

VILNIAUS UNIVERSITETAS

ROBERTAS GUZULAITIS

Nugaros smegenų neuronų tinklo veikimo principai: somatosensorinės  
informacijos integracija ir aktyvumo išplitimas

Daktaro disertacija  
Biomedicinos mokslai, biofizika (02 B)

Vilnius, 2013 metai

Disertacija rengta 2009 – 2013 metais Vilniaus universitete

**Mokslinis vadovas:**

doc. dr. Aidas Alaburda (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai,  
biofizika – 02B).

**Konsultantas:**

prof. dr. Jorn Hounsgaard (Kopenhagos universitetas, biomedicinos mokslai,  
biofizika – 02B).

# TURINYS

<b>SANTRUMPOS</b>	<b>6</b>
<b>ĮVADAS</b>	<b>7</b>
<b>Darbo tikslas</b>	<b>8</b>
<b>Darbo uždaviniai</b>	<b>9</b>
<b>Darbo naujumas</b>	<b>9</b>
<b>Ginamieji teiginiai</b>	<b>9</b>
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Judėjimas ir jo organizavimas</b>	<b>10</b>
Judėjimo valdymo lygmenys	12
Ritmiškumo atsiradimas: vidiniai osciliatoriai ar neuronų tinklo organizavimo pasekmė?	14
Centrinio paterno generatoriaus modeliai	16
CPG lokalizacija	18
Modelinės sistemos CPG tyrimams	19
<b>1.2. STNS (<i>stomatogastric nervous system</i>)</b>	<b>24</b>
Anatomija	24
Ritmai generuojami CPG	25
Neuromoduliacija	27
Homeostazė ir individualūs skirtumai	30
<b>1.3. Vėžlio nugaros smegenų neuronų tinklas</b>	<b>34</b>
Vėžlio nugaros smegenų anatomija	35
Vėžlio motorinės programos	37
Vėžlio nugaros smegenų neuronų tinklo organizavimas	42
Motorinio aktyvumo ritmo variacijos – delecijos	45
Nugaros smegenų neuronų tinklų persidengimas	47
Laikinė somatosensorinių jėjimų integracija – nugaros smegenų atmintis	48
Ilgai trunkantis neuronų aktyvumas sukeltas trumpo stimulo	50
<b>1.4. Ca<sup>2+</sup> kanalai, L-tipo Ca<sup>2+</sup> srovės, plato potencialai</b>	<b>52</b>
Įtampos valdomi Ca <sup>2+</sup> kanalai (Ca <sub>v</sub> ) ir jų generuojamos srovės	52
Plato potencialai generuojami L-tipo kalcio jonų srovių	53
Atsako „įsiūbavimas“ ir skausmo sensitizacija	56
<b>1.5. Somatosensorinis tylos periodas – CSP</b>	<b>58</b>
<b>2. METODIKA</b>	<b>62</b>
<b>2.1. Etikos leidimas</b>	<b>62</b>

<b>2.2.</b>	<b>Preparato paruošimas</b>	<b>62</b>
<b>2.3.</b>	<b>Stimuliuavimas</b>	<b>65</b>
<b>2.4.</b>	<b>Registracija</b>	<b>66</b>
<b>2.5.</b>	<b>Neuronų vaizdinimo protokolas</b>	<b>67</b>
<b>2.6.</b>	<b>Duomenų analizė</b>	<b>68</b>
	CSP laikiniai parametrai	68
	CSP intensyvumo parametrai	69
	Membranos laidumas	69
	Vidutinis membranos potencialas ( $V_m$ )	70
	Sužadynamumas	70
	VP slenkstis ( $V_{th}$ )	70
	$V_m$ sinapsinių fluktuacijų įvertinimas	70
	Kasymosi reflekso įvertinimas	71
	Neuronų aktyvumo fazės analizė	71
	Statistinė analizė	71
<b>3.</b>	<b>REZULTATAI</b>	<b>73</b>
<b>3.1.</b>	<b>Kasymosi refleksai sukelti mechaniniu ir elektriniu stimuliavimais</b>	<b>73</b>
<b>3.2.</b>	<b>Gradualus kasymosi reflekso sukėlimas</b>	<b>74</b>
<b>3.3.</b>	<b>Somatosensorinis tylos periodas</b>	<b>77</b>
	Mechanizmas sukeliantis somatosensorinį tylos periodą	78
<b>3.4.</b>	<b>Laikinė somatosensorinių jėjimų integracija</b>	<b>81</b>
	Motoneuronų $V_m$ ir sužadynamumas prieš kasymosi reflekso įsijungimą	81
	Priešmotorinio tinklo aktyvumas prieš kasymosi reflekso įsijungimą	83
	Priešmotorinio tinklo aktyvumo didėjimas po pakartotinių ikislenkstinių stimulų	85
	L-tipo $Ca^{2+}$ įtaka leikinei somatosensorinių jėjimų integracijai	86
<b>3.5.</b>	<b>Krūtininiai nugaros smegenų segmentai ir jų vaidmuo kasymosi reflekso generavime</b>	<b>88</b>
	Krūtininiai nugaros smegenų segmentai aktyviai dalyvauja kasymosi reflekso generavime	88
	D4 segmento neuronų aktyvacija vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso metu	90
	Ritmiškų D4 segmento neuronų fazės analizė	91
	D4 segmento neuronų aktyvavimo intensyvumas	93
	D4 segmento neuronų projekcijos	94
<b>4.</b>	<b>REZULTATŲ APTARIMAS IR DISKUSIJA</b>	<b>96</b>
<b>4.1.</b>	<b>Kasymosi refleksas sukeltas mechaniniu ir elektriniu stimuliavimais</b>	<b>96</b>
<b>4.2.</b>	<b>CSP ir jo mechanizmai</b>	<b>96</b>
<b>4.3.</b>	<b>Gradualus kasymosi refleksas – laikinė somatosensorinių jėjimų integracija</b>	<b>98</b>
	Motorinių neuronų vidinės savybės laikinės integracijos metu	99

Priešmotorinio tinklo aktyvumas laikinės somatosensorinių jėjimų integracijos metu	99
<b>4.4. Krūtininių segmentų įtaka vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso generavimui</b>	<b>102</b>
D4 segmento neuronų aktyvavimas vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso metu	102
D4 segmento neuronų aksonų projekcijos	103
Galimos krūtininių nugaros smegenų segmentų funkcijos	103
<b>IŠVADOS</b>	<b>105</b>
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS</b>	<b>106</b>
<b>REZULTATŲ PRISTATYMAS</b>	<b>122</b>
<b>PADĖKA</b>	<b>125</b>

## Santrumpos

APV	– 2-amino-5-phosphonopentanoic rūgštis;
CNS	– centrinė nervų sistema;
CPG	– centrinis paterno generatorius;
CSP	– somatosensorinis tylos periodas;
DLF	– dorsolateralinis traktas;
ENG	– elektroneurograma;
HE	– šlaunie ekstensorius;
HF	– šlaunies fleksorius;
IN	– tarpinis neuronas;
MLR	– mesoencefalinis lokomocijos regionas ;
MN	– motorinis neuronas;
NMDA	– N-metyl D-aspartatas;
PF	– paterno formavimo tinklas;
RG	– ritmo generavimo tinklas;
SN	– sensorinis neuronas;
STG	– somatogastrinis ganglijas;
STNS	– vėžiagyvių nervinė sistema valdanti virškinimą;
UBG	– ritmo generatoriaus modulis;
$V_m$	– membranos potencialas;
VP	– veikimo potencialas;
VPP	– „kišenės“ pilvinis-užpakalinis somatosensorinis nervas;
$V_{th}$	– veikimo potencialo slenkstis;
WDR	– plataus dinaminio diapazono.

## **Įvadas**

Jau daugiau kaip prieš šimtmetį tyrėjai pastebėjo, kad izoliuotas nugaros smegenų neuronų tinklas geba generuoti koordinuotus judesius (Sherrington 1906, Sherrington 1910, Brown 1911, Brown 1914). Šiai dienai neabejojama, kad elementarūs judesiai kaip lokomocija ir refleksai yra organizuoti nugaros smegenų neuronų tinklo. Dažnai po nugaros smegenų traumos žmogus praranda gebėjimą judėti. Tai skaudžiai atsiliepia nukentėjusiam, bei brangiai kainuoja visuomenei. Manoma, kad nugaros smegenų neuronų tinklo tyrimai gali padėti ne tik suprasti jo funkcionavimo principus, bet ir atverti kelią naujoms gydymo/reabilitacijos strategijoms.

Nugaros smegenų neuronų tinklas ne tik generuoja ir koordinuoja judesius, bet ir apdorodamas sensorinę informaciją priima sprendimus. Sprendimo priėmimas – tai gebėjimas atskirti reikšmingą stimulą nuo „triukšmo“. Vienas iš svarbiausių stimulo parametrų, pagal kurią gali būti priimamas sprendimas – tai stimulo intensyvumas. Jeigu stimulus pakankamai intensyvus – neuronų tinklas vykdo atitinkamą motorinę programą. Stimulo intensyvumui mažėjant sprendimo priėmimas gali būti atliekamas atsižvelgiant į kitus stimulo parametrus. Tokiu atveju svarbų vaidmenį gali vaidinti stimulo pasikartojamumas – jeigu silpnas stimulus pasikartoja tam tikru dažniu, tai parodo jo reikšmingumą ir į jį verta reaguoti.

Yra žinomas klasikinis laikinės sumacijos pavyzdys, kuris vyksta neuronuose dėl jų membranos laiko konstantos (Kandel, Schwartz et al. 2000). Neuronas geba integruoti posinapsinius potencialus įvykusius milisekundžių eilės laiko intervale. Pastebėta, kad nugaros smegenų neuronų tinklas geba integruoti somatosensorinius jėjimus įvykusius rečiau nei 1 sekundė (Sherrington 1906, Crowe and Linnartz 1985, Currie and Stein 1988). Tai keliomis eilėmis lėtesnis procesas, nei posinapsinių įvykių laikinė integracija vykstanti neurono lygmenyje. Nors sekundžių eilės laikinė integracija neuronų tinklo lygmenyje pastebėta daugiau nei prieš šimtmetį, jos mechanizmai nėra aiškūs iki šiol. Taip pat nežinoma kurioje neuronų tinklo dalyje laikinė integracija vyksta – motoriniuose ar tarpiniuose neuronuose.

Kaip jau minėta, nugaros smegenų neuronų tinklas geba generuoti lokomociją ir refleksus. Dėl didelio neuronų kiekio, nugaros smegenų neuronų tinklo organizacija nėra visiškai aiški stuburiniuose gyvūnuose. Tiriant žuvis (nėgė, ryklys) buvo prieita išvados, kad neuronų tinklas generuojantis judesius yra plačiai išplitęs visose nugaros smegenyse (Grillner 1974, Cohen and Wallen 1980). Tačiau kalbant apie gyvūnus su galūnėmis, priimta, kad svarbiausi neuronų tinklo elementai valdantys užpakalinių ir priekinių galūnių judėjimą yra išsidėstę atitinkamai strėnų srities ir kakliniame išplatėjimuose (Mortin and Stein 1989, Cazalets, Borde et al. 1995, Ballion, Morin et al. 2001). Šiuos nugaros smegenų išplatėjimus jungia krūtininiai nugaros smegenų segmentai, kurių funkcija lokomocijoje nėra aiški. Pastarųjų metų tyrimai parodė, kad krūtininiuose segmentuose vykstantis sinapsinis perdavimas prisideda prie priekinių ir užpakalinių galūnių koordinacijos, bei komandinės informacijos iš aukštesnių smegenų centrų perdavimo (Cowley, Zaporozhets et al. 2008, Cowley, Zaporozhets et al. 2010). Reabilitacija po nugaros smegenų krūtininių segmentų pažeidimų sukelia neuronų tinklo šiuose segmentuose rekonstrukciją. Toks neuronų tinklo plastiškumas atstato valingus užpakalinių galūnių judesius (van den Brand, Heutschi et al. 2012). Šie tyrimai leidžia manyti, kad ne tik strėnų srities, bet ir krūtininiai nugaros smegenų segmentai yra svarbūs užpakalinių galūnių valdymui.

Šiame darbe pristatomi tyrimai, kurių metu bandoma geriau suprasti šiuos du nugaros smegenų neuronų tinklo organizavimo aspektus: sekundžių eilės somatosensorinių įėjimų laikinės integracijos mechanizmus ir neuronų tinklo erdvinį išplitimą.

### **Darbo tikslas**

Nustatyti nugaros smegenų neuronų tinklo aktyvumo erdvinį išplitimą ir laikinės integracijos galimus mechanizmus.



### **Darbo uždaviniai**

- Ištirti, ar motorinių neuronų sužadynamumo kitimas prisideda prie somatosensorinių jėjimų laikinės integracijos;
- Nustatyti priešmotorinių neuronų aktyvumo pokyčius laikinės integracijos metu;
- Įvertinti neuronų tinklo aktyvumo erdvinį išplitimą vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso metu.

### **Darbo naujumas**

Tiriant somatosensorinių jėjimų laikinės integracijos nugaros smegenyse mechanizmus pirmą kartą parodyta, kad ji susijusi ne su motorinių neuronų sužadynamumo pakitimu, bet su priešmotorinių neuronų aktyvumo padidėjimu.

Pirmą kartą tiesiogiai parodytas motorinių neuronų slopinimas somatosensorinio tylos periodo metu.

Tiriant neuronų tinklo, kuris valdo užpakalines galūnes, aktyvumo erdvinį išplitimą pirmą kartą parodyta, kad krūtininiai nugaros smegenų segmentai gauna informaciją iš strėnų srities išplatėjimo. Neuronai, aktyvuoti strėnų srities tinklo, savo aksonus siunčia atgal, link strėnų srities išplatėjimo. Apibendrinant, parodoma, kad neuronų tinklas valdantis užpakalines galūnes erdviškai išplitęs labiau, nei manyta iki šiol.

### **Ginamieji teiginiai**

- Somatosensorinio tylos periodo metu motoriniai neuronai yra slopinami;
- Somatosensorinių jėjimų laikinė integracija vyksta ne dėl motorinių neuronų sužadynamumo kitimo;
- Priešmotorinių neuronų aktyvumas padidėja somatosensorinių jėjimų laikinės integracijos metu;
- Krūtininiai nugaros smegenų segmentai dalyvauja vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso generavime.

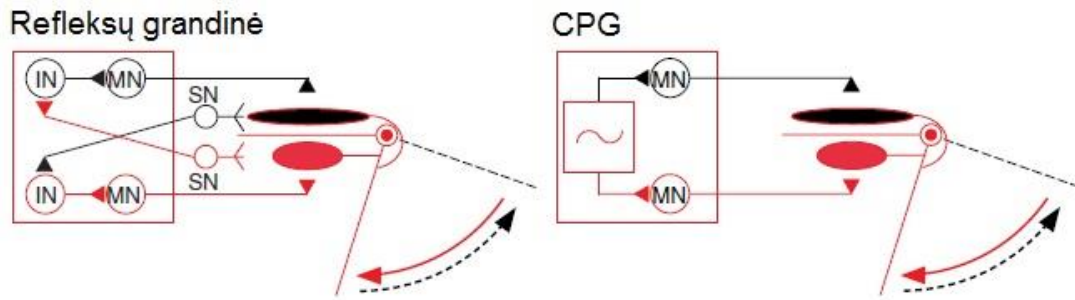
## **1. Literatūros apžvalga**

### **1.1. Judėjimas ir jo organizavimas**

Judėjimas – tai viena iš gyvo organizmo savybių. Jis yra gyvybiškai svarbus – atliekamas tiek norint susirasti maisto ar partnerį dauginimuisi, tiek išvengti pavojų, pabėgti nuo plėšrūnų. Daugelis judėjimo formų (ėjimas, skridimas, plaukimas, šliaužimas ir t.t.) susideda iš ritmiškų besikartojančių elementų (žingsnis, mostas ir t.t.) ir yra vadinami lokomocija. Be lokomocijos prie ritmiškų judesių priskiriamas kasymas, kvėpavimas, virškinimas, ejakuliacija ir panašiai (Marder and Bucher 2001, Guertin and Steuer 2009).

Daugiau nei prieš šimtą metų tyrėjai pastebėjo, kad ritmiškas judėjimas gali būti sukeltas ir spinalizuotuose gyvūnuose (Sherrington 1906, Brown 1911), kuomet nugaros smegenų neuronų tinklas atskiamas nuo galvos smegenų. Spinalizacija parodo, kad ritmiški judesiai generuojami ir koordinuojami nugaros smegenų neuronų tinklų ir jiems nebūtina aukštesnių smegenų struktūrų kontrolė.

Ritmiškas motorinis aktyvumas nugaros smegenų neuronų tinkle teoriškai gali būti organizuotas dviem būdais (Paveikslas 1.1.1). Pirmuoju atveju ritmiški judesiai organizuojami paprasčiausiu refleksų grandinės principu (Paveikslo 1.1.1 kairė pusė). Aktyvavus vieną motorinių neuronų (MN) grupę yra sutraukiami tų MN inervuojami raumenys. Susitraukus raumenims yra aktyvuojami sensoriniai neuronai (SN). Aktyvavus SN, jie savo ruožtu aktyvuoja tarpinius neuronus (IN) neuronų tinkle. IN slopina priešingą (antagonistinę) MN grupę. Tokiu būdu užtikrinama, kad duotuoju laiko momentu aktyvi būna tik viena iš antagonistinių MN grupių. Dėl atitinkamų priežasčių sumažėjus MN grupės aktyvumui, aktyvuojasi antagonistinė MN grupė. Tai sąlygoja, kad antagonistinės MN grupės yra aktyvios alternuojančiai – ritmiškas motorinis aktyvumas. Ritmiškumas pasiekiamas antagonistinių grupių tarpusavio slopinimu ir aferentinio grįžtamojo ryšio pagalba.



Paveikslas 1.1.1 Ritmiškas aktyvumas gali būti organizuojamas kaip refleksų grandinė (kairė), arba vidinis centrinis paterno generatorius (dešinė). MN – motorinis neuronas, IN – tarpinis neuronas, SN – sensorinis neuronas. Adaptuota iš (Marder and Bucher 2001).

Kitas būdas motoriniam ritmiškumui pasiekti – vidinio neuronų tinklo, gebančio generuoti ritmiškumą, buvimas. Toks neuronų tinklas turi gebėti generuoti ritmiškumą be aferentinio grįžtamojo ryšio. Toks neuronų tinklas buvo pavadintas centriniu paterno generatoriumi (*central pattern generator*) arba CPG. CPG aktyvuoja antagonistinius MN, kurie savo ruožtu aktyvuoja raumenų grupes, alternuojančiai be sensorinių grįžtamųjų ryšių pagalbos (Paveikslo 1.1.1 dešinė pusė).

Paprasčiausias būdas paneigti pirmąją (refleksų lanko) hipotezę – pašalinti grįžtamąjį aferentinį ryšį. Eksperimentiškai tai buvo patvirtinta: ritmiški judesiai išlieka katės preparate (Brown 1911), o skėrys sugeba generuoti skridimą (Wilson 1961) po aferentinio grįžtamojo ryšio iš raumenų pašalinimo. Šie ankstyvųjų tyrimų rezultatai parodo, kad ritmiškas antagonistinių raumenų valdymas užprogramuotas nugaros smegenų neuronų tinklų CPG. Dabar jau neabejojama CPG egzistavimu – ritmiškas motorinis aktyvumas sukiamas daugelyje *in vitro* izoliuotų centrinės nervų sistemos (CNS) struktūrų.

Nors ir parodyta, kad nugaros smegenų neuronų tinklai gali savaime generuoti ritmišką MN aktyvumą, sensorinių jėgimų vaidmuo lokomocijoje taip pat didelis. Pavyzdžiui, sensoriniai jėgimai gali būti labai svarbūs judėjimo inicijavimo metu – pradedant judesį svarbu žinoti kokioje padėtyje yra galūnė, o šiam tikslui gali būti naudojama informacija iš proprioreptorių (Grillner 2003). Sensoriniai jėgimai lokomocijoje ir refleksuose – tai labai plati tema.

Šiame darbe bus apžvelgiama tik CNS neuronų tinklų vaidmuo ritmiškų judesių organizavime.

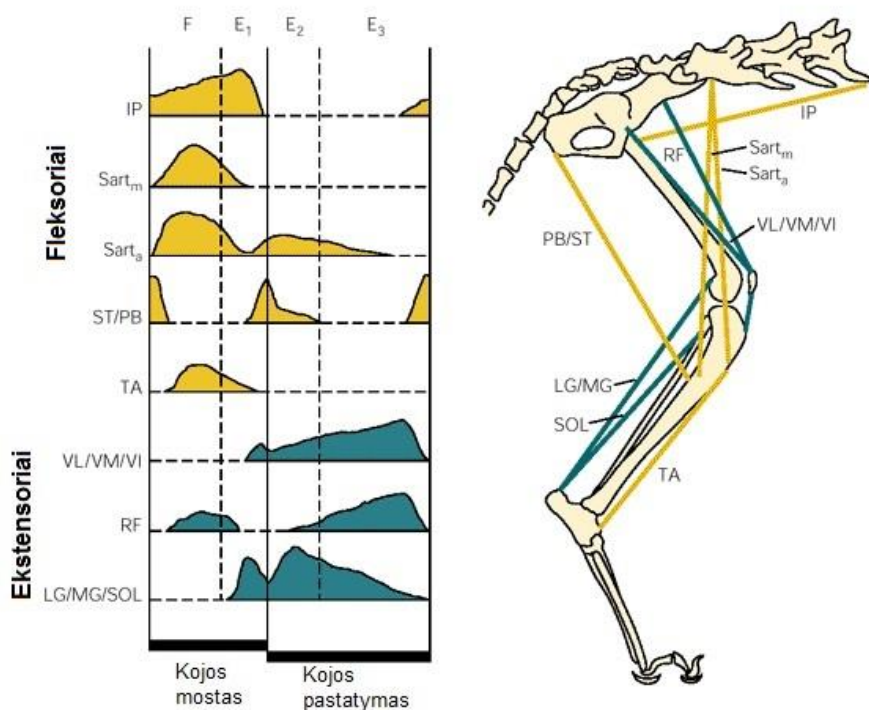
### **Judėjimo valdymo lygmenys**

Judėjime galima išskirti kelis valdymo/koordinavimo lygmenis (Stein 1997).

Pirmas lygmuo – tai koordinacija MN grupės viduje. Atliekant judesius raumenys sutraukiami ne bet kaip, o aktyvuojant juos sudarančias raumenines skaidulas tam tikra tvarka. Tai galima stebėti iš registruojamos elektroneurogramos (ENG) aktyvumo. Pavyzdžiui MN su mažos ir didelės amplitudės veikimo potencialais (VP) aktyvuojami ne vienu metu, o tam tikra tvarka, kas suteikia ENG aktyvumui specifiską pliūpsnio formą (Stein 2010).

Antras lygmuo – tai koordinacija tarp priešingų (antagonistinių) MN grupių, kurios įnervuoja sąnarį sulenkiančias (fleksoriai) ir sąnarį ištiesiančias (ekstensoriai) raumenų grupes. Daugumoje ritmiškų judesių aktyvumas tarp fleksorių ir ekstensorių alternuoja – jie yra aktyvus ne tuo pačiu metu. Antagonistinių raumenų grupių alternavimas – tai fundamentali ritmiškų judesių savybė.

Trečias valdymo lygmuo – raumenų aktyvumo koordinacija tarp skirtingų laisvės laipsnių (sąnarių) toje pačioje galūnėje. Pavyzdžiui kelio fleksoriaus aktyvavimas šlaunies fleksoriaus atžvilgiu. Šį valdymo lygmenį galima iliustruoti 1.1.2 paveikslu, kuriame pavaizduotas skirtingų užpakalinės galūnės raumenų aktyvavimas katės žingsnio metu.



Paveikslas 1.1.2 Katės užpakalinės galūnės raumenų aktyvavimas ėjimo metu. Santrumpos (TA, SOL, IP ir t.t.) žymi užpakalinę galūnę valdančius raumenis. Adaptuota iš (Kandel, Schwartz et al. 2000).

Daugeliui lokomocijos tipų (pavyzdžiui ėjimas ar vidurinės kūno dalies kasymosi refleksas) būdinga tradicinė motorinių grupių sinergija – vieno sąnario ekstensoriai aktyvūs su gretimo sąnario ekstensoriais (Mortin, Keifer et al. 1985, Stein 1997). 1.1.2 paveiksle taip pat matome, kad skirtingus sąnarius valdantys ekstensoriai yra aktyvūs kojos mosto metu, o fleksoriai – kojos pastatymo metu. Tačiau yra lokomocijos tipų (pavyzdžiui pėdos purtymas (Smith, Hoy et al. 1985), priekinės kūno dalies kasymosi refleksas (Mortin, Keifer et al. 1985)) kurioms būdinga mišri sinergija – vieno sąnario ekstensoriai aktyvūs su gretimo sąnario fleksoriais. Mišrios sinergijos pavyzdys gali būti ir kamuolio spyrimas, kai tuo pačiu metu šlaunies sąnarys yra lenkiamas, o kelio – tiesiamas.

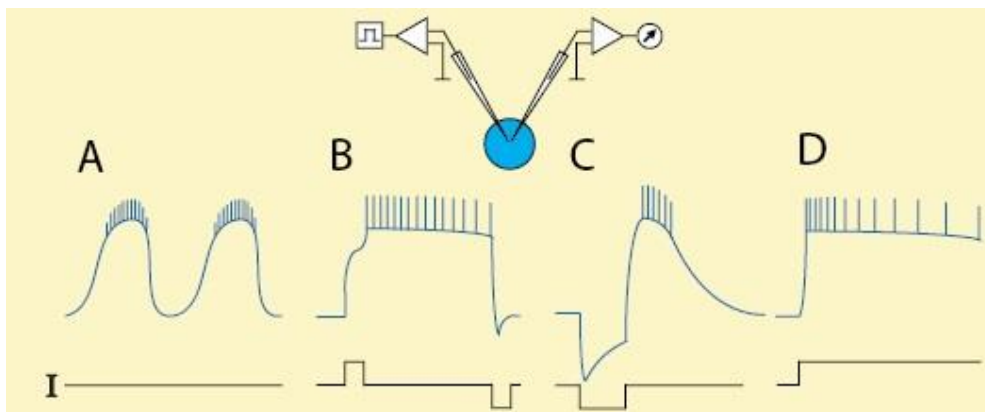
Paskutinis valdymo lygmuo – tai motorinių grupių skirtingose galūnėse koordinacija. Yra lokomocijos tipų, pavyzdžiui ėjimas ar priekinės kūno dalies kasymosi refleksas (Forssberg, Grillner et al. 1980, Stein, Victor et al. 1995), kurių metu tos pačios MN grupės (šlaunies fleksoriai) priešingų pusių galūnėse

alternuoja – nefazinė galūnių koordinacija. Priešingų pusių galūnės aktyvuojamos (judinamos) ne tuo pačiu metu, o priešingai, alternuojančiai. Tačiau yra ir lokomocijos tipų, kaip šuoliavimas ar užpakalinės kūno dalies kasymosi reflekso epizodai (Forssberg, Grillner et al. 1980, Field and Stein 1997), kuriems būdingas fazinė galūnių koordinacija – tos pačios MN grupės skirtingų pusių galūnėse aktyvios tuo pačiu metu. To pasekoje priešingų pusių galūnės aktyvuojamos (judinamos) vienu metu. Puikus priešingų galūnių koordinavimo pavyzdys yra keturkojų judėjimo galimybės: daugelis keturkojų gali eiti (ir/arba bėgti ristele), kai priešingos galūnės aktyvuojamos nefaziškai, bet gali ir šuoliuoti, kai priešingos galūnės aktyvuojamos faziškai.

### Ritmiškumo atsiradimas: vidiniai osciliatoriai ar neuronų tinklo organizavimo pasekmė?

Yra plačiai paplitusi nuomonė, kad ritmiškas nervų sistemos aktyvumas yra organizuojamas mažų neuronų grupių, kurios pasižymi netiesiniu VP sekų generavimu (Marder and Bucher 2001). Keli netiesiniai VP sekų generavimo pavyzdžiai pateikti 1.1.3 paveiksle:

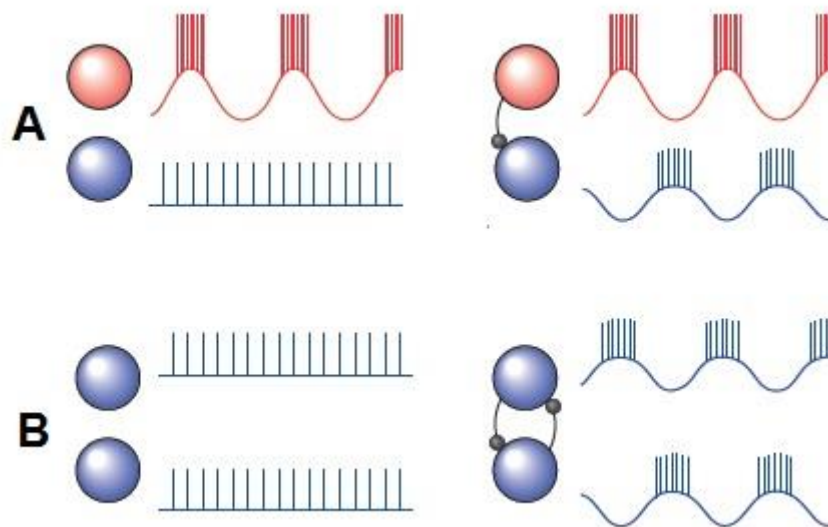
- Pliūpsninis VP generavimas (vidiniai osciliatoriai) (Paveikslas 1.1.3 A);
- Plato potencialai (Paveikslas 1.1.3 B);
- Padidėjęs sužadynamumas po slopinimo (Paveikslas 1.1.3 C);
- VP dažnio adaptacija (Paveikslas 1.1.3 D).



Paveikslas 1.1.3 Įtampos valdomų jonų kanalų srovių generuojami netiesiniai neuronų atsakai. Vidiniai osciliatoriai (A), plato potencialai (B), padidėjęs

sužadynamumas po slopinimo (C) ir VP dažnio adaptacija (D). Adaptuota iš (Marder and Bucher 2001).

Toks netiesiškas VP generavimas sukliamas dėl jonų srovių neuronuose, kurios generuojamos įtampos valdomų jonų kanalų, bei šių srovių tarpusavio sąveikos. Jonų srovių kombinacijos neuroną gali paversti vidiniu osciliatoriumi – tai neuronas, gebantis generuoti ritmiškumą be išorinio stimuliavimo. Viena iš galimybių organizuoti tinklo ritmišką aktyvumą, tai ritmiškumo valdymą patikėti vidiniams osciliatoriams, kurie aktyvuoja/valdo kitus neuronus (Paveikslas 1.1.4 A). Toks tinklo ritmiškumo organizavimas būdingas žinduolių kvėpavimą, bei vėžiagyvių virškinamąjį traktą valdantiems neuronų tinklams (Squire 2009). Bendra šių neuronų tinklų savybė ta, kad jie yra aktyvūs pastoviai. Galbūt tokiam neuronų tinklo aktyvumui pasiekti puikiai tinka ši neuronų tinklo organizavimo savybė.



Paveikslas 1.1.4 Ritmo generavimas organizuojamas vidinių osciliatorių (A) arba neuronų specifinio susijungimo (B). Adaptuota iš (Squire 2009).

Sekantis būdas pasiekti ritmišką neuronų tinklo aktyvumą – per tarpusavio ryšius neuronų tinkle (Paveikslas 1.1.4 B). Šiuo atveju visas vaidmuo tenka sinapsėms. Vienas populiariausių pavyzdžių – tai tarpusavio slopinimas. Viena neuronų grupė (fleksorius) toliau vadinamas moduli aktyvuoja MN (fleksorius) ir tuo pačiu metu slopina antagonistinį modulį (ekstensoriaus), tuo

apsaugodamas antagonistinius MN (ekstensorius) nuo aktyvavimo. Pirmajam moduliui nusilpus (nuovargis, adaptacija ar pan.) aktyvuojasi antrasis ir tokiu būdu pasiekiamas alternuojantis aktyvumas tarp antagonistinių modulių (fleksorių ir ekstensorių). Nors manoma, kad ritmiškam aktyvumui pasiekti labai svarbų vaidmenį atlieka antagonistinių modulių tarpusavio slopinimas (Deliagina and Orlovsky 1980, Grillner 2003, Geertsen, Stecina et al. 2011), tačiau yra įrodymų, kad ritmiškumas gali būti pasiektas ir be jo (Whelan, Bonnot et al. 2000). Tarpusavio slopinimas nėra paneigiamas, bet ritmiškumas galimas ir be jo. Gali būti, kad tarpusavio slopinimas ne užtikrina modulių alternavimą, o vaidina „saugiklio“ vaidmenį – vienam moduliui esant aktyviam antagonistinis yra slopinamas papildomai, kad būtų apsaugota nuo jo aktyvavimosi.

### **Centrinio paterno generatoriaus modeliai**

Kaip jau minėta, neuronų tinklas gebantis generuoti ritmišką aktyvumą be sensorinio grįžtamojo ryšio dar vadinamas centriniu paterno generatoriumi arba CPG. CPG organizavimo aiškinime išryškėja du modeliai – puscentrių (*half-center*) ir ritmo generatoriaus modulių (*unit burst generator* arba UBG) modeliai (Stein 1997), bei jų modifikacijos (McCrea and Rybak 2008).

Puscentrių modelį pirmasis pasiūlė Brown'as (Brown 1914). Šiam modeliui būdingi tokie aspektai (McCrea and Rybak 2008):

- Kiekviena galūnė kontroliuojama atskiro CPG;
- Kiekvienas CPG turi du modulius – puscentrius (fleksoriaus ir ekstensoriaus), kurie tiesiogiai aktyvuoja MN;
- Puscentriai vienas kitą slopina – tarpusavio slopinimo principas. Tarpusavio slopinimu yra užtikrinama, kad tam tikru laiko momentu aktyvus būna tik vienas puscentris;
- Nežinomas „nuovargio“ mechanizmas mažina aktyvaus puscentrio aktyvumą;



- Puscentrių aktyvumo persijungimas įvyksta, kai aktyvaus puscentrio sužadynamumas dėl „nuovargio“ sumažėja iki tam tikros kritinės vertės, o antagonistinis puscentris išsilaisvina nuo slopinimo ir tampa aktyvus.

Puscentriai savaime nėra ritmogeniški. Vienam iš puscentrių esant neaktyviam, kitas nepasižymės ritmiškumu, o bus tiesiog aktyvus toniškai. Šiame modelyje ritmiškumas pasiekiamas absoliučiai tarpusavio sinapsinio slopinimo dėka. Kita šio modelio savybė, kad visi fleksoriai (skirtingų laisvės laipsnių – sąnarių) yra sujungti į vieną puscentrį ir būna aktyvūs vienu metu. Kitaip sakant, šis modelis teigia, kad kelio fleksorius visada bus aktyvus su šlaunies ir pėdos fleksoriumi – pasižymės tradicine sinergija. Taigi puscentrių modelis gali paaiškinti ėjimą (tradicinė sinergija), bet ne pėdos purtymą (mišri sinergija).

Kitas modelis buvo pasiūlytas Grillner'io – UBG modelis (Grillner and Wallen 1985). Šis modelis ne prieštaraujantis puscentrių modeliui, o yra labiau jo išplėtimas. Pagrindinis skirtumas nuo puscentrių modelio yra tai, kad UBG modelis susideda ne iš dviejų, bet daugiau sudedamųjų dalių – modulių. UBG modelyje yra bent du moduliai kiekvienam laisvės laipsniui. Šis modelis jau gali paaiškinti mišrios sinergijos fenomeną (pėdos purtymą, priekinės kūno dalies kasymosi refleksą), nes fleksoriai ir ekstensoriai kiekvienam laisvės laipsniui yra nepriklausomi. Be to šiame modelyje UBG moduliai yra patys ritmiškai aktyvūs.

Abiejuose aptartuose modeliuose juos sudarantys moduliai yra vienpusiai – priešingos pusės (kairės ir dešinės) sudarytos iš atskirų CPG ir juos sudarančių modulių. Tačiau yra tyrimų rodančių, kad priešingų pusių galūnes valdantys moduliai yra tarpiai susiję. Pavyzdžiui normaliam vienos pusės kasymosi refleksui generuoti reikalingas ir neuronų tinklas esantis priešingoje nugaros smegenų pusėje (Stein, Victor et al. 1995). Stein'as siūlo, kad priešingų pusių galūnes valdantis neuronų tinklas turi bendrą šerdį – neuronų grupę, kuri valdo tiek kairės, tiek dešinės galūnės aktyvumą (Stein 1997).

Sekantis svarbus CPG aspektas buvo pasiūlytas McCrea ir kolegų (McCrea and Rybak 2008). Jis teigia, kad CPG sudarytas iš dviejų sluoksnių: ritmo

generavimo (RG) ir paterno formavimo (PF) tinklų. RG tinklas valdo PF tinklą, o PF tinklas projektuojasi į MN ir juos valdo. RG tinklo organizacija panaši į puscentrių, kurie aptarti aukščiau. Be to RG tinklas pasižymi dideliu ritmogenišku ir formuoja ritmą – tai tarsi laikrodis, o PF tinklas yra mažiau ritmogeniškas ir formuoja motorinio atsako paterną. Pagrindinė dvisluoksniu CPG atsiradimo priežastis buvo ta, kad viensluoksniame CPG keičiant puscentrio sužadynamumą keičiamas ritmas ir MN aktyvumas kartu. Dvisluoksniame CPG ritmas (per RG tinklą) ir MN aktyvumas (per PF tinklą) gali būti valdomi nepriklausomai (McCrea and Rybak 2008).

### **CPG lokalizacija**

CPG – tai neuronų tinklas gebantis generuoti ritmiškus aktyvumus be sensorinio grįžtamojo ryšio. Tiriant CPG mažuose neuronų tinkluose (pvz. vėžiagyvių nervinė sistema valdanti virškinimą), kur neuronų kiekis siekia kelias dešimtis, galima nesunkiai nustatyti kiekvieno neurono svarbą ritmo generavime (plačiau apie tai aptarsime 1.2. skyriuje). Susiduriama su problema, kai norima nustatyti CPG dideliuose neuronų tinkluose, pavyzdžiui stuburinių gyvūnų.

Dažniausiai tokie tyrimai siekia nustatyti minimalų CPG (Mortin and Stein 1989, Cazalets, Borde et al. 1995, Ballion, Morin et al. 2001, Cangiano and Grillner 2003, Cangiano, Hill et al. 2012). Tyrimų metu mažinamas neuronų tinklas ir stebima ar vis dar sukeliamas ritmiškas atsakas į tam tikrą stimulą. Neuronų tinklų redukcijos tyrimais nustatyta, kad CPG, valdantis užpakalinių galūnių ritmišką judėjimą, yra išsidėstęs priekinėje strėnų srities išplatėjimo dalyje (Mortin and Stein 1989, Cazalets, Borde et al. 1995). CPG valdantis priekines galūnes išsidėstęs kaudalinėje kaklinio nugaros smegenų išplatėjimo dalyje (Ballion, Morin et al. 2001).

Šių tyrimų pasekoje parodoma kur išsidėstęs minimalus CPG arba svarbiausi CPG elementai, bet prarandama informacija apie realų CPG erdvinį išplitimą.

### **Modelinės sistemos CPG tyrimams**

Pirmieji judėjimo ir CPG tyrimai buvo vykdomi žinduoliuose – katėse ir šunyse (Sherrington 1906, Brown 1911, Brown 1914). Pastaruoju metu šie gyvūnai tyrimams naudojami itin retai, dėl sudėtingos eksperimentų metodikos ir itin didelės jų kainos.

