

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА МОЗ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова на праця  
на правах рукопису

**КРАСНЯКОВА МАРГАРИТА ЄВГЕНІВНА**

УДК 616.212:5:612.821.44:612.08

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**РОЛЬ БОЛЬОВОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ ПОПЕРЕКОВОГО ВІДДІЛУ СПИННОГО  
МОЗКУ ЩУРІВ**

222 «Медицина»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

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

\_\_\_\_\_М.Є.Краснякова

Наукові керівники:

Власенко Олег Володимирович, доктор медичних наук, професор,

Войтенко Нана Володимирівна, доктор біологічних наук, професор

Вінниця – 2023

## АНОТАЦІЯ

*Краснякова М.Є.* Регуляція больової сигналізації поперекового відділу спинного мозку щурів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина». – Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2023.

Дисертація присвячена дослідженню регуляції больової сигналізації поперекового відділу спинного мозку щурів. В роботі вперше виявлено різну функціональну роль у кодуванні сили та інтенсивності ноцицептивного аферентного входу в різних субпопуляціях спинномозково-парабрахіальних нейронів пластинки I дорсального рогу спинного мозку, і як змінюються патерни генерації потенціалів дії у патологічних умовах. Також в ході дисертаційного дослідження нами були отримані дані про залученість пластинки X у больовій сигналізації.

На сьогоднішній день проблема ефективної терапії болю різної етіології залишається вкрай важливою. Розробка нових знеболюючих методів лікування є справжнім викликом для сучасної науки і медицини. Дві головні перешкоди на шляху пошуку і розробки новітніх методів купування больового відчуття - є наше обмежене розуміння того, як організована і регульована сенсорна система на різних рівнях за звичайних обставин і як вона змінюється при патологічних станах, що призводять до хронічного болю.

Відчуття болю опосередковується всією нервовою системою включаючи периферичну нервову систему, спинний і головний мозок. Серед багатьох клітин, що залучені до больової сигналізації особливо важливими є спинномозково-парабрахіальні нейрони, оскільки вони є єдиними, хто передає сенсорну інформацію від спинного мозку до супраспінальних центрів. Спинномозково-парабрахіальні нейрони переважно розташовані в пластинці I і здебільшого націлені на парабрахіальну область стовбура мозку, вони є ноцицептивно специфічними та

здатні генерувати потенціали дії у відповідь на потенційно шкідливі тепло, холод, механічні стимули.

Больова сигналізація поперекового відділу щурів доволі активно досліджується останні десятиліття, однак вивчення функціональних властивостей спинномозково-парабрахіальних нейронів I пластинки були обмежені використанням нативних препаратів спинного мозку з порушеною мережею зв'язків у дорсальному розі. Для збереження складної організації у мережі вхідних і вихідних сигналів ми використовували цілісний препарат поперекового відділу спинного мозку. Такий підхід дозволив нам визначити три субпопуляції спинномозково-парабрахіальних нейронів у пластинці I спинного мозку за кількістю згенерованих потенціалів дії. Одна з цих груп, яку ми виділили у спинномозково-парабрахіальні нейрони II-типу, складає лише 19% у структурі популяції, але генерує 69% вихідної активності за кількістю потенціалів дії. Для того, що визначити функціональні ролі кожної із груп ми проаналізували вплив інтенсивності стимулу на вихідний сигнал. Так, спинномозково-парабрахіальні нейрони I-го типу виконують функцію передачі больових стимулів з C-волокон до супраспінальних центрів. В той час як спинномозково-парабрахіальні нейрони II типу можуть підсилювати ноцицептивний вхід з Ad-волокон через генерацію цілої групи коротких потенціалів дії у відповідь на наростаючий стимул. Аналізуючи аферентні входи ми виявили, що загальне число моносинаптичних входів було в 2,2 рази більше в групі спинномозково-парабрахіальних нейронів II-го типу в порівнянні з нейронами I-го типу, що дає нам можливість припустити, що спинномозково-парабрахіальні нейрони II-го типу отримують значно сильніший полісинаптичний вплив від локальних нейронних мереж.g

Для визначення, як саме спинномозково-парабрахіальні нейрони пластинки I спинного мозку приймають участь в регуляції хронічної болю ми проводили досліди в моделі хронічного нейропатичного болю з частковим пошкодженням нерву. Нейропатичний біль негативно впливає на якість життя. Цей виснажливий стан

