

## **СПОНТАННА СИНАПТИЧНА АКТИВНІСТЬ У ПРОЕКЦІЙНИХ НЕЙРОНАХ ПЛАСТИНИ I ІЗОЛЬОВАНОГО ПОПЕРЕКОВОГО ВІДДІЛУ СПИННОГО МОЗКУ ЩУРА: ВПЛИВ ПЕРИФЕРИЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ**

Надійшла 12.06.17

Спіно-церебральні (проекційні) нейрони пластини I сірої речовини спинного мозку відіграють важливу роль у передачі больової інформації в головний мозок. Ми досліджували спонтанні збуджуючі постсинаптичні струми (сЗПСС) у спіно-понтінних нейронах пластини I, ретроградно мічених флуоресцентним барвником. Експерименти були проведені на ізольованих препаратах поперекового відділу спинного мозку щура. При цьому ми намагалися з'ясувати, чи впливає експериментально індуковане периферичне запалення на амплітудно-часові характеристики згаданих струмів. Виявилось, що в препаратах, отриманих від тварин із запаленням тканин задньої кінцівки, частота і (меншою мірою) амплітуда сЗПСС у проекційних нейронах пластини I перевищують відповідні значення, виміряні в нейронах контрольної групи. Вірогідною причиною цього є індукована запальним болем модифікація нейронних взаємодій у мережах пластини II, котрі утворюють основні синаптичні входи до нейронів пластини I. Підвищені частота та амплітуда сЗПСС у нейронах пластини I мають зумовлювати певне полегшення передачі ноцицептивної інформації в структури головного мозку. Така гіперзбудливість проекційних нейронів пластини I може забезпечувати помітний внесок у розвиток гіпералгезії при хронічних запальних больових станах і полегшувати генерацію емоції болю.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** спинний мозок, пластини I, проекційні нейрони, спонтанна синаптична активність, ноцицепція, периферичне запалення.

### **ВСТУП**

Нейрони спіно-церебральних шляхів (висхідні проекційні нейрони), локалізовані в пластині I сірої речовини спинного мозку, відіграють важливу роль у передачі больової інформації в головний мозок [1]. Такі нейрони складають близько 5 % загальної кількості нервових клітин у згаданій пластині. Їх аксони проектуються в структури мосту (парабрахіальні ядра) і таламус; відповідні шляхи кваліфікуються як антеролатеральний тракт [2]. Основна ж частина нейронів пластини I (95%) є пропріоспинальними одиницями (короткоаксонними або міжсегментарними інтернейронами) [2, 3].

<sup>1</sup> Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).  
Ел. пошта: diana\_95@i.ua (Д. П. Шевчук).

Переважна маса синаптичних входів до висхідних нейронів пластини I утворені аксонами нейронів пластини II, котрі є ключовими елементами в системі обробки больової інформації [4, 5]. Нейрони пластини II є основними реципієнтами синаптичних впливів, котрі надходять по тонких первинних аферентних волокнах груп Ad та C; ці волокна передають інформацію від механо-, термо- та хемонотицепторів. Певна частина даних волокон також утворюють моносинаптичні контакти з проекційними нейронами пластини I [4]. Отже, больові впливи активують проекційні нейрони пластини I як безпосередньо (моносинаптично), так і опосередковано – через нейронні системи пластини II. Більшість нейронів останньої пластини зв'язані між собою синаптично і утворюють досить складні нейронні мережі [6, 7]. Є підстави вважати, що навіть в

умовах відсутності активації нейронів пластини II ноцицептивними стимулами згадані нейрони зберігають певний рівень імпульсної активності (за рахунок нейромережових взаємодій) і продовжують синаптично збуджувати проєкційні нейрони пластини I. Таким чином, «спонтанна» фонові активація вказаних проєкційних нейронів останньої пластини (I) може бути істотним фактором, що впливає на формування імпульсних потоків у висхідних ноцицептивних спіно-церебральних шляхах.

Виявилося, що за наявності периферичного запалення (наприклад, тканин кінцівки) мережеві взаємодії нейронів пластини II дорсального рога істотно модифікуються, співвідношення збуджувачів і гальмівних синаптичних подій у цих нейронах змінюється, розвивається гіперзбудливість відповідних нейронних ланцюгів [8]. Виникає питання, яким чином така модифікація синаптичних взаємодій у пластині II, зумовлена наявністю ноцицептивного аферентного притоку від вогнища периферичного запалення, може вплинути на збуджувальну синаптичну активність у проєкційних нейронах пластини I. У зв'язку з цим ми провели дослідження спонтанних збуджувачів постсинаптичних струмів (сЗПСС) в ізольованих препаратах поперекового відділу спинного мозку щура, намагаючись з'ясувати, яким чином експериментально індуковане периферичне запалення впливає на амплітудно-часові характеристики вказаних струмів.