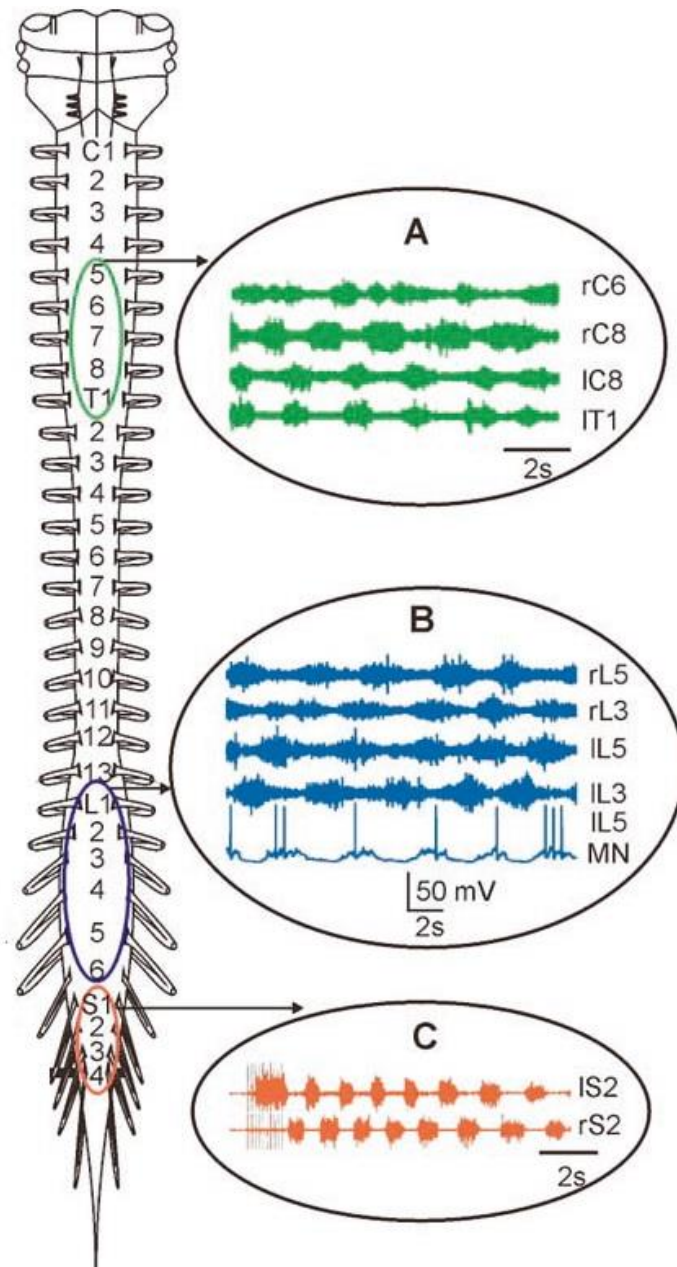
Kita CPG tyrimų sritis apima bestuburius organizmus – skėrys, dėlė, vėžiagyviai ir t.t. Bestuburiai organizmai yra itin patrauklūs CPG tyrimams, nes neuroninis tinklas generuojantis ritmišką aktyvumą turi mažai neuronų, neuronai dažnai būna dideli, o nervinės ląstelės išlieka gyvybingos ir *in vitro*. Trumpai galima paminėti šiuos CPG aspektus žinomus iš bestuburių tyrimų (Grillner 2003):

- Neuronai su antagonistinėmis funkcijomis sujungti tarpusavio slopinimo ryšiais;
- Neuronai su agonistinėmis funkcijomis vienas kitą žadina arba yra sujungti plyšinėmis jungtimis;
- CPG būdingi vidiniai osciliatoriai arba neuronai su plato potencialais;
- Pliūpsnio pabaigą nulemia VP dažnio adaptacija, kuri vyksta dėl  $Ca^{2+}$  valdomų  $K^+$  kanalų aktyvavimo;
- Neurono ar jų grupės aktyvumo padidėjimas po slopinimo yra svarbus pliūpsnio pradžia. Jis gali būti generuojamas dėl T-tipo  $Ca^{2+}$  srovės arba dėl hiperpolarizacijos aktyvuojamos katijonų srovės ( $I_h$ ).

Į sekančią grupę gali būti išskiriami besivystantys organizmai – graužikai, buožgalvis ir zebražuvė. Itin plačiai tiriamas žiurkių (Cazalets, Sqalli-Houssaini et al. 1992, Cazalets, Borde et al. 1995, Kiehn and Kjaerulff 1996, Kiehn and Kjaerulff 1998), o pastaruoju metu ir pelių (Whelan, Bonnot et al. 2000, Kiehn 2011) nugaros smegenų neuronų tinklas naujagimiuose gyvūnuose. Ši modelinė sistema pasirinkta todėl, kad naujagimių organizmų nugaros smegenų neuronų tinklai išlieka gyvybingi *in vitro* (dėl mažos aksonų mielinizacijos) (Clarac, Pearlstein et al. 2004). Po gimimo neuronų tinklai ir jų veikimo principai stipriai keičiasi (Grillner 1999). Pavyzdžiui vystantis embrionui keičiasi motorinių grupių aktyvacija viena kitos atžvilgiu. Pradžioje sukėlus motorinį neuronų tinklo aktyvumą visi motoriniai nervai aktyvūs vienu

metu, o bręstant atsiranda alternacija tarp skirtingų nugaros smegenų pusių, o vėliau ir tarp puscentrių – fleksoriaus/ekstensoriaus (Clarac, Pearlstein et al. 2004). Rezultatus gautus tiriant naujagimius organizmus taikyti suaugusiems organizmams reikėtų su atsargumu. Patys tyrėjai tai įvardija kaip didelį privalumą – atsiranda galimybė tirti ir neuronų tinklų vystymąsi.

Naujagimės žiurkės/pelės preparate tyrėjai lokomociją dažniausiai sukelia farmakologiškai – į ekstraląstelinę terpę pridedant neurotransmiterių (dažniausiai naudojamas dopamino ir NMDA (N-metyl D-aspartato) mišinys (Clarac, Pearlstein et al. 2004)). Priklausomai nuo naudojamo preparato modifikacijos, neurotransmiterių panaudojimas sukelia galūnių raumenų susitraukimus (Kiehn and Kjaerulff 1996) arba ENG aktyvumus pilviniuose nugaros smegenų nervuose (Cazalets, Sqalli-Houssaini et al. 1992). Remiantis šiais tyrimais manoma, kad nugaros smegenų neuronų tinklas turi 3 CPG: priekinių ir užpakalinių galūnių, bei uodegos (Clarac, Pearlstein et al. 2004) (Paveikslas 1.1.5).

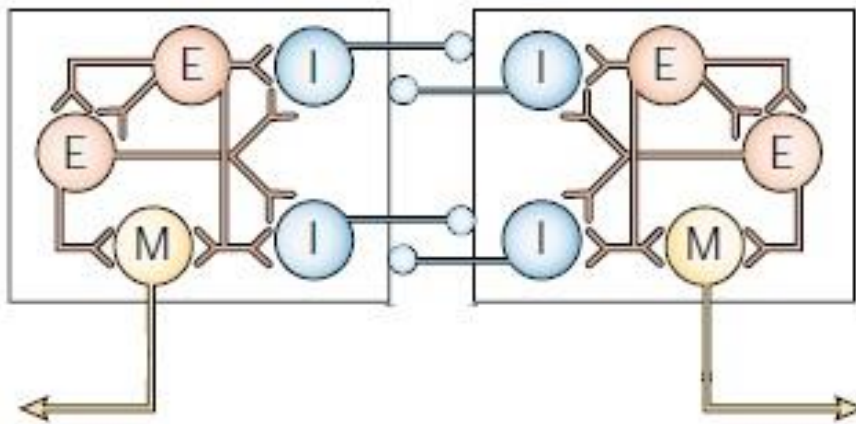


Paveikslas 1.1.5 Neuronų tinklo ritmiškumai generuojami priekinių (A), užpakalinių galūnių (B) ir uodegos (C) CPG naujagimių graužikų nugaros smegenyse. Adaptuota iš (Clarac, Pearlstein et al. 2004).

Lokomocijos sukėlimo metodikos naudojimas šiame preparate (neurotransmiterių pridėjimas į ekstraląstelinę terpę) yra diskutuotinas. Yra žinoma, kad toks nespecifinis neurotransmiterių pridėjimas gali sukelti vidines MN osciliacijas be jokio sinapsinio perdavimo (Guertin and Hounsgaard 1998, Manuel, Li et al. 2012). Be to šiame vystymosi periode neuronai yra sujungti elektrinėmis sinapsėmis (Clarac, Pearlstein et al. 2004). Todėl ventralinių

šakelių pliūpsniai aktyvumai gali atspindėti ne lokomociją, o tiesiog neuronų grupių osciliacijas dėl neurotransmiterių sąveikos šiuose neuronuose.

Verta paminėti ir žemesniųjų stuburinių tyrimus, o konkrečiau tyrimus naudojant nėgės preparatą (Grillner, Parker et al. 1998, Grillner 1999). Jis taip pat pasirinktas dėl *in vitro* tyrimų galimybės. Šiame preparate lokomocija gali būti sukeliama elektriškai stimuliuojant smegenų kamienne esantį lokomotorinį centrą – MLR (mesencefalinis lokomocijos regionas, *mesencephalic locomotor region*) (Sirota, Di Prisco et al. 2000). Nėgės nugaros smegenų CPG galima schematizuoti 1.1.6 paveikslu (Grillner 2003).



Paveikslas 1.1.6 Nėgės nugaros smegenų CPG. E – žadinantys neuronai, I – slopinantys neuronai, M – motoriniai neuronai. Adaptuota iš (Grillner 2003).

Nėgės nugaros smegenų neuronų tinklas gali būti dalinamas į dvi priešingas puses, kurių kiekviena pusė turi glutamaterginius (žadinančius „E“) ir glicinerginius (slopinančius „I“) neuronus. Vienos nugaros smegenų pusės „E“ neuronai žadina: vienas kitą, tos pačios pusės motorinius „M“ neuronus ir tos pačios pusės „I“ neuronus. „I“ neuronai savo ruožtu projektuojasi į kontralateralinę nugaros smegenų CPG pusę ir ją slopina. Manoma, kad plato potencialai (generuojami aktyvavus NMDA receptorius) nulemia ilgą, pastovų neuronų aktyvumą (pliūpsnį), o pliūpsnio pabaiga yra nulemta VP dažnio adaptacijos, kurią sukelia  $Ca^{2+}$  valdomi  $K^+$  kanalai (Grillner 2003).

Vienintelis šios modelinės sistemos trūkumas – judėjimo organizavimas. Dvikojai (ir keturkojai) juda ritmiškais ir koordinuotais galūnių judesiais, o nėgė (ir kitos žuvys, bei gyvatės) varomąją jėgą sukuria judindami

(banguodami) visą savo kūną (Cazalets and Bertrand 2000). Nėgei reikia aktyvuoti alternuojančiai raumenis valdančius skirtingas kūno puses (vienas laisvės laipsnis), o gyvūnai su galūnėmis turi aktyvuoti alternuojančiai raumenis kiekvienam galūnės sąnariui, bei kiekvienai galūnei atskirai (daug laisvės laipsnių). Be to gyvūnams su galūnėmis neužtenka koordinuoti tik galūnių aktyvavimą, reikalinga ir liemens (ašinius) raumenų aktyvacija pusiausvyros palaikymui (Cazalets and Bertrand 2000).

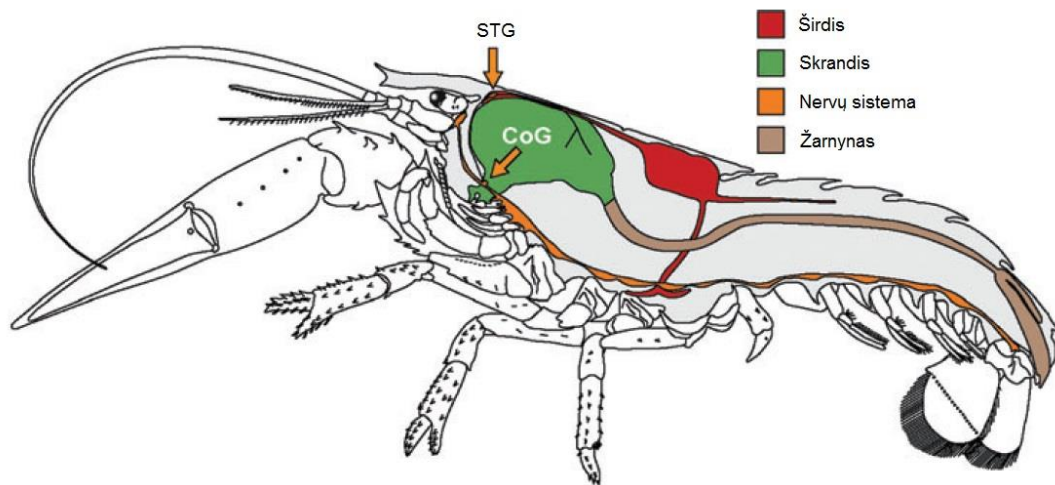
Sekančiuose dviejuose skyriuose plačiau bus aptariamos dvi modelinės sistemos naudojamos CPG tyrimams: vėžiagyvių nervinė sistema valdanti virškinimą ir vėžlio nugaros smegenų neuronų tinklas.

## 1.2. STNS (*stomatogastric nervous system*)

Šiame skyriuje bus apžvelgta viena labiausiai ištirtų CPG modelinių sistemų – vėžiagyvių nervinė sistema valdanti virškinimą (*stomatogastric nervous system* (STNS)).

### Anatomija

Tyrimams dažniausia naudojama omarų (Paveikslas 1.2.1) ir krabų STNS (Marder and Bucher 2007).



Paveikslas 1.2.1 Omaro vidinės sandaros schematinis vaizdas su pažymėta širdimi (raudona), skrandžiu (žalia), STNS (oranžinė) ir žarnynu (pilka). STG – stomatogastrinis ganglijas (*stomatogastric ganglion*), CoG – jungtinis ganglijas (*commissural ganglion*). Adaptuota iš (Marder and Bucher 2007).

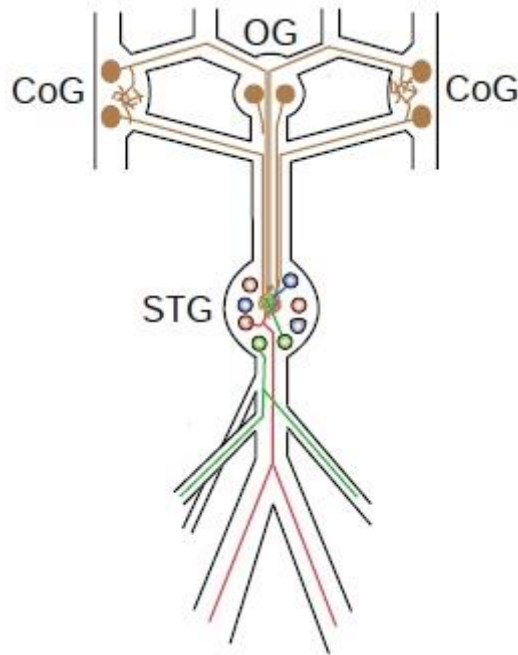
STNS savybės, dėl kurių ji pasirinkta kaip modelinė sistema CPG tyrimams (Marder and Bucher 2007):

- Išpreparavus STNS ir patalpinus į fiziologinį tirpalą, ji generuoja fiktyvias motorines programas (motorinių nervų aktyvumus). Šios motorinės programos atitinka užregistruotas *in vivo*;
- STNS neuronai lengvai identifikuojami ir jų anatomija tarp preparatų nekinta;
- Galima viduląstelinė neuronų registracija, kuri leidžia stebėti ne tik VP bet ir po-sinapsinius potencialus;



- Galima registruoti keletą neuronų vienu metu (tipiškai registruojama 4 viduląsteliniai ir 8-12 ekstraląsteliniai būdai);
- Galima išpreparuoti atskiras ląsteles molekuliniais tyrimams;
- *In vitro* preparatai išlieka stabilūs net iki savaitės (Luther, Robie et al. 2003).

SNTS schematinis vaizdas pateiktas 1.2.2 paveiksle.



Paveikslas 1.2.2 STNS sandara. Ji sudaryta iš keturių ganglijų sujungtų tarpusavyje: dviejų CoG (*commisural ganglia*), OG (*oesophageal ganglion*) ir STG (*stomatogastric ganglion*). Adaptuota iš (Nusbaum and Beenhakker 2002).

SNTS sudaro 4 ganglijai: du CoG (*commisural ganglia*), OG (*oesophageal ganglion*) ir STG (somatogastrinis ganglijas, *stomatogastric ganglion*). Kiekvienas CoG turi apie 550, OG – apie 15, o STG – apie 30 neuronų (skirtingoms rūšims galimi skirtumai) (Nusbaum and Beenhakker 2002, Marder and Bucher 2007).

### Ritmai generuojami CPG

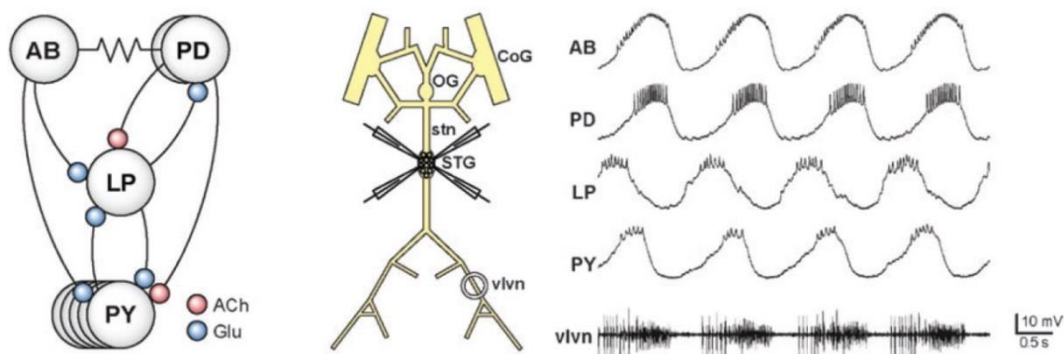
SNTS generuoja skirtingus motorinius ritmus: rijimą (*oesophagus*), maisto laikymą (*cardiac sac*), kramtymą (*gastric mill*) ir sukramtyto maisto filtravimą

(prievarčio, *pylorus*) (Nusbaum and Beenhakker 2002). Labiausiai ištirti yra kramtymas ir prievarčio ritmai.

Kramtymas – tai dviejų lateralinių ir vieno vidurinio danties esančių skrandžio viduje aktyvavimas/valdymas. Kramtymo ritmą generuojantis tinklas neturi vidinių osciliatorių. Ritmo organizavimas apspręstas abipusiu (*reciprocal*) sinapsiniu slopinimu tarp tinklo neuronų, bei sąveikos su projekciniais neuronais (Marder and Bucher 2007). Kramtymo ritmas gana nereguliarus, o jo periodas vidutiniškai trunka 8-20 sekundžių (Marder and Bucher 2007).

Prievarčio ritmas – tai trifazis ritmiškas motorinis aktyvumas, kuris organizme vyksta nuolatos. Jo periodas 1-2 sekundės (Marder and Bucher 2007) ir valdomas 14 neuronų esančių STG (Harris-Warrick, Johnson et al. 1998).

Tipinis prievarčio ritmas pavaizduotas Paveiksle 1.2.3.



Paveikslas 1.2.3 STNS prievarčio ritmas. Piliorinio ritmo CPG anatomija (kairėje) ir jį sudarančių neuronų aktyvumai (dešinė). Adaptuota iš (Marder and Bucher 2007).

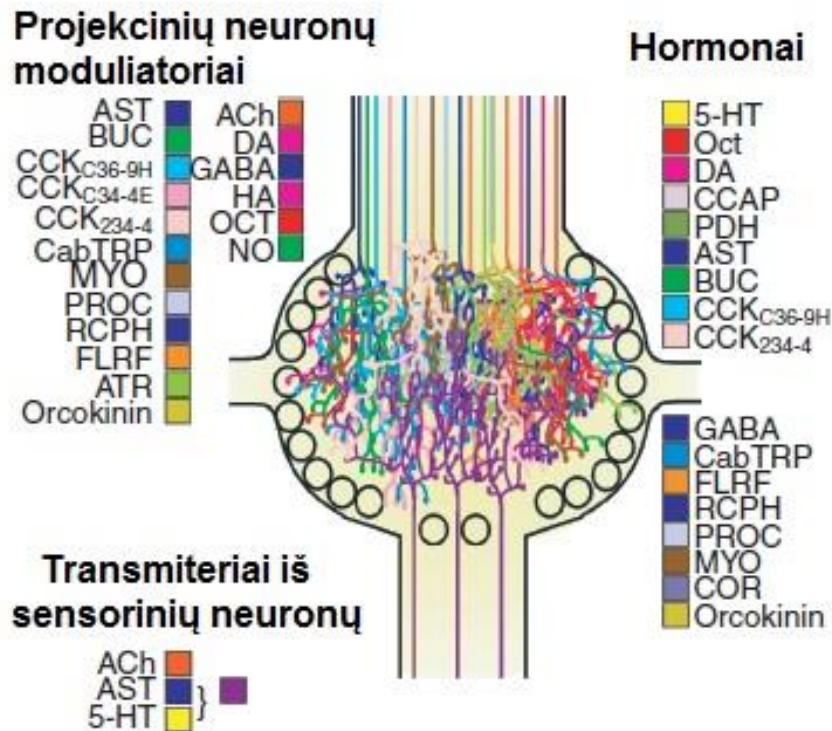
STNS prievarčio ritmas susideda iš VP pliūpsnio PD (*pyloric dilator*) neurone, po jo seka VP pliūpsnis LP (*lateral pyloric*) neurone ir VP pliūpsnis PY (*pyloric*) neurone, t.y. PD → LP → PY (Marder and Bucher 2007). AB (*anterior burster*) neuronas elektrinėmis sinapsėmis sujungtas su PD neuronu ir yra aktyvus tuo pačiu metu kaip ir PD neuronas.

AB neuronas yra vidinis osciliatorius – generuoja ritmišką aktyvumą be išorinio aktyvavimo. Kadangi AB neuronas yra sujungtas elektrinėmis sinapsėmis su PD neuronu, tai AB ir PD neuronai suformuoja ritmo generavimo sistemą (Marder and Bucher 2007). Šie neuronai slopina LP ir PY

neuronus ir nulemia, kad jų aktyvumas alternuoja su PD neuronu. LP neuronas pirmasis „išsilaisvina“ nuo slopinimo ir savo aktyvumu papildomai slopina PY neuroną, bei pradeda slopinti PD neuroną. PY neuronui „išsilaisvinus“ nuo slopinimo, jis slopina LP neuroną. Apibendrinant: ritmas užtikrinamas AB neurono vidinių savybių, sukeliančių neurono ritmišką aktyvumą, o skirtingų neuronų aktyvumo koordinavimas – dėl neuronų tarpusavio slopinimo ir „išsilaisvinimo“ nuo slopinimo (Marder and Bucher 2007). Būtina atkreipti dėmesį į tai, kad šiame tinkle visos sinapsės yra slopinančios, o neuronų žadinimas vyksta iš kitų ganglijų.

### **Neuromoduliacija**

Bene svarbiausias SNTS ganglijas yra STG, nes jis įnervuoja raumenis sukeliančius virškinimo judesius, bei turi neuronus generuojančius *gastric mill* ir piliorinį ritmus. Kitaip tariant, STG yra ritmogeniškiausias. Nustatyta, kad STG yra stipriai moduluojamas. STG moduliacija vyksta per CoG ir OG ganglijų neuronus, kurie projektuojasi į STG ir išskirdami neurotransmitterius moduluoja ganglijo generuojamą ritmą (Marder and Bucher 2007). Taip pat nustatyta, kad STG ritmo neuromoduliacija vyksta per sensorinius neuronus ir neurosekreciją išskiriant neuromodulatorius į hemolimfą (Paveikslas 1.2.4) (Marder and Bucher 2001).



Paveikslas 1.2.4 Galimi STG moduliacijos keliai: endokrininis arba per projekcinius (CoC ir OG) ir sensorinius neuronus. Santrumpos parodo žinomo neurotransmiterio/modulatoriaus pavadinimą kuris keičia STG aktyvumą.

Adaptuota iš (Marder and Bucher 2001).

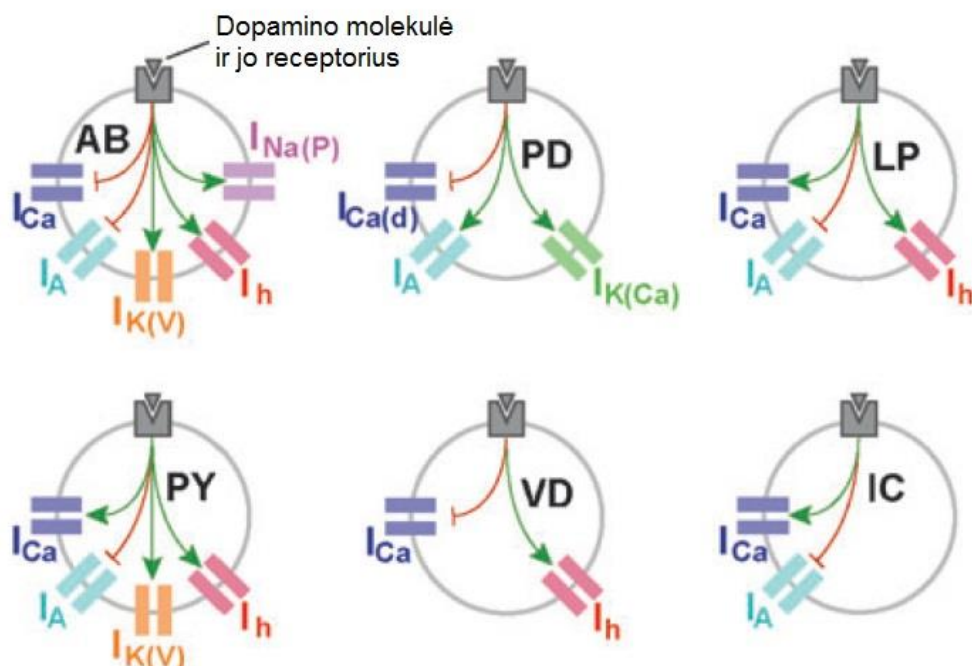
Iš paveikslas 1.2.4 matome, kad nedidelis kiekis STG neuronų gali būti moduliuojami skirtingais neuromoduliatiriais. Tokia neuromoduliacijos įvairovė parodo galimą jos svarbą. Greičiausiai tokios neuromoduliacijos gausos reikia pasiekti neuronų tinklo plastiškumą, turint mažą kiekį neuronų.

Keli STG neuromoduliacijos aspektai:

- Kiekvienas STG tinklo neuronas gali būti moduliuojamas (Flamm and Harris-Warrick 1986, Swensen, Golowasch et al. 2000);
- Tas pats jonų kanalas gali būti veikiamas skirtingų neuromoduliatirų (Swensen and Marder 2000);
- Tas pats neuromoduliatirus aktyvina/blokuoja skirtingus jonų kanalus tame pačiame neurone (Harris-Warrick, Johnson et al. 1998);
- Tas pats neuromoduliatirus tą pačią jonų srovę gali veikti priešingai (slopinti/stiprinti) skirtinguose neuronuose (Harris-Warrick, Johnson et al. 1998);

- Kiekviena STG tinklo sinapsė gali būti moduluojama (Johnson, Peck et al. 1995, Harris-Warrick, Johnson et al. 1998);
- Skirtingos sinapsės gali būti veikiamos priešingai (stiprinamos/slopinamos) to paties neuromodulatoriaus (Johnson, Peck et al. 1995, Harris-Warrick, Johnson et al. 1998).

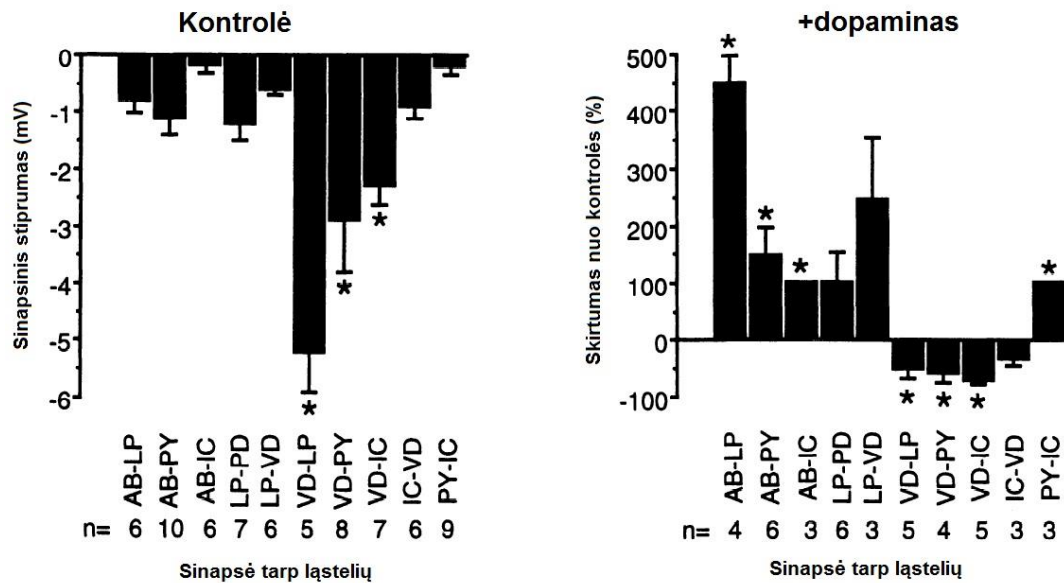
Kaip pavyzdys gali būti dopamino poveikis STG neuronams (Paveikslas 1.2.5). Parodyta, kad tas pats neuromodulatorius veikia įvairius taikinius (joninius kanalus) skirtinguose neuronuose.



Paveikslas 1.2.5 Dopamino poveikis piliorinio tinklo neuronų jonų srovėms. Skirtingi neuronai pažymėti sekančiai: AB (*anterior burster*), PD (*pyloric dilator*), LP (*lateral pyloric*), PY (*pyloric*), VD (*ventricular dilator*), IC (*inferior cardiac*).  $I_{Ca}$ ,  $I_A$ ,  $I_h$  ir t.t. žymi atitinkamas jonų sroves. Žalios rodyklės rodo dopamino žadinantį poveikį, o raudonos – slopinantį. Adaptuota iš (Marder and Bucher 2007).

Pažymėtina, kad dopaminas tą pačią jonų srovę (pvz.  $I_{Ca}$ ) vienuose neuronuose (LP, PY, IC) aktyvina, o kituose (AB, PD, VD) slopina.

Dopaminas taip pat keičia ir sinapsinį perdavimą tarp ląstelių. Dopaminas gali tiek stiprinti, tiek slopinti sinapsinį perdavimą tarp neuronų (Paveikslas 1.2.6).

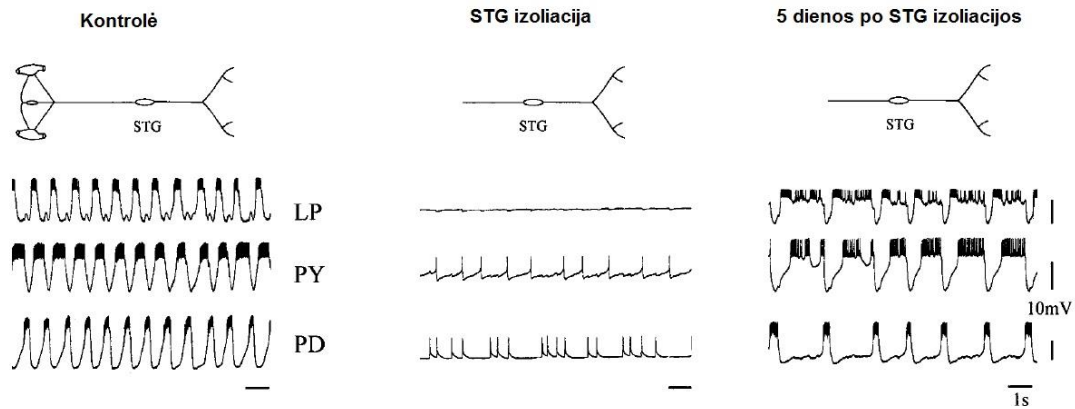


Paveikslas 1.2.6 Sinapsinio perdavimo (kairė) pasikeitimas (dešinė) po dopamino neuromoduliacijos. Adaptuota iš (Johnson, Peck et al. 1995).

Neuromoduliacijos mechanizmas dar labiau sudėtingėja, nes daugelis neuronų turi daugiau nei vieną neurotransmiterį – ko-transmisija (Nusbaum, Blitz et al. 2001, Marder and Bucher 2007).

### Homeostazė ir individualūs skirtumai

Kaip jau minėta praeitame skyriuje STG yra stipriai aktyvuojamas neuromoduliatorių iš kitų ganglijų. Izoliavus STG dingsta prievarčio ritmas. Jeigu *in vitro* preparatas išlaikomas gyvybingu keletą dienų – prievarčio ritmas pradeda atsistatyti (Paveikslas 1.2.7) (Thoby-Brisson and Simmers 2002, Luther, Robie et al. 2003).



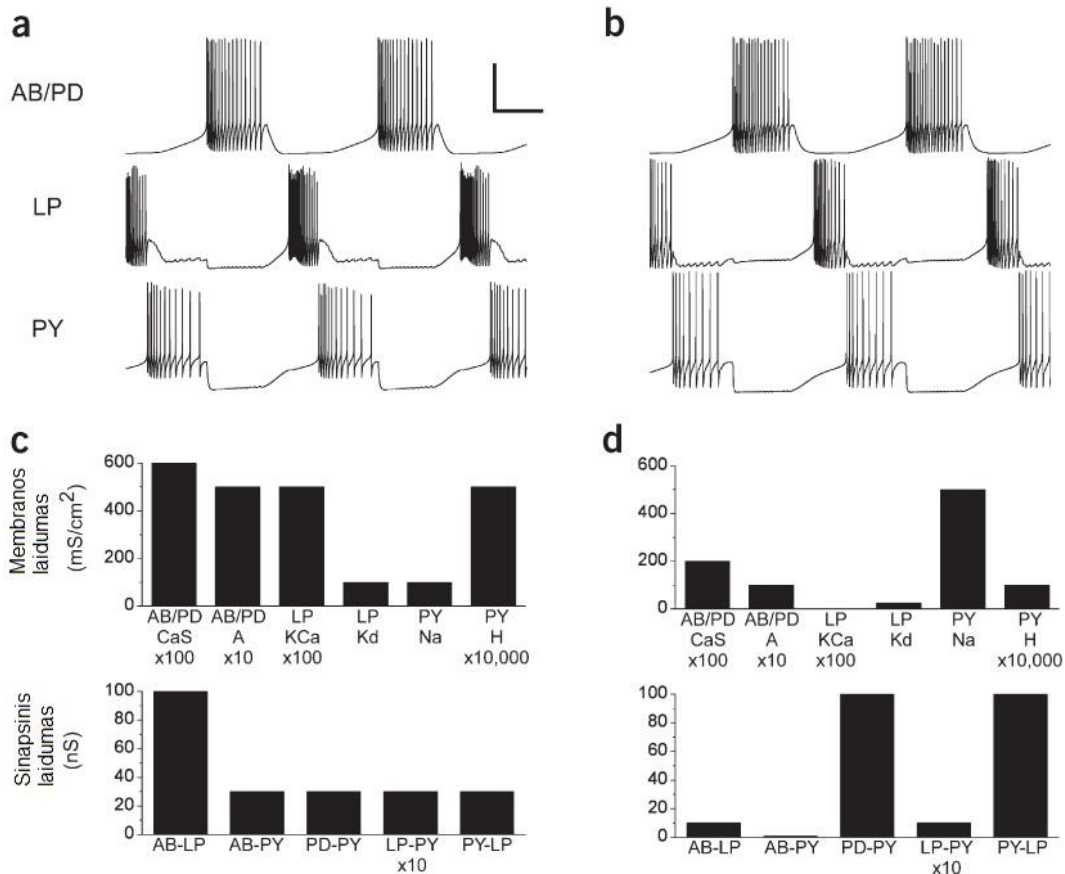
Paveikslas 1.2.7 Piliorinio ritmo atsistatymas. Prievartčio ritmas (kairėje) dažnai dingsta izoliavus STG (vidurys). Po kelių dienų prievartčio ritmas pradeda atsistatyti (dešinė). Adaptuota iš (Thoby-Brisson and Simmers 2002).

Parodyta, kad po STG izoliacijos keičiasi PD neuronų jonų srovės, jų stiprumai (Thoby-Brisson and Simmers 2002). Pasikeitus PD neuronų jonų srovių stiprumams, padidėja jų sužadynamumas (Marder and Bucher 2007). Manoma, kad tai ir nulemia ritmo atsistatymą po STG izoliacijos.

Sekantis homeostazės pavyzdys parodytas, kai į STG neuronus suleidžiama RNR, kuri koduoja baltymą formuojantį joninį kanalą, kuris generuoja A tipo  $K^+$  srovę ( $I_A$ ). Po RNR injekcijos,  $I_A$  srovė neuronuose ženkliai padidėja (MacLean, Zhang et al. 2003). Nepaisant šios srovės padidėjimo, STG generuojamas ritmas nepasikeičia. Rezultatas buvo netikėtas, nes yra žinoma, kad  $I_A$  srovės blokavimas ženkliai keičia STG generuojamą ritmą (Tierney and Harris-Warrick 1992). STG ritmo nepasikeitimas buvo sąlygotas kompensacinio mechanizmo. Didėjant  $I_A$  srovei lygiagrečiai padidėjo ir kita jonų srovė (hiperpoliarizacijos aktyvuojama srovė arba  $I_h$ ) (MacLean, Zhang et al. 2003). Padidėjusi  $I_h$  srovė elektrofiziologiškai kompensuoja  $I_A$  srovę, todėl pokyčio STG ritme nesimato. Šiuo pavyzdžiu parodoma, kaip vienos srovės pokytis kompensuojamas kitos srovės pasikeitimu tam, kad nesutriktų neuronų tinklo veikla.

Sekantis neuronų tinklų aspektas parodytas tiriant STG individualius skirtumus. Matematiškai buvo modeliuojamas STG ritmas. Modelis buvo kuriamas iš trijų neuronų (AB/PD, LP ir PY) sujungtų sinapsiniais ryšiais

(Prinz, Bucher et al. 2004). Modeliavimo metu buvo parenkamos vidinės neuronų savybės ir sinapsinių jungčių stiprumai taip, kad sugeneruoti tipišką STG ritmą (a ir b Paveksle 1.2.8). Modeliavimo pasekoje pastebėta, kad toks pat STG ritmas gali būti sukeliamas parinkus skirtingas vidinių neuronų savybių ir sinapsinių jungčių stiprumų kombinacijas (c ir d Paveksle 1.2.8).



Paveikslas 1.2.8 Individualių skirtumų pavyzdys. Kokybiškai panašus CPG ritmas (a ir b) sukeliamas skirtingais keliais – parinkus skirtingus membraninius ir sinapsinius laidumus (c ir d). Adaptuota iš (Prinz, Bucher et al. 2004).

Paveikslo 1.2.8 c ir d dalyse matome, kad tiek vidinės neuronų savybės tiek sinapsiniai stiprumai tarp šių pavyzdžių ženkliai skiriasi. Nepaisant šių skirtumų, kokybiškai panašus STG ritmas sukeliamas abiem atvejais (a ir b Paveksle 1.2.8). Šis pavyzdys parodo, kad atskiros sudedamosios neuronų tinklo dalys generuojant ritmą neturi būti labai griežtos, jos gali atitinkamai varijuoti. Labiau svarbi yra šių sudedamųjų dalių kombinacija. Pasikeitus



vienam parametrui, jis gali būti kompensuojamas keičiant sekantį parametą, o rezultatas (ritmas) nesikeičia.

Be to šis pavyzdys atskleidžia bendrą problemą eksperimentiniuose tyrimuose. Dažnai tyrėjai priima, kad tiriamas parametras tarp organizmų/individų nekinta, ar kinta labai nežymiai. Tačiau šis modeliavimo pavyzdys parodo, kad tam tikras parametras gali radikaliai skirtis tarp individų, bet išoriškai individo elgsena nekinta. Vieno parametro pokytis tiesiog kompensuojamas kitų parametų pokyčiais.

### 1.3. Vėžlio nugaros smegenų neuronų tinklas

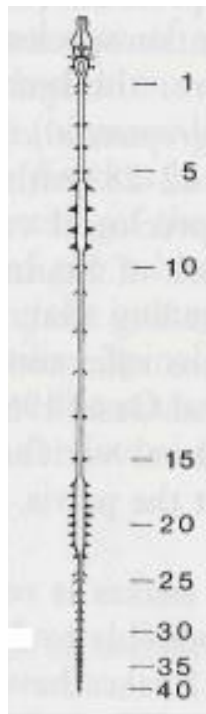
Suaugęs vėžlys, kaip modelinė sistema nugaros smegenų tyrimuose pasirinktas dėl kelių priežasčių. Viena iš priežasčių – tai galimybė tirti nugaros smegenų neuronų tinklą izoliuotai, nepriklausomai nuo aukštesnių smegenų centrų. Spinalizuotiems gyvūnams galima aktyvuoti skirtingas motorines programas, kurios organizuojamos nugaros smegenų neuronų tinklo lygmenyje. Taip pat vėžlio šarvas suteikia mechaninį stabilumą – nugaros smegenys minimaliai juda judant galūnėms. Daugiausia vėžlio nugaros smegenų neuronų tinklų tyrimų atliko prof. Paul Stein ir jo kolegos. Jie dažniausia naudodavo *in vivo* spinalizuotus vėžlio preparatus tirti nugaros smegenų neuronų tinklus valdančius užpakalines galūnes.

Kita priežastis naudoti vėžlį kaip modelinę sistemą – galimybė atlikti *in vitro* tyrimus, nes vėžlio nervų sistema itin atspari anoksijai (deguonies trūkumui). Dėl nervinio audinio atsparumo anoksijai, galima izoliuoti ir tirti net suaugusio gyvūno nugaros smegenis ar jų fragmentus. Izolavus vėžlio CNS komponentus ir tinkamai juos aprūpinant maistinėmis medžiagomis, jie išlieka gyvybingi iki kelių dienų. Prof. Jorn Hounsgaard laboratorijoje ilgą laiką buvo vykdomi elektrofiziologiniai nugaros smegenų neuronų tyrimai riekelėse. Iki šiol nėra rutiniškai naudojamos nugaros smegenų riekelės iš suaugusių žinduolių, nes jų nugaros smegenų audinys labai neatsparus anoksijai. Optimistiškai nuteikia pastaraisiais metais pasirodę tyrimai, kuriuose tyrėjai sugebėjo izoliuoti ir išlaikyti gyvybingas suaugusių pelių nugaros smegenų riekėles (Husch, Cramer et al. 2011, Husch, Van Patten et al. 2012). Ateityje šios metodikos galėtų būti pritaikytos ir kitose laboratorijose, kas leistų tirti žinduolių nugaros smegenų neuronus *in vitro*.

