеси фосфориляції ПКС  $\alpha_1$  субодиниці ПКК. Проте слід зазначити, що дослідження на інтеркардіальному ганглії довели нечутливість модуляції НА струмів через ПКК до агоністів  $\alpha_1$ -АР та  $\alpha_2$ -АР [75].

#### **4.5 Чутливі до норадренергічного впливу типи ПКК нейронів ГТН**

За електрофізіологічними характеристиками струмів ідентифіковано експресію низько- та високопорогових ПКК в нейронах ГТН [112, 134, 135]. Відомо, що саме високопорогові ПКК беруть участь у модуляції НА струмів через ПКК [80], що було також показано у наших експериментах на нейронах ГТН.

За допомогою селективних блокаторів у концентрації максимального пригнічення ідентифіковано у нейронах ГТН експресію N- L- та P/Q – типу ПКК. При аплікації усіх блокаторів залишався токсин-резистивний струм, найімовірніше цей струм протікає через R- канали. Найбільша частка всього струму припадає на N- та L- високопорогові ПКК. Отримані дані узгоджуються з результатами експериментів на свіжоізолюваних нейронах ГТН [112, 134, 135]. Сума середніх пригнічень при дії відповідних селективних блокаторів становить 81%, тому можна було б очікувати, що середня частка струму через R-тип ПКК буде становити 19%, однак її значення в 1.5 рази більше ( $27 \pm 5\%$  ; 11 - 44%). Така невідповідність, хоча і не є статистично достовірною, може свідчити про певну

кореляцію у експресії різних типів високопорогових ПКК на нейронах ГТН, що потребує окремого дослідження.

Результати представленої роботи показали, що до НА впливу чутливі N- P/Q- та R- типи ПКК. Як і для багатьох видів нейронів, найбільший внесок припадає на N- типу ПКК [142, 154, 213]. У деякій частині нейронів аплікація НА не призводила до змін у струмах через ПКК в присутності селективного блокатора N-типу. Це означає, що у цих клітинах норадренергічна модуляція струмів опосередкована лише цим підтипом ПКК. Також показано, що на фоні дії селективних блокаторів P/Q- типу дія НА призводить до змін у кінетиці. Ці дані вказують, що саме каналам N-типу властивий норадренергічний вплив через  $\beta\gamma$ -опосередкований шлях. Це узгоджується з даними, отриманими на нейронах периферичної та центральної нервової систем, адже саме на цих каналах можлива конвергенція декількох НА-індукованих внутрішньоклітинних процесів [142, 143, 153, 211]. Поряд з модуляцією НА струмів через ПКК N-типу, виявлено незначний внесок у цей вплив P/Q та R -типу ПКК. Відсутність змін у кінетиці струму при аплікації НА, пояснюється експресією іншого підтипу N каналів або впливом, опосередкованим R- та P/Q- типами ПКК. Щодо токсин-резистивного струму, пригнічення залишкового струму було сталим і становило 7% по відношенню до загального струму. Участь R-каналів у G-білок зв'язаних рецепторних взаємодіях зареєстровано у небагатьох роботах, а у сенсорних гангліях вперше [180]. Наші результати показали, що внесок цих каналів для всіх нейронів складає 7%, при цьому не спостерігаються кінетичні зміни струму.

## ВИСНОВКИ

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

1. У нейронах ГТН НА-індуковані зміни у електрофізіологічних характеристиках пов'язані з впливом на ПКК та канали, що активуються при гіперполяризації соматичної мембрани. У всіх адаптивних та нейронах з затриманою генерацією ПД зменшується амплітуда та тривалість фази спаду ПД. Такі ефекти також спостерігаються у 65% тонічних клітин. 35% тонічних нейронів втрачають здатність до частотної генерації, у них знижується амплітуди ПД та слідової гіперполяризації. При дії НА нівелюється ефект вхідного випрямлення, як у адаптивних, так і тонічних нейронів.
2. У більшості (91%) нейронів ГТН НА дозозалежно пригнічує струми через ПКК. При цьому у 62% нейронів зменшується лише амплітуда струму (І тип модуляції), а у 29% – додатково уповільнюється кінетика струму (ІІ-тип модуляції). Електрофізіологічними методами встановлено, що ІІ тип модуляції опосередкований взаємодією  $\beta\gamma$ -субодиниці G-білка з ПКК, тоді як у І типі така взаємодія практично відсутня.
3. Модуючий ефект НА на високопороговий струм через ПКК здійснюється через вплив на канали N-, R- та P/Q типів з середнім внеском 52, 35 та 13% відповідно, а канали L-типу у цьому процесі практично не задіяні.
4. Вплив НА на високопорогові ПКК нейронів ГТН лише частково (на 60%) опосередковується активацією  $\alpha_2$ -АР.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. McLachlan, E.M., W. Janig, M. Devor, and M. Michaelis. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature*. 1993;363(6429):543-6.
2. Ramer, M.S., S.W. Thompson, and S.B. McMahon. Causes and consequences of sympathetic basket formation in dorsal root ganglia. *Pain*. 1999;Suppl 6:S111-20.
3. Garcia-Poblete, E., H. Fernandez-Garcia, E. Moro-Rodriguez, M. Catala-Rodriguez, M.L. Rico-Morales, et al. Sympathetic sprouting in dorsal root ganglia (DRG): a recent histological finding? *Histol Histopathol*. 2003;18(2):575-86.
4. Honma, Y., M. Yamakage, and T. Ninomiya. Effects of adrenergic stimulus on the activities of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels of dorsal root ganglion neurons in a neuropathic pain model. *Brain Res*. 1999;832(1-2):195-206.
5. Shen, K.Z., R.A. North, and A. Surprenant. Potassium channels opened by noradrenaline and other transmitters in excised membrane patches of guinea-pig submucosal neurones. *J Physiol*. 1992;445:581-99.
6. Marchetti, C., E. Carbone, and H.D. Lux. Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflugers Arch*. 1986;406(2):104-11.
7. Chen, Y., M. Michaelis, W. Janig, and M. Devor. Adrenoreceptor subtype mediating sympathetic-sensory coupling in injured sensory neurons. *J Neurophysiol*. 1996;76(6):3721-30.
8. Bongenhielm, U., F.M. Boissonade, A. Westermarck, P.P. Robinson, and K. Fried. Sympathetic nerve sprouting fails to occur in the trigeminal ganglion after peripheral nerve injury in the rat. *Pain*. 1999;82(3):283-8.
9. Tal, M. and M. Devor. Ectopic discharge in injured nerves: comparison of trigeminal and somatic afferents. *Brain Res*. 1992;579(1):148-51.
10. Strock, J. and M.A. Diverse-Pierluissi. Ca<sup>2+</sup> channels as integrators of G protein-mediated signaling in neurons. *Mol Pharmacol*. 2004;66(5):1071-6.