виникає після первинного ураження або захворювання соматосенсорної нервової системи і характеризується гіпералгезією (посиленою реакцією на шкідливі подразники), алодинією (нормальною реакцією на нешкідливі подразники) і спонтанним болем. Доступні методи лікування обмежені, адже однією з головних причин цього є відсутність повного розуміння клітинних механізмів, що лежать в основі нейропатичного болю. Так, характеристики плато та сумарна кількість генерованих потенціалів дії значно відрізнялась в групі часткового пошкодження нерва. Ми виявили, що спинномозково-парабрахіальні нейрони I пластинки спинного мозку у групі часткового пошкодження нерва у відповідь на невольовий А-стимул мають значну кількість потенціалів дії, що дає нам можливість припустити, що вони приймають роль у формуванні такого феномену, як алодинія. У відповідь на С – стимул в умовах нейропатичного болю ці нейрони мають здатність генерувати більш тривале плато, та відповідно більшу кількість потенціалів дії. Ці данні дають нам підставу говорити про те, що за рахунок даного механізму може реалізовуватись феномен гіпералгезії.

У дисертаційній роботі вперше була підтверджена залученість пластинки X у регуляцію больової сигналізації. Нами було показано, що значний вклад в цю регуляцію мають ТРПВ1-рецептори, адже вони представлені на мембранах нейронів пластинки X. Також вперше доведено, що нейрони пластинки X регулюються пресинаптично на сегментарному рівні від гомо- і гетеросегментарних первинних аферентів та на супраспінальному рівні - по низхідним волокнам з кортикоспінального тракту, дорсолатерального канатика і переднього канатика. Вперше було показано функціональну схожість пластинки X з основною ноцицептивно-проекційною пластинкою I дорсального рогу спинного мозку.

*Ключові слова:* спинний мозок, дорсальний ріг, пластинки спинного мозку, нейрони, нейропатія, біль, стимуляція, рецепторні потенціали, рецептори, первинні аференти, електрична активність нейронів, іонні струми, больова чутливість, поведінкові тести, щури.

## ANNOTATION

*Krasniakova Marharyta*. The role of pain signaling in the lumbar region of the rat's spinal cord. - Qualification scientific work on the rights of the manuscript. Dissertation of the Philosophy Dissertation for the Philosophy Doctor degree in 22 –“Health Care” in speciality 222 –“Medicine”. – National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsya, 2023.

The dissertation is devoted to the study of the role of pain signaling in the lumbar region of the rat's spinal cord. For the first time, various functional roles were revealed in the work in coding the strength and intensity of nociceptive afferent input in various subpopulations of spino-parabrachial neurons dorsal horn's laminae of the spinal cord, and how they change patterns of generation of action potentials in pathological conditions. Also during the dissertation research we obtained data on the involvement of the lamina X in the pain signaling. The problem of effective pain treatment of various etiologies remains extremely important. The searching of new painkillers is a real challenge for modern science and medicine. The two main obstacles to finding and developing something new are our limited understanding of how the sensory system is organized and regulated at different levels under normal circumstances and how it changes in pathological conditions that lead to chronic pain. The sensation of pain is mediated by the entire nervous system, including the peripheral nervous system, spinal cord and brain. Among the many cells involved in pain signaling, spino-parabrachial neurons are especially important because they are the only ones who transmit sensory information from the spinal cord to the supraspinal centers. The spino-parabrachial neurons are predominantly located in the lamina I and are mostly targeted at the parabrachial region of the brainstem. They are nociceptively specific and are able to generate action potentials in response to potentially harmful heat, cold, mechanical incentives. The pain signaling in the lumbar part of spinal cord has been studied quite actively in recent decades, but the study of the functional properties of the spino-parabrachial neurons and laminae have been limited by using slides techniques where due cutting network connections in the dorsal horn were lost. To