Prieš dešimtmetį prof. Jorn Hounsgaard laboratorijoje pradėtas naudoti nugaros smegenų-šarvo preparatas. Šio preparato privalumas – paliekama nepažeista nugaros smegenų tinklo dalis, kuri sugeba generuoti funkcionalų aktyvumą (kasymosi refleksą) į natūralų dirgiklį (taktilinis šarvo stimuliavimas). Naudojant šį *in vitro* preparatą atsirado galimybė tirti ne tik atskirus neuronus, bet ir paties neuronų tinklo savybes.

### Vėžlio nugaros smegenų anatomija

Vėžlio nugaros smegenys sudarytos iš 8-9 kaklinių (*cervical*, C1-C8), 10 krūtininių/nugarinių (*dorsal*, D1-D10), 2 kryžmeninių (*sacral*, S1-S2) ir apie 16 uodeginių (*caudal*, Ca1-Ca16) nugaros smegenų segmentų (Paveikslas 1.3.1) (Gans, Northcutt et al. 1979). Nugarinius smegenų segmentus dengiantis kaulas (stuburas) yra suaugęs su vėžlio kiautu ir yra visiškai nepaslankus. Kitus segmentus dengiantys kaulai nėra suaugę su šarvu.



Paveikslas 1.3.1 Vėžlio centrinės nervų sistemos sandara. Skaičiai žymi nugaros smegenų segmento eilės numerį, skaičiuojant nuo kaklinės dalies. „1“ atitinka pirmąjį kaklinį C1 segmentą, „10“ – pirmąjį nugarinį D1 segmentą, o „20“ pirmąjį kryžmeninį S1 segmentą. Adaptuota iš (Gans, Northcutt et al. 1979).

Paveiksle 1.3.1 matome, kad vėžlio nugaros smegenyse yra du išplatėjimai – kaklinis ir strėnų srities. Juose yra išsidėstę MN valdantys atitinkamai priekinės ir užpakalines gyvūno galūnes. Kadangi vėžlys neturi raumenų krūtininėje dalyje, todėl krūtininiuose nugaros smegenų segmentuose nėra ir MN. Manoma, kad šiuose segmentuose išsidėstę priešganglijiniai

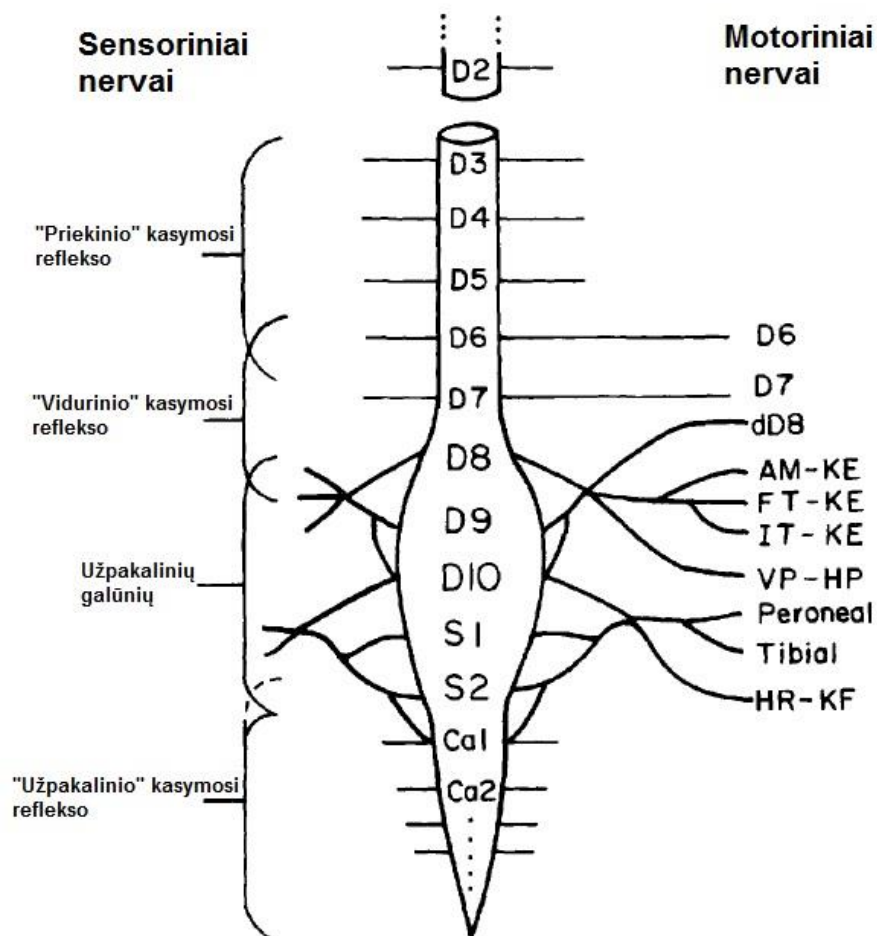
(autonominės nervų sistemos) ir sensoriniai neuronai (Nieuwenhuys, Donkelaar et al. 1998).

Parodyta, kad kaklinis ir strėnų srities išplatėjimai yra sujungti ilgais propriospinaliniais ryšiais (Kusuma and ten Donkelaar 1980). Šie propriospinaliniai ryšiai yra tiek kylantys, tiek besileidžiantys ir dažniausiai jų terminalės yra kontralateralinėje (priešingoje) nugaros smegenų pusėje. Taip pat parodyta, kad strėnų srities išplatėjimo neuronai įnervuoja krūtininius nugaros smegenų segmentus (Kusuma and ten Donkelaar 1980).

MN įnervuojantys užpakalines galūnes išsidėstę strėnų srities išplatėjime – D8-S2 nugaros smegenų segmentuose (Ruigrok and Crowe 1984). Atskiros MN grupės nėra išsidėsčiusios tolygiai. Pavyzdžiui, MN įnervuojantys šlaunies fleksorių (HF) išsidėstę priekinėje išplatėjimo dalyje (D8-9 segmentai), o antagonistiniai MN įnervuojantys šlaunies ekstensorių (HE) – išplitę visame strėnų srities išplatėjime (Ruigrok and Crowe 1984). Todėl norint registruoti HF MN elektrodas įvedamas į D8-9 segmentus, o jei norima registruoti HE MN tikslinga elektrodą įvedinėti kaudaliau, į D10-S2 nugaros smegenų segmentus.

Tiriant užpakalinių galūnių neuronų tinklą, kuris generuoja ritmiškus motorinius atsakus (CPG), nustatyta, kad svarbiausi jo elementai išsidėstę D7-D10 nugaros smegenų segmentuose (Mortin and Stein 1989).

Užpakalinės vėžlio kūno dalies motorinių ir sensorinių nervų išsidėstymas pavaizduotas 1.3.2 paveiksle (Mortin and Stein 1990).



Paveikslas 1.3.2 Užpakalinės vėžlio kūno dalies sensoriniai nervai (kairė) ir užpakalinę galūnę, bei kišenę inervuojantys motoriniai nervai (dešinė).  
Adaptuota iš (Mortin and Stein 1990).

Šiame darbe buvo registruojamas motorinis nervas inervuojantis šlaunies lenkiamąjį raumenį (fleksorių) – VP-HF (Paveikslas 1.3.2), kuris toliau vadinamas tiesiog HF (*hip flexor*). Antagonistinį raumenį, šlaunies ekstensorių, inervuoja HR-KF (arba tiesiog HE) motorinis nervas. 1.3.2 paveiksle pavaizduoti D6 ir D7 motoriniai nervai inervuoja kišenę aplink užpakalinę galūnę, kurios pagalba vėžlys kvėpuoja, o AM-KE, FT-KE, IT-KE yra motoriniai nervai inervuojantys kelio ekstensorius (Mortin and Stein 1990).

### Vėžlio motorinės programos

Vėžlio nugaros smegenų neuronų tinklai gali generuoti keletą skirtingų motorinių programų: ėjimą, plaukimą, plaukimą atgal, galūnės atitraukimo

refleksą ir skirtingų kūno dalių (priekinės, vidurinės ir užpakalinės) kasymosi refleksus (Stein 2005). Taip pat vėžlys plaukimo metu gali sukelti – viena galūne vykdydamas plaukimą į priekį, o priešinga galūne vykdydamas plaukimą atgal (Lennard and Stein 1977).

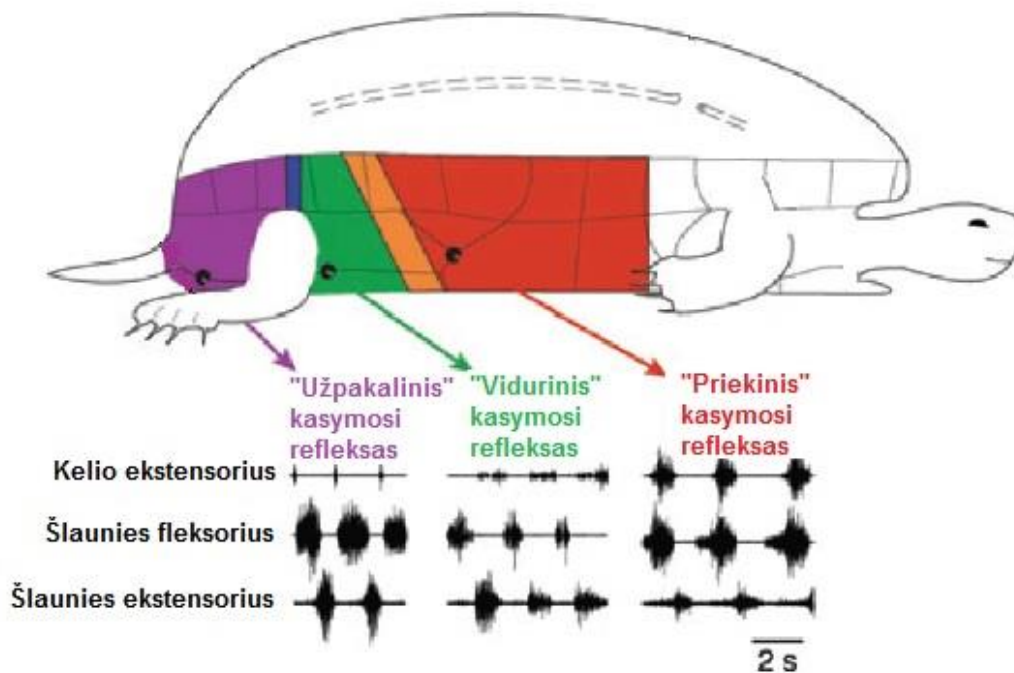
Motorinės programos vėžlyje gali būti tiriamos registruojant raumenų aktyvumą – elektromiogramą (Lennard and Stein 1977, Mortin, Keifer et al. 1985). Kitais atvejais (dauguma prof. Paul Stein tyrimų) vėžlys yra imobilizuojamas panaudojus nervo-raumens sinapsių blokatorius (Robertson, Mortin et al. 1985) arba tiesiog izoliavus nervų sistemą naudojant *in vitro* preparatus (Keifer and Stein 1983, Currie and Lee 1996). Po imobilizacijos nervų sistemos generuojamus motorinius atsakus galima tirti registruojant motorinių nervų aktyvumą – elektroneurogramą (ENG). Motoriniai atsakai sukelti be realaus raumenų aktyvumo vadinami fiktyviais motoriniais atsakais (Stein 1997, Frigon 2012). Tiriant fiktyvius judesius atsiribojama nuo sensorinio grįžtamojo ryšio – tiriamas tik neuronų tinklas, kuris organizuoja ritmiškus motorinius aktyvumus. Parodyta, kad tiek fiktyvios lokomocijos (Juraneck and Currie 2000), tiek fiktyvių kasymosi refleksų (Robertson, Mortin et al. 1985) motoriniai paternai atitinka motorinius paternus stebimus realaus kasymosi refleksų ir lokomocijos metu. Tokiu būdu dar kartą patvirtinama, kad motorinės programos yra koduojamos nugaros smegenų neuronų tinkle, sensorinis grįžtamasis ryšys nėra būtinas.

Plaukimą galima sukelti vėžlį tiesiog panardinus į vandenį (Earhart and Stein 2000) arba elektriškai stimuliuojant besileidžiančius traktus (DLF – *dorsolateral funiculus*), kur išsidėstę tinklinio darinio (*reticular formation*) – nugaros smegenų besileidžiantys aksonai (Lennard and Stein 1977, Earhart and Stein 2000, Stein 2005). Žinoma, kad MLR stimuliavimas, kuris aktyvuoja tinklinio darinio neuronus, taip pat sukelia lokomociją ir kituose gyvūnuose (Stein 1997).

Kasymosi refleksas – tai motorinis atsakas siekiantis pašalinti dirgiklį nuo kūno paviršiaus (Stein 1983). Šis refleksas gyvūnui sukliamas, kai jo kūno paviršius stimuliuojamas taktiliniu stimulu arba elektriškai. Be to kasymosi

reflekso motorinis atsakas yra tikslingas – galūnė trina kūno paviršių tiksliai ten, kur buvo stimuliuota (Stein 1983).

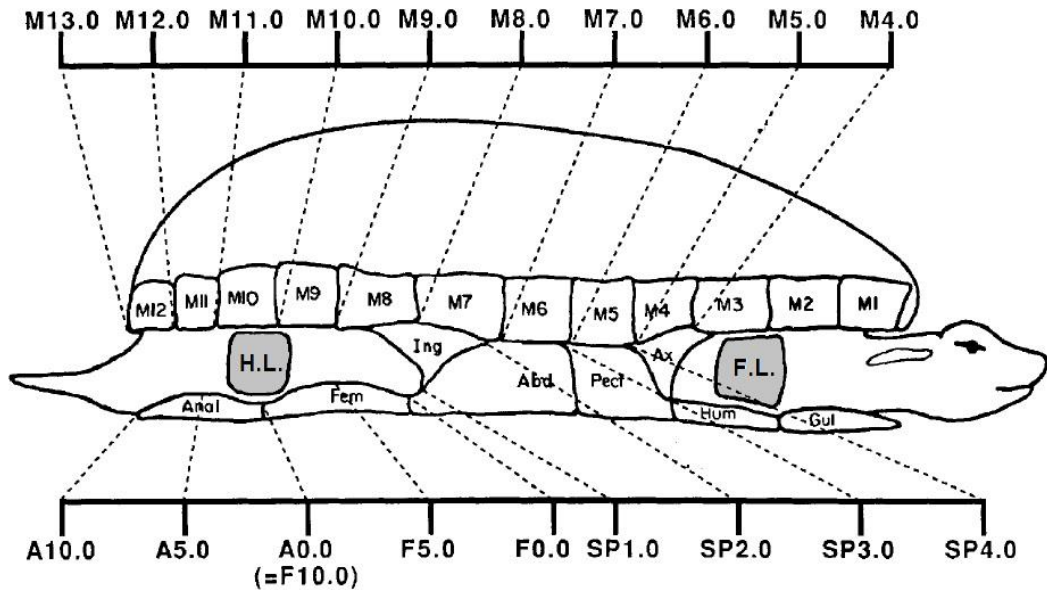
Kaip jau minėta aukščiau, vėžliui būdingi skirtingų kūno dalių kasymosi refleksai: priekinės (*rostral*), vidurinės (*pocket*) ir užpakalinės (*caudal*) (Paveikslas 1.3.3). Yra keletas būdų atskirti kasymosi reflekso tipus: pagal stimuliuojamus receptinius laukus, pagal tai kuri galūnės dalis naudojama kasymuisi (trynimui) ir pagal kelio ekstensoriaus aktyvumą šlaunies aktyvumo atžvilgiu.



Paveikslas 1.3.3 Spinalizuotame vėžlio preparate stimuliuojant atitinkamus receptinius laukus galima sukelti priekinės (raudona), vidurinės (žalia) ir užpakalinės (violetinė) kūno dalių kasymosi refleksus. Apačioje pavaizduoti tipiniai motorinių nervų aktyvumai skirtingų kasymosi refleksų metu.

Adaptuota iš (Berkowitz 2010).

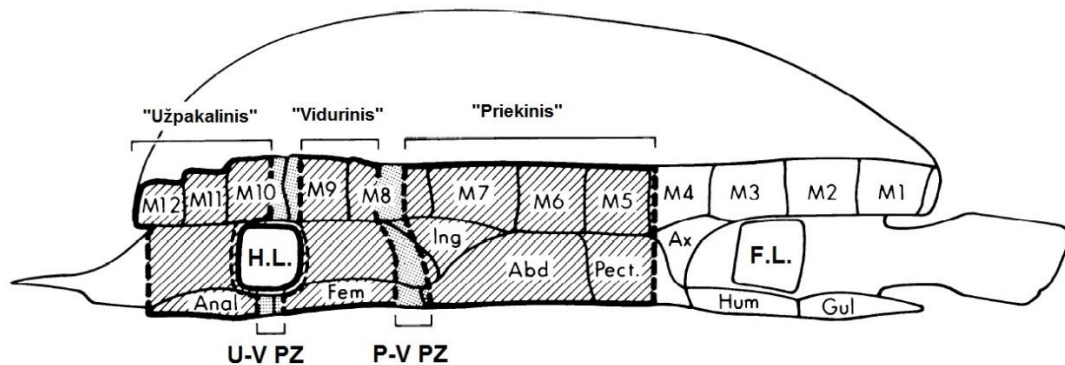
Vėžlio šarvas sudarytas iš plokštelių, kurių išsidėstymas mažai skiriasi tarp gyvūnų. Šarvas pagal plokšteles skirstomas dermatomomis joms suteikiant tam tikrą indeksą (Paveikslas 1.3.4) (Mortin and Stein 1990).



Paveikslas 1.3.4 Vėžlio šarvo suskirstymas. Pilka spalva paveiksle H.L. ir F.L. atitinkamai vaizduoja užpakalinių ir priekinių galūnių išsidėstymą. Adaptuota iš (Mortin and Stein 1990).

Yra gana tiksliai parodyta, kurių nugaros smegenų segmentų aferentai inervuoja atitinkamas dermatomas (Mortin and Stein 1990). Pagal tokį vėžlio šarvo „žemėlapi“ galima parinkti tikslias stimulo vietas atitinkamiems nugaros smegenų segmentų aferentams aktyvuoti. Stimuliuojant dermatomas rostraliau odos aplink užpakalinę galūnę („kišenė“) sukeliama priekinės kūno dalies kasymosi refleksas, stimuliuojant dermatomas ties užpakalinės galūnės kišene sukeliama vidurinės kūno dalies kasymosi refleksas, ir galiausiai stimuliuojant dermatomas arčiau uodegos – užpakalinės kūno dalies kasymosi refleksas (Paveikslas 1.3.5) (Mortin, Keifer et al. 1985).





Paveikslas 1.3.5 Dermatomos sukelti skirtingus kasymosi refleksų tipus. H.L. ir F.L. atitinkamai vaizduoja užpakalinių ir priekinių galūnių išsidėstymą. P-V PZ žymi pereinamą zoną tarp priekinės ir vidurinės kūno dalių kasymosi refleksų, o U-V PZ – tarp užpakalinės ir vidurinės. Adaptuota iš (Mortin, Keifer et al. 1985).

Priekinės kūno dalies kasymosi refleksu metu naudojama užpakalinės galūnės pėdos išorinė dalis ir/arba pirštai; vidurinės kūno dalies – šlaunis, kelias arba blauzda; užpakalinės kūno dalies – kulnas arba pėdos šonas (Mortin, Keifer et al. 1985).

Trečias kriterijus atskirti kasymosi refleksų tipus – kelio ekstensoriaus aktyvumas šlaunies aktyvumo metu (Mortin, Keifer et al. 1985, Robertson, Mortin et al. 1985). Kelio ekstensorius būna aktyvus kai vykdomas pats trynimasis (Stein 2005). Parodyta, kad priekinės kūno dalies kasymosi refleksu metu kelio ekstensorius yra aktyvus šlaunies fleksoriaus aktyvumo pabaigoje; vidurinės kūno dalies – šlaunies ekstensoriaus aktyvumo metu; užpakalinės kūno dalies – po šlaunies ekstensoriaus aktyvumo (žiūrėti Paveikslo 1.3.3 apačioje) (Mortin, Keifer et al. 1985, Robertson, Mortin et al. 1985).

Tiriant vėžlio šarvo dermatomas, buvo pastebėta, kad vėžlio šarvui būdingos pereinamosios zonos (Paveikslas 1.3.5). Tai zonos, kurių stimuliavimas sukelia mišrų kasymosi refleksą (hibridą) (Mortin, Keifer et al. 1985). Taip pat galima sukelti plaukimo-kasymosi refleksu hibridą, mechaniškai stimuliuojant priekinio kasymosi refleksu receptinius laukus ir stimuliuojant DLF elektriškai (Earhart and Stein 2000). Mišrus motorinis atsakas gali būti motorinio atsako pasikeitimas iš vieno į kitą per keletą ritmiškų aktyvumo periodų (priekinės kūno dalies kasymosi refleksas pasikeičia į vidurinės kūno dalies kasymosi

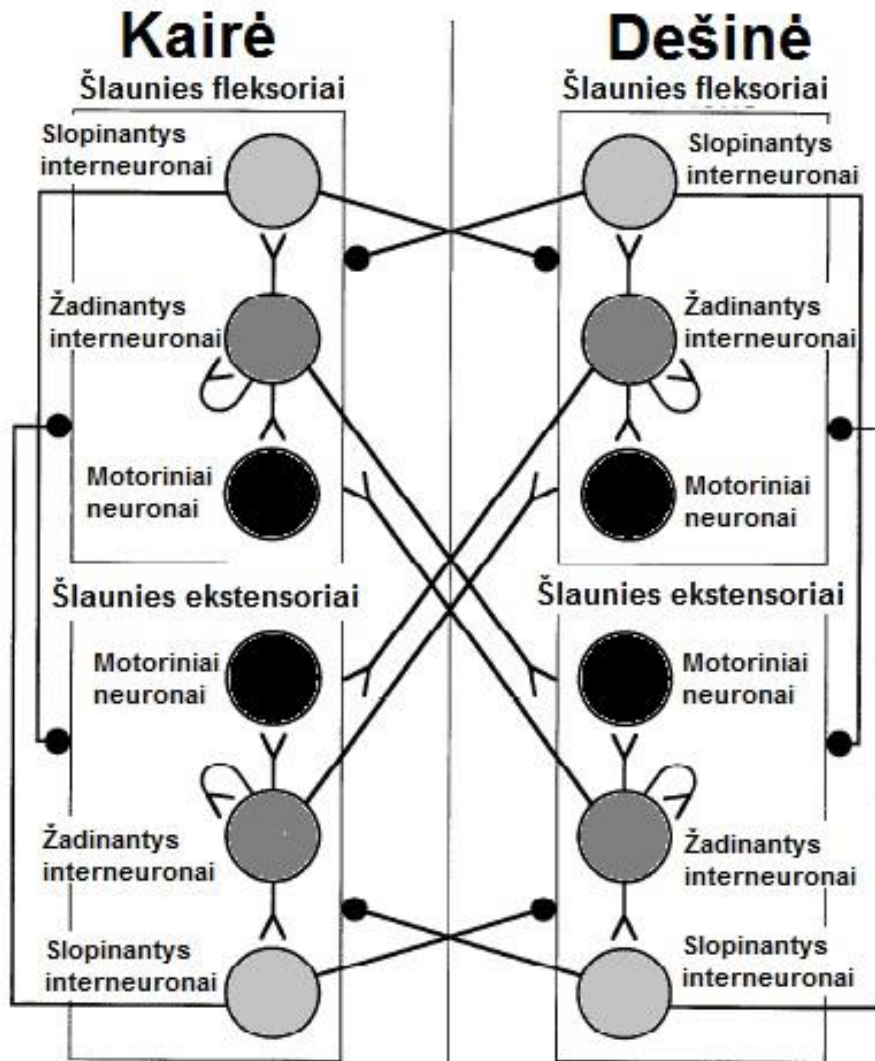
refleksą). Taip pat mišrus motorinis atsakas gali turėti abiejų motorinių atsakų savybes – vėžlys į DLF ir šarvo stimuliavimą atsako motoriniu atsaku, kai vieno ciklo metu vykdomas ir plaukimas, ir kasymosi refleksas (Earhart and Stein 2000). Toks mišrus motorinių programų generavimas leidžia manyti, kad neuronų tinklai generuojantys atskiras motorines programas yra persidengę – tie patys neuronai dalyvauja abiejų motorinių programų generavime.

Vėžlio plaukimą galima tirti nespinalizuotuose gyvūnuose (Lennard 1977), tačiau kasymosi refleksą nespinalizuotuose gyvūnuose sukelti yra labai sunku. Taip yra greičiausiai todėl, kad aukštesni smegenų centrai slopina neuronų tinklą kuris generuoja kasymosi refleksą. Dėl šios priežasties tiriant kasymosi refleksą vėžliai paprastai spinalizuojami ties D2-D3 nugaros smegenų segmentais – kaudaliau priekinių galūnių išplatėjimo (Stein 2005). Tokiu būdu izoliuojamas užpakalinių galūnių neuronų tinklas.

### **Vėžlio nugaros smegenų neuronų tinklo organizavimas**

Jeigu stimuliuojamos abi vėžlio pusės, tai sukeliama abiejų galūnių kasymosi refleksai (Stein, Victor et al. 1995, Field and Stein 1997). Daugumai motorinių atsakų (plaukimas, priekinės, vidurinės ir dalis užpakalinės kūno dalies kasymosi refleksų) būdinga nefazinė užpakalinių galūnių koordinacija – vienai galūnei lenkiantis kita yra tiesiama (Field and Stein 1997). Dalis užpakalinės kūno dalies kasymosi refleksų epizodų pasižymi fazine galūnių koordinacija – abi galūnės vienu metu tiesiamos arba lenkiamos (Field and Stein 1997). Kitiems keturkojams (pavyzdžiui katei) taip pat būdingos fazinė (šuoliavimas) ir ne fazinė (ėjimas) galūnių koordinacijos (Forssberg, Grillner et al. 1980). Yra tyrėjų teigiančių, kad kiekviena galūnė turi atskirą neuronų tinklą (CPG), o galūnių tarpusavio koordinacija užtikrinama propriospinalinių ryšių pagalba (Cowley and Schmidt 1995, Frigon 2012). Tyrimai atlikti su vėžlio nugaros smegenų preparatais leidžia manyti, kad neuronų tinklas esantis kontralateralinėje pusėje stipriai prisideda prie ipsilateralinio motorinio atsako generavimo (Stein, Victor et al. 1995, Stein, McCullough et al. 1998). Taigi, normaliam vienos pusės motoriniam atsakui sugeneruoti reikalingas neuronų

tinklas esantis ir kontralateralinėje nugaros smegenų pusėje. Be to aktyvuojant vienos pusės kasymosi refleksus, kitos pusės motoriniai nervai yra dalinai aktyvūs (Stein, Victor et al. 1995, Currie and Gonsalves 1997). Manoma, kad kontralateralinėje pusėje dominuoja HE modulis (Stein, Victor et al. 1995). Tokios išvados prieita, nes pašalinus kontralateralinę strėnų srities išplatėjimo pusę, prarandamas HE modulio aktyvumas (Stein, Victor et al. 1995). Abipusį neuronų tinklo išsidėstymą patvirtina ir imunohistocheminiai tyrimai, kurių metu sukliamas kasymosi refleksas arba plaukimas vienoje pusėje, o aktyvūs neuronai aptinkami abiejose nugaros smegenų pusėse (Mui, Willis et al. 2012). Šių tyrimų pasekoje prof. Paul Stein iškėlė hipotezę, kad skirtingų pusių nugaros smegenų neuronų tinklas turi bendrą CPG dalį („šerdį“), kuri valdo abiejų pusių galūnes (Stein, Victor et al. 1995, Stein 1997). Jis pateikia ir schematinį CPG modelį (Paveikslas 1.3.6).

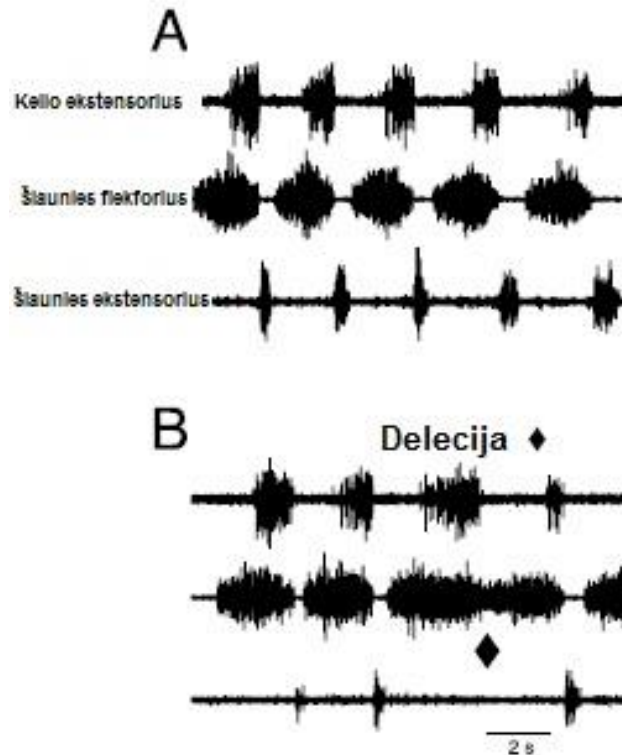


Paveikslas 1.3.6 Vėžlio nugaros smegenų CPG. Juodi apskritimai vaizduoja MN, tamsiai pilki – žadinančius neuronus, o šviesiai pilki – slopinančius neuronus. Adaptuota iš (Stein, Victor et al. 1995).

Šis modelis susideda iš keturių sudedamųjų dalių (modulių): kairės pusės šlaunies fleksoriaus ir ekstensoriaus, bei dešinės pusės šlaunies fleksoriaus ir ekstensoriaus. Kiekvienas iš keturių modulių turi: MN (juodi apskritimai Paveiksle 1.3.6); žadinančius neuronus (tamsiai pilki apskritimai Paveiksle 1.3.6), kurie aktyvuoja agonistinius MN ir kitus – sinerginius modulius; slopinančius neuronus (šviesiai pilki apskritimai Paveiksle 1.3.6), kurie slopina antagonistinius modulius.

### Motorinio aktyvumo ritmo variacijos – delecijos

Kasymosi refleksui, ypač priekinės kūno dalies, būdinga kasymosi reflekso ritmo variacija – šlaunies ekstensoriaus (HE) delecija (Paveikslas 1.3.7) (Robertson and Stein 1988). Delecijos metu dingsta HE nervo aktyvumas, o HF nervo aktyvumas sumažėja, bet nenutrūksta (rombas Paveikslo 1.3.7 B dalyje).



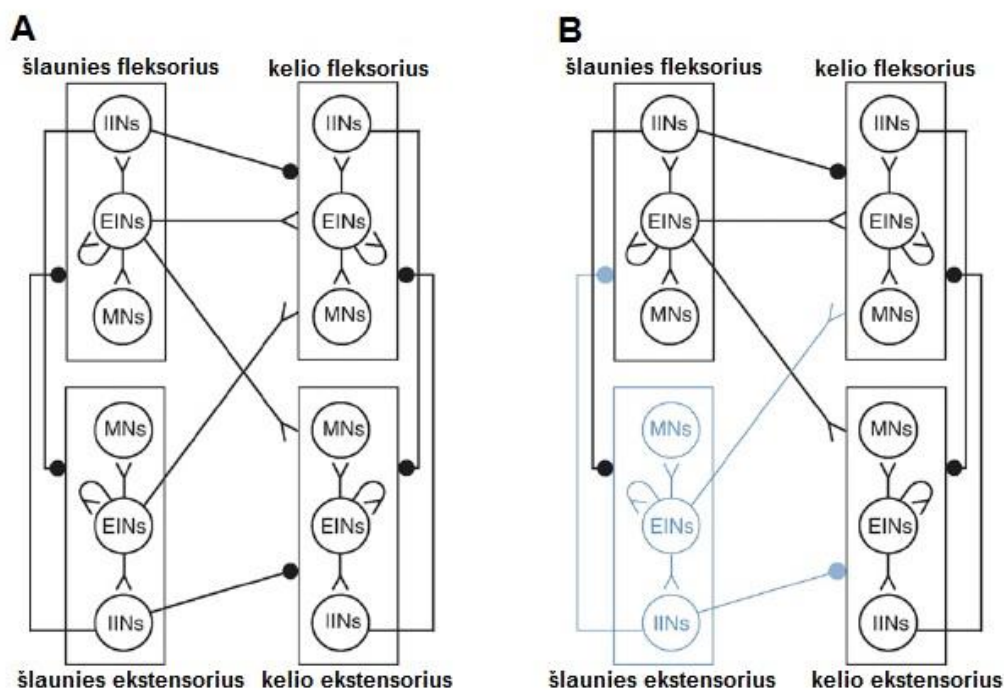
Paveikslas 1.3.7 Normalus kasymosi reflekso ritmas (A) ir kasymosi ritmo variacija – HE delecija (B). Adaptuota iš (Stein and Daniels-McQueen 2002).

Delecijų dažnis ženkliai padidėja jeigu nugaros smegenys pažeidžiamos specifiniais būdais – pašalinama kontralateralinė strėnų srities išplatėjimo pusė (Stein, Victor et al. 1995) arba pažeidžiamos nugaros smegenys kontralateralinėje pusėje virš strėnų srities išplatėjimo (Stein, McCullough et al. 1998).

Be HE delecijų, vėžlio priekinės kūno dalies kasymosi refleksui būdingos kelio fleksoriaus ir ekstensoriaus delecijos (Stein and Daniels-McQueen 2004). Kelio ekstensoriaus/fleksoriaus ir HE delecijų atsiradimas nėra tiesiogiai

susietas – jos gali atsirasti viename sanaryje nepriklausomai nuo kito (Paveikslo 1.3.7 B dalyje HE delecijos metu kelio moduliai yra ritmiški).

Delecijų organizavimą nugaros smegenų lygmenyje galime aprašyti modeliu pateiktu 1.3.8 paveiksle (Stein 2008). Šį modelį sudaro keturi moduliai: šlaunies fleksorius, šlaunies ekstensoriaus, kelio fleksorius ir kelio ekstensoriaus. Kiekvienas modulis turi tris komponentes: žadinančius, slopinančius ir MN. Kiekvieno sąnario moduliai tarpusavio slopinimu organizuoja to sąnario ritmiškumą. Skirtingų sąnarių moduliai nėra visiškai nepriklausomi – HE slopina kelio ekstensorių ir žadina kelio fleksorių ir t.t.. Tačiau sinapsiniai ryšiai tarp skirtingų sąnarių nėra labai stiprūs ir pavyzdžiui HE delecijos atveju (Paveikslas 1.3.8 B) stipriai nepaveikiamas kelio ritmiškumas.



Paveikslas 1.3.8 Priekinės kūno dalies kasymosi reflekso generavimo modelis (A) ir kasymosi reflekso ritmo variacijos – HE delecijos organizavimas (B).

IINs – slopinantys neuronai, EINs – žadinantys neuronai, MNs – motoriniai neuronai. Šviesus modulis B dalyje parodo jo aktyvumo nebuvimą – deleciją.

Adaptuota iš (Stein 2008).

Delecijų fenomenas atskleidžia du svarbius aspektus apie neuronų tinklo organizavimą:

- Modulis yra dalinai ritmogeniškas ir be antagonistinio modulio aktyvumo. Pagal puscentrių modelį ritmiškumas pasiekiamas tik slopinimu tarp antagonistinių modulių.
- Kelio ir šlaunies moduliai nėra labai glaudžiai susiję. Delecijos atsiradimas šlaunies ritme nebūtinai sukelia delecijas kelio ritme. Tai taip pat prieštarauja puscentrių modeliui, kuris teigia, kad visus sąnarius valdantys moduliai yra tarpiai susieti (sudaro viena puscentrį).

Šie delecijų aspektai parodo, kad kasymosi reflekso organizavimas neuronų tinkle labiau atitinka UBG, bet ne puscentrių modelį.

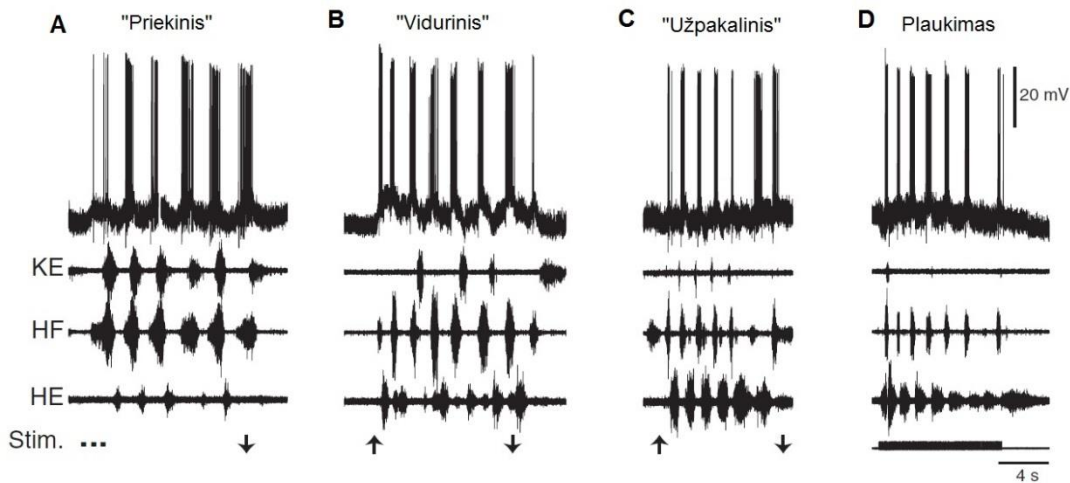
### **Nugaros smegenų neuronų tinklų persidengimas**

Kaip jau anksčiau buvo minėta, vėžlio nugaros smegenų neuronų tinklas geba organizuoti plaukimą, kelis kasymosi refleksų tipus ir t.t. Savaime kylantis klausimas – kaip šios skirtingos motorinės programos organizuojamos, kaip išsidėstę jas valdantys neuronų tinklai? Viena iš galimybių – kiekvienai motorinei programai egzistuoja atskiras neuronų tinklas. Kitas kraštutinumas – tas pats neuronų tinklas organizuoja visas motorines programas. Galimas ir tarpinis variantas – dalis neuronų tinklų organizuojančių skirtingas motorines programas yra persidengę.

Pirmieji netiesioginiai įrodymai, kad neuronų tinklai gali būti persidengę – tai pastebėjimas, kad egzistuoja hibridiniai motoriniai atsakai (Mortin, Keifer et al. 1985, Earhart and Stein 2000). Persidengiančių neuronų tinklų hipotezę paremia paskutinių metų tyrimai, kurių metu buvo taikomi įvairaus intensyvumo skirtingi stimulai (sukelti plaukimą ir kasymosi refleksą). Parodoma, kad motoriniai atsakai sukelti skirtingais stimulais sumuojasi (Hao, Spardy et al. 2011). Tai paremia hipotezę, kad neuronų tinklas generuojantis kasymosi refleksą persidengia su neuronų tinklu generuojančiu plaukimą.

Tiesiogiai neuronų tinklų persidengimas parodytas registruojant IN ekstraląstelinis (Berkowitz and Stein 1994, Berkowitz and Stein 1994,

Berkowitz 2001, Berkowitz 2001) ir viduląsteliniu (Berkowitz 2005, Berkowitz, Yosten et al. 2006, Berkowitz 2008) būdais. Daugelis neuronų yra ritmiškai aktyvuojami kelių motorinių programų metu (Paveikslas 1.3.9).



Paveikslas 1.3.9 Daugiafunkcinis neuronas. Neuronas ritmiškai aktyvuojamas priekinės (A), vidurinės (B), užpakalinės (C) kūno dalių kasymosi refleksų ir plaukimo (D) metu. Adaptuota iš (Berkowitz 2008).

1.3.9 paveikslas iliustruoja pavyzdį, kai tas pats neuronas yra ritmiškai aktyvuojamas tiek plaukimo (Paveikslo 1.3.9 D), tiek visų trijų kasymosi refleksų (Paveikslo 1.3.9. A, B, C dalys) metu. Tokie neuronai, kurie aktyvuojami daugiau nei vienos motorinės programos metu dar vadinami daugiafunkciniais (Berkowitz 2010). Įdomu tai, kad dauguma neuronų aktyvuojami toje pačioje šlaunies fazėje visose motorinėse programose (Stein 2005).

Be daugiafunkcinių neuronų vėžlio nugaros smegenų neuronų tinkle aptinkama ir specializuotų neuronų, kurie selektyviai aktyvuojami tik kasymosi reflekso (Berkowitz 2002, Berkowitz 2008) arba tik galūnės atitraukimo reflekso metu (Berkowitz 2007).