11. Tedford, H.W. and G.W. Zamponi. Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):837-62.
12. Dolphin, A.C. G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 2003;55(4):607-27.
13. Davies, A.M. The trigeminal system: an advantageous experimental model for studying neuronal development. *Development.* 1988;103 Suppl:175-83.
14. Dubner, R. and G.J. Bennett. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annu Rev Neurosci.* 1983;6:381-418.
15. Sessle, B.J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(1):57-91.
16. Dubbeldam, J.L. The sensory trigeminal system in birds: input, organization and effects of peripheral damage. A review. *Arch Physiol Biochem.* 1998;106(5):338-45.
17. Shigenaga, Y., T. Okamoto, T. Nishimori, S. Suemune, I.D. Nasution, et al. Oral and facial representation in the trigeminal principal and rostral spinal nuclei of the cat. *J Comp Neurol.* 1986;244(1):1-18.
18. Altman, J. and S.A. Bayer. Development of the cranial nerve ganglia and related nuclei in the rat. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 1982;74:1-90.
19. D'Amico-Martel, A. and D.M. Noden. Contributions of placodal and neural crest cells to avian cranial peripheral ganglia. *Am J Anat.* 1983;166(4):445-68.
20. Johnston, M.C. A radioautographic study of the migration and fate of cranial neural crest cells in the chick embryo. *Anat Rec.* 1966;156(2):143-55.
21. Marfurt, C.F. The somatotopic organization of the cat trigeminal ganglion as determined by the horseradish peroxidase technique. *Anat Rec.* 1981;201(1):105-18.
22. Sugimoto, T., M. Takemura, A. Sakai, and M. Ishimaru. Cell size analysis of trigeminal primary afferent neurons comprising individual peripheral branches of the rat mandibular nerve. *Exp Neurol.* 1986;93(3):565-73.

23. Boada, M.D. Relationship between electrophysiological signature and defined sensory modality of trigeminal ganglion neurons in vivo. *J Neurophysiol.* 2013;109(3):749-57.
24. Lopez de Armentia, M., C. Cabanes, and C. Belmonte. Electrophysiological properties of identified trigeminal ganglion neurons innervating the cornea of the mouse. *Neuroscience.* 2000;101(4):1109-15.
25. Djouhri, L., L. Bleazard, and S.N. Lawson. Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurones. *J Physiol.* 1998;513 ( Pt 3):857-72.
26. Djouhri, L. and S.N. Lawson. Differences in the size of the somatic action potential overshoot between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the guinea-pig. *Neuroscience.* 2001;108(3):479-91.
27. Fang, X., S. McMullan, S.N. Lawson, and L. Djouhri. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo. *J Physiol.* 2005;565(Pt 3):927-43.
28. Harper, A.A. and S.N. Lawson. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol.* 1985;359:31-46.
29. Petruska, J.C., J. Napaporn, R.D. Johnson, J.G. Gu, and B.Y. Cooper. Subclassified acutely dissociated cells of rat DRG: histochemistry and patterns of capsaicin-, proton-, and ATP-activated currents. *J Neurophysiol.* 2000;84(5):2365-79.
30. Strassman, A.M. and S.A. Raymond. Electrophysiological evidence for tetrodotoxin-resistant sodium channels in slowly conducting dorsal sensory fibers. *J Neurophysiol.* 1999;81(2):413-24.
31. Cajal, R.y. *Textura del Sistema Nervioso del Hombre y los Vertebrados.* 1899: Madrid. p. 363-372.
32. Kummer, W., I.L. Gibbins, P. Stefan, and V. Kapoor. Catecholamines and catecholamine-synthesizing enzymes in guinea-pig sensory ganglia. *Cell Tissue Res.* 1990;261(3):595-606.

33. Matthews, B. and P.P. Robinson. The course of post-ganglionic sympathetic fibres distributed with the trigeminal nerve in the cat. *J Physiol.* 1980;303:391-401.
34. Kessler, J.A., W.O. Bell, and I.B. Black. Interactions between the sympathetic and sensory innervation of the iris. *J Neurosci.* 1983;3(6):1301-7.
35. Walsh, G.S. and M.D. Kawaja. Sympathetic axons surround nerve growth factor-immunoreactive trigeminal neurons: observations in mice overexpressing nerve growth factor. *J Neurobiol.* 1998;34(4):347-60.
36. (editor), W.J.A.R.F.S. *Reflex Sympathetic Dystrophy: Pathophysiological Mechanisms and Clinical Implications.* 1992: VCH, Weinheim and New York.
37. Janig, W. and H.J. Habler. Sympathetic nervous system: contribution to chronic pain. *Prog Brain Res.* 2000;129:451-68.
38. William D, W.E. *Hyperalgesia and allodynia.* 1992: Raven Press, New York.
39. Kim, S.H., H.S. Na, K. Sheen, and J.M. Chung. Effects of sympathectomy on a rat model of peripheral neuropathy. *Pain.* 1993;55(1):85-92.
40. Xie, W., J.A. Strong, H. Li, and J.M. Zhang. Sympathetic sprouting near sensory neurons after nerve injury occurs preferentially on spontaneously active cells and is reduced by early nerve block. *J Neurophysiol.* 2007;97(1):492-502.
41. Johnson, E.M., Jr., M. Taniuchi, and P.S. DiStefano. Expression and possible function of nerve growth factor receptors on Schwann cells. *Trends Neurosci.* 1988;11(7):299-304.
42. Jones, M.G., J.B. Munson, and S.W. Thompson. A role for nerve growth factor in sympathetic sprouting in rat dorsal root ganglia. *Pain.* 1999;79(1):21-9.
43. Curtis, R., S.S. Scherer, R. Somogyi, K.M. Adryan, N.Y. Ip, et al. Retrograde axonal transport of LIF is increased by peripheral nerve injury: correlation with increased LIF expression in distal nerve. *Neuron.* 1994;12(1):191-204.
44. Kurek, J.B., L. Austin, S.S. Cheema, P.F. Bartlett, and M. Murphy. Up-regulation of leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 in transected sciatic nerve and muscle following denervation. *Neuromuscul Disord.* 1996;6(2):105-14.