## МЕТОДИКА

*Ретроградне маркування проєкційних нейронів пластини I.* В експериментах були використані 18–20-денні щури лінії Вістар. Тварин анестезували сумішшю кетаміну та ксилазину (7.3 та 0.7 мг на 100 г маси відповідно). Голову щура фіксували в стереотаксичному апараті, у кістці черепа над цільовою ділянкою мікроін'єкцій просвердлювали отвір. Локалізацію зони ін'єкції (латеральної частини правого парабрахіального ядра мосту) встановлювали згідно з атласом [9], уводячи необхідні поправки на розмір молодих тварин. У зону ін'єкції за допомогою мікрошприца ("Hamilton", Велика Британія) вводили 200–300 нл 2%-вого розчину флуоресцентного барвника Флуороголд ("Thermo Scientific", США). Через три – п'ять днів нейрони пластини I, аксони котрих проєктувались у згадану область мосту, ставали ретроградно маркованими флуоресцентним барвником.

*Індуція периферичного запалення.* У чотирьох тварин викликали запалення тканин задньої кінцівки (периферичне запалення, далі група ПЗ). Для цього тваринам під шкіру підшви правої стопи ін'єкували 100 мкл суспензії повного ад'юванта Фрейнда (CFA; "Sigma", США; олійно-сольова емульсія 1:1). Шість інтактних щурів склали контрольну групу. Електрофізіологічні дослідження проводили через добу після ін'єкцій CFA. Розвиток запалення та ноцицептивної гіперчутливості підтверджувався результатами поведінкового тесту Харгрівса та тестування з використанням філаментів фон Фрея.

*Ізольований препарат поперекового відділу спинного мозку.* В умовах ефірного наркозу в щурів обох груп поперековий відділ хребта швидко ізольовали, пересікаючи спінальні корінці та спинний мозок на рівні L1, та занурювали в насичений карбогеном (95 % O<sub>2</sub> та 5 % CO<sub>2</sub>) розчин наступного складу (в мілімолях на 1 л): сахароза – 250, глюкоза – 11, NaHCO<sub>3</sub> – 26, MgCl<sub>2</sub> – 7, CaCl<sub>2</sub> – 0.5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.2, KCl – 2. Спинний мозок виділяли з хребтового каналу і звільняли від твердої мозкової оболонки. Отриманий препарат фіксували на пластині та переносили в камеру для електрофізіологічних досліджень. Камеру перфузували насиченим карбогеном розчином Кребса (склад у мілімолях на 1 л): NaCl – 125, KCl – 2.5, NaHCO<sub>3</sub> – 26, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.2, MgCl<sub>2</sub> – 1.0, CaCl<sub>2</sub> – 2.0, глюкоза – 10; pH 7.3, осмолярність 310 мОсм.

*Відведення синаптичних струмів від проєкційних нейронів пластини I.* Ретроградно марковані проєкційні нейрони цієї пластини візуалізували за допомогою флуоресцентної мікроскопії та інфрачервоного підсвічування світловипромінюючим діодом [10] (мікроскоп Olympus BX50WI, "Olympus", Японія; водноімерсійний об'єктив ×60). Спонтанні постсинаптичні струми відводили від таких клітин, використовуючи петч-клемп у конфігурації «ціла клітина»; застосовували підсилювач Multiclamp 700 і програмне забезпечення "pCLAMP 9.2" ("Molecular Devices", США). Піпетки виготовляли з боросилікатного скла ("WPI", США) і заповнювали розчином наступного складу (в мілімолях на 1 л): калію глюконат – 144, NaCl – 5.0, MgCl<sub>2</sub> – 0.5, Na-HEPES – 10, Mg<sub>2</sub>-ATP – 2.0, Na-НТР – 0.1, EGTA – 0.5 (pH 7.2, осмолярність 290 мОсм); опір піпеток складав 4–6 МОм. Потенціал на мембрані досліджуваних нейронів фіксували на рівні –60 мВ, що приблизно відповідало потенціалу спокою в та-

ких нейронах.

Отримані дані аналізували з використанням програмного забезпечення “Mini Analysis” (“Synaptosoft”, США) та “Origin” (“OriginLab Corp.”, США).