### **Laikinė somatosensorinių jėjimų integracija – nugaros smegenų atmintis**

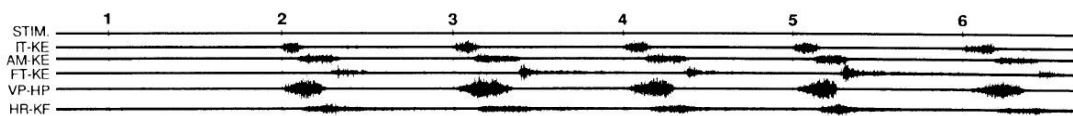
Priklausomai nuo stimulo parametrų motorinė neuronų tinklo programa sukeliama arba ne. Todėl galima manyti, kad neuronų tinklas priima spėdimą reaguojant į tam tikrą stimuliaciją. Jeigu stimulus pakankamai stiprus – į jį



verta reaguoti ir aktyvuoti motorinę programą. Stimulo stiprumui mažėjant neuronų tinklas gali įvertinti kitus stimulo parametrus, pavyzdžiui stimulo pasikartojamumą. Jeigu neuronų tinklą pasiekia vienetinis silpnas stimulus – tai galbūt jis nėra reikšmingas, tačiau jeigu silpnas stimulus pasikartoja didesniu dažniu – tai jis gali būti reikšmingas ir į jį verta reaguoti. Šiam tikslui stimulus reikia sumuoti laike.

Dar Sherrington'as pastebėjo, kad spinalizuoto šuns nugaros smegenų neuronų tinklas integruoja somatosensorinius jėjimus įvykusius rečiau nei 1 sekundė (Sherrington 1906). Šiam tikslui jis elektriškai stimuliuodavo šuns odą, o stimulo stiprumą naudodavo tokį, kad atskiras stimulus būdavo ikislenkstinis – nesukeldavo kasymosi reflekso. Pateikus pirmąjį stimulus – motorinis atsakas nesukeliamas, tačiau pateikus sekantį stimulus po 1,6 sekundės – sukeliamas kasymosi refleksas. Tai parodo, kad vyksta sekundžių eilės somatosensorinių jėjimų laikinė integracija.

Vėžlio nugaros smegenų neuronų tinklas taip pat pasižymi sekundžių eilės laikine somatosensorinių stimulų integracija (Paveikslas 1.3.10) (Crowe and Linnartz 1985, Currie and Stein 1988, Currie and Stein 1990, Currie and Stein 1992, Currie and Lee 1996). Jei pirmasis stimulus yra ikislenkstinis, kad sukeltų motorinį atsaką, bet viršslenkstinis kad aktyvuotų aferentus, tai tokie stimulus sumuojasi juos pateikus net rečiau nei kelios sekundės.



Paveikslas 1.3.10 Viršsekundinė somatosensorinių stimulų integracija.

Somatosensoriniai stimulus pateikiami kas 4 sekundes. Pirmasis (1) somatosensorinis stimulus nesukelia motorinio atsako, o sekantis (2), pateiktas po 4 s jau sukelia motorinį atsaką. Adaptuota iš (Currie and Stein 1988).

Parodyta, kad stimulus sukeliantys somatosensorinės informacijos integraciją, taip pat sukelia ilgai trunkančius neuronų atsakus IN (Currie and Stein 1990). Stimulus, nesukeliantis motorinio atsako, sukelia VP generavimą neuronuose, kuris tęsiasi ženkliai ilgiau (kelios sekundės) nei pats stimulus. Todėl manoma, kad šie ilgai trunkantys neuronų atsakai gali būti somatosensorinės

informacijos integracijos mechanizmas. Taip pat parodyta, kad ilgalaikiai neuronų atsakai į ikislenkstinį stimulą (tuo pačiu ir laikinė integracija) gali būti priklausoma nuo NMDA receptorių (Currie and Stein 1992, Currie and Lee 1996).

Pastebėta, kad neuronų tinklo sužadynamumas keičiasi ne tik somatosensorinių jėimų laikinės integracijos metu, bet ir po motorinio atsako. Sužadynamumas išlieka pakitęs iki kelių/keliolikos sekundžių po kasymosi reflekso (Currie and Stein 1988, Alaburda and Hounsgaard 2003). Pakitęs tinklo sužadynamumas po kasymosi reflekso yra specifiškas sukeltam kasymosi reflekso tipui – jis nesisumuoja su somatosensoriniais jėjimais kitų kasymosi refleksų formų (Currie and Stein 1988). Jeigu prieš tai buvo sukeltas vidurinės kūno dalies kasymosi refleksas ir po jo seka VPP („kišenės“ pilvinis-užpakalinis, *ventral posterior pocket*) nervo (kuris inervuoja receptinius laukus vidurinės kūno dalies kasymosi refleksui sukelti) stimuliacija – tai po VPP stimuliacijos sukeliamas motorinis atsakas. Tačiau, jeigu prieš VPP stimulą vyko priekinės kūno dalies kasymosi refleksas, tai VPP stimuliavimas nesukelia motorinio atsako. Tai parodo, kad tai nėra tiesiog padidėjęs neuronų tinklo sužadynamumas, bet jis specifiškas kiekvienam motorinės programos tipui.

### **Ilgai trunkantis neuronų aktyvumas sukeltas trumpo stimulo**

Neuronai ar jų tinklai pasižymi savybe, kad į trumpą stimulą gali sugeneruoti ilgai trunkantį atsaką. Šis atsakas – tai pastovus neuronų aktyvumo (VP generavimo) pasikeitimas, kuris vyksta ir po stimulo išjungimo (Major and Tank 2004). Ilgai trunkantis neuronų aktyvumas buvo aptiktas įvairiose smegenų srityse pradedant smegenų žieve ir baigiant nugaros smegenimis. Dėl tokio plataus išplitimo CNS manoma, kad šis procesas yra universalus neuronų tinklo mechanizmas leidžiantis „saugoti“ ir kaupti sensorinę ir/arba motorinę informaciją. Kadangi pastovus neuronų aktyvumas „saugo“ informaciją apie prieš tai buvusį stimulą, todėl jis glaudžiai siejamas su trumpalaike arba darbine atmintimi (Aksay, Gamkrelidze et al. 2001, Major and Tank 2004).

Neuronų aktyvumo pasikeitimas, kuris vyksta be pastovaus išorinio stimuliavimo parodo, kad tai vidinė ląstelių arba neuronų tinklo savybė. Šis procesas dažniausiai trunka nuo kelių šimtų milisekundžių iki keliasdešimties sekundžių (Major and Tank 2004).

Paprasčiausias neuronų aktyvumo perėjimas iš vienos stabilios būsenos į kitą vadinamas bistabilumu (Hounsgaard, Hultborn et al. 1984, Kiehn and Eken 1998). Tačiau žinoma, kad neuronų tinklai gali turėti ir daugiau stabilių neuronų aktyvumo būsenų – daugiastabilumas (Aksay, Baker et al. 2000, Aksay, Gamkrelidze et al. 2001). Esant kelioms stabilioms aktyvumo būsenoms, galima „saugoti“ informaciją ir apie stimulo stiprumą ar jo specifiškumą (Major and Tank 2004).

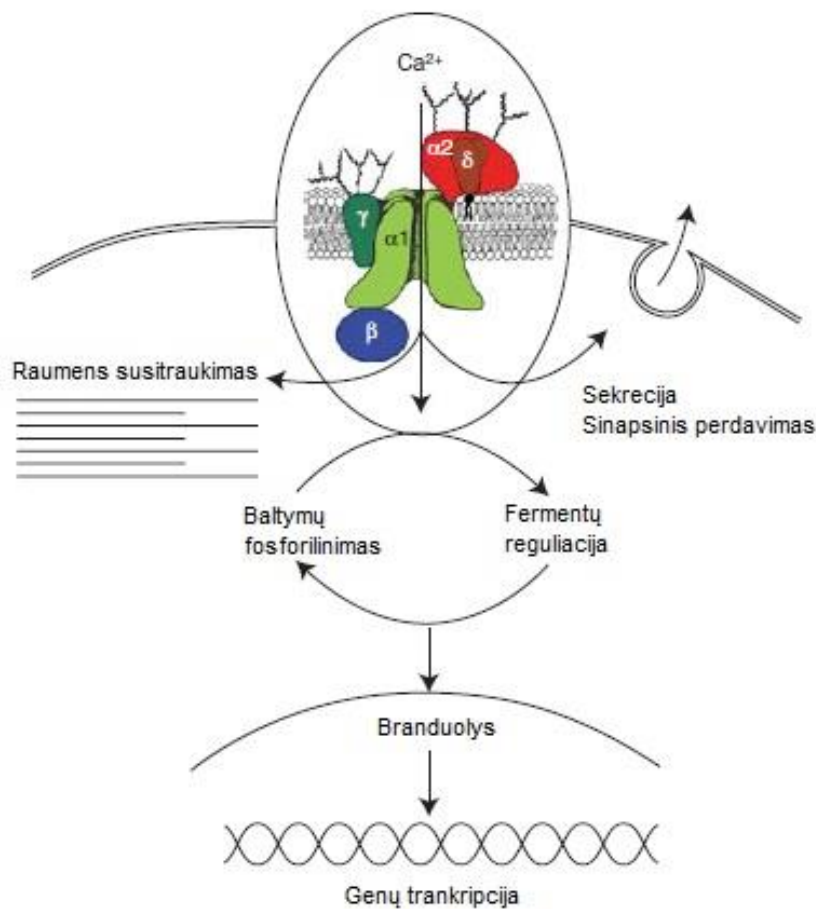
Pastovus neuronų aktyvumas gali būti generuojamas vidinių neuronų savybių (joninių srovių) arba rekurentinio (save žadinantis) neuronų tinklo. Yra trys labiausiai tikėtini viduląsteliniai mechanizmai kurie sukelia pastovų neuronų aktyvumą: nespecifinė katijonų srovė ( $I_{CAN}$ ) (Di Prisco, Pearlstein et al. 1997, Morisset and Nagy 1999, Di Prisco, Pearlstein et al. 2000), pastovi  $Na^+$  srovė (Lee and Heckman 2001, Li, Gorassini et al. 2004), bei L-tipo  $Ca^{2+}$  srovė (Alaburda, Perrier et al. 2002, Perrier, Alaburda et al. 2002). Tiesioginių įrodymų, kad pastovus neuronų aktyvumas yra sukeliamas rekurentinio tinklo, yra nedaug (Aksay, Gamkrelidze et al. 2001, Li, Soffe et al. 2006).

Sekančiame skyriuje bus aptartas vienas iš galimų mechanizmų, kuris sukelia ilgai trunkantį neuronų atsaką į trumpą stimulą – tai kalcio jonų srovė, kurią generuoja L-tipo  $Ca^{2+}$  kanalai.

## 1.4. $\text{Ca}^{2+}$ kanalai, L-tipo $\text{Ca}^{2+}$ srovės, plato potencialai

### Įtampos valdomi $\text{Ca}^{2+}$ kanalai ( $\text{Ca}_V$ ) ir jų generuojamos srovės

Įtampos valdomi  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_V$ ) kanalai – tai didelės įtampos valdomų jonų kanalų superšeimos dalis (Yu, Yarov-Yarovoy et al. 2005). Kalcio jonų patekimas į ląstelę per šiuos kanalus vyksta pasikeitus ląstelės membranos potencialui (depoliarizacija). Kalcio jonų patekimas į ląstelę gali sukelti eilę procesų – nuo raumeninės ląstelės susitraukimo iki genų ekspresijos (Paveikslas 1.4.1) (Catterall 2011).



Paveikslas 1.4.1 Įtampos valdomų kalcio jonų kanalų galimos funkcijos.  
Adaptuota iš (Catterall 2011).

Įtampos valdomi  $\text{Ca}^{2+}$  kanalai sudaryti iš 5 subvienetų, koduojamų skirtingų genų (Catterall 2000, Catterall, Perez-Reyes et al. 2005). Kanalo „šerdis“ yra  $\alpha_1$  subvienetas (Paveikslas 1.4.1) – tai 190-250 kDa baltymas (Catterall 2000, Catterall, Perez-Reyes et al. 2005, Catterall 2011).  $\alpha_1$  subvienetą sudaro 4

domenai (I-IV), kurių kiekvienas turi 6 transmembraninius segmentus (S1-S6). S4 segmentas – įtampos sensorius; porą sudaro S5 ir S6 segmentai ir kilpa tarp jų. Kanalą taip pat sudaro vidinis  $\beta$  subvienetas, transmembraninis  $\delta$  subvienetas, kuris susijungia su  $\alpha_2$  subvienetu ir sudaro  $\alpha_2\delta$  dimerą, bei  $\gamma$  subvienetas.

Remiantis kalio kanalų nomenklatūra 2000 metais buvo sukurta įtampos valdomų  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų nomenklatūra (Ertel, Campbell et al. 2000). Pagal šią nomenklatūrą kanalui vardas suteikiamas pagal tai kokiam jonui šis kanalas laidus (Ca), bei koks pagrindinis šio kanalo reguliatorius ( $\text{Ca}_V$ ) (*voltage*). Po  $\text{Ca}_V$  sekantis skaičius nurodo geno, koduojančio  $\alpha_1$  subvienetą, pošeimį. Šiuo metu yra trys (1-3) pošeimiai. Sekantis skaičius (nuo 1 iki n) žymi eiliškumą pagal  $\alpha_1$  subvieneto aptikimą tame pošeimyje. Remiantis šia nomenklatūra iki šiol nustatyti šie kanalai:  $\text{Ca}_V1.1$  –  $\text{Ca}_V1.4$ ,  $\text{Ca}_V2.1$  –  $\text{Ca}_V2.3$ ,  $\text{Ca}_V3.1$  –  $\text{Ca}_V3.3$  (viso 10).

$\text{Ca}_V1$  kanalų pošeimis generuoja L-tipo kalcio jonų srovę. Šiai srovei būdingas aukštas aktyvavimo slenkstis (ją aktyvuoti reikia stiprios depoliarizacijos) ir lėtos aktyvacijos ir inaktivacijos kinetikos (Nowycky, Fox et al. 1985, Catterall 2000, Perrier, Alaburda et al. 2002, Catterall, Perez-Reyes et al. 2005). Nervų sistemoje aptinkami tik  $\text{Ca}_V1.2$  ir  $\text{Ca}_V1.3$  kanalai (Catterall 2000).  $\text{Ca}_V1$  kanalų specifiniai blokatoriai – dihidropiridiniai (*dihydropyridines*), fenylalkylaminai (*phenylalkylamines*) ir benzodiazepinai (*benzothiazepines*) (Reuter 1983, Catterall 2011).

### **Plato potencialai generuojami L-tipo kalcio jonų srovių**

Trumpas Ia aferentų (tai pirminiai aferentai iš raumens verpsčių) stimuliavimas gali sukelti ilgai trunkantį tos pačios grupės (arba sinerginių) raumenų aktyvumą (Hultborn, Wigstrom et al. 1975). Šio tyrimo metu buvo padaryta išvada, kad tokiu būdu yra suaktyvinamas rekurentinis (save žadinantis) neuronų tinklas. Tačiau vėlesni eksperimentai parodė, kad ilgai trunkantis MN aktyvumas vyksta dėl viduląstelių neuronų mechanizmų (Hounsgaard, Hultborn et al. 1984). Šios išvados prieita, nes toks pat ilgas MN aktyvumas

gali vykti ir įleidus trumpą depoliarizuojančios srovės impulsą į neuroną (Paveikslas 1.4.2).



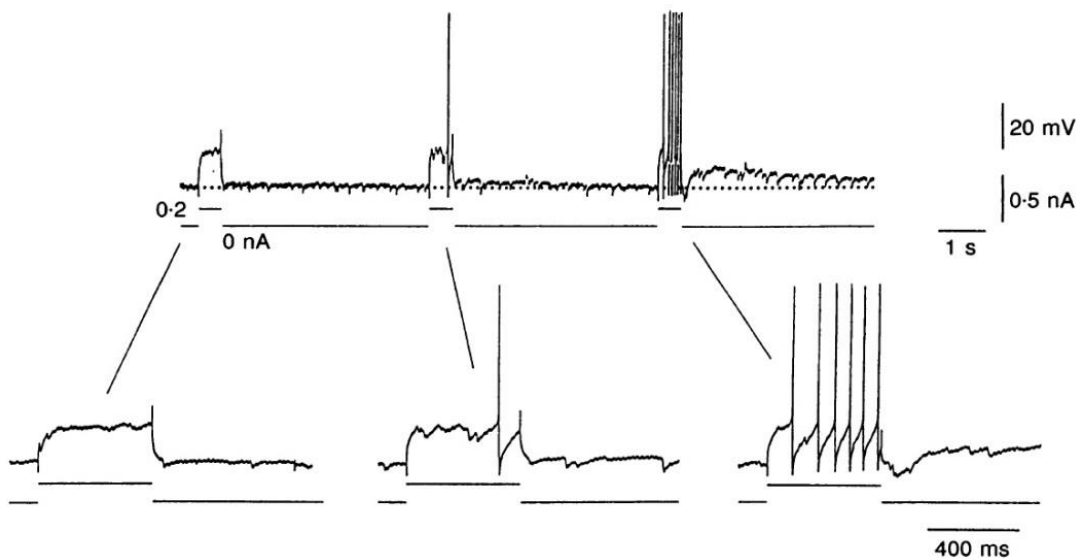
Paveikslas 1.4.2 MN atsakas į trumpą depoliarizuojančios srovės impulsą.  
Adaptuota iš (Hounsgaard, Hultborn et al. 1984).

Iš paveikslo 1.4.2 matome, kad MN iš vienos stabilios būsenos (ramybė, nėra VP) pereina į kita stabilią būseną (nuolatinis VP generavimas). Toks dviejų būsenų buvimas dar vadinamas bistabilumas. Antros stabilios būsenos metu neurono  $V_m$  depoliarizuojasi ir išlieka depoliarizuotas po stimulo nutraukimo. Tokia ilga neurono depoliarizacija dar vadinama plato (stabilus, pastovus) potencialu. 1.4.2 paveiksle plato potencialas – tai būseną kai generuojami VP po srovės impulso nutraukimo.

Plato potencialai aptikti ne tik katės (Hounsgaard, Hultborn et al. 1988, Bennett, Hultborn et al. 1998), bet ir vėžlio (Hounsgaard and Mintz 1988), pelės (Carlin, Jones et al. 2000), bei varlės MN (Perrier and Hounsgaard 2000, Perrier and Tresch 2005). Taip pat plato potencialai aptikti vėžlio (Hounsgaard and Kjaerulff 1992, Russo and Hounsgaard 1994) ir žiurkės (Morisset and Nagy 1996, Morisset and Nagy 2000) IN. Yra netiesioginių įrodymų, kad plato potencialai būdingi ir žmogaus MN (Kiehn and Eken 1997, Collins, Burke et al. 2001).

Jau ankstyvųjų tyrimų metu buvo pastebėta, kad plato potencialai sukeliama įtekančių  $Ca^{2+}$  srovių (Hounsgaard and Kiehn 1985), o šios  $Ca^{2+}$  srovės blokuojamos dihidropiridinais (Hounsgaard and Mintz 1988, Hounsgaard and

Kiehn 1989, Morisset and Nagy 1996, Svirskis and Hounsgaard 1997). Šie rezultatai parodo, kad plato potencialai generuojami L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  srovių ( $\text{Ca}_v1$  kanalų pošeimis), o imunohistocheminiai tyrimai patvirtino, kad šią srovę sukelia  $\text{Ca}_v1.3$  kanalai (Carlin, Jones et al. 2000, Simon, Perrier et al. 2003). Buvo pastebėta, kad pateikiant stimulus kas kaletą sekundžių, stimulo sukeltos depoliarizacijos (plato potencialai) gali sumuotis. Toks mechanizmas dar vadintas „išsiūbavimu“ (*wind-up*). L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų sukeltos srovės gali sumuotis ir nevykstant realiai  $V_m$  depoliarizacijai (Paveikslas 1.4.3) (Russo and Hounsgaard 1994, Russo and Hounsgaard 1996).



Paveikslas 1.4.3 Atsako į stimulą didėjimas „apšylant“. Adaptuota iš (Russo and Hounsgaard 1996).

Iš paveikslo 1.4.3 matome, kad po srovės impulso membranos potencialas ženkliai nesikeičia, bet atsakas į srovės impulsą didėja. Tai parodo, kad sumacija vyksta ne dėl tiesioginės  $V_m$  depoliarizacijos. Toks reiškinys dar vadinamas „apšilimu“ (*warm-up*) (Russo and Hounsgaard 1996, Bennett, Hultborn et al. 1998). Manoma, kad kanalai generuojantys plato potencialus turi daugiau nei vieną uždara būseną. Trumpas neurono aktyvavimas leidžia kanalams iš vienos uždaros būsenos pereiti į kitą, kuri yra labiau linkusi atsidaryti (Delgado-Lezama and Hounsgaard 1999, Alaburda, Perrier et al. 2002). Išsiūbavimas ir apšilimas galimi kai tarp stimulų net kelių sekundžių intervalai.

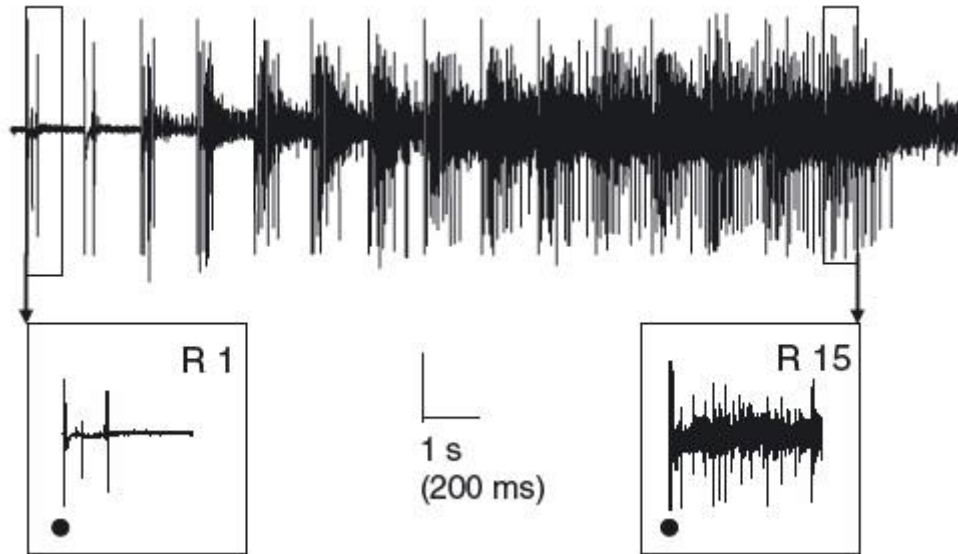
Pirmųjų plato potencialų tyrimų metu buvo manoma, kad juos generuojantys kanalai išsidėstę ant ląstelės kūno. Tačiau selektyviai aktyvuojant dendritus (Hounsgaard and Kiehn 1993, Delgado-Lezama, Perrier et al. 1999) prieita išvados, kad plato potencialai generuojami  $Ca^{2+}$  kanalų išsidėsčiusių dendrituose. Be to vėliau tai buvo patvirtinta ir imunohistocheminiais tyrimais (Carlin, Jones et al. 2000, Simon, Perrier et al. 2003).

Sekantis svarbus aspektas kalbant apie plato potencialus yra metabotropinė moduliacija. Spinalizuotuose preparatuose plato potencialų nėra, o pridėjus serotonino pirmtako (5-hidroksi-triptofano) vėl sukeliama plato potencialai (Hounsgaard, Hultborn et al. 1984, Hounsgaard, Hultborn et al. 1988). Tai parodo, kad plato potencialų sukėlimui reikalinga aktyvuoti serotonino receptorius. Vėliau buvo parodyta, kad plato potencialus sukelia ne tik serotonino, bet ir metabotropinių glutamato, noradrenalino, bei muskarininių acetilcholino receptorių aktyvavimas (Svirskis and Hounsgaard 1998, Alaburda, Perrier et al. 2002).

### **Atsako „įsiūbavimas“ ir skausmo sensitizacija**

Pakartotinai stimuliuojant nemielinizuotas C tipo skaidulas (skausmo aferentai) sukiamas atsako didėjimas nugaros smegenų nugarinio rago neuronuose (*dorsal horn neurons* DHN) (Woolf and Wall 1986). Šis fenomenas – DHN atsako didėjimas į pakartotinį aferentų stimuliavimą vadinamas „įsiūbavimu“ (Mendell 1966). Vėliau šis terminas panaudotas ir vėžlio neuronų plato potencialams ir jų savybėms aprašyti. Parodyta, kad šis DHN įsiūbavimas sukelia skausmo sensitizaciją – skausmo receptinio lauko didėjimą, bei skausmo slenksčio mažėjimą (Li, Simone et al. 1999). Priimta, kad įsiūbavimas vyksta WDR (plataus dinaminio diapazono, *wide dynamic range*) neuronuose, kurie gauna jėgimus ir iš skausmo, ir ne skausmo aferentų (Fossat, Sibon et al. 2007). Įsiūbavimo pavyzdys pateiktas Paveiksle 1.4.4.





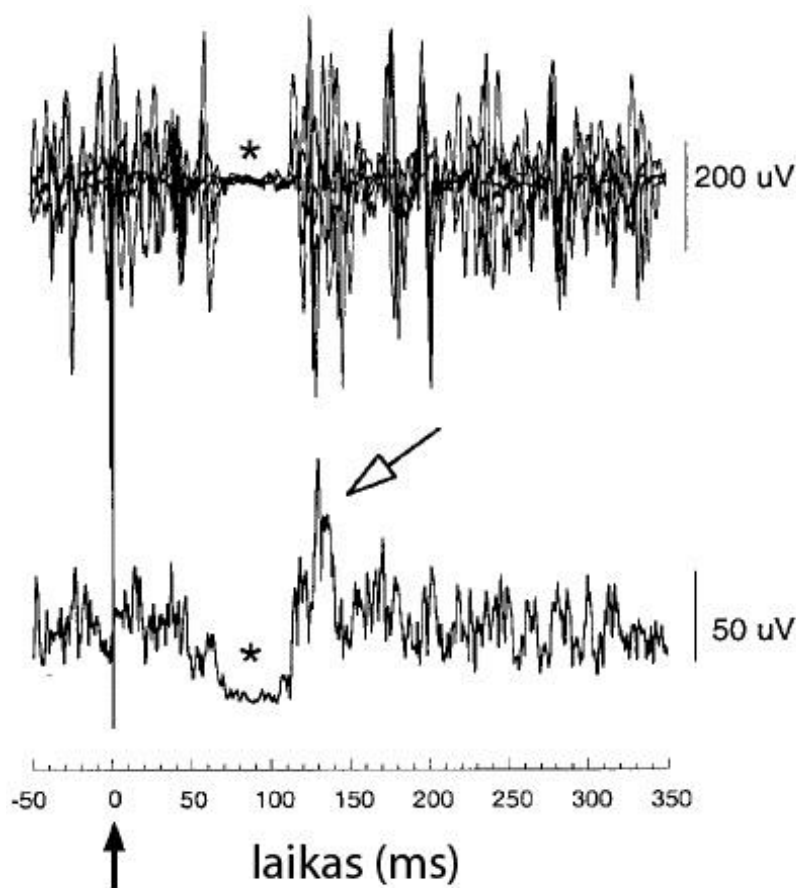
Paveikslas 1.4.4 Atitraukimo reflekso įsiūbavimas. Atitraukimo refleksas (EMG atsakas) didėja pakartotinio stimuliavimo metu. R1 – atsakas į pirmą stimulą; R15 – atsakas į 15-tą stimulą. Stimulai pateikiami vienodo stiprumo. Adaptuota iš (Fossat, Sibon et al. 2007).

Šio įsiūbavimo mechanizmas nėra pilnai ištirtas. Įsiūbavimas apjungia tiek NMDA ir neurokinino receptorių aktyvavimą (Baranauskas and Nistri 1996, Baranauskas and Nistri 1998, Fossat, Sibon et al. 2007), tiek viduląstelinis mechanizmus (L-tipo kalcio jonų srovę) (Morisset and Nagy 1996, Morisset and Nagy 2000). Manoma, kad atsako įsiūbavimas vyksta NMDA (ir/arba neurokinino) receptoriams aktyvavus L-tipo  $Ca^{2+}$  kanalus (Fossat, Sibon et al. 2007).

Vėžlio nugaros smegenų nugarinio rago neuronai taip pat pasižymi atsako įsiūbavimu (Russo and Hounsgaard 1994, Russo and Hounsgaard 1996). Tai L-tipo  $Ca^{2+}$  sukeliamas neurono sužadimumo padidėjimas. Gali būti, kad šie vėžlio nugaros smegenų nugarinio rago neuronai atitinka WDR neuronus plačiai tirtus žinduoliuose. O mechanizmai sukeliantys „įsiūbavimą“ skirtingose sistemose gali būti taip pat panašūs.

### 1.5. Somatosensorinis tylos periodas – CSP

Somatosensorinių aferentų sudirginimas sukelia įvairius atsakus stebimus galūnės raumenyse (Caccia, McComas et al. 1973). Vienas iš tokių atsakų – motorinio aktyvumo slopinimas po skausmingo stimulo (Hoffmann 1922, Higgins and Lieberman 1968). Šis atsakas pavadintas somatosensoriniu tylos periodu (CSP – *cutaneous silent period*) (Uncini, Kujirai et al. 1991, Shefner and Logigian 1993). Tipinis CSP atsakas pavaizduotas Paveiksle 1.5.1.



Paveikslas 1.5.1 Raumens aktyvumo slopinimas (\*) po elektrinio stimulo (juoda rodyklė). Viršuje raumens elektromiogramos (EMG) signalas, o apačioje rektifikuotas EMG. Adaptuota iš (Floeter 2003).

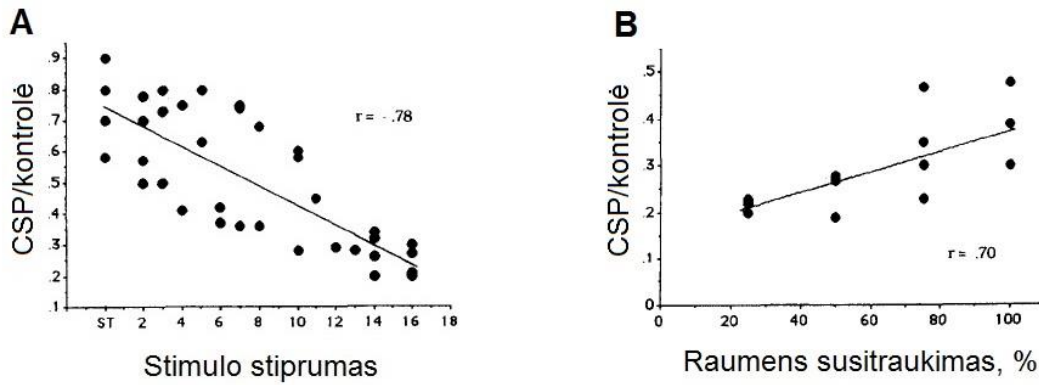
CSP dažniausiai tiriamas žmonių galūnių raumenyse pastovaus raumens aktyvumo metu – tiriamajam liepiama generuoti tam tikrą pastovų raumens aktyvumą (paprastai nuo 20% iki 80% maksimalaus) (Floeter 2003) ir tada pateikiamas stimulus. Po stimulo pateikimo stebimas motorinio atsako slopinimas (Paveikslo 1.5.1 viršutinė dalis). Norint įvertinti laikinius CPS

parametrus EMG aktyvumas paprastai rektifikuojamas ir vidurkinamas. Rektifikacija – tai neigiamų verčių pavertimas teigiamomis (kėlimas kvadratu). Rektifikacijos metu teigiamos vertės lieka tokios pačios, o neigiamos vertės paverčiamos teigiamomis. CSP latencija ir trukmė nustatoma, kai EMG signalas kerta 50% (Manconi, Syed et al. 1998, Serrao, Parisi et al. 2001) arba 80% (Inghilleri, Cruccu et al. 1997, Rodi and Springer 2011) bazinės EMG aktyvumo linijos.

Pastebėta, kad sustimulivus tam tikrą somatosensorinį nervą (dažniausiai naudojami pirštų nervai), CSP atsakas sukiamas įvairiuose raumenyse (Uncini, Kujirai et al. 1991, Inghilleri, Cruccu et al. 1997, Leis, Stokic et al. 2000). Po CSP dažnai stebimas EMG intensyvumo padidėjimas, kuris viršija net bazinę EMG liniją (balta rodyklė Paveiksle 1.5.1) (Kumru, Opisso et al. 2009). Manoma, kad šis motorinio atsako padidėjimas atsiranda dėl MN sinchroniško aktyvavimosi po slopinimo (Kranz, Adorjani et al. 1973).

Yra priimta, kad CSP sukiamas stimuliuojant stipriu stimulu, kuris aktyvuoja A $\delta$  (skausmo) nervines skaidulas (Shefner and Logigian 1993, Logigian, Plotkin et al. 1999, Romaniello, Truini et al. 2004). Tačiau yra žinoma, kad silpnesnis CSP sukiamas ir mažesnio stiprumo stimulais (Uncini, Kujirai et al. 1991, Serrao, Parisi et al. 2001). Šiam nuomonių išsiskyrimui galimi du paaiškinimai: arba dalis CSP sukiamama aktyvavus A $\beta$  (ne skausmo) skaidulas, arba ir neintensyvūs stimulai aktyvuoja dalį A $\delta$  skaidulų kurios ir sukelia dalinį CSP.

Pastebėta, kad CSP laikiniai parametrai (latencija ir trukmė) ir slopinimo intensyvumas priklauso nuo naudojamo stimulo intensyvumo (Uncini, Kujirai et al. 1991, Shefner and Logigian 1993, Leis, Stokic et al. 2000, Serrao, Parisi et al. 2001, Kofler 2003). Pavyzdžiui didinant stimuliavimo intensyvumą sukiamas stipresnis CPS (Paveikslo 1.5.2 A dalis).



Paveikslas 1.5.2 CSP stiprumo priklausomybė nuo naudojamo stimulo stiprumo. ST – sensorinis slenkstis. Tai stimulo stiprumas kai tiriamasis jaučia pateiktą stimulą. Adaptuota iš (Uncini, Kujirai et al. 1991).

CSP parametrai taip pat priklauso ir nuo valingo raumens sutraukimo stiprumo (Paveikslas 1.5.2 B) (Uncini, Kujirai et al. 1991). Kuo raumuo sutraukiamas stipriau – tuo mažiau išreikštas CSP sukiamas. Taip pat pastebėta, kad sukulto CSP parametrai priklauso nuo stimuliuojamo somatosensorinio nervo ir tiriamo raumens (Inghilleri, Cruccu et al. 1997, Leis, Stokic et al. 2000, Kofler 2003).

CSP yra generuojamas nugaros smegenų neuronų tinklų (Logigian, Plotkin et al. 1999). Manoma, kad šis kompleksinis refleksas, kuris apjungia atsaką sinerginiuose raumenyse atsakinguose už sugriebimą (Leis, Stokic et al. 2000) gali būti naudojamas kaip apsauginis mechanizmas (Inghilleri, Cruccu et al. 1997). Pavyzdžiui užčiuopus karštą ar aštrų objektą atitinkami raumenys (aktyvūs sugriebimo metu) yra slopinami.

Neuronų tinklas generuojantis CSP nėra aiškus, o dėl mechanizmo sukeliančio CSP yra diskutuojama (Floeter 2003). Galimi šie CSP mechanizmai: MN slopinimas, žadinančių priešmotorinių neuronų slopinimas arba šių mechanizmų kombinacija. Yra netiesioginių įrodymų, kad MN CSP metu yra slopinami (Inghilleri, Cruccu et al. 1997, Manconi, Syed et al. 1998). Tačiau kitų tyrimų metu parodyta, kad MN sužadynamumas CSP metu nesumažėja, kas paneigtą MN slopinimą (Leis, Stetkarova et al. 1995, Leis, Stetkarova et al. 1996). Dėl metodinių apribojimų (negalima viduląstelinė registracija iš MN) mechanizmo sukeliančio CSP klausimas lieka atviras.

Dėl paprasto CSP sukėlimo ir matavimo, pastaraisiais metais jį stengiamasi pritaikyti ir diagnostikai – juo stengiamasi įvertinti periferinių nervų ir/arba nugaros smegenų neuronų tinklo būklę (Svilpauskaite, Truffert et al. 2006, Onal, Ulas et al. 2010, Leis, Kofler et al. 2011, Oz, Erdogan et al. 2011, Pujia, Coppola et al. 2012). Tikėtina, kad CSP naudojimas diagnostikoje dar labiau paplistų jeigu būtų aiškus jį sukeliantis mechanizmas.

## **2. Metodika**

### **2.1. Etikos leidimas**

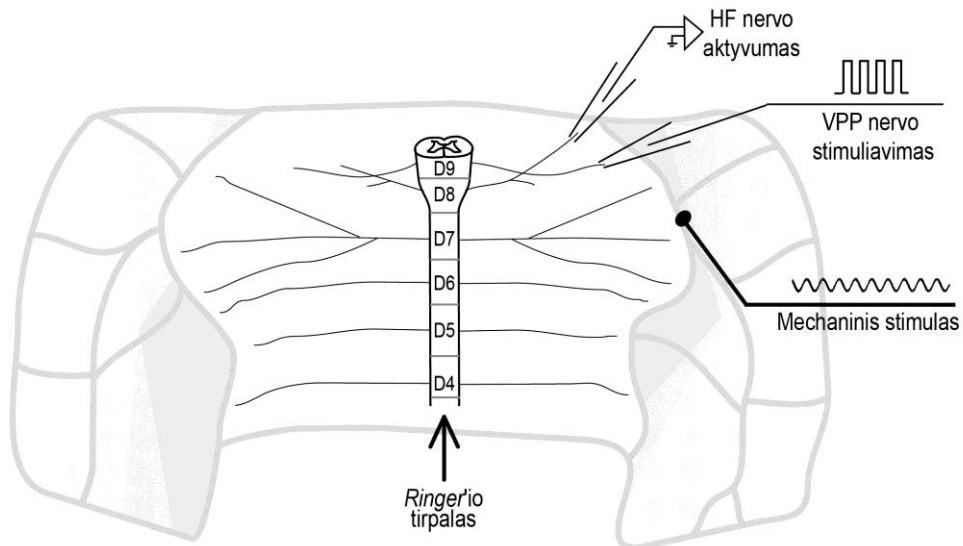
Eksperimentai atlikti Kopenhagos universitete, *neuronal signalling* laboratorijoje ir Vilniaus universitete, neurobiologijos ir biofizikos katedroje.

Danijoje visos chirurginės procedūros atliktos pagal Danijos valstybės teisės aktus ir patvirtintos Danijos Teisingumo Ministerijos. Lietuvoje eksperimentai atlikti gavus Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimą (nr. 0240).

### **2.2. Preparato paruošimas**

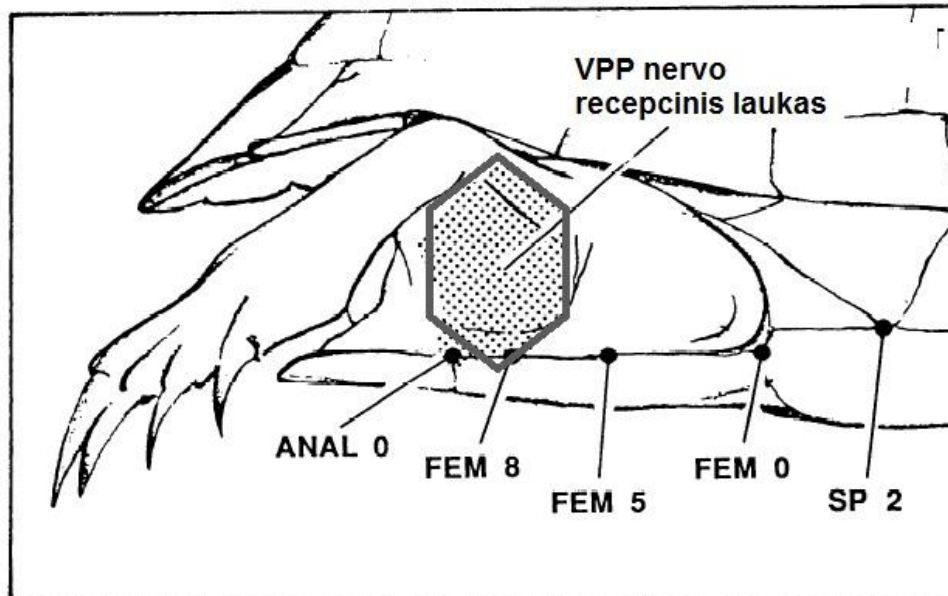
Raudonausiai vėžliai (n=68) (*Chrysemys scripta elegans*), kurių šarvo ilgis 10-15 cm buvo įsigyti iš Nasco, Fort Atkinsonas, Viskonsinas, JAV. Prieš chirurginę operaciją vėžlys dviem valandom padedamas ant ledo (Melby and Altman 1974, Lennard and Stein 1977), kad sulėtinti jo metabolizmą ir sukelti mieguistumą. Hipotermija norima sumažinti gyvūno stresą ir galimą skausmą. Vėžlį atvėsinus, jo galva ištraukiama iš kiauto. Vėžlys dekapituojamas, o galvos smegenys mechaniškai suardomos. Pilvinėje vėžlio šarvo dalyje oscilaciniu pjūklau išpjaujama ertmė pro kurią įvedamas kateteris į širdį. Perfuzijos būdu kraujas pakeičiamas *Ringer*'io tirpalu, kurio cheminė sudėtis (mM): 120 NaCl; 5 KCl; 15 NaHCO<sub>3</sub>; 2 MgCl<sub>2</sub>; 3 CaCl<sub>2</sub>; 20 gliukozės ir prisotintas dujų mišiniu (98% O<sub>2</sub> ir 2% CO<sub>2</sub>), kad pasiekti pH 7.6.