45. Thompson, S.W. and A.A. Majithia. Leukemia inhibitory factor induces sympathetic sprouting in intact dorsal root ganglia in the adult rat in vivo. *J Physiol.* 1998;506 ( Pt 3):809-16.
46. Thompson, S.W., A.B. Vernallis, J.K. Heath, and J.V. Priestley. Leukaemia inhibitory factor is retrogradely transported by a distinct population of adult rat sensory neurons: co-localization with trkA and other neurochemical markers. *Eur J Neurosci.* 1997;9(6):1244-51.
47. Benoliel, R., E. Eliav, and M. Tal. No sympathetic nerve sprouting in rat trigeminal ganglion following painful and non-painful infraorbital nerve neuropathy. *Neurosci Lett.* 2001;297(3):151-4.
48. Shafer, A.J., K.A. Crutcher, and L.G. Isaacson. Remodeling of adult sensory axons in the superior cervical ganglion in response to exogenous nerve growth factor. *Brain Res.* 2000;864(2):252-62.
49. Shoemaker, S.E., A.E. Kudwa, and L.G. Isaacson. Sympathetic ingrowth to the trigeminal ganglion following intracerebroventricular infusion of nerve growth factor. *Brain Res.* 2002;956(1):136-48.
50. Devor, M., W. Janig, and M. Michaelis. Modulation of activity in dorsal root ganglion neurons by sympathetic activation in nerve-injured rats. *J Neurophysiol.* 1994;71(1):38-47.
51. Shinder, V., R. Govrin-Lippmann, S. Cohen, M. Belenky, P. Ilin, et al. Structural basis of sympathetic-sensory coupling in rat and human dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. *J Neurocytol.* 1999;28(9):743-61.
52. Chung, K., Y.W. Yoon, and J.M. Chung. Sprouting sympathetic fibers form synaptic varicosities in the dorsal root ganglion of the rat with neuropathic injury. *Brain Res.* 1997;751(2):275-80.
53. Cheng, C.F., J.K. Cheng, C.Y. Chen, R.H. Rau, Y.C. Chang, et al. Nerve growth factor-induced synapse-like structures in contralateral sensory ganglia contribute to chronic mirror-image pain. *Pain.* 2015;156(11):2295-309.

54. Hein, L. Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell Tissue Res.* 2006;326(2):541-51.
55. Horn, J.P. and D.A. McAfee. Alpha-drenergic inhibition of calcium-dependent potentials in rat sympathetic neurones. *J Physiol.* 1980;301:191-204.
56. Abdulla, F.A. and P.A. Smith. Ectopic alpha2-adrenoceptors couple to N-type Ca<sup>2+</sup> channels in axotomized rat sensory neurons. *J Neurosci.* 1997;17(5):1633-41.
57. Lipscombe, D., S. Kongsamut, and R.W. Tsien. Alpha-adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature.* 1989;340(6235):639-42.
58. Langer, S.Z. Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol Rev.* 1980;32(4):337-62.
59. Illes, P. Mechanisms of receptor-mediated modulation of transmitter release in noradrenergic, cholinergic and sensory neurones. *Neuroscience.* 1986;17(4):909-28.
60. Starke, K. Presynaptic alpha-autoreceptors. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1987;107:73-146.
61. Ahlquist, R.P. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol.* 1948;153(3):586-600.
62. Lands, A.M., A. Arnold, J.P. McAuliff, F.P. Luduena, and T.G. Brown, Jr. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature.* 1967;214(5088):597-8.
63. Baldwin, J.M. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* 1993;12(4):1693-703.
64. Oliveira, L., A.C. Paiva, C. Sander, and G. Vriend. A common step for signal transduction in G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 1994;15(6):170-2.
65. Scheer, A., F. Fanelli, T. Costa, P.G. De Benedetti, and S. Cotecchia. Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation. *EMBO J.* 1996;15(14):3566-78.

66. Ahles, A. and S. Engelhardt. Polymorphic variants of adrenoceptors: pharmacology, physiology, and role in disease. *Pharmacol Rev.* 2014;66(3):598-637.
67. Cotecchia, S. The alpha1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *J Recept Signal Transduct Res.* 2010;30(6):410-9.
68. Graham, R.M., D.M. Perez, J. Hwa, and M.T. Piascik. alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ Res.* 1996;78(5):737-49.
69. Wu, D., A. Katz, C.H. Lee, and M.I. Simon. Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. *J Biol Chem.* 1992;267(36):25798-802.
70. Nakaoka, H., D.M. Perez, K.J. Baek, T. Das, A. Husain, et al. Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science.* 1994;264(5165):1593-6.
71. Eason, M.G., H. Kurose, B.D. Holt, J.R. Raymond, and S.B. Liggett. Simultaneous coupling of alpha 2-adrenergic receptors to two G-proteins with opposing effects. Subtype-selective coupling of alpha 2C10, alpha 2C4, and alpha 2C2 adrenergic receptors to Gi and Gs. *J Biol Chem.* 1992;267(22):15795-801.
72. Gyires, K., Z.S. Zadori, T. Torok, and P. Matyus. alpha(2)-Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions. *Neurochem Int.* 2009;55(7):447-53.
73. Vasudevan, N.T., M.L. Mohan, S.K. Goswami, and S.V. Naga Prasad. Regulation of beta-adrenergic receptor function: an emphasis on receptor resensitization. *Cell Cycle.* 2011;10(21):3684-91.
74. Daaka, Y., L.M. Luttrell, and R.J. Lefkowitz. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature.* 1997;390(6655):88-91.
75. Xu, Z.J. and D.J. Adams. Alpha-adrenergic modulation of ionic currents in cultured parasympathetic neurons from rat intracardiac ganglia. *J Neurophysiol.* 1993;69(4):1060-70.