maintain a complex organization in the network with input and output signals, we used a complete all lumbar part of spinal cord. This approach allowed us to identify three subpopulations of spino-parabrachial neurons in the lamina I of the spinal cord by the number of generated action potentials. One of these groups, which we have isolated in spino-parabrachial neurons of the II-type, is only 19% in the structure of the population, therefore generates 69% of the initial activity. In order to determine the functional roles of each of the groups, we analyzed the effect of the stimulus intensity on the output signal. Thus, spino-parabrachial neurons of the I type perform the function of transmitting pain stimuli from C-fibers to the supraspinal centers. While spino-parabrachial neurons of type II can enhance nociceptive entrance from A $\delta$ -fibers through the generation of a whole group of short action potentials in response to an increasing stimulus. Analyzing the afferent inputs, we found that the total number of monosynaptic inputs was 2.2 times more in the group of spino-parabrachial neurons of the II type compared to type I neurons, which allows us to assume that spino-parabrachial neurons of the II type receive much stronger polysynaptic influence from local neural networks. To determine how the spino-parabrachial neurons in the lamina I of the spinal cord are involved in the regulation of chronic pain, we conducted experiments in a model of chronic neuropathic pain with spare nerve damage. Neuropathic pain negatively affects the quality of life. This debilitating condition occurs after a primary lesion or disease of the somatosensory nervous system and is characterized by hyperalgesia (increased reaction to harmful stimuli), allodynia (normal reaction to harmless stimuli) and spontaneous pain. Modern approaches and available treatments of pain are limited. One of the main reasons for this is the lack of a complete understanding of the cellular mechanisms underlying neuropathic pain. Thus, the characteristics of the laminae and the total number of generated action potentials significantly increase in the group of spare nerve damage. We have found that spino-parabrachial neurons and spinal cord laminae in the group of spare nerve damage in response to A-stimulus have a significant number of action potentials, which allows us to assume that they take a role in the development allodynia. In response to C - stimulus in

neuropathic pain, these neurons have the ability to generate a longer plateau, and accordingly more action potentials. These data give us reason to say that due to this mechanism the phenomenon of hyperalgesia can be realized. In the dissertation for the first time we were confirmed the involvement of lamina X in the regulation of pain signaling was. We also have shown that TRPV1-receptors have a significant contribution to this regulation, because they are represented on the membranes of lamina's X neurons. We proved for the first time that the neurons of the lamina X are regulated presynaptically at the segmental level from homo- and heterosegmental primary afferents and at the supraspinal level on the descending fibers by corticospinal tract, dorsolateral funiculus and anterior funiculus. Also for the first time, the functional similarity of lamina X and lamina I was shown.

*Key words:* spinal cord, dorsal horn, laminae of spinal cord, neurons, neuropathic, pain, stimulation, receptor potentials, receptors, primary afferent, electrical activity of neurons, ion currents, pain sensitivity, behavioral tests, rats.

#### **Список публікацій здобувача:**

#### **Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації**

1. Agashkov K, Krotov V, **Krasniakova M**, Shevchuk D, Andrianov Y, Zabenko Y, Safronov BV, Voitenko N, Belan P. (2019) *Distinct mechanisms of signal processing by lamina I spino-parabrachial neurons*. Scientific Reports 2019 Dec 17;9(1):19231. PMID: 31848358 (Q1)
2. Krotov V, Agashkov K, **Krasniakova M**, Safronov B, Belan P, Voitenko N. (2022) *Segmental and descending control of primary afferent input to the spinal lamina X*. PAIN 163(10):p 2014-2020, October 2022; doi: 10.1097/j.pain.0000000000002597 (Q1)
3. Krotov, Volodymyr & Agashkov, Kirill & Romanenko, Sergii & Koroid, Kostiantyn & **Krasniakova, Marharyta** & Belan, Pavel & Voitenko, Nana. (2023).

Neuropathic pain changes the output of rat lamina I spino-parabrachial neurons. BBA Advances. 3. 100081. doi: 10.1016/j.bbadv.2023.100081