Tyrimuose buvo naudojamas integruotas vėžlio nugaros smegenų-šarvo preparatas (Paveikslas 2.2.1). Pirmiausia skersiniais pjūviais izoliuojama vėžlio šarvo dalis su funkcionalių neuronų tinklu. Pjūviai atliekami priekinėje (ties D3 arba D4 segmentu) ir užpakalinėje (ties D9 arba S2 segmentu) nugaros smegenų dalyje. Motorinis nervas, įnervuojantis šlaunį sulenkiantį raumenį (*puboischiofemoralis internus, pars anteroventralis*) – HF (*hip flexor*), atskiriamas nuo jungiamųjų audinių, kad būtų galima jį prisiurbti registruojamu elektrodu.



Paveikslas 2.2.1 Integruotas vėžlio nugaros smegenų-šarvo preparatas. Stimuliuojant mechaniškai receptinius laukus arba elektriškai somatosensorinį VPP nervą sukliamas kasymosi refleksas kuris gali būti stebimas registruojant motorinio nervo (HF) elektroneurogramą.

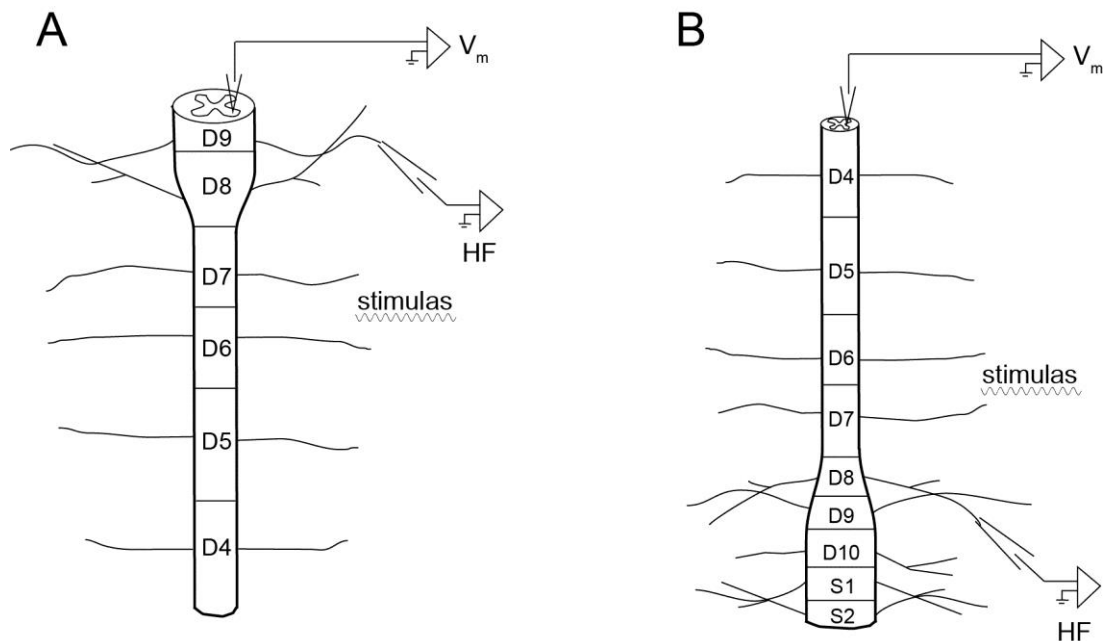
Dalyje eksperimentų taip pat atskiriamas ir somatosensorinis nervas, kurį stimuliuojant elektriškai sukliamas kasymosi refleksas (Paveikslas 2.2.1). Iš literatūros yra žinoma, kad tai VPP (*ventral posterior pocket*) somatosensorinis nervas įnervuojantis dalį odos netoli užpakalinės galūnės (Paveikslas 2.2.2) (Currie and Stein 1988).



Paveikslas 2.2.2 Vėžlio užpakalinė galūnė ir periferijos sritis aplink ją. Pilkame fone pavaizduotas odos plotas įnervuojamas VPP somatosensorinio nervo. Adaptuota iš (Currie and Stein 1988).

Vidulasteliniam neuronų registravimui buvo naudojami skirtingi preparatai (Paveikslas 2.2.3). Preparato vienas kraštas priklijuojamas prie organinio stiklo platformos, o platforma įtvirtinama laikiklyje. Priklausomai nuo to kokie neuronai buvo registruojami, preparato kaudalinis (Paveikslas 2.2.3 A) arba rostralinis (Paveikslas 2.2.3 B) kraštas klijuojamas prie platformos ir nukreipiamas į viršų. Toks preparato vertikalus įtvirtinimas leidžia vizualizuoti nugaros smegenų skersinio pjūvio plokštumą. Kitoje (apatinėje) nugaros smegenų kanalo pusėje įtvirtinamas plastiko vamzdelis pro kurį preparatas visą eksperimento laiką perfuzuojamas *Ringer*'io tirpalu.





Paveikslas 2.2.3 Vėžlio nugaros smegenų-šarvo preparatas naudojamas MN (A) ir neuronų iš krūtininių nugaros smegenų segmentų (B) viduląstelinei registracijai. Neuronai registruojami skersinio nugaros smegenų pjūvio plokštumoje.

Neuronų tinklo redukcijos eksperimentuose vėžlio nugaros smegenų-šarvo preparatas įtvirtinamas horizontaliai, nugarinę šarvo dalį priklijuojant prie vonelės dugno, o vonelė įtvirtinama laikiklyje. Prieš eksperimentą pašalinamas kaulas supantis D3-D5 nugaros smegenų segmentus, kad vėliau juos būtų galima lengvai juos pašalinti. Kaudalinėje preparato dalyje įtvirtinamas plastikinis vamzdelis pro kurį nugaros smegenys perfuzuojamos *Ringer*'io tirpalu, o pats preparatas panardinamas į *Ringer*'io tirpalą.

### 2.3. Stimuliavimas

Kasymosi refleksui (ritmiškas motorinio HF nervo aktyvumas) sukelti buvo naudojama somatosensorinio VPP nervo (Currie and Stein 1988) elektrinė stimuliacija. Nervas stimuliuojamas prisiurbimo elektrodo pagalba. Elektrinis somatosensorinio nervo stimuliavimas naudotas sukelti ir kasymosi refleksui, ir somatosensoriniam tylos periodui (CSP).

Atitinkamai parenkant elektrinio stimuliavimo parametrus (stimuliavimo dažnį ir stimulo amplitudę) galima sukelti kasymosi refleksą gradualiai (Currie and

Stein 1988, Currie and Stein 1990). Eksperimentų metu stimulo intensyvumas buvo parenkamas toks, kad nervą stimuliuojant  $\geq 0.2$  Hz dažniu būdavo sukiamas gradualus kasymosi refleksas, o stimuliavimo dažnį sumažinus iki  $< 0.05$  Hz kasymosi refleksas nebuvo sukiamas. CSP tyrimams buvo naudojamas toks pat stimuliavimo intensyvumas, o stimuliavimo dažnis sumažinamas iki  $< 0.05$  Hz, kad nesukelti kasymosi reflekso.

Kasymosi refleksas buvo sukiamas ir mechaniniu stimulu – pincetu sužnybiant odą prie užpakalinės galūnės. Tam kad tiksliai kontroliuoti mechaninį stimulą, buvo stimuliuojama su nugludinta stikline lazdele pritvirtinta prie garsiakalbio membranos, kuris valdomas funkcinio signalo generatoriumi (Rosenberg 1986, Alaburda and Hounsgaard 2003). Naudotas 1 arba 2 Hz dažnio sinuso formos stimulus. Toliau paveikslų apačioje pažymina koks stimulus buvo naudotas.

Eksperimentuose sukiant vidurinės kūno dalies kasymosi refleksą (Mortin, Keifer et al. 1985) buvo stimuliuojama M9,5 dermatoma, kurią įnervuoja D7 nugaros smegenų segmento aferentai (Mortin and Stein 1990). Eksperimentuose sukiant vidurinės kūno dalies kasymosi refleksą (Mortin, Keifer et al. 1985) buvo stimuliuojama M8,5 dermatoma, kurią įnervuoja D6 nugaros smegenų segmento aferentai (Mortin and Stein 1990).

#### **2.4. Registracija**

Viduląstelinė neuronų registracija buvo atliekama naudojant aštrius elektrodus, pagamintus iš plonasienio borosilikatinio stiklinio vamzdelio ir užpildytus elektrodų tirpalu: 0.9 M  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$  ir 0.1 M KCl. MN registracijai buvo naudojami elektrodai, kurių varža apie 40-50  $\text{M}\Omega$ , o IN atveju – 50-60  $\text{M}\Omega$ . Eksperimentuose vizualizuojant IN į elektrodų tirpalą buvo pridedama 2% *biocytin*'o.

Neuronai buvo registruojami taikant srovės fiksavimo (*current-clamp*) metodą. Šiam tikslui buvo naudojamas Multiclamp 700B stiprintuvas (Molecular Devices). Mikroskopo pagalba preparate lengvai matoma skersinė nugaros smegenų plokštuma, todėl galima buvo vizualiai parikti elektrodų įvedimo

vietą. Elektrodai buvo įvedami į pilvinius ragus (*ventral horn*) (MN ir IN registracijai) ir atskirais atvejais į tarpinę pilkosios medžiagos dalį (*intermedium zone*) (IN registracijai). MN buvo pasirinkti tolimesnei analizei tik tada jeigu jų membranos ramybės potencialas buvo stabilus ir neigiamesnis už -50mV. Daugelis IN sponataniškai generuodavo VP, todėl į ląsteles papildomai buvo įleidžiama pastovi neigiama srovė sumažinti spontaniinį VP aktyvumą.

Matuojami bioelektriniai signalai buvo diskretizuojami 10 arba 20 kHz dažniu naudojant Digidata 1440 arba Digidata 1322A analogas-kodas keitiklį (Molecular Devices). Signalų atvaizdavimui naudojama Axoscope ir Clampex programinės įrangos (Molecular Devices). Duomenys buvo įrašomi į kietąjį diską tolimesnei analizei.

HF motorinio nervo elektroneurograma (ENG) buvo registruojama Iso-DAM8 stiprintuvu (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) naudojant prisiurbimo elektrodą. Registruojamų dažnių juosta 100 Hz – 1 kHz, stiprinimas  $\times 10^4$  kartų.

## **2.5. Neuronų vaizdinimo protokolas**

Neuronų vaizdinimui ir jų aksonų identifikavimui buvo naudojamas konfokalinis mikroskopas Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss, Vokietija) su operacine sistema Zeiss Zen 2010 (Carl Zeiss, Vokietija).

Neuronų dažymas buvo atliekamas pagal *neuronal signalling* laboratorijos (Kopenhagos universitetas) metodiką. Neuronas registracijos metu užpildomas *biocytin*‘u pro elektrodą 5-20 min. į neuroną leidžiant teigiamos srovės (100-500 pA) impulsus (250 ms trukmės, 2 Hz dažnio). Po elektrofiziologinio eksperimento, nugaros smegenų D4-D5 segmentai su neuronais užpildytais *biocytin*‘u išimami iš preparato ir patalpinami į 4% paraformaldehido (*paraformaldehyde*) PBS (*phosphate buffered saline*) tirpalą ir laikomi 24-48 valandas 4°C temperatūroje. Po to nugaros smegenų dalis tris kartus praskalaujama PBS tirpalu ir jame patalpinama.

Sekančiame etape nugaros smegenys skalpeliu perpjaunamos išilgai per pusę. Nugaros smegenų puselė vidiniu kraštu priklijuojama prie agaro pagrindo ir nugaros smegenų pjaustykle/vibrotomu (VT 1000 S, Leica, Wetzlar, Vokietija) supjaustoma į 100 µm storio išilgines riekeles.

Paruoštos nugaros smegenų riekelės patalpinamos į *blocking buffer* tirpalą su *Cyanine-3* sujungto su *streptavidin*‘u ir paliekamos šaldytuve per naktį. *Blocking buffer* – tai 5% *donkey* serumas PBS-T tirpale (PBS su 0.3% Triton X-100). *Streptavidin*‘as – tai molekulė pasižyminti dideliu afiniškumu *biocytin*‘ui. *Cyanine-3* – tai fluorescencinis dažas, kurio sužadavimo/emisijos bangos ilgiai atitinkamai 550/570 nm. Po inkubacijos riekelės praskalaujamos PBS tirpalu ir įtvirtinamos ant objektinio stiklelio pridodant *ProLong® Gold* reagento (Invitrogen Molecular Probes, USA), kuris stabdo fluorescencinio dažo fotoblukimą.

## **2.6. Duomenų analizė**

### **CSP laikiniai parametrai**

ENG įrašo fragmentai su CSP (200 ms prieš stimulą ir 300 ms po stimulo) buvo atrinkti kai stimulus buvo pateiktas motorinio nervo aktyvumo metu. Kiekybiniam CSP identifikavimui mažiausia 20 ENG fragmentų su CSP buvo rektifikuoti ir paskaičiuotas jų vidurkis. Rektifikacija – tai duomenų vėrčių pakėlimas kvardatu ir kvardatinės šaknies paskaičiavimas. Bazinė linija nustatoma kaip 100 ms ENG signalo vidurkis prieš stimulą (nuo 50 iki 150 ms). CSP pradžia ir pabaiga laikomas momentas kai suvidurkintas ir rektifikuotas ENG signalas kerta 80% bazinės linijos (Inghilleri, Cruccu et al. 1997, Rodi and Springer 2011). CSP latencija – tai laikas nuo stimulo pateikimo iki CSP įsijungimo, o CSP trukmė – laikas nuo CSP pradžios iki CSP pabaigos.

### CSP intensyvumo parametrai

CSP intensyvumas buvo įvertinamas slopinimo indeksu (SI), santykiu rektifikuoto ENG CSP metu ir prieš stimulą (bazinė linija) (Rodi and Springer 2011).

ENG aktyvumo padidėjimas po CSP buvo įvertintas kaip rektifikuoto ENG aktyvumas 50 ms po CSP pabaigos. Aktyvumo padidėjimo stiprumas įvertintas kaip IR (*rebound* indeksas), tai yra santykis rektifikuoto ENG padidėjimo metu ir prieš stimulą (bazinė linija) (Kumru, Opisso et al. 2009).

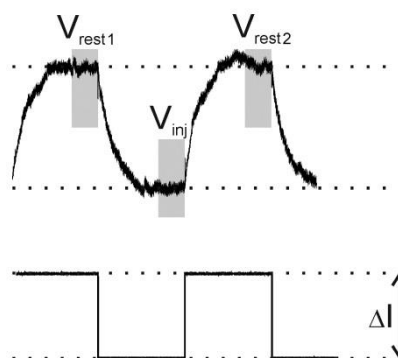
### Membranos laidumas

MN membranos laidumas ramybėje ir CSP metu buvo apskaičiuotas iš mažiausiai 3 atsakų, kurių metu per mikroelektrodą į neuroną buvo įleidžiama skirtingo stiprumo nuolatinė srovė. Laidumas įvertintas iš srovės – membranos potencialo (I-V) kreivės kiekvienam 0,1 ms laiko momentui.

MN (ir IN) membranos laidumas buvo įvertinamas iš  $V_m$  nuokrypio sukkelto įleidžiant neigiamos srovės impulsus. 250 ms trukmės srovės impulsai pateikiami 2 Hz dažniu, o 100 ms trukmės srovės impulsai – 5 Hz dažniu. Laidumas skaičiuojamas pagal formulę:

$$g = \frac{\Delta I}{V_{inj} - \left( \frac{V_{rest1} + V_{rest2}}{2} \right)}$$

Formulė 2.6.1 Kintamieji formulėje atitinka pavaizduotus 2.6.1 paveiksle.



Paveikslas 2.6.1 Neuronų laidumo skaičiavimo schema. Į neuroną įleidžiami neigiamos srovės impulsai (apačioje), kurie sukelia membranos potencialo ( $V_m$ ) nuokrypius (viršuje).

Membranos potencialas skirtingais laiko momentais ( $V_{rest1}$ ,  $V_{rest2}$ ,  $V_{inj}$ ) įvertinamas kaip 100 ms momentinio  $V_m$  vidurkis. Neigiamos membranos laidumo vertės ir 10 kartų didesnės vertės nei ramybės fazėje buvo laikomos artefaktais ir neįtraukiamos į tolesnius skaičiavimus.

### **Vidutinis membranos potencialas ( $V_m$ )**

Skirtingose būsenose (ramybė, po pirmojo elektrinio stimulo ir pan.) membranos potencialas buvo įvertinamas kaip momentinio  $V_m$  vidurkis per 0,5 s.

### **Sužadynamumas**

MN sužadynamumas buvo vertinamas leidžiant į neuroną 250 ms trukmės teigiamus srovės impulsus 2 Hz dažniu. Įleidžiamų impulsų stiprumas kiekvienam MN parenkamas individualiai, kad sukeltų vieną VP ramybėje (Russo and Hounsgaard 1994, Delgado-Lezama, Perrier et al. 1997, Alaburda and Hounsgaard 2003). Sukeliamų VP skaičiaus pokytis parodo MN sužadynamumo pokytį.

### **VP slenkstis ( $V_{th}$ )**

$V_{th}$  apibibrėžiamas kaip  $V_m$  vertė ties kuria depoliarizacijos greitis padidėja iki  $\geq 10$  V/s VP įsijungimo metu.  $V_{th}$  buvo vertinamas VP sukeltiant depoliarizuojančiais stačiakampiais srovės impulsais (sužadynamumo testas). Ramybėje  $V_{th}$  buvo apskaičiuotas kaip 10-ties VP slenksčių vidutinė vertė, o laikinės integracijos metu (prieš kasymosi reflekso įsijungimą) – paskutiniųjų 3-jų VP vidutinė vertė.

### **$V_m$ sinapsinių fluktuacijų įvertinimas**

Signalų perdavimo tarp neuronų metu priešsinapsinio neurono aktyvumas sukelia membranos potencialo ( $V_m$ ) fluktuacijas posinapsiniame neurone.  $V_m$  fluktuacijų intensyvumas buvo įvertinamas kaip standartinis nuokrypis (SD) nuo  $V_m$  (Pare, Shink et al. 1998, Destexhe and Pare 1999) 0.5 s laiko intervale tam tikru laiko momentu (prieš pirmąjį stimulą, 1 s po pirmojo stimulo, prieš

stimulą kuris sukelia kasymosi refleksą ir pan.). Buvo naudojami juostinis (50 Hz) ir aukštų dažnių (>2 Hz) filtrai, kad eliminuoti lėtus  $V_m$  kitimus.

### **Kasymosi reflekso įvertinimas**

Mechaniškai stimuliuojant D7 (arba D6) nugaros smegenų segmento recepcinius laukus sukeliamas kasymosi refleksas, kuris atsispindi kaip ritmiškas HF motorinio nervo aktyvumas. Kasymosi reflekso epizodai buvo sukeliami kas 4-5 min ir kartojami mažiausiai 5 kartus kiekvienai būsenai (kontrolė, pašalinus D3, D4 ir D5). Po  $\geq 5$  kartų kasymosi reflekso sukėlimo vienas krūtininis (D3, D4, D5) nugaros smegenų segmentas pašalinamas jį nukerpant.

Kasymosi refleksas buvo charakterizuotas šiais parametrais: rektifikuoto HF nervo ENG integralu, HF aktyvumo pliūpsnių skaičiumi ir HF pliūpsnių dažniu kasymosi reflekso metu. Pliūpsnio pradžia ir pabaiga laikomas momentas kai rektifikuotas ENG signalas kerta 150% bazinės linijos. Bazinė linija – tai ENG aktyvumas prieš stimuliaciją.

### **Neuronų aktyvumo fazės analizė**

D4 neuronų aktyvumo fazės analizė buvo atliekama pagal anksčiau aprašytą metodiką (Berkowitz and Stein 1994, Stein and Daniels-McQueen 2002). HF pliūpsniai buvo normalizuojami. Pliūpsnio pradžia prilyginama 0 ir 1, o pabaiga 0,5 ir -0,5. Neuronų aktyvumo (VP) pradžia ir pabaiga buvo sulyginama su normalizuotu HF nervo pliūpsniu ir joms priskiriamos atitinkamos vertės nuo -1 iki 1. Neuronų fazės analizei atlikti turėjo būti tenkinami šie reikalavimai: D4 neuronas aktyvus ritmiškai, depoliarizacijos metu D4 neuronas generuoja bent 3 VP, kasymosi metu generuojami bent 3 HF pliūpsniai kurių metu D4 neuronas yra aktyvus (generuoja bent 3 VP kiekvieno pliūpsnio metu).

### **Statistinė analizė**

Imčių skirtumams surasti naudotas porinis *Student*'o *t*-testas (Origin software; Microcal Software, Northampton, MA). Skirtumai laikomi reikšmingais, kai  $p < 0,05$ . Reikšmingumo lygmuo žymimas sekančiai: n.r. kai  $p > 0,05$ ; \* kai

$p < 0,05$ ; \*\* kai  $p < 0,01$  ir \*\*\* kai  $p < 0,001$ . Rezultatai pateikiami kaip imties vidurkis  $\pm$  SD.

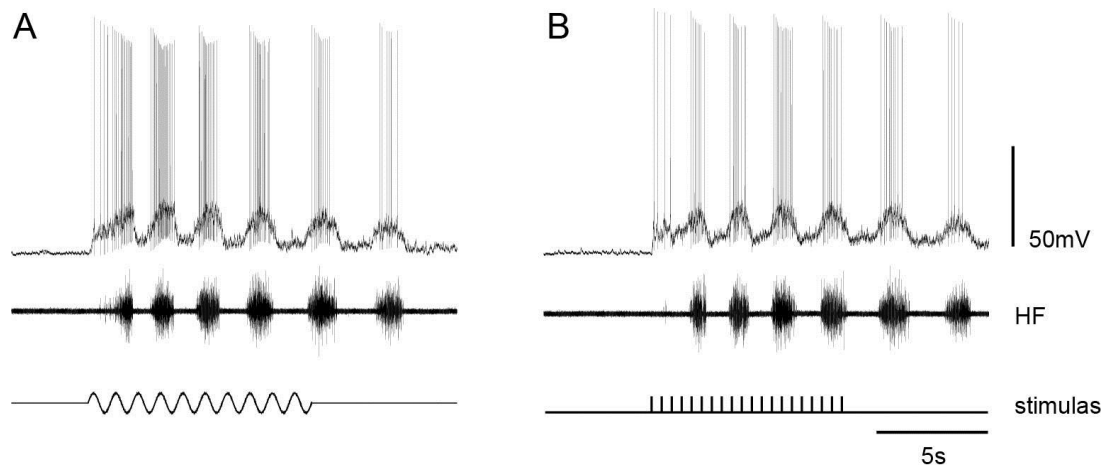


### 3. Rezultatai

#### 3.1. Kasymosi refleksai sukelti mechaniniu ir elektriniu stimuliavimais

Jau pirmųjų nugaros smegenų tyrimų metu buvo pastebėta, kad motorinį aktyvumą spinalizuotame šuns preparate galima sukelti tiek mechaniniais, tiek elektriniais stimuliavimais (Sherrington 1906). Mechaniškai stimuliuojant vėžlio šarvo ir/arba odos receptinius laukus aplink užpakalines galūnes, sukeliamas motorinis atsakas į stimulą – kasymosi refleksas (Stein 2005). Kasymosi refleksą *in vivo* vėžlio preparate galima sukelti ir elektriškai stimuliuojant somatosensorinius nervus (Currie and Stein 1988). Taip pat yra žinoma, kad kasymosi refleksas gali būti sukeliamas tiek mechaniniais (Keifer and Stein 1983), tiek elektriniais (Currie and Lee 1996) stimuliavimais *in vitro* vėžlio preparatuose. Kyla klausimas, ar kasymosi refleksai sukelti skirtingais stimuliavimo būdais kokybiškai skiriasi?

Šiame tyrime buvo naudojamas integruotas vėžlio nugaros smegenų-šarvo *in vitro* preparatas (Paveikslas 2.2.1) (Alaburda and Hounsgaard 2003). Mechaniškai stimuliuojant receptinius laukus aplink užpakalinę galūnę buvo sukeliamas ritmiškas motorinio nervo (HF) aktyvumas (Paveikslo 3.1.1 A vidurinė kreivė). Toks tipinis HF nervo aktyvumas sukeltas stimuliavimo yra vadinamas fiktyviu kasymosi refleksu. Paprastumo dėlei fiktyvus kasymosi refleksas toliau bus vadinamas tiesiog kasymosi refleksu. Šiame preparate yra galimybė atlikti ir viduląstelinius MN registravimus. Pavyzdyje pateiktame paveikslo 3.1.1 A dalyje matome, kad MN taip pat yra ritmiškai aktyvus (depolarizuojasi ir generuoja VP) kasymosi reflekso metu (Paveikslo 3.1.1 A viršutinė kreivė). Kokybiškai panašus kasymosi refleksas (HF aktyvumas ir MN aktyvavimas) sukeliamas somatosensorinį (VPP) nervą stimuliuojant elektriškai 2,2 Hz dažniu (Paveikslas 3.1.1 B).

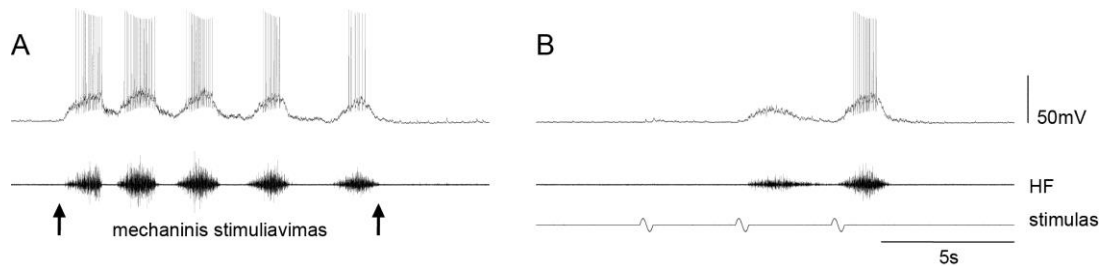


Paveikslas 3.1.1 Kasymosi refleksas sukeltas skirtingais stimuliavimo būdais. Kasymosi refleksas sukeltas mechaniniu šarvo (A) ir elektriniu somatosensorinio nervo stimuliavimu (B). A ir B įrašai iš to pačio MN. Nuo viršaus: MN  $V_m$ ; HF nervo ENG aktyvumas; stimulus.

Šiuo pavyzdžiu norima parodyti, kad kokybiškai panašus kasymosi refleksas sukeltas tiek elektriniu somatosensorinio nervo stimuliavimu, tiek natūraliu – mechaniniu stimuliavimu. Ruošiant preparatą somatosensorinis nervas yra nukerpamas, kad vėliau jį galima būtų galima prisiurbti ir elektriškai stimuliuoti. Kadangi somatosensorinis nervas buvo nukirptas, tai kasymosi refleksu mechaniškai stimuliuojant šio nervo receptinius laukus sukelti neįmanoma. To pasekoje skirtingais būdais sukeltas kasymosi refleksas yra inicijuojamas aktyvuojant skirtingus sensorinius neuronus. Be to stimuliuojant skirtingais metodais sudėtinga parinkti vienodą stimulų intensyvumą. Dėl šių priežasčių kiekybinis kasymosi refleksų palyginimas nebuvo atliekamas.

### 3.2. Gradualus kasymosi refleksu sukėlimas

Kasymosi refleksas gali būti sukeltas tiesiog pincetu sužnybiant odą esančią užpakalinės galūnės ertmėje (Paveikslas 3.2.1 A). Toks mechaninis stimulus sukelia intensyvią, ritmišką HF nervo aktyvumą, bei registruojamo MN  $V_m$  depolarizacijas.



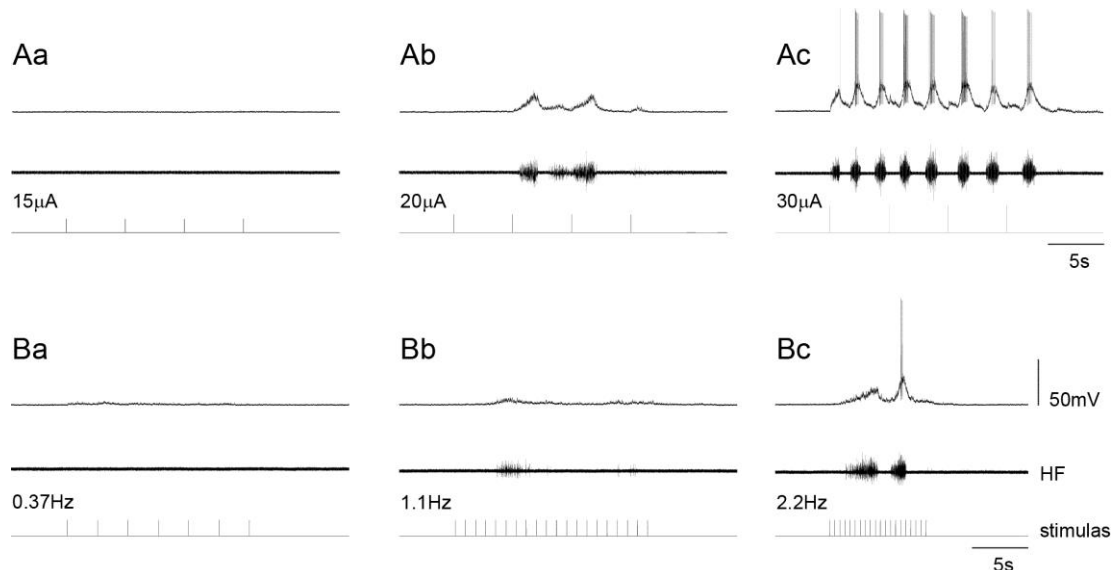
Paveikslas 3.2.1 Gradualus kasymosi reflekso aktyvavimas jį sukeltiant ikislenkstiniais pakartotiniais mechaniniais stimuliavimais. Mechaninis kūno paviršiaus stimuliavimas sukelia neuronų tinklo aktyvumą – kasymosi refleksą (A). Atitinkamas stimuliavimo parametrų parinkimas leidžia kasymosi refleksą sukelti gradualiai – motorinis atsakas stebimas tik po antro stimulo (B). Nuo viršaus: MN  $V_m$ ; HF nervo ENG aktyvumas; stimulus.

Panaudojus stiklinę lazdele, kuri pritvirtinama prie garsiakalbio membranos, mechaninis stimulą ir jo parametrus (intensyvumą, trukmę bei dažnį) galima tiksliai kontroliuoti. Atitinkamai parinkus mechaninio stimulo parametrus kasymosi refleksą galima sukelti gradualiai (Paveikslas 3.2.1 B). Pirmasis trumpas mechaninis stimulus nesukelia jokio motorinio atsako (nėra aktyvumo HF nerve), o tokio paties stimulo pateikimas po 3 sekundžių jau sukelia kasymosi refleksą – ritmišką HF nervo aktyvumą.

Toks kasymosi reflekso sukėlimas leidžia manyti, kad ikislenkstinis stimulus sukelia tam tikrą atsaką neuronų tinkle, tačiau šis atsakas yra per silpnas sukelti aktyvumą motorinėje tinklo dalyje. Šie ikislenkstiniai atsakai neuronų tinkle gali sumuotis ir pakartotinis ikislenkstinių stimulų pateikimas tam tikru dažniu sukelia motorinį atsaką – kasymosi refleksą. Tokia somatosensorinių stimulų integracija parodo, kad izoliuotas nugaros smegenų neuronų tinklas informaciją apie stimulą „saugo“ ilgiau nei 1 sekundę. Panaši nugaros smegenų somatosensorinių stimulų integracija pristatyta ir anksčiau *in vivo* organizmuose (Sherrington 1906, Crowe and Linnartz 1985, Currie and Stein 1988, Currie and Stein 1990).

Norint tiksliau kontroliuoti pateikiamus stimulus, gradualaus kasymosi reflekso tyrimui buvo adaptuotas elektrinis somatosensorinių nervų stimuliavimas, kuris detalai aprašytas ankstesniuose tyrimuose (Currie and Stein 1988, Currie and Lee 1996). Kasymosi reflekso sukėlimas naudojant somatosensorinių nervų

elektrinę stimuliaciją priklauso tiek nuo naudojamų stimulų intensyvumo (Paveikslas 3.2.2 A), tiek nuo stimuliavimo dažnio (Paveikslas 3.2.2 B). Pateikiant 4 elektrinius stimulus 5 sekundžių intervalais, žemo intensyvumo stimulai ( $15\mu\text{A}$ ) nesukelia jokio aktyvumo HF nerve (Paveikslas 3.2.2 Aa). Padidinus stimuliavimo intensyvumą iki  $20\mu\text{A}$  kasymosi refleksą galime sukelti gradualiai (Paveikslas 3.2.2 Ab). Po pirmojo stimulo HF nervo aktyvumo nėra, tačiau sekantys trys stimulai sukelia posinapsinį aktyvumą MN (viršutinė kreivė) ir aktyvumą HF nervo ENG (vidurinė kreivė). Stimuliavimo intensyvumą dar labiau padidinus ( $30\mu\text{A}$ ) kasymosi refleksas sukliamas jau po pirmojo elektrinio stimulo (Paveikslas 3.2.2 Ac).



Paveikslas 3.2.2 Gradualus kasymosi refleksu aktyvavimas ikislenkstiniiais pakartotiniiais elektriniais stimulais. Kasymosi refleksu sukėlimo priklausomybė nuo stimulo stiprumo (A) ir pateikiamų stimulų dažnio (B). Silpnas stimulus nesukelia motorinio atsako (Aa), o pakankamai stiprus stimulus motorinį atsaką sukelia iš karto (Ac). Vidutinio intensyvumo stimuliavimas leidžia kasymosi refleksą sukelti gradualiai (Ab). Nuo viršaus: MN  $V_m$ ; HF nervo ENG aktyvumas; stimulus.

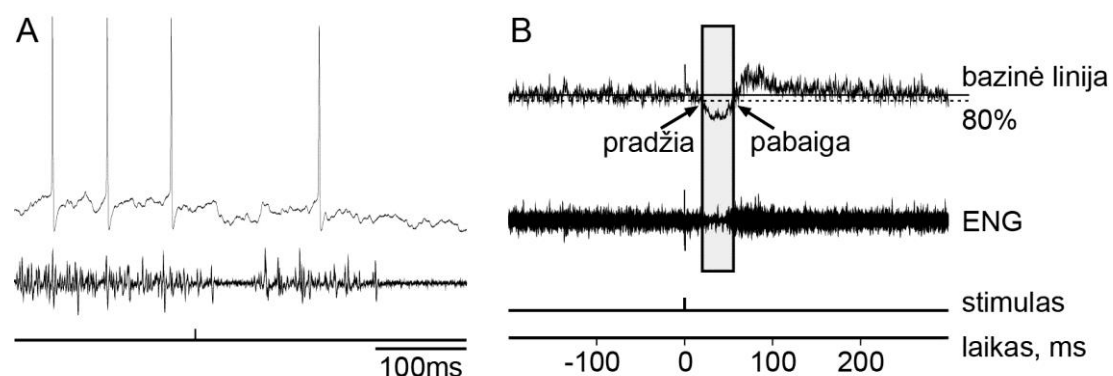
Kaip jau minėta, kasymosi refleksu sukėlimas taip pat priklauso ir nuo stimuliavimo dažnio (Paveikslas 3.2.2 B). Somatosensorinį nervą stimuliuojant 0,37 Hz dažniu ( $17\mu\text{A}$  stiprio srove) kasymosi refleksas nesukliamas (Paveikslas 3.2.2 Ba). Stimuliavimo dažnį padidinus iki 1,1 Hz (stimulų stipris toks pat –  $17\mu\text{A}$ ) matomas nežymus HF nervo aktyvumas, bei posinapsiniai

įėjimai MN (Paveikslas 3.2.2 Bb). Stimuliavimo dažnį padidinus iki 2,2 Hz stebimas tipinis kasymosi refleksas – ritmiškas HF nervo aktyvumas, bei intensyvus posinapsinis MN aktyvavimas (Paveikslas 3.2.2 Bc).

Daugelyje naudotų preparatų (18 iš 25) stimuliavimo parametrus buvo galima parinkti taip, kad kasymosi refleksas (HF nervo ENG aktyvumas) būtų sukeliamas antro (arba sekančio) stimulo be HF aktyvumo po pirmojo stimulo, kai stimuliavimo dažnis mažesnis nei 1 Hz. Tipinis naudojamo protokolo pavyzdys pateiktas 3.2.2 paveikslo Ab dalyje. Šiais rezultatais patvirtinama, kad nugaros smegenų neuronų tinklas pasižymi sekundžių eilės somatosensorinių stimulų laikine integracija.

### 3.3. Somatosensorinis tylos periodas

Sukeliant kasymosi refleksą elektriškai visų pirma buvo norima išsiaiškinti, kokius trumpalaikius atsakus sukelia elektrinis stimulus. Buvo vertinami HF nervo ir MN atsakai į elektrinį stimulą. Pastebėta, kad elektrinis stimulus sukelia motorinio aktyvumo slopinimą – slopinamas HF nervo ir MN aktyvumai (pavyzdys Paveikslo 3.3.1 A dalyje). Toks HF aktyvumo slopinimas gali būti stebimas, kai elektrinio stimulo pateikimo metu nervas yra aktyvus. Laikiniai slopinimo parametrai buvo įvertinti iš rektifikuotų HF nervo ENG epizodų (Paveikslas 3.3.1 B). Tolesnei analizei ENG epizodai buvo atrinkti tik tie, kai stimulo pateikimo metu motorinis HF nervas buvo aktyvus.



Paveikslas 3.3.1 Motorinio aktyvumo slopinimas po elektrinio somatosensorinio nervo stimulo. HF aktyvumo ir MN VP generavimo slopinimas po elektrinio stimulo (A). Paveikslo B dalyje pavaizduotas kokybinis slopinimo įvertinimas, pilkame fone pavaizduotas slopinimo

periodas, o rodyklės rodo slopinimo pradžią ir pabaigą. A nuo viršaus: MN  $V_m$ ; HF nervo ENG aktyvumas; stimulus. B nuo viršaus: HF nervo ENG aktyvumų vidurkis; HF nervo ENG aktyvumai; stimulus.

Toks motorinio aktyvumo slopinimas buvo stebimas 9 iš 10 tirtų preparatų. Jo latencija (laikas nuo stimulo pateikimo iki slopinimo pradžios) buvo  $22,2 \pm 6,8$  ms, o trukmė –  $24,9 \pm 10,7$  ms ( $n=9$ ). Slopinimo stiprumas buvo įvertinamas slopinimo indeksu SI ir buvo lygus  $0,52 \pm 0,14$  ( $p<0,001$ ,  $n=9$ ).

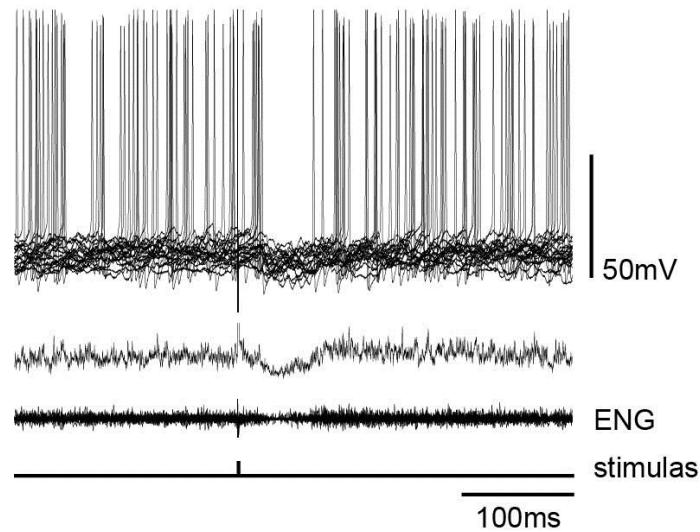
Pastebėta, kad po HF aktyvumo slopinimo ENG aktyvumas ženkliai padidėja ir net viršija bazinį ENG aktyvumo lygį (viršutinė kreivė Paveikslo 3.3.1 B dalyje). Toks ENG padidėjimas buvo stebimas 8 iš 9 preparatų. Šis ENG padidėjimas buvo įvertintas IR indeksu ir buvo lygus  $1,3 \pm 0,21$  ( $p<0,05$ ,  $n=8$ ).

Iš ankstesnių tyrimų yra žinoma, kad žmogaus odos elektrinis stimuliavimas (ypač jei pateikiamas stimulus yra skausmingas) gali sukelti slopinimą motoriniame atsake (Uncini, Kujirai et al. 1991, Floeter 2003). Šis motorinio aktyvumo slopinimas vadinamas somatosensoriniu tylos periodu (*cutaneous silent period*, CSP). CSP intensyviai tirtas žmonėse, todėl gerai charakterizuotas. Laikiniai parametrai nustatyti šiame tyrime atitinka laikinius parametrus nustatytus žmonėms (žiūrėti diskusiją). Tikėtina, kad vėžlio nugaros smegenų neuronų tinklas generuoja tokį patį atsaką į elektrinį somatosensorinį stimulą kaip ir stebimą žmonėse. Toliau, slopinimas stebėtas šiame tyrime taip pat bus vadinamas CSP.