76. Timmons, S.D., E. Geisert, A.E. Stewart, N.M. Lorenzon, and R.C. Foehring. alpha2-Adrenergic receptor-mediated modulation of calcium current in neocortical pyramidal neurons. *Brain Res.* 2004;1014(1-2):184-96.
77. Takeda, M., M. Ikeda, T. Tanimoto, J. Lipski, and S. Matsumoto. Changes of the excitability of rat trigeminal root ganglion neurons evoked by alpha(2)-adrenoreceptors. *Neuroscience.* 2002;115(3):731-41.
78. Yagi, J. and R. Sumino. Inhibition of a hyperpolarization-activated current by clonidine in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 1998;80(3):1094-104.
79. Li, C. and J.P. Horn. Differential Inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels by alpha2-adrenoceptors in three functional subclasses of rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol.* 2008;100(6):3055-63.
80. Ishibashi, H. and N. Akaike. Norepinephrine modulates high voltage-activated calcium channels in freshly dissociated rat nucleus tractus solitarii neurons. *Neuroscience.* 1995;68(4):1139-46.
81. Zhang, Q. and Y. Tan. Nerve growth factor augments neuronal responsiveness to noradrenaline in cultured dorsal root ganglion neurons of rats. *Neuroscience.* 2011;193:72-9.
82. Boehm, S. and S. Huck. alpha 2-Adrenoreceptor-mediated inhibition of acetylcholine-induced noradrenaline release from rat sympathetic neurons: an action at voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuroscience.* 1995;69(1):221-31.
83. Sonohata, M., H. Furue, T. Katafuchi, T. Yasaka, A. Doi, et al. Actions of noradrenaline on substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by in vivo patch recording. *J Physiol.* 2004;555(Pt 2):515-26.
84. Cheng, H.J., K.T. Ma, L. Li, L. Zhao, Y. Wang, et al. Differential expression of alpha-adrenoceptor subtypes in rat dorsal root ganglion after chronic constriction injury. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2014;34(3):322-329.
85. Bean, B.P. Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature.* 1989;340(6229):153-6.

86. Gold, M.S., S. Dastmalchi, and J.D. Levine. Alpha 2-adrenergic receptor subtypes in rat dorsal root and superior cervical ganglion neurons. *Pain*. 1997;69(1-2):179-90.
87. Walsh, K.B., T.B. Begenisich, and R.S. Kass. Beta-adrenergic modulation of cardiac ion channels. Differential temperature sensitivity of potassium and calcium currents. *J Gen Physiol*. 1989;93(5):841-54.
88. Gallego, M., A. Alday, H. Alonso, and O. Casis. Adrenergic regulation of cardiac ionic channels: role of membrane microdomains in the regulation of kv4 channels. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(2):692-9.
89. Campbell, V., N.S. Berrow, E.M. Fitzgerald, K. Brickley, and A.C. Dolphin. Inhibition of the interaction of G protein G(o) with calcium channels by the calcium channel beta-subunit in rat neurones. *J Physiol*. 1995;485 ( Pt 2):365-72.
90. Fink, A.E. and J.E. LeDoux. beta-Adrenergic enhancement of neuronal excitability in the lateral amygdala is developmentally gated. *J Neurophysiol*. 2018;119(5):1658-1664.
91. Dascal, N. Signalling via the G protein-activated K<sup>+</sup> channels. *Cell Signal*. 1997;9(8):551-73.
92. Lei, Q., M.B. Jones, E.M. Talley, J.C. Garrison, and D.A. Bayliss. Molecular mechanisms mediating inhibition of G protein-coupled inwardly-rectifying K<sup>+</sup> channels. *Mol Cells*. 2003;15(1):1-9.
93. Soeda, H., H. Tatsumi, and Y. Katayama. Neurotransmitter release from growth cones of rat dorsal root ganglion neurons in culture. *Neuroscience*. 1997;77(4):1187-99.
94. Thayer, S.A. and R.J. Miller. Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. *J Physiol*. 1990;425:85-115.
95. Dolphin, A.C. Voltage-gated calcium channels: their discovery, function and importance as drug targets. *Brain Neurosci Adv*. 2018;2.

96. Puil, E. and I. Spigelman. Electrophysiological responses of trigeminal root ganglion neurons in vitro. *Neuroscience*. 1988;24(2):635-46.
97. Carbone, E. and H.D. Lux. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature*. 1984;310(5977):501-2.
98. Fedulova, S.A., P.G. Kostyuk, and N.S. Veselovsky. Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol*. 1985;359:431-46.
99. Bean, B.P. Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(20):6388-92.
100. Bean, B.P. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol*. 1989;51:367-84.
101. Hess, P. Calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Neurosci*. 1990;13:337-56.
102. Jeong, S.W. and R.D. Wurster. Calcium channel currents in acutely dissociated intracardiac neurons from adult rats. *J Neurophysiol*. 1997;77(4):1769-78.
103. McCleskey, E.W. Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*. 1994;4(3):304-12.
104. Tottene, A., A. Moretti, and D. Pietrobon. Functional diversity of P-type and R-type calcium channels in rat cerebellar neurons. *J Neurosci*. 1996;16(20):6353-63.
105. Tsien, R.W., D. Lipscombe, D.V. Madison, K.R. Bley, and A.P. Fox. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci*. 1988;11(10):431-8.
106. Zammuto, R.F., I.R. Turner, S. Miller, I. Shannon, and J. Christian. Effect of clinical settings on the utilization of nurse practitioners. *Nurs Res*. 1979;28(2):98-102.
107. Zhang, J.F., A.D. Randall, P.T. Ellinor, W.A. Horne, W.A. Sather, et al. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology*. 1993;32(11):1075-88.
108. Bean, B.P. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol*. 1985;86(1):1-30.