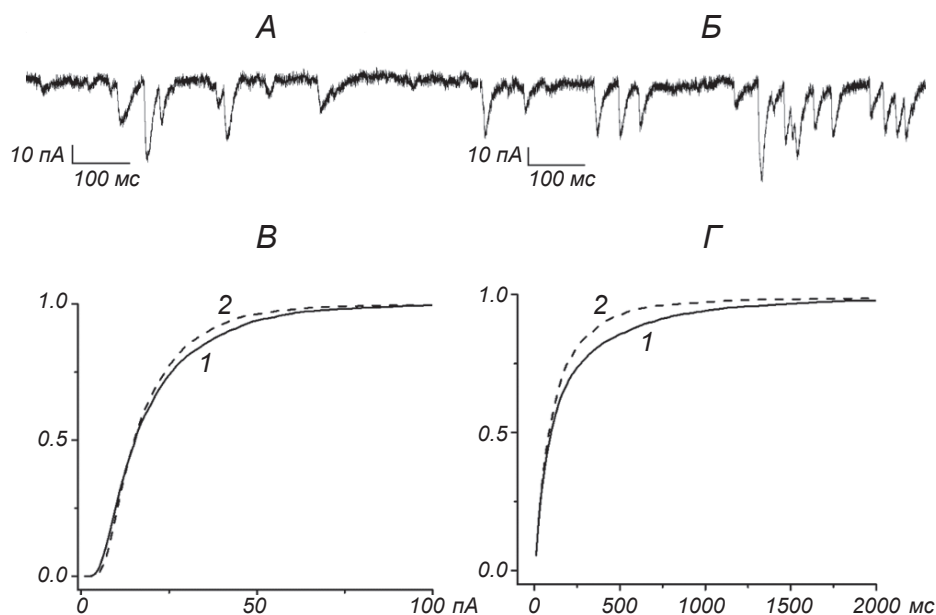
## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

сЗПСС були відведені від дев'яти ретроградно маркованих клітин пластини І в ізолюваних препаратах поперекового відділу спинного мозку тварин контрольної групи та дев'яти аналогічних нейронів, отриманих від щурів групи ПЗ. Загальна кількість зареєстрованих синаптичних подій, отриманих у виборках, складала 2547 та 2700 відповідно (див. рисунок, А і Б).

Амплітуди сЗПСС в обох виборках характеризувалися високою варіабельністю – від декількох до 75–100 пА (див. рисунок, В). Відповідні сумарні розподіли, що відносилися до двох груп, статистично вірогідно відрізнялись один від одного (згідно з тестом Колмогорова–Смирнова  $P < 0.001$ ). Різницю зумовлювала в основному більша частка струмів відносно високої амплітуди в клітинах препаратів групи ПЗ (В). Розподіли амплітуд сЗПСС в індивідуальних нейронах пластини

І звичайно включали в себе значну кількість низьких значень (до 25–30 пА); істотно менша кількість струмів характеризувалися значно вищими амплітудами. У зв'язку з тим, що такі розподіли в обох групах вірогідно відхилялися від нормального закону, були розраховані не середні, а медіанні значення амплітуд спонтанних струмів. У контрольній групі середнє значення медіан розподілу амплітуд складало  $15.40 \pm 1.94$ , а в групі ПЗ –  $16.55 \pm 1.93$  пА (в обох групах  $n = 9$ ). Отже, середні значення медіан амплітуд струмів у групі ПЗ дещо перевищували відповідну величину в контрольній групі, але різниця була невеликою і, згідно з  $t$ -тестом для незалежних виборок, статистично невірогідною ( $P > 0.05$ ).

Розподіли величин інтервалів між аналізованими синаптичними подіями в обох групах були певною мірою подібними до розподілу Пуассона та статистично вірогідно розрізнялися згідно з тестом Колмогорова–Смирнова ( $P < 0.001$ ; див. рисунок, Г). Середні значення медіан таких розподілів у контрольній групі та групі ПЗ дорівнювали  $141.18 \pm 40.70$  та  $95.85 \pm 17.23$  мс відповідно (в обох групах  $n = 9$ ). Таким чином, усереднена величина медіан розподілів інтервалів між сЗПСС у проекційних нейронах спінальної пластини І щурів групи ПЗ була майже в півтора разу меншою, ніж у контрольних тварин,



**Р и с. 1.** Характеристики спонтанних збуджуючих постсинаптичних струмів (сЗПСС) у проекційних нейронах пластини І ізолюваних препаратів поперекового відділу спинного мозку контрольних щурів та тварин з наявністю периферичного запалення. А, Б – приклади сЗПСС, відведених у нейронах тварин двох вказаних груп відповідно; В, Г – кумулятивні графіки ймовірності для розподілів амплітуд таких струмів (В) та інтервалів між сЗПСС (Г). 1 – контроль, 2 – група з наявністю запалення.