### **Mechanizmas sukiantis somatosensorinį tylos periodą**

Galimi keli motorinio aktyvumo po elektrinio stimulo slopinimo mechanizmai: MN slopinimas, priešmotorinių neuronų slopinimas, arba šių mechanizmų kombinacija. Norint nustatyti kuris mechanizmas sukelia CSP, buvo analizuojami viduląsteliniai MN įrašai. MN kasymosi reflekso metu dažniausiai būna ritmiškai aktyvūs, todėl analizei buvo atrinkti epizodai, kai elektrinis stimulus pateikiamas MN aktyvumo metu (Paveikslas 3.3.2). Kaip ir

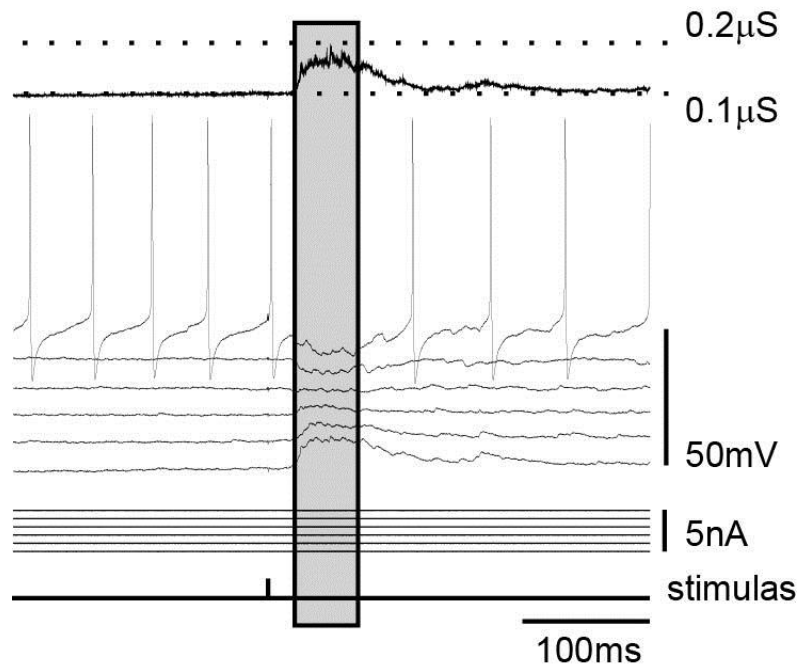
buvo galima tikėtis, po stimulo MN generuoja mažiau VP (Paveikslo 3.3.2 viršuje), o motorinio nervo aktyvumas sumažėja (Paveikslo 3.3.2 viduryje).



Paveikslas 3.3.2 MN aktyvumo slopinimas CSP metu. Somatosensorinio nervo stimuliavimas sukelia MN slopinimą neuronų tinklo aktyvumo metu. Nuo viršaus: MN  $V_m$ ; rektifikuotas ir suvidurkintas HF nervo ENG aktyvumas; stimulus.

Iš ankstesnių tyrimų yra žinoma, kad MN laidumas ženkliai padidėja kasymosi reflekso metu (Alaburda, Russo et al. 2005, Berg, Ditlevsen et al. 2008). Šio padidėjusio laidumo metu MN tuo pačiu metu gauna žadinančius ir slopinančius įėjimus (Berg, Alaburda et al. 2007). Šis kombinuotas žadinimas/slopinimas neleidžia vienareikšmiškai nustatyti kuris mechanizmas (sinapsinis slopinimas ar sumažėjęs MN žadinimas) dominuoja CSP metu.

Problemos sprendimui buvo pasinaudota kasymosi reflekso tinklo aktyvavimo savybe – gradualiu kasymosi reflekso sukėlimu. CSP mechanizmo nustatymui, somatosensorinis nervas buvo stimuliuojamas žemo dažnio (<0,05 Hz), atitinkamo stiprumo elektriniais stimulais nesukeliant kasymosi reflekso. Jeigu somatosensorinis nervas buvo stimuliuojamas tokio paties stiprumo stimulais >0,2 Hz dažniu, tai sukeliamas gradualus kasymosi refleksas. Taikant žemo stimuliavimo dažnio protokolą, buvo galima analizuoti elektrinio stimulo sukeltus posinapsinius atsakus (Paveikslas 3.3.3).



Paveikslas 3.3.3 MN slopinimas CSP metu. Somatosensorinio nervo stimuliavimas sukelia MN slopinimą ramybėje. Nuo viršaus: MN laidumas; MN  $V_m$  prie skirtingų į MN įleidžiamų srovės stiprio verčių; srovė įleidžiama į MN; stimulus. Posinapsinių potencialų CSP metu reversija yra apie -70 mV.

Nustatyta, kad po somatosensorinio nervo stimuliacijos sukeliamas polisinapsinis (daugiau nei vienas) posinapsinis potencialas. Šio polisinapsinio atsako latencija artima CSP latencijai nustatyta iš HF ENG atsakų. Posinapsinis atsakas į somatosensorinio nervo stimuliavimą buvo hiperpolarizuojantis, kai  $V_m$  vertės buvo artimos  $V_{th}$ , ir slopindavo VP aktyvumą sukeltą pastovios įleidžiamos teigiamos srovės (viršutinis  $V_m$  įrašas 3.3.3 Paveiksle). Tai parodo, kad somatosensorinio nervo stimulus, sukeliantis CSP motorinio aktyvumo metu, aktyvuoja neuronų tinklą, kuris konverguodamas į MN sumažina jų sužadynamumą dėl tiesioginio posinapsinio slopinimo.

Posinapsinio atsako į somatosensorinio nervo stimulą dydis buvo įvertintas kaip MN membranos laidumo pokytis CSP metu (viršutinė kreivė Paveiksle 3.3.3). MN laidumas ramybėje (prieš stimulą) buvo  $80,8 \pm 34,3$  nS, o CSP metu (20-50 ms po stimulo) –  $124,6 \pm 60,4$  nS ( $n=15$ ). MN laidumas CSP metu padidėja  $55 \pm 38$  % ( $p<0,001$ ,  $n=15$ ).



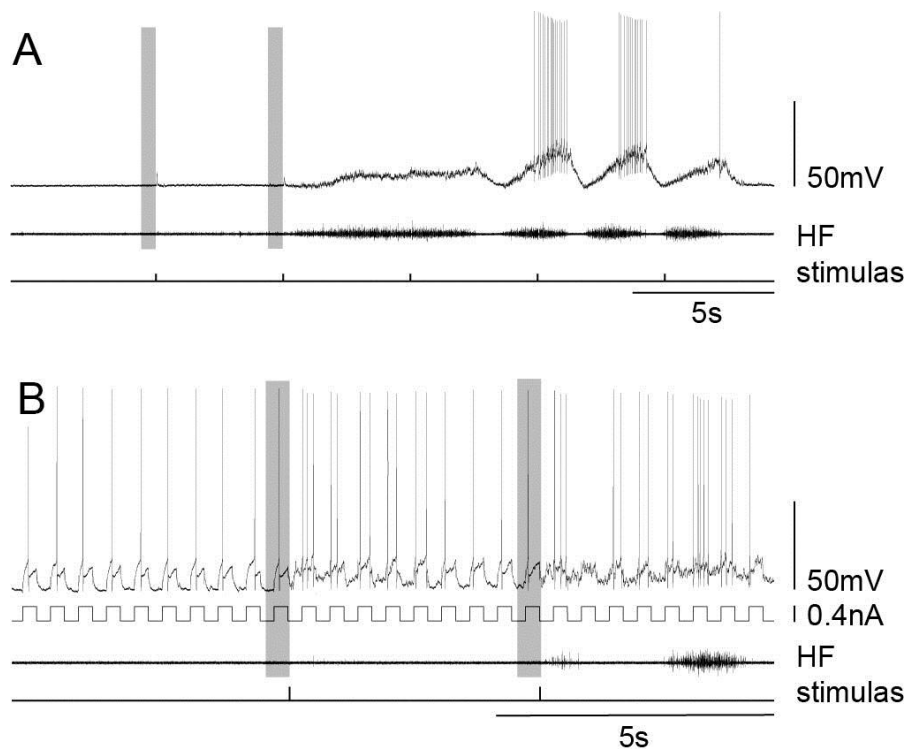
Šie rezultatai parodo, kad CSP metu MN slopinimas padidėja ir jis gali lemti motorinio aktyvumo slopinimą kasymosi reflekso metu.

### **3.4. Laikinė somatosensorinių jėjimų integracija**

#### **Motoneuronų $V_m$ ir sužadynamumas prieš kasymosi reflekso įsijungimą**

Gradualaus kasymosi reflekso aktyvavimo metu somatosensorinė informacija apie prieš tai buvusį stimulą išsaugoma iki kelių sekundžių. Viena iš galimų šios informacijos saugojimo vietų – tai MN ir jų vidinių savybių pasikeitimas. Yra manoma, kad MN prie kintančių funkcinių poreikių adaptuojami metabotropiškai moduluojant jų vidines savybes (Delgado-Lezama and Hounsgaard 1999). MN sužadynamumą galima padidinti stimuliuojant besileidžiančius traktus (DLF ar MLF) ir aktyvuojant glutamatergines sinapses (Delgado-Lezama, Perrier et al. 1997, Delgado-Lezama, Perrier et al. 1999). MN sužadynamumo kitimas nustatytas ir funkcionalaus neuronų tinklo veikimo metu – katėje tiek lokomocijos (Krawitz, Fedirchuk et al. 2001), tiek kasymosi reflekso metu (Power, McCrea et al. 2010). Viena iš galimybių, kad somatosensorinių jėjimų laikinė integracija vyksta dėl MN vidinių savybių moduliacijos, kuri padidina jų sužadynamumą.

Paprasčiausias būdas MN sužadynamumui padidinti –  $V_m$  depoliarizacija. Jeigu pirmasis stimulus sukeltų MN  $V_m$  depoliarizaciją, kuri tęstųsi iki sekančio stimulo, tai sekančio stimulo sukelta  $V_m$  depoliarizacija sumuosis su pirmąją (laikinė  $V_m$  sumacija). Todėl pirmiausia tirta, ar ikislenkstinis somatosensorinis stimulus sukelia ženklų MN  $V_m$  pokytį prieš kasymosi reflekso įsijungimą. Nustatyta, kad MN  $V_m$  kontrolėje ( $-64,8 \pm 6,7$  mV) ženkliai nesiskyrė nuo  $V_m$  ( $-64,5 \pm 6,5$  mV) prieš stimulą sukeliantį kasymosi refleksą (pilki stulpeliai paveiksle 3.4.1 A parodo kuriais laiko momentais buvo vertinamas  $V_m$ ) (n=20).



Paveikslas 3.4.1 MN  $V_m$  ir sužadindamumas nesikeičia gradualaus kasymosi reflekso sukėlimo metu. MN  $V_m$  prieš stimulą sukeltą motorinį atsaką yra toks pat kaip ir kontrolėje (pilki stulpeliai A dalyje). MN sužadindamumas prieš stimulą sukeltą motorinį atsaką yra toks pat kaip ir kontrolėje (pilki stulpeliai B dalyje). Įrašai pateikti A ir B dalyse yra skirtingų MN. A nuo viršaus: MN  $V_m$ ; HF nervo ENG aktyvumas; stimulus. B nuo viršaus: MN  $V_m$ ; įleidžiami srovės stimulai; HF nervo ENG aktyvumas; stimulus.

Yra žinoma, kad neuronų sužadindamumas gali pasikeisti ir be ženklaus  $V_m$  pokyčio (Russo and Hounsgaard 1996, Delgado-Lezama, Perrier et al. 1997, Russo, Nagy et al. 1997). Todėl, MN sužadindamumo pokyčiams nustatyti buvo naudojamas sužadindamumo testas (Paveikslas 3.4.1 B). Buvo lyginami MN atsakai į viršslenkstinį srovės stimulą kontrolėje su atsakais gradualaus kasymosi reflekso sukėlimo metu. 7 iš 12 MN sužadindamumas iškart po pirmojo stimulo padidėjo, 1 – sumažėjo ir likusiuose 4 MN nesikeitė. Somatosensorinis stimulus sukelia intensyvius trumpalaikius posinapsinius įėjimus MN, kas gali pakeisti ir MN sužadindamumą iškart po stimuliacijos. Visuose MN ( $n=12$ ) atsakas į viršslenkstinį stimulą, esantį prieš somatosensorinį stimulą sukeltą kasymosi refleksą, buvo nepakitęs (pilki

stulpeliai paveiksle 3.4.1 B parodo kuriais laiko momentais MN sužadynamumas buvo lyginamas).

MN sužadynamumas gali padidėti dėl  $V_{th}$  hiperpoliarizacijos fiktyvios lokomocijos (Krawitz, Fedirchuk et al. 2001) ir kasymosi reflekso (Power, McCrea et al. 2010) metu. Sužadynamumo testas pristatytas aukščiau gali būti nejautrus mažiems  $V_{th}$  pokyčiams, todėl  $V_{th}$  kasymosi reflekso inicijavimo metu taip pat buvo įvertintas. Nustatyta, kad MN  $V_{th}$  prieš kasymosi reflekso įsijungimą ( $-41,8 \pm 5,5$  mV) nesiskyrė nuo  $V_{th}$  kontrolėje ( $-41,6 \pm 5,2$  mV) ( $p > 0,05$ ,  $n=12$ ).

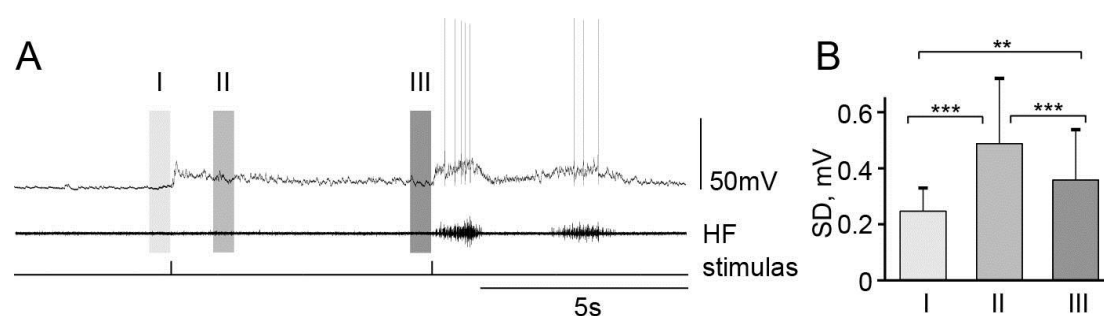
Aukščiau aptarti rezultatai parodo, kad MN  $V_m$  ir sužadynamumas reikšmingai nesikeičia gradualaus kasymosi reflekso įsijungimo metu. Galima teigti, kad gradualiam kasymosi reflekso sukėlimui nėra būtinas MN vidinių savybių ( $V_m$  ir sužadynamumo) pokytis.

### **Priešmotorinio tinklo aktyvumas prieš kasymosi reflekso įsijungimą**

Pastebėta, kad po ikislenkstinio stimulo ženkliai padidėja MN  $V_m$  fluktuacijų.  $V_m$  fluktuacijos – tai posinapsiniai įėjimai.  $V_m$  fluktuacijų MN padidėjimas parodo, kad šie MN gauna posinapsinius įėjimus iš neuronų sudarančių sinapses su jais. Tokie tarpiniai neuronai, kurie sudaro sinapses su MN, dar vadinami priešmotoriniais neuronais. Taigi MN  $V_m$  fluktuacijų padidėjimas parodo, kad padidėja priešmotorinių neuronų aktyvumas (VP generavimas). Paveiksle 3.4.2 A pavyzdyje pirmasis ikislenkstinis stimulus sukelia ilgai trunkančias ( $>1$  s)  $V_m$  fluktuacijas – posinapsinius įėjimus MN (viršutinė kreivė) be aktyvumo padidėjimo HF (vidurinė kreivė).

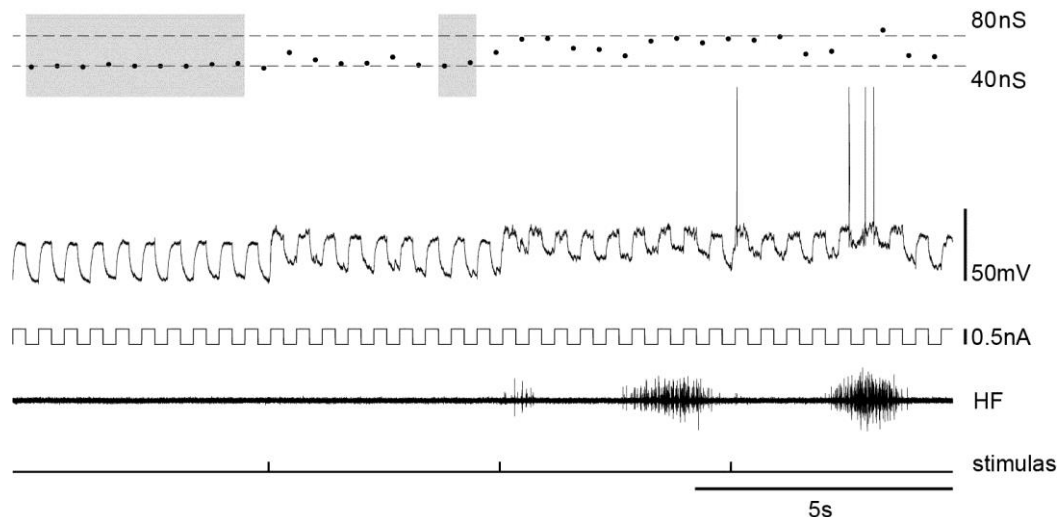
Posinapsinių įėjimų intensyvumas buvo įvertinamas kaip  $V_m$  standartinis nuokrypis (SD) (Pare, Shink et al. 1998, Destexhe and Pare 1999). Buvo palyginti MN  $V_m$  SD ramybėje (prieš pirmąjį stimulą) (I), 1 s po pirmojo stimulo (II) ir prieš stimulą, kuris sukelia HF aktyvumą (III) (pilki stulpeliai Paveiksle 3.4.2 A parodo kuriais laiko momentais buvo vertinamas  $V_m$  SD).  $V_m$  SD ramybėje buvo  $0,25 \pm 0,08$  mV, padidėjo iki  $0,49 \pm 0,23$  mV (1 s po stimulo) ir liko padidėjęs ties  $0,36 \pm 0,18$  mV įvertinant paskutinės 0,5 s

intervale prieš stimulą sukeltą kasymosi refleksą (n=20, paveikslas 3.4.2 B). MN  $V_m$  SD 1 s po pirmojo stimulo ir prieš stimulą sukeltą kasymosi refleksą buvo patikimai didesnis už  $V_m$  SD ramybėje. Taip pat  $V_m$  SD 1 s po stimulo buvo patikimai didesnis nei prieš stimulą sukeltą motorinį atsaką. Tai rodo, kad priešmotorinio tinklo aktyvumas laikinės integracijos metu gradualiai mažėja. Pažymėtina, kad gradualaus kasymosi reflekso įsijungimo metu nebuvo stebimas kasymosi refleksui būdingas lėtas  $V_m$  fluktuacijų ritmiškumas. Priešmotorinio tinklo aktyvumas buvo toninis – intensyviausias po stimulo ir mažėjantis laike.



Paveikslas 3.4.2 Padidėjęs priešmotorinio neuronų tinklo aktyvumas gradualaus kasymosi reflekso aktyvavimo metu. Ilgai truncančios (>1 s) MN  $V_m$  fluktuacijos po elektrinio stimulo rodo padidėjusį priešmotorinių neuronų aktyvumą (A). MN  $V_m$  fluktuacijos yra didesnės praėjus 1 s po stimulo (II) ir prieš sekantį stimulą (III) nei ramybėje (I) (pilki stulpeliai A dalyje). MN fluktuacijos įvertintos kaip  $V_m$  standartinis nuokrypis (SD) 0,5 s intervale (B). A nuo viršaus: MN  $V_m$ ; HF nervo ENG aktyvumas; stimulus. Imčių skirtumai statistiškai reikšmingi su tikimybe  $p < 0,01$  (\*\*) ir  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $n = 20$ .

Dėl posinapsinių įėjimų MN yra būdingos didelio membranos laidumo būsenos kasymosi reflekso metu (Alaburda, Russo et al. 2005, Berg, Alaburda et al. 2007, Berg, Ditlevsen et al. 2008). Kad įvertinti posinapsinių įėjimų intensyvumą gradualaus kasymosi reflekso sukėlimo metu, buvo skaičiuojamas MN membranos laidumas (Paveikslas 3.4.3). MN membranos laidumas ramybėje ( $73 \pm 36,5$  nS) ir prieš stimulą sukeltą kasymosi refleksą ( $73,6 \pm 37,2$  nS) (pilki stulpeliai Paveiksle 3.4.3 parodo kada buvo vertinamas laidumas) patikimai nesiskyrė ( $p > 0,05$ ,  $n = 15$ ).

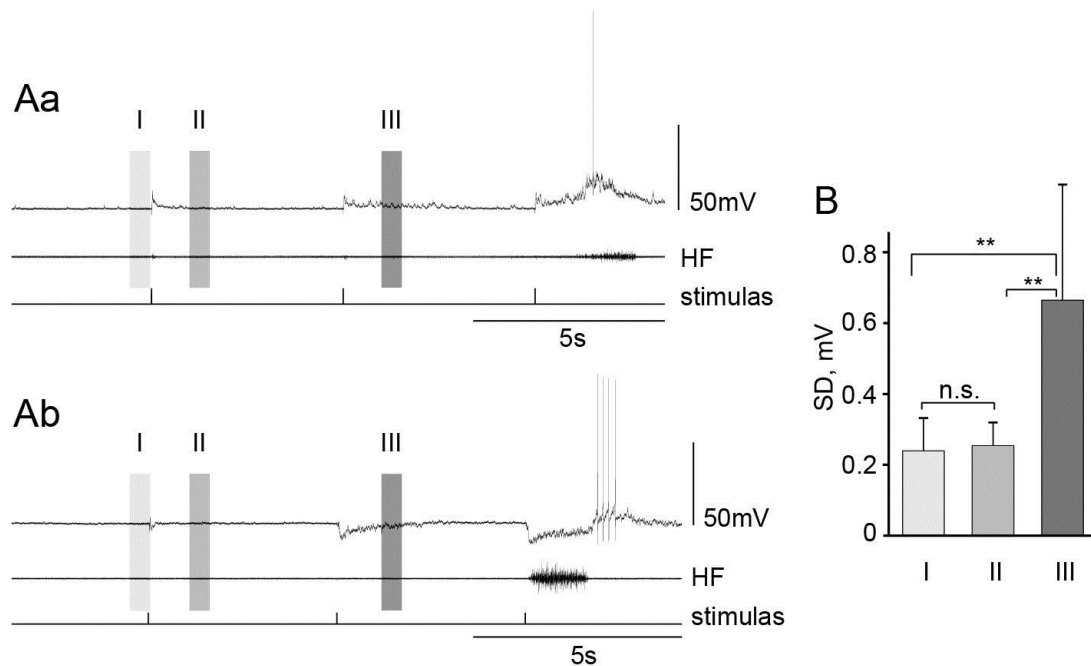


Paveikslas 3.4.3 MN membranos laidumas gradualaus kasymosi reflekso sukėlimo metu reikšmingai nesikeičia. MN laidumas ir jo kitimas buvo įvertinamas įleidžiant neigiamos srovės impulsus. Nuo viršaus: MN laidumas; MN  $V_m$ ; HF nervo ENG aktyvumas; įleidžiami neigiamos srovės impulsai; stimulus.

Galima teigti, kad posinapsiniai įėjimai MN laikinės integracijos metu yra nepakankamai intensyvūs, kad padidintų MN laidumą. Taip pat reikėtų paminėti, kad šis MN membranos laidumo įvertinimo metodas gali būti neįvertinamas mažiems ir trumpiems laidumo pokyčiams aptikti.

### **Priešmotorinio tinklo aktyvumo didėjimas po pakartotinių ikislenkstinių stimulių**

Parinkus stimuliavimo intensyvumą, kasymosi refleksą galima sukelti ne antru, bet trečiu (ar vėlesniu) ikislenkstiniu stimulu (Paveikslas 3.4.4 Aa ir Ab). Tokiomis sąlygomis buvo palygintas MN  $V_m$  SD ramybėje (I), 1 s po pirmojo stimulo (II), 1 s po antrojo stimulo (III) (pilki stulpeliai Paveiksle 3.4.4 Aa ir Ab). SD ramybėje buvo  $0,24 \pm 0,09$  mV, po pirmojo stimulo –  $0,25 \pm 0,06$  mV, o po antrojo –  $0,66 \pm 0,33$  mV ( $n=8$ ) (Paveikslas 3.4.4 B). Priešmotorinio tinklo aktyvumas buvo patikimai didesnis po antrojo stimulo, nei po pirmojo ar ramybėje ( $p<0,01$ ).



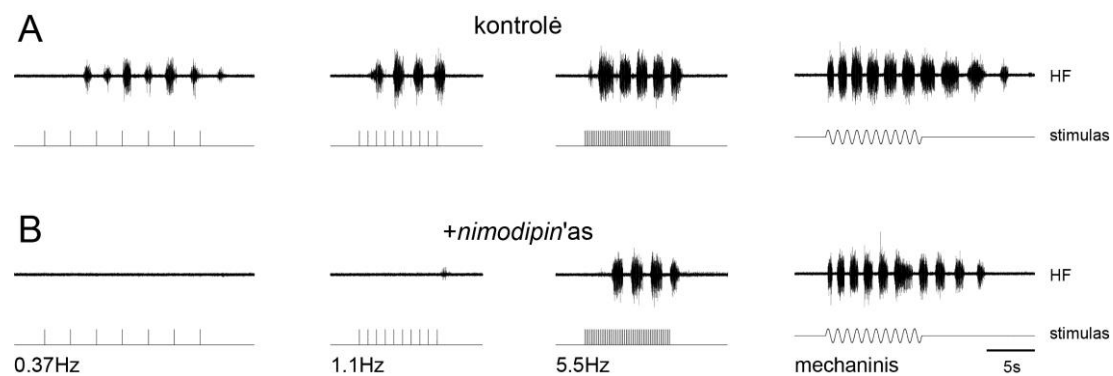
Paveikslas 3.4.4 Priešmotorinio neuronų tinklo aktyvumo didėjimas stimuliuojant pakartotiniais ikislenkstiniais stimulais. Žadinančių (Aa) ir slopinančių (Ab) posinapsinių įėjimų MN didėjimas kaip atsakas į ikislenkstinį stimuliavimą. MN fluktuacijos įvertintos kaip SD kontrolėje (I), 1 s po pirmojo stimulo (II) ir 1 s po antrojo (III) (pilki stulpeliai Aa ir Ab dalyse). Įrašai Aa ir Ab dalyse iš skirtingų MN. Aa ir Ab nuo viršaus: MN  $V_m$ ; HF nervo ENG aktyvumas; stimulus. Imčių skirtumai statistiškai reikšmingi su tikimybe  $p > 0,05$  (n.s.) ir  $p < 0,01$  (\*\*),  $n = 8$ .

Reikia paminėti, kad MN stebimi ne tik žadinantys posinapsiniai įėjimai laikinės integracijos metu. 3 iš 8 MN aiškiai dominuoja slopinantys posinapsiniai įėjimai gradualaus kasymosi reflekso aktyvavimo metu (Paveikslas 3.4.4 Ab).

### L-tipo $Ca^{2+}$ įtaka leikinei somatosensorinių įėjimų integracijai

Sekančiame etape buvo tirtas galimas gradualų kasymosi refleksą sukeliantis mechanizmas. Buvo tiriama L-tipo kalcio jonų srovės įtaka gradualaus kasymosi reflekso sukėlimui. Šiam tikslui visas nugaros smegenų neuronų tinklas buvo perfuzuojamas kontroliniu Ringer'io tirpalu, o po to į jį buvo pridėdama specifinio L-tipo  $Ca^{2+}$  kanalų blokatoriaus – nimodipin'o (nuo 10 iki 25  $\mu M$ ). Kasymosi refleksas buvo sukliamas naudojant įvairius stimulus – skirtingo dažnio elektrinius (0,37, 1,1 ir 5,5 Hz) ir mechaninį stimuliavimą.

3.4.5 paveiksle matoma, kad *nimodipin*‘as blokuoja gradualų kasymosi reflekso sukėlimą – kasymosi refleksas nesukeliamas žemo dažnio (0,37 Hz) elektriniais stimulais pridėjus L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokatoriaus. Taip pat kasymosi refleksas kai kuriais atvejais nesukeliamas net ir vidutinio dažnio (1,1 Hz) elektriniu stimuliavimu. Naudojant didesnio dažnio (5,5 Hz) arba mechaninį stimuliavimą, kasymosi refleksas sukeliamas ir po *nimodipin*‘o pridėjimo į *Ringer*‘io tirpalą (Paveikslo 3.4.5 dešinė pusė).

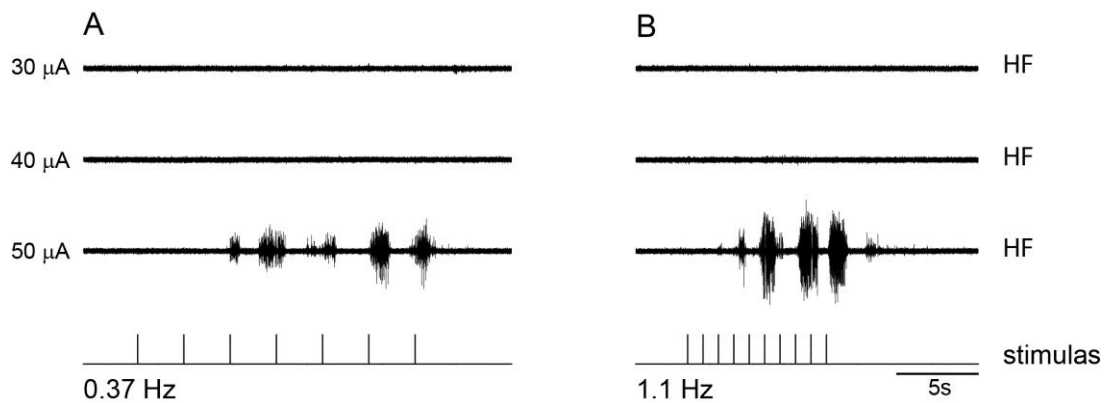


Paveikslas 3.4.5 *Nimodipin*‘as blokuoja gradualų kasymosi reflekso sukėlimą.

A dalyje – kasymosi refleksas sukeliamas VPP nervą stimuliuojant 30  $\mu\text{A}$  stiprumo, skirtingo dažnio elektriniais stimulais, bei mechaniniu stimuliavimu. B – kasymosi reflekso sukėlimas naudojant tokį pat stimuliavimą po 30-60 min po *nimodipin*‘o pridėjimo į *Ringer*‘io tirpalą. Nuo viršaus: HF nervo ENG aktyvumas, stimulus.

Toks *nimodipin*‘o efektas stebėtas visų pilotinių eksperimentų metu ( $n=3$ ), kai nugaros smegenų neuronų tinklas buvo perfuzuojamas 30-60 minučių *Ringer*‘io tirpalu turinčiu *nimodipin*‘o.

Norint įsitikinti ar *nimodipin*‘as tikrai blokuoja somatosensorinių jėjimų laikinę integraciją buvo padidintas stimulo stiprumą. Stimulo stiprumo padidinimas leido vėl sukelti kasymosi refleksą gradualiai net ir po 90-120 minučių perfuzijos su *Ringer*‘io tirpalu turinčiu *nimodipin*‘o (Paveikslas 3.4.6). Paveikslo 3.4.6 A dalyje somatosensorinis nervas buvo stimuliuojamas 0,37 Hz dažniu, o B – 1,1 Hz dažniu. Somatosensorinį nervą stimuliuojant 30  $\mu\text{A}$  stiprumo srovės stimulais kasymosi refleksas nesukeliamas (kontrolėje tokio stiprumo stimuliavimas kasymosi refleksą sukėlė). Padidinus stimulų stiprumą iki 50  $\mu\text{A}$  kasymosi refleksas sukeliamas stimuliuojant 1,1 ir 0,37 Hz stimulais.



Paveikslas 3.4.6 Gradualus kasymosi refleksas sukliamas padidinus stimulo stiprumą po *nimodipin*'o. Kasymosi reflekso sukėlimas 0,37 Hz (A) ir 1,1 Hz (B) dažnio stimuliavimu. Elektrinio stimulo stiprumas: 30  $\mu$ A (viršuje), 40  $\mu$ A (viduryje) ir 50  $\mu$ A (apačioje).

Šie pilotiniai tyrimai parodė, kad L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokavimas *nimodipin*'u greičiausiai nespecifiškai sumažina neuronų tinklo sužadynamumą, o ne blokuoja laikinės integracijos mechanizmą (pvz. priešmotorinio tinklo padidėjusį aktyvumą). Pastebėjus šį nespecifišką L-tipo  $\text{Ca}^{2+}$  kanalų blokavimo poveikį gradualiam kasymosi reflekso sukėlimui, farmakologiniai eksperimentai toliau nebuvo vykdomi.

### 3.5. Krūtininiai nugaros smegenų segmentai ir jų vaidmuo kasymosi reflekso generavime

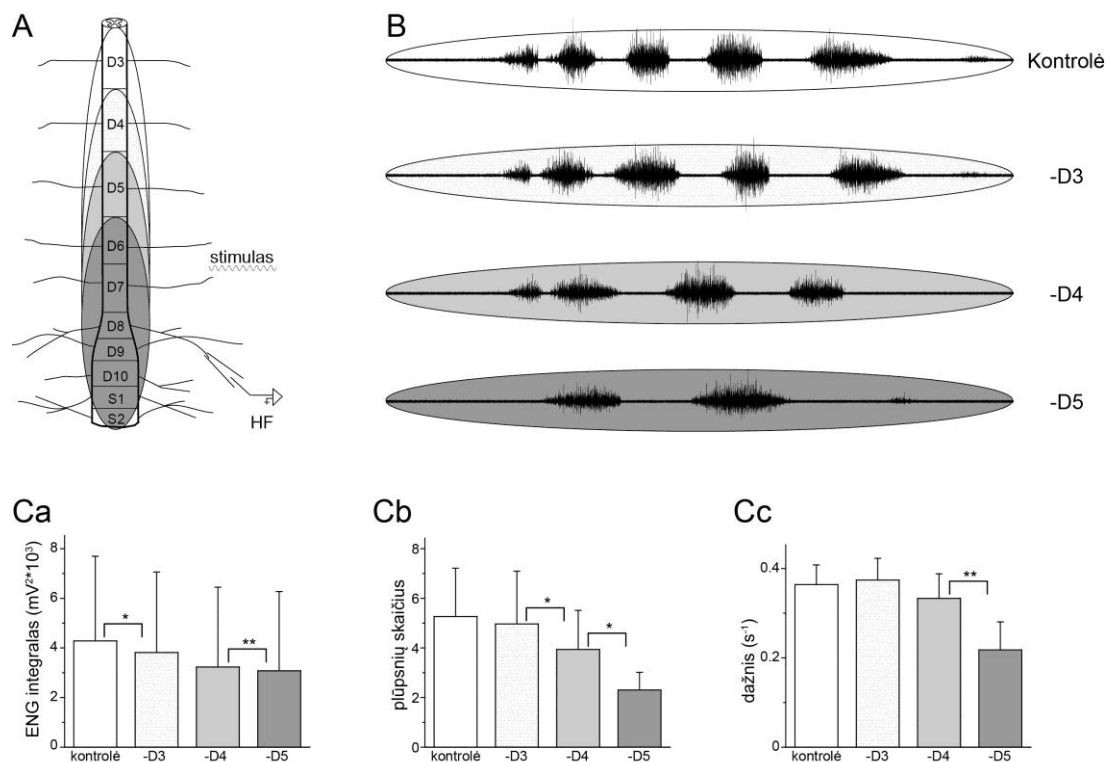
#### Krūtininiai nugaros smegenų segmentai aktyviai dalyvauja kasymosi reflekso generavime

Stimuliuojant receptinius laukus aplink užpakalinę vėžlio galūnę, galima sukelti trijų tipų kasymosi refleksus: priekinės, vidurinės ir užpakalinės kūno dalies (Mortin, Keifer et al. 1985). Vidurinės kūno dalies kasymosi refleksas ypatingas tuo, kad aferentai įnervuojantys receptinius laukus išsidėstę strėnų srities išplatėjime (D7-D8 nugaros smegenų segmentai) (Mortin and Stein 1990). Kasymosi reflekso vykdymui aktyvuojami motoriniai neuronai išsidėstę taip pat strėnų srityje (Ruigrok and Crowe 1984). Todėl galima manyti, kad sukėlus vidurinės kūno dalies kasymosi refleksą visas aktyvus neuronų tinklas bus lokalizuotas strėnų srities išplatėjime.



Šis kasymosi reflekso tipas leidžia tirti nutolusių nugaros smegenų segmentų (pavyzdžiui krūtininių nugaros smegenų segmentų) įtaką kasymosi reflekso generavimui. Pašalinus šiuos segmentus nepažeidžiamos nei sensorinė, nei motorinė neuronų tinklo dalis. Todėl pirmiausia buvo tiriama kokia krūtininių nugaros smegenų segmentų (D3-D5) įtaka vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso generavimui.

Mechaniškai stimuliuojant M9,5 dermatomą (D7 nugaros smegenų segmento receptinis laukas) sukeliamas kasymosi refleksas kuris atsispindi ritmišku HF motorinio nervo aktyvumu (Paveikslas 3.5.1 B).



Paveikslas 3.5.1 Nugaros smegenų krūtininių segmentų (D3-D5) įtaka vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso generavimui. Kasymosi refleksas (B) sukeltas vėžlio nugaros smegenų-šarvo preparate (A). Pašalinus krūtininius segmentus (D3-D5) sukeliamas „silpnėjęs“ kasymosi refleksas, kas atsispindi sumažėjusiu HF ENG integralu (Ca), HF pliūpsnių skaičiumi (Cb) ir HF pliūpsnių dažniu (Cc). Imčių skirtumai statistiškai reikšmingi su tikimybe  $p < 0,05$  (\*) ir  $p < 0,01$  (\*\*),  $n = 6$ .

Kaip matyti 3.5.1 paveiksle, pašalinus krūtininius nugaros smegenų segmentus kokybiškai keičiasi HF nervo aktyvumas. Pastebėta, kad po šių segmentų

pašalinimo kasymosi refleksas tampa mažiau ritmiškas – mažiau HF pliūpsnių, jie tampa ilgesni.

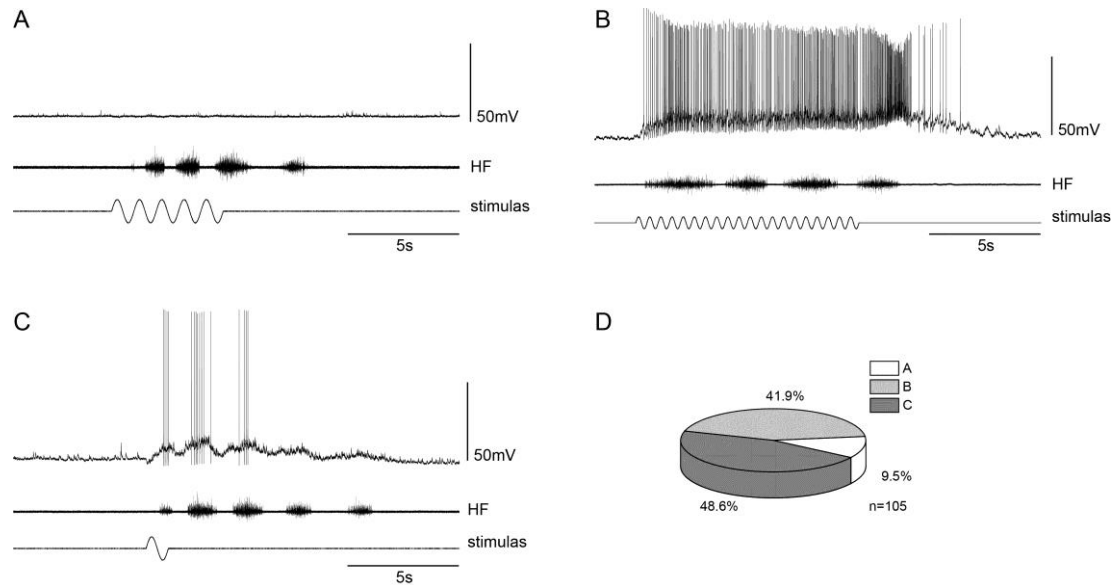
Šis eksperimentas buvo kartojamas su 3 vėžlio preparatais sukeliant kasymosi refleksą kairėje ir dešinėje pusėje alternuojančiai ir šalinant krūtininius nugaros smegenų segmentus po vieną (D3, D4, D5). Buvo palygintas rektifikuoto HF ENG integralas, HF pliūpsnių skaičius ir HF pliūpsnių vidutinis dažnis per kasymosi reflekso epizodą. Visi šie HF aktyvumo parametrai mažėja pašalinus krūtininius nugaros smegenų segmentus (Paveikslo 3.9.1 Ca, Cb, Cc dalys).