109. Hagiwara, S. and K. Takahashi. Resting and spike potentials of skeletal muscle fibres of salt-water elasmobranch and teleost fish. *J Physiol.* 1967;190(3):499-518.
110. Budde, T., S. Meuth, and H.C. Pape. Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(11):873-83.
111. Tillotson, D. Inactivation of Ca conductance dependent on entry of Ca ions in molluscan neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(3):1497-500.
112. Kim, H.C. and M.K. Chung. Voltage-dependent sodium and calcium currents in acutely isolated adult rat trigeminal root ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 1999;81(3):1123-34.
113. Catterall, W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:521-55.
114. Ertel, E.A., K.P. Campbell, M.M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, et al. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 2000;25(3):533-5.
115. Tsien, R.W., P.T. Ellinor, and W.A. Horne. Molecular diversity of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12(9):349-54.
116. Bechem, M. and H. Hoffmann. The molecular mode of action of the Ca agonist (-) BAY K 8644 on the cardiac Ca channel. *Pflugers Arch.* 1993;424(3-4):343-53.
117. Hamilton, B.R. and D.O. Smith. Calcium currents in rat motor nerve terminals. *Brain Res.* 1992;584(1-2):123-31.
118. Westenbroek, R.E., J.W. Hell, C. Warner, S.J. Dubel, T.P. Snutch, et al. Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron.* 1992;9(6):1099-115.
119. Westenbroek, R.E., T. Sakurai, E.M. Elliott, J.W. Hell, T.V. Starr, et al. Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J Neurosci.* 1995;15(10):6403-18.
120. Wheeler, D.B., A. Randall, and R.W. Tsien. Roles of N-type and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science.* 1994;264(5155):107-11.

121. Hirning, L.D., A.P. Fox, E.W. McCleskey, B.M. Olivera, S.A. Thayer, et al. Dominant role of N-type Ca<sup>2+</sup> channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science*. 1988;239(4835):57-61.
122. Regan, L.J., D.W. Sah, and B.P. Bean. Ca<sup>2+</sup> channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and omega-conotoxin. *Neuron*. 1991;6(2):269-80.
123. Randall, A. and R.W. Tsien. Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci*. 1995;15(4):2995-3012.
124. Catterall, W.A. Structure and modulation of Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;707:1-19.
125. Hobom, M., S. Dai, E. Marais, L. Lacinova, F. Hofmann, et al. Neuronal distribution and functional characterization of the calcium channel alpha2delta-2 subunit. *Eur J Neurosci*. 2000;12(4):1217-26.
126. Dubel, S.J., C. Altier, S. Chaumont, P. Lory, E. Bourinet, et al. Plasma membrane expression of T-type calcium channel alpha(1) subunits is modulated by high voltage-activated auxiliary subunits. *J Biol Chem*. 2004;279(28):29263-9.
127. Singer, D., M. Biel, I. Lotan, V. Flockerzi, F. Hofmann, et al. The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science*. 1991;253(5027):1553-7.
128. Berrow, N.S., V. Campbell, E.M. Fitzgerald, K. Brickley, and A.C. Dolphin. Antisense depletion of beta-subunits modulates the biophysical and pharmacological properties of neuronal calcium channels. *J Physiol*. 1995;482 ( Pt 3):481-91.
129. Berrow, N.S., N.L. Brice, I. Tedder, K.M. Page, and A.C. Dolphin. Properties of cloned rat alpha1A calcium channels transiently expressed in the COS-7 cell line. *Eur J Neurosci*. 1997;9(4):739-48.
130. Stephens, G.J., K.M. Page, J.R. Burley, N.S. Berrow, and A.C. Dolphin. Functional expression of rat brain cloned alpha1E calcium channels in COS-7 cells. *Pflugers Arch*. 1997;433(4):523-32.



131. Stephens, G.J., K.M. Page, Y. Bogdanov, and A.C. Dolphin. The  $\alpha 1B$   $Ca^{2+}$  channel amino terminus contributes determinants for beta subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. *J Physiol.* 2000;525 Pt 2:377-90.
132. Pragnell, M., M. De Waard, Y. Mori, T. Tanabe, T.P. Snutch, et al. Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the  $\alpha 1$ -subunit. *Nature.* 1994;368(6466):67-70.
133. Hanlon, M.R., N.S. Berrow, A.C. Dolphin, and B.A. Wallace. Modelling of a voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel beta subunit as a basis for understanding its functional properties. *FEBS Lett.* 1999;445(2-3):366-70.
134. Ikeda, M. and S. Matsumoto. Classification of voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels in trigeminal ganglion neurons from neonatal rats. *Life Sci.* 2003;73(9):1175-87.
135. Gover, T.D., T.H. Moreira, J.P. Kao, and D. Weinreich. Calcium homeostasis in trigeminal ganglion cell bodies. *Cell Calcium.* 2007;41(4):389-96.
136. Dolphin, A.C., S.R. Forda, and R.H. Scott. Calcium-dependent currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones are inhibited by an adenosine analogue. *J Physiol.* 1986;373:47-61.
137. Dunlap, K. and G.D. Fischbach. Neurotransmitters decrease the calcium component of sensory neurone action potentials. *Nature.* 1978;276(5690):837-9.
138. Scott, R.H. and A.C. Dolphin. Regulation of calcium currents by a GTP analogue: potentiation of (-)-baclofen-mediated inhibition. *Neurosci Lett.* 1986;69(1):59-64.
139. Dunlap, K. and G.D. Fischbach. Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J Physiol.* 1981;317:519-35.
140. Patil, P.G., D.L. Brody, and D.T. Yue. Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. *Neuron.* 1998;20(5):1027-38.
141. Formenti, A., E. Arrigoni, and M. Mancina. Two distinct modulatory effects on calcium channels in adult rat sensory neurons. *Biophys J.* 1993;64(4):1029-37.