#### **Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

4. Agashkov K., Krotov V., **Krasniakova M.**, Shevchuk D., Safronov B., Belan P., Voitenko N. *New approaches in studies of molecular mechanisms of spinal cord neuronal signaling*. 8th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology, 18-21 June, 2017, Kosice, Slovakia
5. Agashkov K., Krotov V., **Krasniakova M.**, Safronov B., Voitenko V., Belan P. *Subpopulation of C-fiber-activated lamina I projection neurons with unique input-output characteristics for NMDAR-dependent nociceptive coding*, Polish Society for Neuroscience Meeting, 28-31 August 2017, Warsaw, Poland
6. Agashkov K., Krotov V., Rula H., **Krasniakova M.**, Shevchuk O., Liashenko A., Safronov B., Voitenko N., Belan P. *Specific C-fiber-activated lamina I projection neurons as major contributor of acute nociceptive transmission*. III International School in Biomedical Sciences “Cell Function in Health and Disease”, Kyiv- Lutsk, Ukraine, 17-22 September 2017
7. Krotov V., Agashkov K., **Krasniakova M.**, Safronov B.V., Voitenko N., Belan P. *Lamina I projection neuron outputs in physiological and neuropathic pain conditions*. 11<sup>th</sup> FENS Forum for Neuroscience, 7-11 July 2018, Berlin, Germany
8. Voitenko N., Agashkov K., Krotov V., **Krasniakova M.**, Zaben Y., Safronov B., Belan P. *Spinal lamina I projection neurons play distinct roles in nociception*. Society for Neuroscience meeting 2018, 3-7 November 2018, San Diego, USA.
9. **Краснякова М. Є.** (2023). Регуляція больової сигналізації поперекового відділу спинного мозку щурів. Матеріали XX наукової конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Перший крок в науку-2023», Вінниця, 21-22 квітня 2023 р., Вінниця: Міністерство охорони здоров'я України, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова



## ЗМІСТ

<b>АНОТАЦІЯ</b>	2
<b>ЗМІСТ</b>	9
<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ</b>	12
<b>ВСТУП</b>	13
<b>РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b>	
1.1. Визначення ролі і класифікація болю	24
1.2. Хронічний біль нейропатичного та запального генезу	27
1.3. Організація сірої речовини спинного мозку: функціональні особливості I та X пластинок	30
1.4. Організація нейронів в сірій речовині дорсального рогу і значення їх локальних нейронних мереж в обробці ноцицептивної інформації	32
1.5. Спінномозково-парабрахіальні нейрони дорсального рогу спинного мозку і їх ролі і передачі ноцицептивних стимулів	34
1.6. Властивості та характеристики первинних аферентів та розподіл їх терміналей в структурі дорсального рогу спинного мозку.	36
1.7. Роль каналів транзйєтного рецепторного потенціалу у больовій сигналізації	39
1.8. Цільний препарат спинного мозку з візуалізацією нейронів I і X пластинок за технікою світлодіодного освітлення	40
<b>РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b>	

2.1. Експериментальні тварини	42
2.2. Модель хронічного нейропатичного болю	43
2.3. Поведінковий тест для оцінки механічної больової чутливості з використанням філаментів фон Фрея	44
2.4. Поведінковий тест Харгівса для оцінки термічної больової чутливості	45
2.5. Методики отримання ex-vivo препаратів спинного мозку для дослідження I і X пластинок	47
2.6. Методики селективного маркування спинномозково-парабрахіальних нейронів дорсального мозку щурів	48
2.7. Використання бічного світлодіодного освітлення для візуалізації клітин інтактного ex-vivo препарату спинного мозку	52
2.8. «Patch-clamp» методика для реєстрації іонних струмів від нейронів I та X пластинок	53
2.9. Стимуляція дорсальних корінців спинного мозку	55
2.10. Статистична обробка результатів дослідження	57
<b>РОЗДІЛ 3. СПИННОМОЗКОВО-ПАРАБРАХІАЛЬНІ НЕЙРОНИ ПЛАСТИНКИ I СПИННОГО МОЗКУ ТА ЇХ ВІДПОВІДЬ НА РІЗНІ ТИПИ ЕЛЕКТРИЧНИХ СТИМУЛІВ</b>	59
<b>РОЗДІЛ 4. ХАРАКТЕРНІ ЗМІНИ СПИННОМОЗКОВО-ПАРАБРАХІАЛЬНИХ НЕЙРОНІВ У МОДЕЛІ ХРОНІЧНОГО НЕЙРОПАТИЧНОГО БОЛЮ</b>	70
<b>РОЗДІЛ 5. ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕЙРОНІВ ПЛАСТИНКИ X СПИННОГО МОЗКУ І ЇХ ЗАЛУЧЕНІСТЬ У</b>	77