Neuronų tinklo redukcijos eksperimentai buvo atlikti dar su trim vėžlio preparatais pašalinant D4 ir po to D5 nugaros smegenų segmentus (n=1) arba pašalinant visus tris krūtininius segmentus (D3-D5) iškart (n=2). Visų šių eksperimentų metu gauti panašūs rezultatai – po krūtininių nugaros smegenų segmentų pašalinimo tendencingai mažėja rektifikuoto ENG integralas, HF pliūpsnių skaičius ir dažnis.

#### **D4 segmento neuronų aktyvacija vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso metu**

Toliau buvo tiriama kokią informaciją apie kasymosi refleksą gauna neuronai esantys krūtininiuose nugaros smegenų segmentuose. Buvo registruojami D4 segmento neuronai viduląstelinio būdu tuo pačiu metu sukeliant vidurinės kūno dalies kasymosi refleksą. Iš viso buvo užregistruota 105 neuronai ir jų atsakai į vidurinės kūno dalies kasymosi refleksą. Pagal kokybinius skirtumus neuronų atsakai į kasymosi refleksą buvo suskirstyti į tris tipus: neaktyvuojami, aktyvuojami toniškai ir aktyvuojami ritmiškai (Paveikslo 3.5.2 D skritulinė diagrama). 10 iš 105 neuronų nebuvo aktyvuojami (nesimato posinapsinių potencialų) kasymosi reflekso metu (Paveikslas 3.5.2 A). Likusiuose neuronuose (95 iš 105) buvo stebimi atsakai į kasymosi refleksą – posinapsiniai potencialai ir/arba veikimo potencialai (VP). Dalis neuronų (44 iš 105) vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso metu buvo aktyvuojami toniškai (Paveikslas 3.5.2 B). Paskutinė neuronų grupė (51 iš 105) kasymosi reflekso

metu buvo aktyvuojama ritmiškai (Paveikslas 3.5.2 C). Įdomu tai, kad ritmiškumas koreliuoja su motoriniu atsaku – HF nervo aktyvumu. Tai parodo, kad D4 neuronai aktyvuojami neuronų tinklo generuojančio motorinį atsaką – kasymosi refleksą.



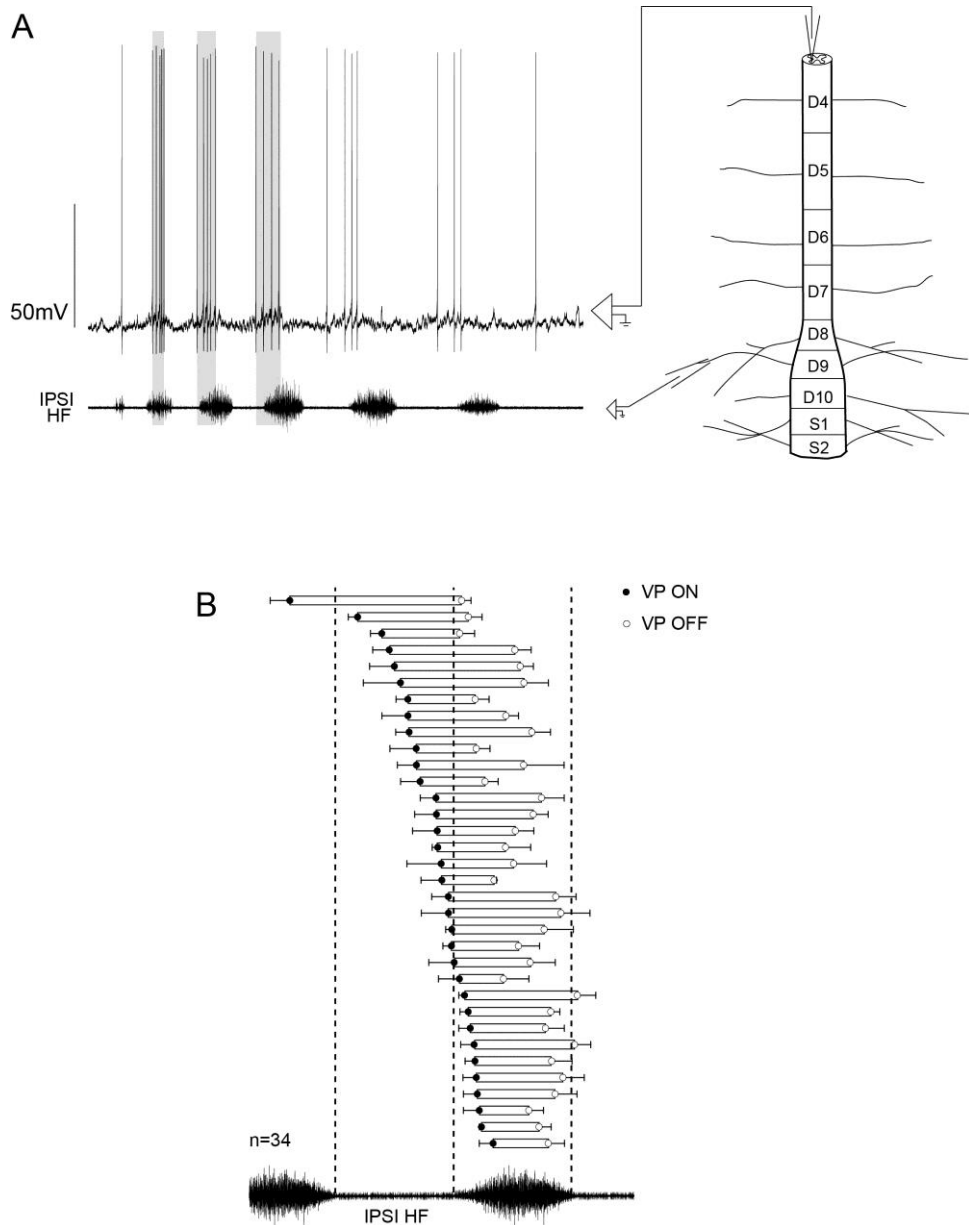
Paveikslas 3.5.2 D4 nugaros smegenų segmento neuronų atsakai į vidurinės kūno dalies kasymosi refleksą. Dalis neuronų kasymosi reflekso metu buvo neaktyvūs (A), kiti gaudavo toninius įėjimus (B), o trečia neuronų grupė buvo aktyvuojama ritmiškai (C). D4 segmento neuronų atsakų į tos pačios pusės kasymosi refleksą apibendrinimas (D). A, B ir C nuo viršaus: IN Vm; HF nervo ENG aktyvumas; stimulus.

Apibendrinant – apie 90% D4 segmento neuronų yra aktyvuojami vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso metu. Net apie 50% neuronų aktyvuojami ritmiškai, o neuronų aktyvumo ritmiškumas koreliuoja su HF nervo aktyvumo ritmiškumu. Rezultatai parodo, kad motorinio tinklo informacija intensyviai perduodama į krūtininius nugaros smegenų segmentus.

### Ritmiškų D4 segmento neuronų fazės analizė

Kaip jau minėta dalis D4 segmento neuronų (51 iš 105) buvo aktyvuojami ritmiškai vidurinės kūno dalies (ipsilateralinės) kasymosi reflekso metu (pavyzdys Paveikslo 3.5.3 A dalyje). 34 iš 51 neuronų atitiko fazės analizei keliamus reikalavimus (žiūrėti metodiką). Atskiras D4 segmento neuronas

aktyvus tam tikroje HF fazėje (pavyzdžiui neuronas aktyvus fazėje su HF aktyvumu). Skirtingi D4 segmento neuronai yra aktyvuojami skirtingose HF fazėse (Paveikslas 3.5.3 B dalis). Iš paveikslas 3.5.3 B dalies matoma, kad neuronai aktyvuojami tiek fazėje (Paveikslas 3.5.3 B dalies apačia), tiek ne fazėje (Paveikslas 3.5.3 B dalies viršus) su HF nervu.



Paveikslas 3.5.3 D4 segmento neuronai aktyvuojami ritmiškai ipsilateralinio kasymosi reflekso metu (A). D4 segmento neuronų populiacijos aktyvumo faziškumas ipsilateralinio kasymosi reflekso metu pateiktas B dalyje.

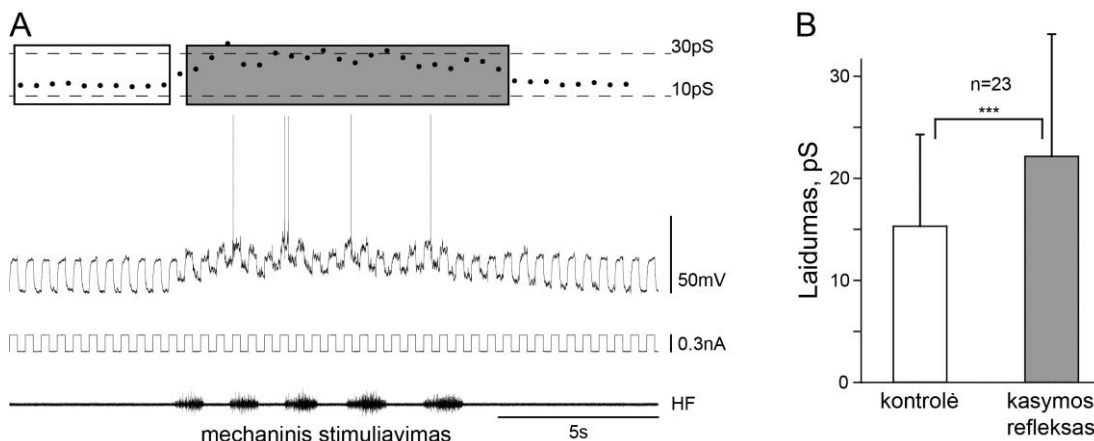
Apibendrinant, D4 neuronai aktyvuojami įvairiose šlaunies modulio fazėse kasymosi reflekso metu. Nepastebėtas aiškus dominavimas HF ar HE fazės

metu. Toks išplitęs neuronų aktyvumas kasymosi ciklo metu stebimas ir katėje (Berkinblit, Deliagina et al. 1978).

#### D4 segmento neuronų aktyvavimo intensyvumas

D4 neuronų membranos potencialas ( $V_m$ ) tampa „triukšmingas“ kasymosi reflekso metu. Tai parodo, kad neuronas gauna posinapsinius įėjimus. Yra žinoma, kad intensyvus neuroono posinapsinis aktyvavimas padidina jo laidumą (Alaburda, Russo et al. 2005, Berg, Ditlevsen et al. 2008).

Neurono membranos laidumas ir jo pokyčiai buvo stebimi į neuroną įleidžiant neigiamos srovės impulsus (Paveikslas 3.5.5 A). Laidumo pasikeitimas leidžia įvertinti neuronų posinapsinio aktyvavimo stiprumą. Buvo įvertinti D4 segmento neuronų (tik ritmiškai aktyvių) laidumo pokyčiai kasymosi refleksų metu (Paveikslas 3.5.5 A). Palygintas neuronų laidumas kasymosi reflekso metu (pilkas stačiakampis) su laidumu ramybėje (baltas stačiakampis). Nustatyta, kad membranos laidumas patikimai padidėjo  $47 \pm 34 \%$  ( $n=23$ ) kasymosi reflekso metu.



Paveikslas 3.5.5 D4 segmento neuronų laidumas padidėjo vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso metu. Neurono laidumas ženkliai padidėja įsijungus kasymosi refleksui (A). A nuo viršaus: IN laidumas; IN  $V_m$ ; įleidžiamos srovės impulsai; HF nervo ENG aktyvumas; stimulus. Imčių skirtumai statistiškai reikšmingi su tikimybe  $p < 0,001$  (\*\*),  $n=23$ .

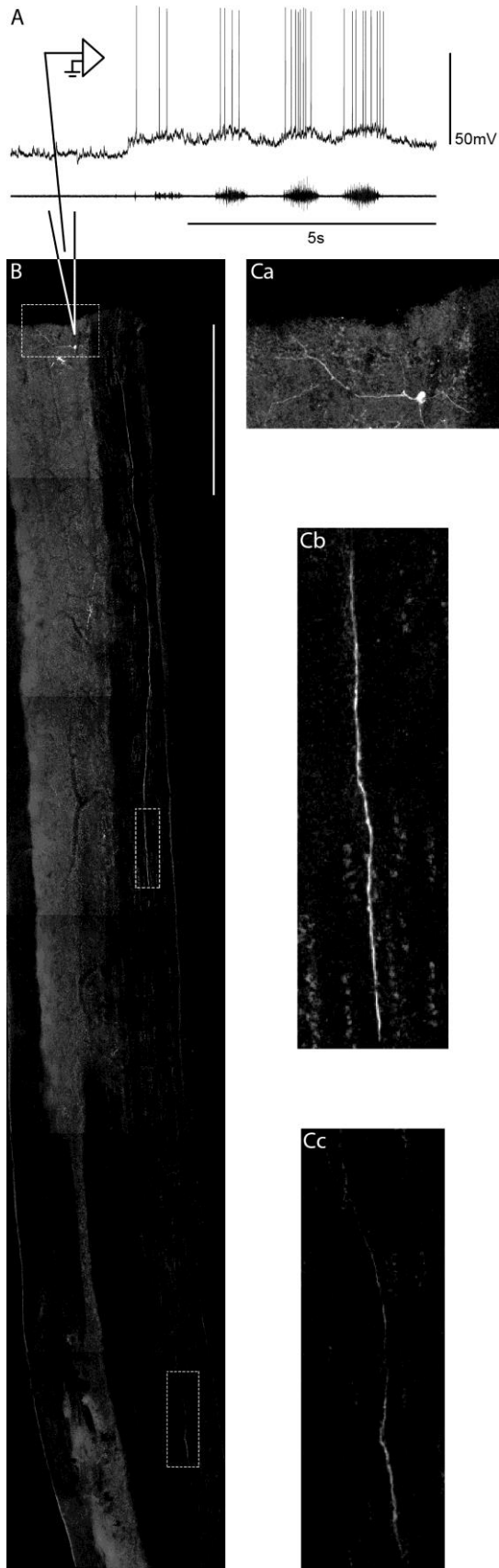
Laidumo padidėjimas D4 segmento neuronuose kasymosi reflekso metu yra sulyginamas su laidumo padidėjimu kasymosi reflekso metu strėnų srities (D9-

D10) IN (Alaburda, Russo et al. 2005). Tai parodo, kad D4 neuronai yra aktyvuojami taip pat intensyviai kaip ir neuronai esantys strėnų srities išplatėjime (kur manoma yra išsidėstęs CPG).

#### **D4 segmento neuronų projekcijos**

D4 segmento neuronas, kuris buvo ritmiškai aktyvuojamas kasymosi reflekso metu (Paveikslas 3.5.6 A), buvo užpildytas *biocytin*'u. Po elektrofiziologinių eksperimentų nugaros smegenų dalis (D4-D5 segmentai) buvo išimama ir atliekama procedūra neuronų vaizdinimui (žiūrėti metodus). Išilginės smegenų riekelės viename iš galų matomas neurono kūnas su besišakojančiomis ataugomis – dendritais (Paveikslo 3.5.6 B ir jo padidintas fragmentas Ca dalyje). Nugaros smegenų riekelėse, kuriose nėra neurono kūno randami dendritai, todėl yra žinoma kuriame riekelės gale buvo registruojamas neuronas. Konfokaliniu mikroskopu buvo aptikta ilga, plona besileidžianti struktūra – aksonas (Paveikslo 3.5.6 B ir jo padidinti fragmentai Cb ir Cc dalyse).

Iš viso buvo atlikta 14 neuronų (kurie ritmiškai aktyvuojami vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso metu) vizualizacija iš 5 vėžlio nugaros smegenų-šarvo preparatų. Buvo aptikti 8 besileidžiantys aksonai. Šie rezultatai parodo, kad D4 segmento neuronai ne tik yra aktyvuojami neuronų tinklo, kuris generuoja kasymosi refleksą, bet tie patys neuronai siunčia savo aksonus link neuronų tinklo generuojančio šį kasymosi refleksą.



Paveikslas 3.5.6 D4 segmento neuronai projektuojasi link strėnų srities išplatėjimo. D4 segmento neuronas, kuris buvo ritmiškai aktyvuojamas vidurinės kūno dalies kasymosi refleksu metu (A) buvo užpildytas *biocitin*‘u. Po neuronų dažymo procedūros buvo aptiktas neurono kūnas (B, Ca) ir besileidžiantis neurono aksonas (B, Cb, Cc).

## **4. Rezultatų aptarimas ir diskusija**

### **4.1. Kasymosi refleksas sukeltas mechaniniu ir elektriniu stimuliavimais**

Tiek *in vivo*, tiek *in vitro* vėžlio preparatuose kasymosi refleksas gali būti sukeltas mechaniniu (Keifer and Stein 1983, Stein 1983, Stein 2005) ir/arba elektriniu stimuliavimu (Currie and Stein 1988, Currie and Stein 1990, Currie and Stein 1992, Currie and Lee 1996). Sherrington'as savo viename iš darbų teigia, kad mechaninis stimulus kasymosi reflekso sukėlimui yra efektyvesnis, nei elektrinė stimuliacija ir manė, kad tai gali būti dėl mechaninio stimulo natūralumo (Sherrington 1906). Disertacijoje parodoma, kad kasymosi refleksas sukeltas elektriniu somatosensorinio nervo stimuliavimu kokybiškai panašus į kasymosi refleksą sukeltą natūraliu mechaniniu stimuliavimu. Galima teigti, kad nors kasymosi refleksą sukelti sunkiau stimuliuojant elektriškai, bet jeigu kasymosi refleksas sukliamas – jis kokybiškai panašus į kasymosi refleksą sukeltą mechaniniu stimulu.

### **4.2. CSP ir jo mechanizmai**

Yra žinoma, kad žmogaus galūnę stimuliuojant skausmo slenkstį viršijančiu stimulu, sukliamas somatosensorinis tylos periodas (CSP – *cutaneous silent period*). Tai galūnės raumenų aktyvumo slopinimas po stimulo. Nors CSP tiriamas jau seniai, jį sukliantys mechanizmai iki šiol nėra žinomi. CSP gali būti sukliamas dėl MN slopinimo (Inghilleri, Cruccu et al. 1997, Manconi, Syed et al. 1998), dėl žadinančių įėjimų MN sumažėjimo (Leis, Stetkarova et al. 1995, Leis, Stetkarova et al. 1996) ar šių mechanizmų kombinacijos.

Šiame darbe buvo tiriami mechanizmai sukliantys CSP atsakus integruotame vėžlio nugaros smegenų preparate. Parodyta, kad somatosensorinio nervo elektrinis stimuliavimas sukliama posinapsinius įėjimus MN, kurie slopina esamą motorinį aktyvumą kasymosi reflekso metu. MN membranos laidumas CSP metu padidėja daugiau nei 50% (lyginant su ramybe), o posinapsiniai įėjimai slopina MN VP generavimą sukeltą įleidžiant depoliarizuojančią



pastovią srovę. Gauti rezultatai parodo, kad posinapsinis MN slopinimas prisideda prie CSP sukėlimo kasymosi reflekso metu. Ši išvada neatmeta galimybės, kad žadinačių posinapsinių jėgimų į MN slopinimas taip pat gali būti dalis CSP mechanizmo.

Šio tyrimo metodika skyrėsi nuo tradicinių CSP tyrimų atliekamų su žmonėmis dviem aspektais. Pirma – pastovus raumens sutraukimas naudojamas žmonių CSP tyrimuose buvo pakeistas ritmišku kasymosi refleksu. Dėl šios priežasties nebuvo galima kontroliuoti motorinio aktyvumo lygio. Nepaisant to, kad motorinis aktyvumas nebuvo pastovus, CSP mechanizmas buvo stebimas 9 iš 10 analizuotų atvejų (preparatų).

Antra – žmonių tyrimuose nustatyta, kad CSP yra mažiau išreikštas (silpnėsnis ir trumpėsnis) proksimaliniuose galūnių raumenyse, nei distaliniuose (Inghilleri, Cruccu et al. 1997, Leis, Stokic et al. 2000, Serrao, Parisi et al. 2001). Dėl šios priežasties dažniausia CSP tiriamas raumenyse valdančiuose rankų pirštus (Floeter 2003). Disertacijoje parodoma, kad ženklus CSP stebimas ir motoriniame nerve valdančiame proksimalinius šlaunies raumenis (motorinio nervo pasirinkimas buvo nulemtas metodinių apribojimų). Šis metodinis skirtumas gali paaiškinti kodėl CSP trukmė pristatyta disertacijoje yra trumpesnė, nei stebima žmonių tyrimuose (Uncini, Kujirai et al. 1991, Serrao, Parisi et al. 2001, Floeter 2003). CSP trukmė taip pat galėjo skirtis ir dėl naudojamo nestipraus elektrinio stimuliavimo. CSP yra trumpėsnis naudojant silpnus stimulus (Serrao, Parisi et al. 2001).

Disertacijoje CSP latencija nustatyta ženkliai trumpesnė, nei žmonių tyrimuose (Shefner and Logigian 1993, Serrao, Parisi et al. 2001, Kofler 2003, Rodi and Springer 2011). CSP latencija susideda iš dviejų dalių: periferinės ir centrinės. Periferinė – tai laikas reikalingas sensoriniam signalui pasiekti nugaros smegenis periferiniais nervais ir laikas kuris reikalingas atsako signalui nusklisti motoriniais nervais iki raumens. Centrinė – tai informacijos apdorojimo laikas nugaros smegenų neuronų tinkle. Naudota skirtinga eksperimentų metodika paaiškina latencijos skirtumus: šiame tyrime motorinio nervo ENG aktyvumas, bei somatosensorinio nervo stimuliavimas buvo

atliekamas arti nugaros smegenų (1-2 cm), o tuo tarpu žmonių tyrimuose stimuliuojama ir registruojama galūnės distalinėje dalyje (apie 50 cm). CSP latencija nustatyta šiame darbe turėtų būti artima centrinei latencijai nustatyta žmonių tyrimuose. Shefner su kolegomis apskaičiavo centrinę latenciją, kuri yra lygi 20 ms (Shefner and Logigian 1993) ir atitinka latenciją nustatytą šiame darbe.

Apibendrinant, darbe pristatyti rezultatai parodo, kad somatosensorinio nervo stimuliavimas izoliuotame vėžlio nugaros smegenų-šarvo preparate sukelia CSP atsakus kasymosi reflekso metu. Tas pats somatosensorinis stimulus, kuris sukelia CSP atsakus kasymosi reflekso metu, sukelia stiprų polisinapsinį MN posinapsinį slopinimą ramybėje. Tai patvirtina hipotezę, kad CSP yra sukeliamas dėl MN posinapsinio slopinimo.

### **4.3. Gradualus kasymosi refleksas – laikinė somatosensorinių jėjimų integracija**

Šiame darbe buvo tiriamas gradualaus neuronų tinklo aktyvumo sukėlimas panaudojant izoliuotą vėžlio nugaros smegenų-šarvo preparatą. Yra žinoma, kad nugaros smegenys pasižymi sekundžių eilės „atmintimi“ (Sherrington 1906, Crowe and Linnartz 1985, Currie and Stein 1988, Currie and Stein 1990) – informacija apie somatosensorinį jėjimą nugaros smegenyse išlieka ilgiau negu sekundę net ir jei nesukeliamas motorinis atsakas. Šiame tyrime nugaros smegenų neuronų tinklo „atmintis“ patvirtinta – ikislenkstinis somatosensorinis stimulus, kuris nesukelia motorinio atsako, pateiktas ilgesniais negu 1 sekundė laiko intervalais sukelia kasymosi refleksą. Tai parodo, kad informacija apie ikislenkstinį stimulą nugaros smegenų neuronų tinkle išlieka iki sekančio ikislenkstinio stimulo.

Elektriškai stimuliuojant atitinkamus receptinius laukus galima sukelti gradualų vidurinės (pristatytas šiame darbe ir (Currie and Stein 1988)) ir priekinės kūno dalių kasymosi refleksus (Currie and Stein 1990). Šiame darbe taip pat parodyta, kad gradualus kasymosi refleksas gali būti sukeliamas ir mechaniniu stimuliavimu. Kadangi šie tyrimai atlikti spinalizuotuose

preparatuose, jie negali būti apibendrinti lokomocijos mechanizmams, kurie apima ir besileidžiančių traktų aktyvumą.

### **Motorinių neuronų vidinės savybės laikinės integracijos metu**

Šio tyrimo metu nebuvo aptiktas MN vidinių savybių nulemiančių jų sužadinamumą pakitimas laikinės integracijos metu. MN  $V_m$ , sužadinamumas ir  $V_{th}$  prieš stimulą sukeltą kasymosi refleksą buvo toks pat kaip ir ramybėje. MN vidinių savybių reguliavimas gali būti naudojamas kaip atitinkamų neuronų parinkimas atlikti tam tikras motorines programas (Delgado-Lezama and Hounsgaard 1999). L-tipo  $Ca^{2+}$  kanalų metabotropinis aktyvavimas padidina vėžlio MN sužadinamumą (Perrier, Alaburda et al. 2002). Kasymosi reflekso metu išskirtas glutamatas padidina MN sužadinamumą, aktyvuodamas L-tipo  $Ca^{2+}$  kanalus, kuris tęsiasi net iki dešimčių sekundžių po kasymosi reflekso pabaigos (Alaburda and Hounsgaard 2003). Toks pat MN sužadinamumo padidėjimas sukeliama trumpu dorsolateralinio trakto (DLF) stimuliavimu nugaros smegenų riekelėse (Delgado-Lezama, Perrier et al. 1997).

MN moduliacijos nebuvimą laikinės integracijos metu galima paaiškinti tuo, kad laikinės integracijos metu MN aktyvuojami neintensyviai (MN laidumas stipriai nesikeičia), todėl ir glutamato išskiriama mažai. Tuo tarpu MN laidumas kasymosi reflekso metu ženkliai padidėja (Alaburda, Russo et al. 2005, Berg, Ditlevsen et al. 2008), kas rodo intensyvų MN aktyvumą, bei didelio glutamato kiekio išskyrimą. Alternatyvus aiškinimas: DLF ir somatosensorinių aferentų stimuliavimas gali aktyvuoti skirtingas glutamato sinapses, kurios nevienodai moduluoja L-tipo  $Ca^{2+}$  kanalus.

### **Priešmotorinio tinklo aktyvumas laikinės somatosensorinių įėjimų integracijos metu**

Nustatyta, kad priešmotorinių neuronų aktyvumas po trumpo stimulo padidėja ir išlieka padidėjęs iki keletos sekundžių somatosensorinių įėjimų laikinės

integracijos metu. Tai parodo, kad trumpas stimulus sukelia ilgalaikį priešmotorinių neuronų aktyvumo pokytį.

Pastovus ir ilgas neuronų aktyvumas po trumpo stimulo yra stebimas daugelyje centrinės nervų sistemos dalių ir manoma, kad toks neuronų aktyvumo pasikeitimas gali būti darbinės atminties mechanizmas (Major and Tank 2004). Labiausiai tikėtina, kad ilgai trunkančius neuronų aktyvumo pokyčius po trumpo stimulo sukelia vidinės neuronų bistabilumo savybės (Russo and Hounsgaard 1994, Bennett, Hultborn et al. 1998, Di Prisco, Pearlstein et al. 2000) arba rekurentinis neuronų tinklas (Li, Soffe et al. 2006).

Anksčiau parodyta, kad D4 nugaros smegenų segmento neuronai gali į trumpą stimulą atsakyti ilga VP seka (Currie and Stein 1990). Taip pat šios VP sekos gali sumuotis sekundžių eilės laiko skalėje (Currie and Stein 1990). Galima būtų manyti, kad priešmotorinio tinklo aktyvumas aprašomas disertacijoje yra būtent šios grupės neuronų aktyvumas po trumpo stimulo.

Viename iš tyrimų (Currie and Stein 1992) teigiama, kad gradualus kasymosi reflekso sukėlimas, bei ilgai trunkantis neuronų aktyvumas – tai nuo NMDA receptorių priklausomas mechanizmas. Alternatyvus mechanizmas, galintis sukelti ilgalaikį aktyvumo padidėjimą po trumpo stimulo neuronuose – plato potencialai. Yra žinoma, kad vėžlio nugaros smegenų IN pasižymi plato potencialais (Hounsgaard and Kjaerulff 1992, Russo and Hounsgaard 1996). Taip pat yra žinoma, kad plato potencialus aktyvavus nuo įtampos ir/arba transmiterių priklausomu būdu (Russo and Hounsgaard 1994, Russo and Hounsgaard 1996, Russo, Nagy et al. 1997, Perrier, Alaburda et al. 2002), jie gali laike sumuotis/integruotis. Plato potencialų laikinės sumacijos charakteristikos atitinka šiame darbe nagrinėjamą laikinę integraciją.

Būtina pažymėti, kad sekundžių eilės laikinė integracija būdinga ir WDR neuronams sukeliantiems skausmo sensitizaciją žinduoliuose (Fossat, Sibon et al. 2007). Šiuose neuronuose integracija sukeliama NMDA receptoriams aktyvavus L-tipo  $Ca^{2+}$  kanalus (Fossat, Sibon et al. 2007). Tikėtina, kad ir disertacijoje aprašoma somatosensorinių jėjimų laikinė integracija gali būti sukeliama tų pačių mechanizmų WDR tipo neuronuose.

Farmakologijos (agonistų ir antagonistų) naudojimas yra viena iš galimybių konkrečiam mechanizmui nustatyti. Parodyta, kad APV (NMDA receptorių antagonistas) blokuoja gradualų kasymosi reflekso aktyvavimą *in vivo* (Currie and Stein 1992) ir *in vitro* (Currie and Lee 1996). Šių eksperimentų silpnoji pusė yra tai, kad panaudojus NMDA receptorių antagonistus jie gali tiesiog sumažinti viso tinklo sužadinamumą, bet ne specifiškai blokuoti aktyvumą neuronuose su ilgalaikiu atsaku į trumpą stimulą. APV ne tik blokuoja gradualų kasymosi reflekso sukėlimą, bet sumažina kasymosi reflekso atsaką į intensyvų stimulą (Currie and Stein 1992, Currie and Lee 1996). Tai patvirtina, kad APV sumažina viso neuronų tinklo sužadinamumą, bet ne blokuoja laikinės integracijos mechanizmą.

Analogiškas eksperimentas buvo atliktas ir šiame darbe. Parodyta, kad *nimodipin*‘as blokuoja gradualų kasymosi reflekso sukėlimą nekeičiant elektrinio stimuliavimo stiprumo. Tačiau padidinus stimulo stiprumą – vėl sukeliamas gradualus kasymosi refleksas. Šių rezultatų interpretacija gali būti dvejopa: arba laikinė integracija vyksta ne dėl L-tipo  $Ca^{2+}$  kanalų, arba *nimodipin*‘as neblokavo visų L-tipo  $Ca^{2+}$  kanalų, o likę neužblokuoti kanalai sugebėjo sukelti gradualų kasymosi reflekso įsijungimą padidinus stimulo stiprumą. Šis pavyzdys parodo, kad nespecifinis kanalų/receptorių aktyvavimas/blokavimas neuronų tinklų tyrimuose yra sunkiai interpretuojamas.

Norint nustatyti tikslius mechanizmus sukeliančius priešmotorinio tinklo aktyvumą po ikislenkstinio stimulo, būtina šių priešmotorinių neuronų viduląstelinė registracija. Tačiau net ir viduląstelinė šių neuronų registracija nepadėtų atsakyti į klausimą ar priešmotorinio tinklo aktyvumas yra: a) dalis neuronų tinklo mechanizmo, kuris sąlygoja tam tikro funkcinio motorinio atsako generavimą į atitinkamą stimulą; b) tiesiog nespecifinis tinklo sužadinimas, kuris tiesiog nepasiekia slenksčio „tikram“ kasymosi refleksui sukelti. Šiai hipotezei patvirtinti ar paneigti reikia specifiškai išjungti L-tipo  $Ca^{2+}$  kanalus ar NMDA receptorius tik tuose neuronuose kurie aktyvuojami

ikislenkstinio stimulo. Šiam tikslui pasiekti puikiai tiktų optogenetiniai metodai, deja, galimybių tai atlikti šiuo metu dar nėra.

Išvadoje galima teigti, kad padidėjęs priešmotorinio neuronų tinklo aktyvumas gali būti somatosensorinių įėjimų laikinės integracijos mechanizmas. Be to padidėjęs priešmotorinio tinklo aktyvumas nepakeičia MN sužadnamumo laikinės integracijos metu.

#### **4.4. Krūtininių segmentų įtaka vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso generavimui**

Šios tyrimo dalies metu nustatyta, kad krūtininiai nugaros smegenų segmentai (D3-D5) aktyviai dalyvauja užpakalinių galūnių judesių generavime – šių segmentų pašalinimas keičia užpakalinių galūnių kasymosi refleksą. Iki šiol buvo manoma, kad neuronų tinklas generuojantis vidurinės kūno dalies kasymosi refleksą yra išsidėstęs strėnų srities išplatėjime (Mortin and Stein 1989). Disertacijoje parodoma, kad krūtininiai segmentai ženkliai prisideda generuojant vidurinės kūno dalies kasymosi refleksą. Panašu, kad šie segmentai nevaizina konkretaus vaidmens kasymosi reflekso generavime, o tiesiog padidina neuronų tinklo bendrą sužadnamumą. Šie rezultatai leidžia manyti, kad neuronų tinklas generuojantis kasymosi refleksą nėra išsidėstęs tik strėnų srities išplatėjime, o gerokai labiau išplitęs.

#### **D4 segmento neuronų aktyvavimas vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso metu**

Vidulastelinis D4 segmento neuronų registravimas parodė, kad apie 90% neuronų yra aktyvuojami (gauna posinapsinius įėjimus) vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso metu. Dar svarbiau, net apie 50% registruotų neuronų buvo aktyvuojami ritmiškai. Šis ritmiškumas koreliuoja su ritmišku motorinių atsaku – HF nervo aktyvumu. Be to neuronų laidumas ženkliai padidėja kasymosi reflekso metu, kas parodo intensyvų posinapsinį neuronų aktyvavimą. Šie rezultatai leidžia teigti, kad neuronų tinklas esantis strėnų srities išplatėjime

stipriai aktyvuoja krūtininius segmentus – intensyvus kylančios informacijos perdavimas į krūtininius nugaros smegenų segmentus.

Tiriant somatosensorinių jėjimų apdorojimą izoliuotame D4 nugaros smegenų segmente, nebuvo aptikta jokio ritmiškumo neuronų atsakuose į somatosensorinius stimulus (Currie and Stein 1990). Tai parodo, kad ritmiškas D4 segmento neuronų aktyvavimas aprašomas disertacijoje vyksta dėl to, kad kiti nugaros smegenų segmentai (labiausia tikėtina kad strėnų srities) aktyvuoja D4 segmento neuronus. Pats D4 segmentas nėra ritmogeniškas.

Ritmiškų neuronų fazės analizė parodė, kad D4 segmento neuronų aktyvumas išsibarstęs HF nervo aktyvumo atžvilgiu sukeltant vidurinės kūno dalies kasymosi refleksus. Įdomu tai, kad neuronai nėra aktyvūs tik fazėje ar ne fazėje su HF, jų aktyvumas tolygiai pasiskirstęs viso HF ciklo metu. Panašūs rezultatai gauti tiriant katės interneuronus kasymosi reflekso metu – jų aktyvumas tolygiai išsibarstęs viso kasymosi reflekso ciklo metu (Berkinblit, Deliagina et al. 1978).

#### **D4 segmento neuronų aksonų projekcijos**

Besileidžiančių D4 segmento neuronų, kurie ritmiškai aktyvuojami kasymosi reflekso metu, aksonų aptikimas leidžia teigti, kad D4 segmento neuronai ne tik gauna informaciją iš strėnų srities išplatėjimo, bet aktyviai gali dalyvauti kasymosi reflekso generavime. Krūtininių segmentų įtaką kasymosi reflekso generavime patvirtina ir neuronų tinklo redukcijos tyrimas – pašalinus krūtininius segmentus keičiasi kasymosi reflekso generavimas. Šiuos rezultatus galima būtų paaiškinti tuo, kad neuronų tinklas, generuojantis kasymosi refleksą, nėra lokalizuotas tik strėnų srities išplatėjimo segmentuose, bet yra išplitęs gerokai labiau (bent iki krūtininių segmentų).

#### **Galimos krūtininių nugaros smegenų segmentų funkcijos**

Žmogaus krūtininiuose nugaros smegenų segmentuose yra išsidėstę MN, kurie įnervuoja nugaros raumenis (*intrinsic back muscles*) (Tortora and Derrickson

2006). Šie nugaros raumenys tiek žmogaus, tiek kitų gyvūnų (katės) lokomocijos metu yra aktyvūs ir naudojami pagrindinai kūno pusiausvyrai palaikyti (Thorstensson, Carlson et al. 1982, Zomlefer, Provencher et al. 1984). Šiuo atveju yra dvi priežastys neigiančios šią krūtininių nugaros smegenų segmentų funkciją. Pirma – vėžlys neturi nei nugaros raumenų, nei MN krūtininiuose segmentuose (Nieuwenhuys, Donkelaar et al. 1998). Antra, lokomocijos metu tiek žmogaus (Thorstensson, Carlson et al. 1982), tiek katės (Zomlefer, Provencher et al. 1984) nugaros raumenys aktyvuojami du kartus vieno motorinio ciklo metu. Disertacijoje pristatomi krūtininių nugaros smegenų segmentų neuronai aktyvuojami vieną kartą per ciklą.

Pastaraisiais metais daugėja tyrimų, kurie parodo, kad krūtininiai nugaros smegenų segmentai gali būti svarbūs gaūnių judesių generavime. Pavyzdžiui yra parodyta, kad krūtininiuose segmentuose vykstantis sinapsinis perdavimas reikalingas tarpgalūninei (priekinių ir užpakalinių galūnių) koordinacijai ir komandinės informacijos iš aukštesnių smegenų centrų perdavimui (Cowley, Zaporozhets et al. 2008, Cowley, Zaporozhets et al. 2010). van den Brand su kolegomis parodė, kad žiurkėms pažeidus nugaros smegenis ties krūtininiais segmentais, po rehabilitacijos jos sugeba vėl vykdyti valingus užpakalinių galūnių judesius (van den Brand, Heutschi et al. 2012). Šio atsistatymo po traumos metu krūtininiuose segmentuose vyksta sinapsinis plastiškumas – naujų sinapsių formavimas. Tikėtina, kad šis neuronų tinklo reorganizavimas veda link valingų judesių atsistatymo. Tariant, kad krūtininiai nugaros smegenų segmentai yra dalis neuronų tinklo valdančio užpakalines galūnes, tai judesių atsistatymas po krūtininių segmentų pažeidos lengviau interpretuojamas.

Apibendrinant, disertacijoje pateikti rezultatai rodo, kad nugaros smegenų neuronų tinklas generuojantis ritmiškus galūnių judesius nėra erdvėje kompaktiškai lokalizuotas, o išplitęs visame nugaros smegenų tinkle.



## **Išvados**

- Elektrinis vėžlio somatosensorinių nervų stimuliavimas sukelia slopinimą motoriniuose atsakuose, kurio laikiniai parametrai atitinka somatosensorinį tylos periodą aptinkamą ir žmonėse;
- Motoriniai neuronai yra slopinami somatosensorinio tylos periodo metu;
- Laikinė somatosensorinės įėjimų integracija nugaros smegenyse galima ir be motorinių neuronų sužadimumo pokyčio;
- Laikinės integracijos metu padidėja priešmotorinių neuronų aktyvumas;
- Krūtininiai nugaros smegenų segmentai dalyvauja vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso generavime – jų pašalinimas sumažina kasymosi reflekso ritmiškumą;
- Krūtininių segmentų neuronai gauna intensyviuos posinapsinius įėjimus vidurinės kūno dalies kasymosi reflekso metu ir dalis šių neuronų savo aksonus siunčia atgal link strėnų srities išplatėjimo.

## Literatūros saraksts

1. Aksay, E., R. Baker, H. S. Seung and D. W. Tank (2000). "Anatomy and discharge properties of pre-motor neurons in the goldfish medulla that have eye-position signals during fixations." *J Neurophysiol* 84(2): 1035-1049.
2. Aksay, E., G. Gamkrelidze, H. S. Seung, R. Baker and D. W. Tank (2001). "In vivo intracellular recording and perturbation of persistent activity in a neural integrator." *Nat Neurosci* 4(2): 184-193.
3. Alaburda, A. and J. Hounsgaard (2003). "Metabotropic modulation of motoneurons by scratch-like spinal network activity." *J.Neurosci.* 23(25): 8625-8629.
4. Alaburda, A., J. F. Perrier and J. Hounsgaard (2002). "Mechanisms causing plateau potentials in spinal motoneurons." *Adv Exp Med Biol* 508: 219-226.
5. Alaburda, A., R. Russo, N. MacAulay and J. Hounsgaard (2005). "Periodic high-conductance states in spinal neurons during scratch-like network activity in adult turtles." *J.Neurosci.* 25(27): 6316-6321.
6. Ballion, B., D. Morin and D. Viala (2001). "Forelimb locomotor generators and quadrupedal locomotion in the neonatal rat." *Eur J Neurosci* 14(10): 1727-1738.
7. Baranauskas, G. and A. Nistri (1996). "NMDA receptor-independent mechanisms responsible for the rate of rise of cumulative depolarization evoked by trains of dorsal root stimuli on rat spinal motoneurons." *Brain Res* 738(2): 329-332.
8. Baranauskas, G. and A. Nistri (1998). "Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms." *Prog Neurobiol* 54(3): 349-365.
9. Bennett, D. J., H. Hultborn, B. Fedirchuk and M. Gorassini (1998). "Short-term plasticity in hindlimb motoneurons of decerebrate cats." *J Neurophysiol* 80(4): 2038-2045.
10. Berg, R. W., A. Alaburda and J. Hounsgaard (2007). "Balanced inhibition and excitation drive spike activity in spinal half-centers." *Science* 315(5810): 390-393.
11. Berg, R. W., S. Ditlevsen and J. Hounsgaard (2008). "Intense synaptic activity enhances temporal resolution in spinal motoneurons." *PLoS.One.* 3(9): e3218.