142. Luebke, J.I. and K. Dunlap. Sensory neuron N-type calcium currents are inhibited by both voltage-dependent and -independent mechanisms. *Pflügers Arch.* 1994;428(5-6):499-507.
143. Diverse-Pierluissi, M. and K. Dunlap. Distinct, convergent second messenger pathways modulate neuronal calcium currents. *Neuron.* 1993;10(4):753-60.
144. Li, Y.W. and D.A. Bayliss. Activation of alpha 2-adrenoceptors causes inhibition of calcium channels but does not modulate inwardly-rectifying K<sup>+</sup> channels in caudal raphe neurons. *Neuroscience.* 1998;82(3):753-65.
145. Li, Y.W., P.G. Guyenet, and D.A. Bayliss. Voltage-dependent calcium currents in bulbospinal neurons of neonatal rat rostral ventrolateral medulla: modulation by alpha2-adrenergic receptors. *J Neurophysiol.* 1998;79(2):583-94.
146. Nicholas, A.P., V. Pieribone, and T. Hokfelt. Distributions of mRNAs for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol.* 1993;328(4):575-94.
147. Galvan, M. and P.R. Adams. Control of calcium current in rat sympathetic neurons by norepinephrine. *Brain Res.* 1982;244(1):135-44.
148. Ikeda, S.R. Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J Physiol.* 1991;439:181-214.
149. Forscher, P., G.S. Oxford, and D. Schulz. Noradrenaline modulates calcium channels in avian dorsal root ganglion cells through tight receptor-channel coupling. *J Physiol.* 1986;379:131-44.
150. Koh, D.S. and B. Hille. Modulation by neurotransmitters of catecholamine secretion from sympathetic ganglion neurons detected by amperometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(4):1506-11.
151. Mochida, S., Z.H. Sheng, C. Baker, H. Kobayashi, and W.A. Catterall. Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron.* 1996;17(4):781-8.
152. Takahashi, T. and A. Momiyama. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature.* 1993;366(6451):156-8.

153. Herlitze, S., D.E. Garcia, K. Mackie, B. Hille, T. Scheuer, et al. Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*. 1996;380(6571):258-62.
154. Ikeda, S.R. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*. 1996;380(6571):255-8.
155. Agler, H.L., J. Evans, L.H. Tay, M.J. Anderson, H.M. Colecraft, et al. G protein-gated inhibitory module of N-type (ca(v)2.2) ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron*. 2005;46(6):891-904.
156. De Waard, M., H. Liu, D. Walker, V.E. Scott, C.A. Gurnett, et al. Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature*. 1997;385(6615):446-50.
157. Zamponi, G.W. and T.P. Snutch. Decay of prepulse facilitation of N type calcium channels during G protein inhibition is consistent with binding of a single Gbeta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(7):4035-9.
158. Canti, C., K.M. Page, G.J. Stephens, and A.C. Dolphin. Identification of residues in the N terminus of alpha1B critical for inhibition of the voltage-dependent calcium channel by Gbeta gamma. *J Neurosci*. 1999;19(16):6855-64.
159. Li, B., H. Zhong, T. Scheuer, and W.A. Catterall. Functional role of a C-terminal Gbetagamma-binding domain of Ca(v)2.2 channels. *Mol Pharmacol*. 2004;66(3):761-9.
160. Qin, N., D. Platano, R. Olcese, E. Stefani, and L. Birnbaumer. Direct interaction of gbetagamma with a C-terminal gbetagamma-binding domain of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(16):8866-71.
161. Meir, A., D.C. Bell, G.J. Stephens, K.M. Page, and A.C. Dolphin. Calcium channel beta subunit promotes voltage-dependent modulation of alpha 1 B by G beta gamma. *Biophys J*. 2000;79(2):731-46.
162. Rane, S.G. and K. Dunlap. Kinase C activator 1,2-oleoylacetyl glycerol attenuates voltage-dependent calcium current in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(1):184-8.

163. Zhu, Y. and S.R. Ikeda. Modulation of Ca(2+)-channel currents by protein kinase C in adult rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol.* 1994;72(4):1549-60.
164. Veselovsky, N.S., F. Engert, and H.D. Lux. Fast local superfusion technique. *Pflugers Arch.* 1996;432(2):351-4.
165. Pape, H.C. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol.* 1996;58:299-327.
166. Hogan, Q.H. and M. Poroli. Hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) contributes to excitability of primary sensory neurons in rats. *Brain Res.* 2008;1207:102-10.
167. Momin, A., H. Cadiou, A. Mason, and P.A. McNaughton. Role of the hyperpolarization-activated current I<sub>h</sub> in somatosensory neurons. *J Physiol.* 2008;586(24):5911-29.
168. Cho, H.J., J.B. Furness, and E.A. Jennings. Postnatal maturation of the hyperpolarization-activated cation current, I<sub>h</sub>, in trigeminal sensory neurons. *J Neurophysiol.* 2011;106(4):2045-56.
169. Telka, M.V., O.V. Rikhalsky, and N.S. Veselovsky. Excitability Properties of Trigeminal Ganglion Neurons. *Fiziol Zh.* 2016;62(2):24-34.
170. Fu, X.W., B.L. Brezden, and S.H. Wu. Hyperpolarization-activated inward current in neurons of the rat's dorsal nucleus of the lateral lemniscus in vitro. *J Neurophysiol.* 1997;78(5):2235-45.
171. Bayliss, D.A., F. Viana, M.C. Bellingham, and A.J. Berger. Characteristics and postnatal development of a hyperpolarization-activated inward current in rat hypoglossal motoneurons in vitro. *J Neurophysiol.* 1994;71(1):119-28.
172. Cabanes, C., M. Lopez de Armentia, F. Viana, and C. Belmonte. Postnatal changes in membrane properties of mice trigeminal ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 2002;87(5):2398-407.
173. MV Tel'ka, O.R.s.N.V. Electrophysiological properties of cultured neurons of thr rat trigeminal ganglion *Neurophysiology* 2012;45(1):84-88.
174. Lawson, S.N. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Adelta- or Aalpha/beta-fibres. *Exp Physiol.* 2002;87(2):239-44.