а середня частота спонтанних синаптичних подій – відповідно значно вищою. Ця переконлива різниця, проте, виявилася статистично невірогідною ( $P > 0.05$ ) при використанні критерію Ст'юдента. Очевидною причиною подібної ситуації є малий розмір проаналізованих виборок та велика дисперсія значень медіан в індивідуальних клітинах.

Отже, в разі розвитку периферичного запалення як усереднена частота, так і амплітуда ЗПСС у ретроградно маркованих проєкційних нейронах пластини I в ізольованих препаратах поперекового відділу спинного мозку щура перевищують відповідні величини, виміряні у контрольних тварин (хоча для амплітуд таке перевищення в проаналізованих виборках було незначним). Вірогідно, фонове збуджуюче «ноцицептивне» синаптичне бомбардування таких нейронів в умовах наявності запалення призводило до істотної модифікації збудливості нейронів пластини II (її підвищення). Нейрони цієї пластини є основними реципієнтами моносинаптичних входів від первинних аферентів груп Ad та C та, одночасно, основними джерелами даних входів до проєкційних одиниць пластини I. Таке підвищення в умовах ізольованого препарату ділянки спинного мозку зберігається та зумовлює істотне посилення фонові імпульсації нейронів II пластини та підвищення відповідної частоти сЗПСС у нейронах пластини I. Кінцевим ефектом таких зрушень буде полегшення передачі ноцицептивної інформації в структури мосту та таламуса. Така гіперзбудливість нейронних мереж поверхневих пластин дорсального рога взагалі та проєкційних нейронів пластини I зокрема може забезпечувати помітний внесок у розвиток гіпералгезії при хронічних запальних больових станах і полегшувати генерацію емоції болю.

Всі стадії дослідження відповідали положенням Європейської Конвенції про захист тварин, яких використовують в експериментах (86/609/ЄЕС, 1986, Страсбург), та нормативам Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Автори даної роботи – Д. П. Шевчук, К. С. Агашков, П. В. Білан та Н. В. Войтенко – підтверджують відсутність будь-яких конфліктів щодо комерційних або фінансових відносин, стосунків з організаціями або особами, котрі будь-яким чином могли бути пов'язані з дослідженням, а також взаємовідносин співавторів статті.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. W. D. Willis and R. E. Coggeshall, *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*, JohnWiley, NewYork (1991).
2. R. C. Spike, Z. Puskár, D. Andrewand, and A. J. Todd, "A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord," *Eur. J. Neurosci.*, **18**, No. 9, 2433–2448, doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02981.x (2004).
3. J. Braz, C. Solorzano, X. Wang, and A. I. Basbaum, "Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control," *Neuron*, **82**, No. 3, 522–536, doi:10.1016/j.neuron.2014.01.018 (2014).
4. T. J. Grudt and E. R. Perl, "Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn," *J. Physiol.*, **540**, No. 3, 189–207, doi: 10.1113/jphysiol.2001.012890 (2002).
5. A. J. Todd, "Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn," *Nat. Rev. Neurosci.*, **11**, No. 12, 823–836, doi: 10.1038/nrn2947 (2010).
6. Y. Lu and E. R. Perl, "Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II)," *J. Neurosci.*, **25**, No. 15, 3900–3907 (2005).
7. D. Guo and J. Hu, "Spinal presynaptic inhibition in pain control," *Neuroscience*, **283**, 95–106, doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.032 (2014).
8. O. Kopach, V. Viatchenko-Karpinski, P. Belan, and N. Voitenko, "Inflammatory-induced changes in synaptic drive and postsynaptic AMPARs in lamina II dorsal horn neurons are cell-type specific," *Pain*, **156**, No. 3, 428–438, doi: 10.1097/01.j.pain.0000460318.65734.00 (2015).
9. G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Acad. Press (2008).
10. B. V. Safronov, V. Pinto, and V. A. Derkach, "High-resolution single-cell imaging for functional studies in the whole brain and spinal cord and thick tissue blocks using light-emitting diode illumination," *J. Neurosci. Methods*, **164**, No. 2, 292–298, doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.05.010 (2007).