12. Berkinblit, M. B., T. G. Deliagina, A. G. Feldman, I. M. Gelfand and G. N. Orlovsky (1978). "Generation of scratching. I. Activity of spinal interneurons during scratching." *J Neurophysiol* 41(4): 1040-1057.
13. Berkowitz, A. (2001). "Broadly tuned spinal neurons for each form of fictive scratching in spinal turtles." *J Neurophysiol* 86(2): 1017-1025.
14. Berkowitz, A. (2001). "Rhythmicity of spinal neurons activated during each form of fictive scratching in spinal turtles." *J Neurophysiol* 86(2): 1026-1036.
15. Berkowitz, A. (2002). "Both shared and specialized spinal circuitry for scratching and swimming in turtles." *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 188(3): 225-234.
16. Berkowitz, A. (2005). "Physiology and morphology indicate that individual spinal interneurons contribute to diverse limb movements." *J Neurophysiol* 94(6): 4455-4470.
17. Berkowitz, A. (2007). "Spinal interneurons that are selectively activated during fictive flexion reflex." *J Neurosci* 27(17): 4634-4641.
18. Berkowitz, A. (2008). "Physiology and morphology of shared and specialized spinal interneurons for locomotion and scratching." *J Neurophysiol* 99(6): 2887-2901.
19. Berkowitz, A. (2010). "Multifunctional and specialized spinal interneurons for turtle limb movements." *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1198: 119-132.
20. Berkowitz, A. and P. S. Stein (1994). "Activity of descending propriospinal axons in the turtle hindlimb enlargement during two forms of fictive scratching: broad tuning to regions of the body surface." *J Neurosci* 14(8): 5089-5104.
21. Berkowitz, A. and P. S. Stein (1994). "Activity of descending propriospinal axons in the turtle hindlimb enlargement during two forms of fictive scratching: phase analyses." *J Neurosci* 14(8): 5105-5119.
22. Berkowitz, A., G. L. Yosten and R. M. Ballard (2006). "Somato-dendritic morphology predicts physiology for neurons that contribute to several kinds of limb movements." *J Neurophysiol* 95(5): 2821-2831.
23. Brown, T. G. (1911). "The intrinsic factors in the act of progression in the mammal." *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Containing Papers of a Biological Character* 84(572): 308-319.

24. Brown, T. G. (1914). "On the nature of the fundamental activity of the nervous centres; together with an analysis of the conditioning of rhythmic activity in progression, and a theory of the evolution of function in the nervous system." *J Physiol* 48(1): 18-46.
25. Caccia, M. R., A. J. McComas, A. R. Upton and T. Blogg (1973). "Cutaneous reflexes in small muscles of the hand." *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 36(6): 960-977.
26. Cangiano, L. and S. Grillner (2003). "Fast and slow locomotor burst generation in the hemispinal cord of the lamprey." *J Neurophysiol* 89(6): 2931-2942.
27. Cangiano, L., R. H. Hill and S. Grillner (2012). "The hemisegmental locomotor network revisited." *Neuroscience* 210: 33-37.
28. Carlin, K. P., K. E. Jones, Z. Jiang, L. M. Jordan and R. M. Brownstone (2000). "Dendritic L-type calcium currents in mouse spinal motoneurons: implications for bistability." *Eur J Neurosci* 12(5): 1635-1646.
29. Catterall, W. A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels." *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 521-555.
30. Catterall, W. A. (2011). "Voltage-gated calcium channels." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(8): a003947.
31. Catterall, W. A., E. Perez-Reyes, T. P. Snutch and J. Striessnig (2005). "International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels." *Pharmacol Rev* 57(4): 411-425.
32. Cazalets, J. R. and S. Bertrand (2000). "Ubiquity of motor networks in the spinal cord of vertebrates." *Brain Res Bull* 53(5): 627-634.
33. Cazalets, J. R., M. Borde and F. Clarac (1995). "Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat." *J Neurosci* 15(7 Pt 1): 4943-4951.
34. Cazalets, J. R., Y. Sqalli-Houssaini and F. Clarac (1992). "Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat." *J Physiol* 455: 187-204.
35. Clarac, F., E. Pearlstein, J. F. Pflieger and L. Vinay (2004). "The in vitro neonatal rat spinal cord preparation: a new insight into mammalian locomotor

- mechanisms." *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 190(5): 343-357.
36. Cohen, A. H. and P. Wallen (1980). "The neuronal correlate of locomotion in fish. "Fictive swimming" induced in an in vitro preparation of the lamprey spinal cord." *Exp Brain Res* 41(1): 11-18.
  37. Collins, D. F., D. Burke and S. C. Gandevia (2001). "Large involuntary forces consistent with plateau-like behavior of human motoneurons." *J Neurosci* 21(11): 4059-4065.
  38. Cowley, K. C. and B. J. Schmidt (1995). "Effects of inhibitory amino acid antagonists on reciprocal inhibitory interactions during rhythmic motor activity in the in vitro neonatal rat spinal cord." *J Neurophysiol* 74(3): 1109-1117.
  39. Cowley, K. C., E. Zaporozhets and B. J. Schmidt (2008). "Propriospinal neurons are sufficient for bulbospinal transmission of the locomotor command signal in the neonatal rat spinal cord." *J Physiol* 586(6): 1623-1635.
  40. Cowley, K. C., E. Zaporozhets and B. J. Schmidt (2010). "Propriospinal transmission of the locomotor command signal in the neonatal rat." *Ann N Y Acad Sci* 1198: 42-53.
  41. Crowe, A. and P. Linnartz (1985). "Studies on the excitability of the central program generator in the spinal cord of the terrapin *Pseudemys scripta elegans*." *Comp Biochem. Physiol A Comp Physiol* 81(4): 905-909.
  42. Currie, S. N. and G. G. Gonsalves (1997). "Right-left interactions between rostral scratch networks generate rhythmicity in the preenlargement spinal cord of the turtle." *J Neurophysiol* 78(6): 3479-3483.
  43. Currie, S. N. and S. Lee (1996). "Sensory-evoked pocket scratch motor patterns in the in vitro turtle spinal cord: reduction of excitability by an N-methyl-D-aspartate antagonist." *J. Neurophysiol.* 76(1): 81-92.
  44. Currie, S. N. and P. S. Stein (1988). "Electrical activation of the pocket scratch central pattern generator in the turtle." *J. Neurophysiol.* 60(6): 2122-2137.
  45. Currie, S. N. and P. S. Stein (1990). "Cutaneous stimulation evokes long-lasting excitation of spinal interneurons in the turtle." *J. Neurophysiol.* 64(4): 1134-1148.

46. Currie, S. N. and P. S. Stein (1992). "Glutamate antagonists applied to midbody spinal cord segments reduce the excitability of the fictive rostral scratch reflex in the turtle." *Brain Res.* 581(1): 91-100.
47. Delgado-Lezama, R. and J. Hounsgaard (1999). "Adapting motoneurons for motor behavior." *Prog.Brain Res.* 123: 57-63.
48. Delgado-Lezama, R., J. F. Perrier and J. Hounsgaard (1999). "Local facilitation of plateau potentials in dendrites of turtle motoneurons by synaptic activation of metabotropic receptors." *J Physiol* 515 ( Pt 1): 203-207.
49. Delgado-Lezama, R., J. F. Perrier, S. Nedergaard, G. Svirskis and J. Hounsgaard (1997). "Metabotropic synaptic regulation of intrinsic response properties of turtle spinal motoneurons." *J.Physiol* 504 ( Pt 1): 97-102.
50. Deliagina, T. G. and G. N. Orlovsky (1980). "Activity of Ia inhibitory interneurons during fictitious scratch reflex in the cat." *Brain Res* 193(2): 439-447.
51. Destexhe, A. and D. Pare (1999). "Impact of network activity on the integrative properties of neocortical pyramidal neurons in vivo." *J Neurophysiol* 81(4): 1531-1547.
52. Di Prisco, G. V., E. Pearlstein, R. D. Le, R. Robitaille and R. Dubuc (2000). "A cellular mechanism for the transformation of a sensory input into a motor command." *J.Neurosci.* 20(21): 8169-8176.
53. Di Prisco, G. V., E. Pearlstein, R. Robitaille and R. Dubuc (1997). "Role of sensory-evoked NMDA plateau potentials in the initiation of locomotion." *Science* 278(5340): 1122-1125.
54. Earhart, G. M. and P. S. Stein (2000). "Scratch-swim hybrids in the spinal turtle: blending of rostral scratch and forward swim." *J Neurophysiol* 83(1): 156-165.
55. Earhart, G. M. and P. S. Stein (2000). "Step, swim, and scratch motor patterns in the turtle." *J Neurophysiol* 84(5): 2181-2190.
56. Ertel, E. A., K. P. Campbell, M. M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T. P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R. W. Tsien and W. A. Catterall (2000). "Nomenclature of voltage-gated calcium channels." *Neuron* 25(3): 533-535.

57. Field, E. C. and P. S. Stein (1997). "Spinal cord coordination of hindlimb movements in the turtle: interlimb temporal relationships during bilateral scratching and swimming." *J Neurophysiol* 78(3): 1404-1413.
58. Flamm, R. E. and R. M. Harris-Warrick (1986). "Aminergic modulation in lobster stomatogastric ganglion. II. Target neurons of dopamine, octopamine, and serotonin within the pyloric circuit." *J Neurophysiol* 55(5): 866-881.
59. Floeter, M. K. (2003). "Cutaneous silent periods." *Muscle Nerve* 28(4): 391-401.
60. Forssberg, H., S. Grillner, J. Halbertsma and S. Rossignol (1980). "The locomotion of the low spinal cat. II. Interlimb coordination." *Acta Physiol Scand* 108(3): 283-295.
61. Fossat, P., I. Sibon, M. G. Le, M. Landry and F. Nagy (2007). "L-type calcium channels and NMDA receptors: a determinant duo for short-term nociceptive plasticity." *Eur.J.Neurosci.* 25(1): 127-135.
62. Frigon, A. (2012). "Central pattern generators of the mammalian spinal cord." *Neuroscientist* 18(1): 56-69.
63. Gans, C., G. Northcutt and P. Ulinksi (1979). *Biology of the reptilia*. London; New York; Chicago, Academic Press, Wiley, A.R. Liss., University of Chicago Press, Society for the Study of Amphibians and Reptiles.
64. Geertsen, S. S., K. Stecina, C. F. Meehan, J. B. Nielsen and H. Hultborn (2011). "Reciprocal Ia inhibition contributes to motoneuronal hyperpolarisation during the inactive phase of locomotion and scratching in the cat." *J Physiol* 589(Pt 1): 119-134.
65. Grillner, S. (1974). "On the generation of locomotion in the spinal dogfish." *Exp Brain Res* 20(5): 459-470.
66. Grillner, S. (1999). "Bridging the gap - from ion channels to networks and behaviour." *Curr Opin Neurobiol* 9(6): 663-669.
67. Grillner, S. (2003). "The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks." *Nat Rev Neurosci* 4(7): 573-586.
68. Grillner, S., D. Parker and A. el Manira (1998). "Vertebrate locomotion--a lamprey perspective." *Ann N Y Acad Sci* 860: 1-18.
69. Grillner, S. and P. Wallen (1985). "Central pattern generators for locomotion, with special reference to vertebrates." *Annu Rev Neurosci* 8: 233-261.

70. Guertin, P. A. and J. Hounsgaard (1998). "NMDA-Induced intrinsic voltage oscillations depend on L-type calcium channels in spinal motoneurons of adult turtles." *J Neurophysiol* 80(6): 3380-3382.
71. Guertin, P. A. and I. Steuer (2009). "Key central pattern generators of the spinal cord." *J Neurosci Res* 87(11): 2399-2405.
72. Hao, Z. Z., L. E. Spardy, E. B. Nguyen, J. E. Rubin and A. Berkowitz (2011). "Strong interactions between spinal cord networks for locomotion and scratching." *J Neurophysiol* 106(4): 1766-1781.
73. Harris-Warrick, R. M., B. R. Johnson, J. H. Peck, P. Kloppenburg, A. Ayali and J. Skarbinski (1998). "Distributed effects of dopamine modulation in the crustacean pyloric network." *Ann N Y Acad Sci* 860: 155-167.
74. Higgins, D. C. and J. S. Lieberman (1968). "The muscle silent period and spindle function in man." *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 25(3): 238-243.
75. Hoffmann, P. (1922). "Untersuchungen fiber die Eigenreflexe (Sehnenreflexe) menschlicher Muskeln." Springer, Berlin 66.
76. Hounsgaard, J., H. Hultborn, B. Jespersen and O. Kiehn (1984). "Intrinsic membrane properties causing a bistable behaviour of alpha-motoneurones." *Exp Brain Res* 55(2): 391-394.
77. Hounsgaard, J., H. Hultborn, B. Jespersen and O. Kiehn (1988). "Bistability of alpha-motoneurones in the decerebrate cat and in the acute spinal cat after intravenous 5-hydroxytryptophan." *J.Physiol* 405: 345-367.
78. Hounsgaard, J. and O. Kiehn (1985). "Ca<sup>++</sup> dependent bistability induced by serotonin in spinal motoneurons." *Exp Brain Res* 57(2): 422-425.
79. Hounsgaard, J. and O. Kiehn (1989). "Serotonin-induced bistability of turtle motoneurones caused by a nifedipine-sensitive calcium plateau potential." *J Physiol* 414: 265-282.
80. Hounsgaard, J. and O. Kiehn (1993). "Calcium spikes and calcium plateaux evoked by differential polarization in dendrites of turtle motoneurones in vitro." *J Physiol* 468: 245-259.
81. Hounsgaard, J. and O. Kjaerulff (1992). "Ca<sup>2+</sup>-Mediated Plateau Potentials in a Subpopulation of Interneurons in the Ventral Horn of the Turtle Spinal Cord." *Eur.J.Neurosci.* 4(2): 183-188.



82. Hounsgaard, J. and I. Mintz (1988). "Calcium conductance and firing properties of spinal motoneurons in the turtle." *J Physiol* 398: 591-603.
83. Hultborn, H., H. Wigstrom and B. Wangberg (1975). "Prolonged activation of soleus motoneurons following a conditioning train in soleus Ia afferents - A case for a reverberating loop?" *Neurosci Lett* 1(3): 147-152.
84. Husch, A., N. Cramer and R. M. Harris-Warrick (2011). "Long-duration perforated patch recordings from spinal interneurons of adult mice." *J Neurophysiol* 106(5): 2783-2789.
85. Husch, A., G. N. Van Patten, D. N. Hong, M. M. Scaperotti, N. Cramer and R. M. Harris-Warrick (2012). "Spinal cord injury induces serotonin supersensitivity without increasing intrinsic excitability of mouse V2a interneurons." *J Neurosci* 32(38): 13145-13154.
86. Inghilleri, M., G. Cruccu, M. Argenta, L. Polidori and M. Manfredi (1997). "Silent period in upper limb muscles after noxious cutaneous stimulation in man." *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.* 105(2): 109-115.
87. Johnson, B. R., J. H. Peck and R. M. Harris-Warrick (1995). "Distributed amine modulation of graded chemical transmission in the pyloric network of the lobster stomatogastric ganglion." *J Neurophysiol* 74(1): 437-452.
88. Juranek, J. and S. N. Currie (2000). "Electrically evoked fictive swimming in the low-spinal immobilized turtle." *J Neurophysiol* 83(1): 146-155.
89. Kandel, E. R., J. H. Schwartz and T. M. Jessell (2000). *Principles of neural science*. New York, McGraw-Hill, Health Professions Division.
90. Keifer, J. and P. S. Stein (1983). "In vitro motor program for the rostral scratch reflex generated by the turtle spinal cord." *Brain Res.* 266(1): 148-151.
91. Kiehn, O. (2011). "Development and functional organization of spinal locomotor circuits." *Curr Opin Neurobiol* 21(1): 100-109.
92. Kiehn, O. and T. Eken (1997). "Prolonged firing in motor units: evidence of plateau potentials in human motoneurons?" *J Neurophysiol* 78(6): 3061-3068.
93. Kiehn, O. and T. Eken (1998). "Functional role of plateau potentials in vertebrate motor neurons." *Curr Opin Neurobiol* 8(6): 746-752.
94. Kiehn, O. and O. Kjaerulff (1996). "Spatiotemporal characteristics of 5-HT and dopamine-induced rhythmic hindlimb activity in the in vitro neonatal rat." *J Neurophysiol* 75(4): 1472-1482.

95. Kiehn, O. and O. Kjaerulff (1998). "Distribution of central pattern generators for rhythmic motor outputs in the spinal cord of limbed vertebrates." *Ann N Y Acad Sci* 860: 110-129.
96. Kofler, M. (2003). "Functional organization of exteroceptive inhibition following nociceptive electrical fingertip stimulation in humans." *Clin.Neurophysiol.* 114(6): 973-980.
97. Kranz, H., C. Adorjani and G. Baumgartner (1973). "The effect of nociceptive cutaneous stimuli on human motoneurons." *Brain* 96(3): 571-590.
98. Krawitz, S., B. Fedirchuk, Y. Dai, L. M. Jordan and D. A. McCrea (2001). "State-dependent hyperpolarization of voltage threshold enhances motoneurone excitability during fictive locomotion in the cat." *J.Physiol* 532(Pt 1): 271-281.
99. Kumru, H., E. Opisso, J. Valls-Sole and M. Kofler (2009). "The effect of a prepulse stimulus on the EMG rebound following the cutaneous silent period." *J.Physiol* 587(Pt 3): 587-595.
100. Kusuma, A. and H. J. ten Donkelaar (1980). "Propriospinal fibers interconnecting the spinal enlargements in some quadrupedal reptiles." *J Comp Neurol* 193(4): 871-891.
101. Lee, R. H. and C. J. Heckman (2001). "Essential role of a fast persistent inward current in action potential initiation and control of rhythmic firing." *J Neurophysiol* 85(1): 472-475.
102. Leis, A. A., M. Kofler, I. Stetkarova and D. S. Stokic (2011). "The cutaneous silent period is preserved in cervical radiculopathy: significance for the diagnosis of cervical myelopathy." *Eur.Spine J.* 20(2): 236-239.
103. Leis, A. A., I. Stetkarova, A. Beric and D. S. Stokic (1995). "Spinal motor neuron excitability during the cutaneous silent period." *Muscle Nerve* 18(12): 1464-1470.
104. Leis, A. A., I. Stetkarova, A. Beric and D. S. Stokic (1996). "The relative sensitivity of F wave and H reflex to changes in motoneuronal excitability." *Muscle Nerve* 19(10): 1342-1344.
105. Leis, A. A., D. S. Stokic, P. Fuhr, M. Kofler, M. F. Kronenberg, J. Wissel, F. X. Glocker, C. Seifert and I. Stetkarova (2000). "Nociceptive fingertip

- stimulation inhibits synergistic motoneuron pools in the human upper limb." *Neurology* 55(9): 1305-1309.
106. Lennard, P. R. and P. S. Stein (1977). "Swimming movements elicited by electrical stimulation of turtle spinal cord. I. Low-spinal and intact preparations." *J Neurophysiol* 40(4): 768-778.
  107. Li, J., D. A. Simone and A. A. Larson (1999). "Windup leads to characteristics of central sensitization." *Pain* 79(1): 75-82.
  108. Li, W. C., S. R. Soffe, E. Wolf and A. Roberts (2006). "Persistent responses to brief stimuli: feedback excitation among brainstem neurons." *J Neurosci* 26(15): 4026-4035.
  109. Li, Y., M. A. Gorassini and D. J. Bennett (2004). "Role of persistent sodium and calcium currents in motoneuron firing and spasticity in chronic spinal rats." *J Neurophysiol* 91(2): 767-783.
  110. Logigian, E. L., G. M. Plotkin and J. M. Shefner (1999). "The cutaneous silent period is mediated by spinal inhibitory reflex." *Muscle Nerve* 22(4): 467-472.
  111. Luther, J. A., A. A. Robie, J. Yarotsky, C. Reina, E. Marder and J. Golowasch (2003). "Episodic bouts of activity accompany recovery of rhythmic output by a neuromodulator- and activity-deprived adult neural network." *J Neurophysiol* 90(4): 2720-2730.
  112. MacLean, J. N., Y. Zhang, B. R. Johnson and R. M. Harris-Warrick (2003). "Activity-independent homeostasis in rhythmically active neurons." *Neuron* 37(1): 109-120.
  113. Major, G. and D. Tank (2004). "Persistent neural activity: prevalence and mechanisms." *Curr.Opin.Neurobiol.* 14(6): 675-684.
  114. Manconi, F. M., N. A. Syed and M. K. Floeter (1998). "Mechanisms underlying spinal motor neuron excitability during the cutaneous silent period in humans." *Muscle Nerve* 21(10): 1256-1264.
  115. Manuel, M., Y. Li, S. M. Elbasiouny, K. Murray, A. Griener, C. J. Heckman and D. J. Bennett (2012). "NMDA induces persistent inward and outward currents that cause rhythmic bursting in adult rodent motoneurons." *J Neurophysiol* 108(11): 2991-2998.
  116. Marder, E. and D. Bucher (2001). "Central pattern generators and the control of rhythmic movements." *Current Biology* 11(23): R986-R996.

117. Marder, E. and D. Bucher (2007). "Understanding circuit dynamics using the stomatogastric nervous system of lobsters and crabs." *Annu Rev Physiol* 69: 291-316.
118. McCrea, D. A. and I. A. Rybak (2008). "Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation." *Brain Res Rev* 57(1): 134-146.
119. Melby, E. C. and N. H. Altman (1974). *CRC handbook of laboratory animal science*. Cleveland, CRC Press.
120. Mendell, L. M. (1966). "Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord." *Exp Neurol* 16(3): 316-332.
121. Morisset, V. and F. Nagy (1996). "Modulation of regenerative membrane properties by stimulation of metabotropic glutamate receptors in rat deep dorsal horn neurons." *J Neurophysiol* 76(4): 2794-2798.
122. Morisset, V. and F. Nagy (1999). "Ionic basis for plateau potentials in deep dorsal horn neurons of the rat spinal cord." *J Neurosci* 19(17): 7309-7316.
123. Morisset, V. and F. Nagy (2000). "Plateau potential-dependent windup of the response to primary afferent stimuli in rat dorsal horn neurons." *Eur J Neurosci* 12(9): 3087-3095.
124. Mortin, L. I., J. Keifer and P. S. Stein (1985). "Three forms of the scratch reflex in the spinal turtle: movement analyses." *J Neurophysiol.* 53(6): 1501-1516.
125. Mortin, L. I. and P. S. Stein (1989). "Spinal cord segments containing key elements of the central pattern generators for three forms of scratch reflex in the turtle." *J Neurosci* 9(7): 2285-2296.
126. Mortin, L. I. and P. S. Stein (1990). "Cutaneous dermatomes for initiation of three forms of the scratch reflex in the spinal turtle." *J Comp Neurol* 295(4): 515-529.
127. Mui, J. W., K. L. Willis, Z. Z. Hao and A. Berkowitz (2012). "Distributions of active spinal cord neurons during swimming and scratching motor patterns." *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 198(12): 877-889.
128. Nieuwenhuys, R., H. J. t. Donkelaar and C. Nicholson (1998). *The central nervous system of vertebrates*. Berlin ; New York, Springer.

129. Nowycky, M. C., A. P. Fox and R. W. Tsien (1985). "Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity." *Nature* 316(6027): 440-443.
130. Nusbaum, M. P. and M. P. Beenhakker (2002). "A small-systems approach to motor pattern generation." *Nature* 417(6886): 343-350.
131. Nusbaum, M. P., D. M. Blitz, A. M. Swensen, D. Wood and E. Marder (2001). "The roles of co-transmission in neural network modulation." *Trends Neurosci.* 24(3): 146-154.
132. Onal, M. R., U. H. Ulas, O. Oz, V. S. Bek, M. Yucel, A. Taslipinar and Z. Odabasi (2010). "Cutaneous silent period changes in Type 2 diabetes mellitus patients with small fiber neuropathy." *Clin.Neurophysiol.* 121(5): 714-718.
133. Oz, O., C. Erdogan, M. Yucel, H. Akgun, Y. Kutukcu, Z. Gokcil and Z. Odabasi (2011). "Effect of pramipexole on cutaneous-silent-period parameters in patients with restless legs syndrome." *Clin.Neurophysiol.*
134. Pare, D., E. Shink, H. Gaudreau, A. Destexhe and E. J. Lang (1998). "Impact of spontaneous synaptic activity on the resting properties of cat neocortical pyramidal neurons In vivo." *J Neurophysiol* 79(3): 1450-1460.
135. Perrier, J. F., A. Alaburda and J. Hounsgaard (2002). "Spinal plasticity mediated by postsynaptic L-type Ca<sup>2+</sup> channels." *Brain Res.Brain Res.Rev.* 40(1-3): 223-229.
136. Perrier, J. F. and J. Hounsgaard (2000). "Development and regulation of response properties in spinal cord motoneurons." *Brain Res Bull* 53(5): 529-535.
137. Perrier, J. F. and M. C. Tresch (2005). "Recruitment of motor neuronal persistent inward currents shapes withdrawal reflexes in the frog." *J Physiol* 562(Pt 2): 507-520.
138. Power, K. E., D. A. McCrea and B. Fedirchuk (2010). "Intraspinally mediated state-dependent enhancement of motoneurone excitability during fictive scratch in the adult decerebrate cat." *J.Physiol* 588(Pt 15): 2839-2857.
139. Prinz, A. A., D. Bucher and E. Marder (2004). "Similar network activity from disparate circuit parameters." *Nat Neurosci* 7(12): 1345-1352.
140. Pujia, F., G. Coppola, M. G. Anastasio, M. Brienza, E. Vestrini, G. O. Valente, L. Parisi, M. Serrao and F. Pierelli (2012). "Cutaneous silent period

- in hand muscles is lengthened by tramadol: Evidence for monoaminergic modulation?" *Neurosci Lett* 528(1): 78-82.
141. Reuter, H. (1983). "Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs." *Nature* 301(5901): 569-574.
  142. Robertson, G. A., L. I. Mortin, J. Keifer and P. S. Stein (1985). "Three forms of the scratch reflex in the spinal turtle: central generation of motor patterns." *J. Neurophysiol.* 53(6): 1517-1534.
  143. Robertson, G. A. and P. S. Stein (1988). "Synaptic control of hindlimb motoneurons during three forms of the fictive scratch reflex in the turtle." *J Physiol* 404: 101-128.
  144. Rodi, Z. and C. Springer (2011). "Influence of muscle contraction and intensity of stimulation on the cutaneous silent period." *Muscle Nerve* 43(3): 324-328.
  145. Romaniello, A., A. Truini, F. Galeotti, C. De Lena, J. C. Willer and G. Cruccu (2004). "Cutaneous silent period in hand muscle is evoked by laser stimulation of the palm, but not the hand dorsum." *Muscle Nerve* 29(6): 870-872.
  146. Rosenberg, M. E. (1986). "Carapace and plastron sensitivity to touch and vibration in the tortoise ( *Testudo hermanni* and *T. graeca* )." *J.Zool.(Lond)* 208: 443-455.
  147. Ruigrok, T. J. and A. Crowe (1984). "The organization of motoneurons in the turtle lumbar spinal cord." *J Comp Neurol* 228(1): 24-37.
  148. Russo, R. E. and J. Hounsgaard (1994). "Short-term plasticity in turtle dorsal horn neurons mediated by L-type Ca<sup>2+</sup> channels." *Neuroscience* 61(2): 191-197.
  149. Russo, R. E. and J. Hounsgaard (1996). "Plateau-generating neurones in the dorsal horn in an in vitro preparation of the turtle spinal cord." *J.Physiol* 493 ( Pt 1): 39-54.
  150. Russo, R. E., F. Nagy and J. Hounsgaard (1997). "Modulation of plateau properties in dorsal horn neurones in a slice preparation of the turtle spinal cord." *J.Physiol* 499 ( Pt 2): 459-474.

151. Serrao, M., L. Parisi, F. Pierelli and P. Rossi (2001). "Cutaneous afferents mediating the cutaneous silent period in the upper limbs: evidences for a role of low-threshold sensory fibres." *Clin.Neurophysiol.* 112(11): 2007-2014.
152. Shefner, J. M. and E. L. Logigian (1993). "Relationship between stimulus strength and the cutaneous silent period." *Muscle Nerve* 16(3): 278-282.
153. Sherrington, C. S. (1906). "Observations on the scratch-reflex in the spinal dog." *J Physiol* 34(1-2): 1-50.
154. Sherrington, C. S. (1910). "Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing." *J Physiol* 40(1-2): 28-121.
155. Simon, M., J. F. Perrier and J. Hounsgaard (2003). "Subcellular distribution of L-type Ca<sup>2+</sup> channels responsible for plateau potentials in motoneurons from the lumbar spinal cord of the turtle." *Eur J Neurosci* 18(2): 258-266.
156. Sirota, M. G., G. V. Di Prisco and R. Dubuc (2000). "Stimulation of the mesencephalic locomotor region elicits controlled swimming in semi-intact lampreys." *Eur J Neurosci* 12(11): 4081-4092.
157. Smith, J. L., M. G. Hoy, G. F. Koshland, D. M. Phillips and R. F. Zernicke (1985). "Intralimb coordination of the paw-shake response: a novel mixed synergy." *J Neurophysiol* 54(5): 1271-1281.
158. Squire, L. R. (2009). *Encyclopedia of neuroscience*. Amsterdam ; Boston, Elsevier/Academic Press.
159. Stein, P. S. (1983). "The vertebrate scratch reflex." *Symp.Soc.Exp.Biol.* 37: 383-403.
160. Stein, P. S. (2005). "Neuronal control of turtle hindlimb motor rhythms." *J.Comp Physiol A Neuroethol.Sens.Neural Behav.Physiol* 191(3): 213-229.
161. Stein, P. S. (2008). "Motor pattern deletions and modular organization of turtle spinal cord." *Brain Res Rev* 57(1): 118-124.
162. Stein, P. S. (2010). "Alternation of agonists and antagonists during turtle hindlimb motor rhythms." *Ann N Y Acad Sci* 1198: 105-118.
163. Stein, P. S. and S. Daniels-McQueen (2002). "Modular organization of turtle spinal interneurons during normal and deletion fictive rostral scratching." *J Neurosci* 22(15): 6800-6809.

164. Stein, P. S. and S. Daniels-McQueen (2004). "Variations in motor patterns during fictive rostral scratching in the turtle: knee-related deletions." *J Neurophysiol* 91(5): 2380-2384.
165. Stein, P. S., M. L. McCullough and S. N. Currie (1998). "Reconstruction of flexor/extensor alternation during fictive rostral scratching by two-site stimulation in the spinal turtle with a transverse spinal hemisection." *J Neurosci* 18(1): 467-479.
166. Stein, P. S., J. C. Victor, E. C. Field and S. N. Currie (1995). "Bilateral control of hindlimb scratching in the spinal turtle: contralateral spinal circuitry contributes to the normal ipsilateral motor pattern of fictive rostral scratching." *J Neurosci* 15(6): 4343-4355.
167. Stein, P. S. G. (1997). *Neurons, networks, and motor behavior*. Cambridge, Mass., MIT Press.
168. Svilpauskaite, J., A. Truffert, N. Vaiciene and M. R. Magistris (2006). "Cutaneous silent period in carpal tunnel syndrome." *Muscle Nerve* 33(4): 487-493.
169. Svirskis, G. and J. Hounsgaard (1997). "Depolarization-induced facilitation of a plateau-generating current in ventral horn neurons in the turtle spinal cord." *J Neurophysiol* 78(3): 1740-1742.
170. Svirskis, G. and J. Hounsgaard (1998). "Transmitter regulation of plateau properties in turtle motoneurons." *J Neurophysiol* 79(1): 45-50.
171. Swensen, A. M., J. Golowasch, A. E. Christie, M. J. Coleman, M. P. Nusbaum and E. Marder (2000). "GABA and responses to GABA in the stomatogastric ganglion of the crab *Cancer borealis*." *J Exp Biol* 203(Pt 14): 2075-2092.
172. Swensen, A. M. and E. Marder (2000). "Multiple peptides converge to activate the same voltage-dependent current in a central pattern-generating circuit." *J Neurosci* 20(18): 6752-6759.
173. Thoby-Brisson, M. and J. Simmers (2002). "Long-term neuromodulatory regulation of a motor pattern-generating network: maintenance of synaptic efficacy and oscillatory properties." *J Neurophysiol* 88(6): 2942-2953.
174. Thorstensson, A., H. Carlson, M. R. Zomlefer and J. Nilsson (1982). "Lumbar back muscle activity in relation to trunk movements during locomotion in man." *Acta Physiol Scand* 116(1): 13-20.



175. Tierney, A. J. and R. M. Harris-Warrick (1992). "Physiological role of the transient potassium current in the pyloric circuit of the lobster stomatogastric ganglion." *J Neurophysiol* 67(3): 599-609.
176. Tortora, G. J. and B. Derrickson (2006). *Principles of anatomy and physiology*. Hoboken, NJ, John Wiley & Sons.
177. Uncini, A., T. Kujirai, B. Gluck and S. Pullman (1991). "Silent period induced by cutaneous stimulation." *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.* 81(5): 344-352.
178. van den Brand, R., J. Heutschi, Q. Barraud, J. DiGiovanna, K. Bartholdi, M. Huerlimann, L. Friedli, I. Vollenweider, E. M. Moraud, S. Duis, N. Dominici, S. Micera, P. Musienko and G. Courtine (2012). "Restoring voluntary control of locomotion after paralyzing spinal cord injury." *Science* 336(6085): 1182-1185.
179. Whelan, P., A. Bonnot and M. J. O'Donovan (2000). "Properties of rhythmic activity generated by the isolated spinal cord of the neonatal mouse." *J Neurophysiol* 84(6): 2821-2833.
180. Wilson, D. M. (1961). "Central Nervous Control of Flight in a Locust." *Journal of Experimental Biology* 38(2): 471-&.
181. Woolf, C. J. and P. D. Wall (1986). "Relative effectiveness of C primary afferent fibers of different origins in evoking a prolonged facilitation of the flexor reflex in the rat." *J Neurosci* 6(5): 1433-1442.
182. Yu, F. H., V. Yarov-Yarovoy, G. A. Gutman and W. A. Catterall (2005). "Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily." *Pharmacol Rev* 57(4): 387-395.
183. Zomlefer, M. R., J. Provencher, G. Blanchette and S. Rossignol (1984). "Electromyographic study of lumbar back muscles during locomotion in acute high decerebrate and in low spinal cats." *Brain Res* 290(2): 249-260.

## Rezultatų pristatymas

Darbe pristatyti rezultatai išspausdinti mokslinėse publikacijose:

- Guzulaitis R, Alaburda A & Hounsgaard J. (2013). Increased activity of pre-motor network does not change the excitability of motoneurons during protracted scratch initiation. *J Physiol* 591, 1851-1858.
- Guzulaitis R, Hounsgaard J & Alaburda A. (2012). Inhibition of motoneurons during the cutaneous silent period in the spinal cord of the turtle. *Experimental brain research* 220, 23-28.

Publikacijos neįtrauktos į disertaciją:

- Buisas R, Guzulaitis R, Ruksenas O, Alaburda A (2012) Gain of spinal motoneurons measured from square and ramp current pulses. *Brain Res* 1450:33-39.
- Gabrielaitis M, Buisas R, Guzulaitis R, Svirskis G, Alaburda A (2011) Persistent sodium current decreases transient gain in turtle motoneurons. *Brain Res* 1373:11-16.
- Alaburda Aidas, Buišas Rokas, Guzulaitis Robertas, Kaminskas Osvaldas, Rukšėnas Osvaldas. Locust wing stretch receptor adaptation and recovery from adaptation. *Biologija*. 2010, vol. 56, nr. 1-4. ISSN 1392-0146 p. 24-28.

Rezultatai pristatyti mokslinėse konferencijose:

- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda, Jorn Hounsgaard; Scratch generation beyond the lumbar enlargement; FENS/IBRO organizuojama vasaros mokykla “Causal Neuroscience: interacting with neural circuits”, Bertinoro, Italija, 2013;
- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda, Jorn Hounsgaard; Scratch generation beyond the lumbar enlargement; 1st European neuroscience conference by doctoral students (ENCODS 2013), Bordo, Prancūzija, 2013;
- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda, Jorn Hounsgaard; Scratch generation beyond the lumbar enlargement; 10th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingenas, Vokietija, 2013;
- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda, Jorn Hounsgaard; Scratch generation beyond the lumbar enlargement; Annual INF Conference, Danija, 2013;

- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda, Jorn Hounsgaard; Scratch generation beyond the lumbar enlargement; SfN 42st annual meeting, Naujasis Orleansas, JAV, 2012;
- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda, Jorn Hounsgaard; Scratch reflex generation beyond the lumbar enlargement in spinal cord of adult turtle; Motoneuron meeting, Sidnėjus, Australija, 2012;
- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda, Jorn Hounsgaard; Temporal integration of sensory inputs in the pre-motor spinal network; 8<sup>th</sup> FENS Forum of Neuroscience, Barselona, Ispanija, 2012;
- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda, Jorn Hounsgaard; Scratch generation beyond the lumbar enlargement; Neuroday, Kopenhaga, Danija 2012;
- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda, Jorn Hounsgaard; Temporal summation of sensory input in the pre-motor spinal network; SfN 41st annual meeting, Vašingtonas, JAV, 2011;
- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda, Osvaldas Ruksenas, Rokas Buisas and Jorn Hounsgaard; Motoneurons are not involved in temporal summation of sensory information 8<sup>th</sup> IBRO World Congress of Neuroscience, Florencija, Italija, 2011;
- Robertas Guzulaitis, Jorn Hounsgaard, Aidas Alaburda; Kasymosi reflekso sukėlimas stimuliuojant sensorinį nervą integruotame vėžlio preparate; Doktorantų stažuotės užsienio mokslo centruose, Vilnius, Lietuva, 2011;
- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda, Jorn Hounsgaard; Cutaneous silent periods in turtles; 15 – toji tarptautinė konferencija Biomedicininė inžinerija, Kaunas, Lietuva, 2011;
- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda, Jorn Hounsgaard; L-tipo Ca<sup>2+</sup> srovė sukelia laikinę sensorinės informacijos sumaciją; Virtualūs instrumentai biomedicinoje, Klaipėda, Lietuva, 2011;
- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda, Jorn Hounsgaard; Temporal summation of sensory information takes place in pre motor network of spinal cord; 1<sup>st</sup> Annual INF Conference, Danija, 2010;
- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda; Spinal network generating swim-like activity; Motoneuron meeting, Paryžius, Prancūzija, 2010;
- Rokas Buišas, Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda; Gain of spinal motoneurons measured from current pulses and ramps; 14 - oji tarptautinė konferencija Biomedicininė inžinerija, Kaunas, Lietuva, 2010;

- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda; Motoneuronų aktyvavimas kasymosi ir plaukimo metu; Lietuvos Neuromokslų asociacijos konferencija "Nervų sistemos tyrimai Lietuvoje" Vilnius, Lietuva, 2009;
- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda; Plaukimo ritmo priklausomybė nuo elektrinio stimuliavimo dažnio; Virtualūs instrumentai biomedicinoje, Klaipėda, Lietuva, 2009;
- Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda; Increased conductance of spinal motoneurons during swim-like activity; 13 - oji tarptautinė konferencija Biomedicininė inžinerija, Kaunas, Lietuva, 2009;

## **Padėka**

Visų pirma noriu tarti nuoširdų ačiū savo vadovui dr. Aidui Alaburdai ir konsultantui prof. Jorn Hounsgaard už patarimus, diskusijas ir kitą pagalbą studijų laikotarpiu. Esu dėkingas jiems ir už mano, kaip mokslininko, asmenybės formavimą.

Dėkoju dr. Vilmai Kisnerienei už naudingas pastabas skaitant disertacijos juodrašį. Už pastabas rengiant disertaciją taip pat dėkoju dr. Rokui Buišui ir Ramūnui Grigoniui.

Esu dėkingas kolegoms iš neurobiologijos ir biofizikos katedros už patarimus mokslinėje srityje, šiltą darbo aplinką, gerą nuotaiką ir palaikymą. Taip pat esu dėkingas Kopenhagos universiteto *neuronal signalling* kolektyvui už šiltą priėmimą stažuočių metu, naudingus patarimus ir draugiškumą.

Dėkoju Lietuvos mokslo tarybai už finansinę paramą vykstant į stažuotes ir konferencijas.

Ir galiausiai nuoširdžiai dėkoju savo šeimai ir draugams už nuolatinį palaikymą ir supratingumą.