175. M.V. Telka, V.Y.M., S.A. Fedulova, N.S. Veselovsky Noradrenaline action on electrical activity of cultured trigeminal ganglion neurons *Fiziol Zh.* 2019;65(6):22-29.
176. Eckert, R. and D.L. Tillotson. Calcium-mediated inactivation of the calcium conductance in caesium-loaded giant neurones of *Aplysia californica*. *J Physiol.* 1981;314:265-80.
177. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol.* 1952;116(4):497-506.
178. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 1952;117(4):500-44.
179. M.V. Telka, V.Y.M., N.S. Veselovsky, S.A. Fedulova. Adrenergic modulation of high voltage activated calcium channels in trigeminal ganglion neurons. *Fiziol Zh.* 2020;66(2-3):75-82.
180. Bian, X. and J.J. Galligan. Alpha2-adrenoceptors couple to inhibition of R-type calcium currents in myenteric neurons. *Neurogastroenterol Motil.* 2007;19(10):845-55.
181. Levi-Montalcini, R. and P.U. Angeletti. Nerve growth factor. *Physiol Rev.* 1968;48(3):534-69.
182. Angeletti, P.U., R. Levi-Montalcini, and P. Calissano. The nerve growth factor (NGF): chemical properties and metabolic effects. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1968;31:51-75.
183. Ritter, A.M., G.R. Lewin, N.E. Kremer, and L.M. Mendell. Requirement for nerve growth factor in the development of myelinated nociceptors in vivo. *Nature.* 1991;350(6318):500-2.
184. Ueda, M., M. Hirose, N. Takei, T. Ibuki, Y. Naruse, et al. Nerve growth factor induces systemic hyperalgesia after thoracic burn injury in the rat. *Neurosci Lett.* 2002;328(2):97-100.

185. Woolf, C.J., B. Safieh-Garabedian, Q.P. Ma, P. Crilly, and J. Winter. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience*. 1994;62(2):327-31.
186. Kitamura, N., A. Konno, T. Kuwahara, and Y. Komagiri. Nerve growth factor-induced hyperexcitability of rat sensory neuron in culture. *Biomed Res*. 2005;26(3):123-30.
187. Djouhri, L., D. Dawbarn, A. Robertson, R. Newton, and S.N. Lawson. Time course and nerve growth factor dependence of inflammation-induced alterations in electrophysiological membrane properties in nociceptive primary afferent neurons. *J Neurosci*. 2001;21(22):8722-33.
188. Shu, X. and L.M. Mendell. Acute sensitization by NGF of the response of small-diameter sensory neurons to capsaicin. *J Neurophysiol*. 2001;86(6):2931-8.
189. Zhu, W., S.M. Galoyan, J.C. Petruska, G.S. Oxford, and L.M. Mendell. A developmental switch in acute sensitization of small dorsal root ganglion (DRG) neurons to capsaicin or noxious heating by NGF. *J Neurophys*. 2004;92(5):3148-52.
190. M.V. Telka, O.V.R., N.S. Veselovsky. NGF-induced changes in adrenergic modulation of calcium channels of trigeminal ganglion neurons. *Fiziol Zh*. 2017;63(4):17-23.
191. Catacuzzeno, L., B. Fioretti, D. Pietrobon, and F. Franciolini. The differential expression of low-threshold K<sup>+</sup> currents generates distinct firing patterns in different subtypes of adult mouse trigeminal ganglion neurones. *J Physiol*. 2008;586(21):5101-18.
192. Djouhri, L., X. Fang, K. Okuse, J.N. Wood, C.M. Berry, et al. The TTX-resistant sodium channel Nav1.8 (SNS/PN3): expression and correlation with membrane properties in rat nociceptive primary afferent neurons. *J Physiol*. 2003;550(Pt 3):739-52.
193. Cho, H.J., V. Staikopoulos, J.J. Ivanusic, and E.A. Jennings. Hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide gated 4 (HCN4) protein is expressed in a subset of rat dorsal root and trigeminal ganglion neurons. *Cell Tissue Res*. 2009;338(2):171-7.

194. Robinson, R.B. and S.A. Siegelbaum. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:453-80.
195. Bunemann, M., M.M. Bucheler, M. Philipp, M.J. Lohse, and L. Hein. Activation and deactivation kinetics of  $\alpha$ 2A- and  $\alpha$ 2C-adrenergic receptor-activated G protein-activated inwardly rectifying  $K^+$  channel currents. *J Biol Chem.* 2001;276(50):47512-7.
196. Dascal, N. and U. Kahanovitch. The Roles of Gbetagamma and Galpha in Gating and Regulation of GIRK Channels. *Int Rev Neurobiol.* 2015;123:27-85.
197. Won, J., P.R. Lee, and S.B. Oh. Alpha 2 adrenoceptor agonist guanabenz directly inhibits hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-modulated (HCN) channels in mesencephalic trigeminal nucleus neurons. *Eur J Pharmacol.* 2019;854:320-327.
198. Faber, E.S. and P. Sah. Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist.* 2003;9(3):181-94.
199. Sah, P.  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci.* 1996;19(4):150-4.
200. Dolmetsch, R.E., U. Pajvani, K. Fife, J.M. Spotts, and M.E. Greenberg. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science.* 2001;294(5541):333-9.
201. Dunlap, K., J.I. Luebke, and T.J. Turner. Exocytotic  $Ca^{2+}$  channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.* 1995;18(2):89-98.
202. Martin-Moutot, N., N. Charvin, C. Leveque, K. Sato, T. Nishiki, et al. Interaction of SNARE complexes with P/Q-type calcium channels in rat cerebellar synaptosomes. *J Biol Chem.* 1996;271(12):6567-70.
203. Reid, C.A., D.B. Dixon, M. Takahashi, T.V. Bliss, and A. Fine. Optical quantal analysis indicates that long-term potentiation at single hippocampal mossy fiber synapses is expressed through increased release probability, recruitment of new release sites, and activation of silent synapses. *J Neurosci.* 2004;24(14):3618-26.

204. Galdzicki, Z., G. Puia, M. Sciancalepore, and O. Moran. Voltage-dependent calcium currents in trigeminal chick neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;167(3):1015-21.
205. Viana, F. and B. Hille. Modulation of high voltage-activated calcium channels by somatostatin in acutely isolated rat amygdaloid neurons. *J Neurosci.* 1996;16(19):6000-11.
206. Hille, B. G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron.* 1992;9(2):187-95.
207. Swartz, K.J. Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G protein-mediated inhibition. *Neuron.* 1993;11(2):305-20.
208. Beech, D.J., L. Bernheim, and B. Hille. Pertussis toxin and voltage dependence distinguish multiple pathways modulating calcium channels of rat sympathetic neurons. *Neuron.* 1992;8(1):97-106.
209. Beech, D.J., L. Bernheim, A. Mathie, and B. Hille. Intracellular Ca<sup>2+</sup> buffers disrupt muscarinic suppression of Ca<sup>2+</sup> current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(2):652-6.
210. Schiff, M.L., D.P. Siderovski, J.D. Jordan, G. Brothers, B. Snow, et al. Tyrosine-kinase-dependent recruitment of RGS12 to the N-type calcium channel. *Nature.* 2000;408(6813):723-7.
211. Diverse-Pierluissi, M. and K. Dunlap. Interaction of convergent pathways that inhibit N-type calcium currents in sensory neurons. *Neuroscience.* 1995;65(2):477-83.
212. Fang, X., L. Djouhri, S. McMullan, C. Berry, K. Okuse, et al. trkA is expressed in nociceptive neurons and influences electrophysiological properties via Nav1.8 expression in rapidly conducting nociceptors. *J Neurosci.* 2005;25(19):4868-78.
213. Abdulla, F.A. and P.A. Smith. Axotomy- and autotomy-induced changes in Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channel currents of rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 2001;85(2):644-58.



## ДОДАТОК 1

### СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Електрофізіологічні властивості нейронів трійчастого ганглія в первинній культурі. Нейрофізіологія / Neurophysiology. 2013; 1 (45): 92-6. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*
2. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Характеристика електричної активності нейронів ганглія трійчастого нерва в первинній культурі. Фізіологічний журнал 2016; 2 (62): 24-34. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*
3. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Зміни в адренергічній модуляції кальцієвих струмів нейронів ганглія трійчастого нерва, викликані фактором росту нервової тканини. Фізіологічний журнал. 2017; 4 (63):17-23 *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*
4. **Телька МВ**, Маслов ВЮ, Федулова СА, Веселовський МС. Вплив норадреналіну на електричну активність культивованих нейронів ганглія трійчастого нерва. Фізіологічний журнал. 2019; 6 (65): 22-9. *(Особистий внесок здобувача: проведення електрофізіологічних досліджень, статистична обробка даних, участь у обговоренні даних, підготовка результатів до друку).*

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

**Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

1. **Telka MV**, Veselovsky NS. Electrophysiological properties of cultured rat trigeminal ganglion neurons, II International Symposium “Molecular Mechanisms of Synaptic transmission regulation” in memory of Prof. Vladimir Skok, 6 – 9 October 2012, Kyiv, Ukraine.
2. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Модуючий вплив норадреналіна на електричну активність нейронів ганглія трійчастого нерва, VI Конгрес Українського товариства нейронаук, 4 – 8 червня 2014, Київ, Україна
3. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Веселовський МС. Вплив фактору росту нервової тканини на адренергічну модуляцію високопорогових кальцієвих струмів нейронів ганглія трійчастого нерва, VII Конгрес Українського Товариства Нейронаук, 7 – 11 червня 2017, Київ, Україна
4. **Telka MV**, Veselovsky NS. Influence of adrenergic stimulus on excitability of cultured trigeminal ganglion neurons, International neuroscience graduate summer workshop and practical training “Gazi-EgeBINGSS” in honor of Prof. Gonul O. Peker “Neuroinflammation: a sneaky FOE or a reliable FRIEND”, 25 – 29 June 2018, Ankara, Turkey
5. **Telka MV**, O.V. Ryhalsky OV, Veselovsky NS. NGF-induced augmentation of adrenergic modulation of calcium currents in cultured trigeminal ganglion neurons;

6. **Телька МВ**, Рихальський ОВ, Пурнинь ОЕ, Веселовський МС. Роль А2-адренорецепторів у потенціалкерованих кальцієвих струмів нейронів ганглія трійчастого нерва, XX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка, 27 – 30 травня 2019, Київ, Україна Фізіологічний журнал Т.65, №3 Додаток, С.27
7. **Телька МВ**, Маслов ВЮ, Веселовський МС, Федулова СА Моделювання адренергічного впливу на нейрони ганглія трійчастого нерва, VIII Національний конгрес патофізіологів України присвячений 120-річчю Одеської патофізіологічної школи, 13 – 15 травня 2020, Одеса Україна, Збірка тез, С. 202-203