<b>НОЦИЦЕПТИВНУ ПЕРЕДАЧУ</b>	
<b>РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ</b>	91
<b>ВИСНОВКИ</b>	108
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>	110
<b>ДОДАТКИ</b>	131

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

AMPA -  $\alpha$ -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота

NMDA – N-метил-D-аспартат

ГАМК –  $\gamma$ -аміномасляна кислота

ГПСС – гальмівні постсинаптичні струми

ЗПСП - збуджуючі постсинаптичні потенціали

ЗПСС – збуджуючі постсинаптичні струми

мЗПСС – мініатурні збуджувальні постсинаптичні струми

ТПРА - транзиторний рецепторний потенціал анкілоїдного рецептору

ТРП - транзйєнтний рецепторний потенціал

ТРПВ - транзйєнтний рецепторний потенціал ванілоїдного рецептору

ЦНС – центральна нервова система

## ВСТУП

Біль - це неприємне чуттєве та емоційне переживання, яке сприймається як сигнал про фактичне або можливе пошкодження тканин, або тим, що на нього схоже [1]. Фізіологічна роль болю є пріоритетною для гомеостазу, адже пов'язана із захистом організму від дії загрозливих факторів і призводить формуванням захисної поведінки.

Існує декілька класифікацій больових відчуттів: на основі патофізіологічного механізму, тривалості, анатомічної локалізації, методів купування болю, медикаментів, що для цього застосовуються [2]. За тривалістю больові відчуття можна розділити на гострий і хронічний біль. Так, гострий біль триває до 6-12 тижнів і має важливе значення, адже виконує захисну функцію. Хронічним вважається біль, що залишається після періоду видужання і має тривати або повторюватися більше ніж 3-6 місяців [3], [4]. Необхідними умовами для хронізації є інтенсивність і повторюваність стимуляції спинномозкових і супраспінальних шляхів [5]–[7]. Хронічний біль вже не має протекторної функції і є причиною біохімічних та фенотипових змін в нервовій системі, що призводять до фізіологічної, метаболічної та імунологічної альтерації [8]–[10].

Проблема болю і пошуку нових методів його лікування є важливою медико-соціальною дилемою, адже від хронічного болю у розвинутих країнах страждають 40% людей [11]. В Україні 60.4 % людей відповіли, що відчували хронічний біль [12]. В структурі хронічного болю від 20 до 25% займає нейропатичний біль, що протікає із залученням соматосенсорної системи і може бути вторинним по відношенню до уражень ЦНС (післяінсультний таламічний біль), або у разі периферичних розладів (діабетична нейропатія) [13]–[16].

Нейропатичний біль вражає до 17% населення та негативно впливає на якість життя [17]. Цей виснажливий стан виникає після первинного ураження або захворювання соматосенсорної нервової системи і характеризується гіпералгезією (посиленою реакцією на шкідливі подразники), аллодинією (аномальна реакція на нешкідливі подразники) і спонтанним болем [17]. Доступні методи лікування обмежені, і однією з головних причин цього є наше неповне розуміння клітинних і молекулярних механізмів, що лежать в основі нейропатичного болю.

Відчуття болю опосередковується всією нервовою системою, включаючи периферичну нервову систему, спинний і головний мозок. Серед різних класів залучених клітин, спинномозково-парабрахіальні нейрони є особливо важливими. Спинномозкові-парабрахіальні нейрони, що відповідають за ноцицепцію, розташовані в пластинці I і здебільшого націлені на парабрахіальну область стовбура мозку у гризунів. Вони, фактично, є єдиними, хто передає сенсорну інформацію від спинного мозку до супраспинальних центрів [18].

Регуляція больових процесів відбувається через збудливі та гальмівні ланцюги в центральній нервовій системі, що контролюється, в основному, ядрами в стовбурі мозку, які можуть або зменшувати, або посилювати біль залежно від настрою, когнітивних функцій і спогадів [19], [20].

Позаклітинні записи *in vivo* продемонстрували, що більшість спинномозкові-парабрахіальні нейрони пластинки I є ноцицептивно-специфічними і здатні генерувати потенціали дії у відповідь на шкідливе тепло, холод і механічні стимули [21]. Перед доставкою ноцицептивної інформації через спинномозкові-парабрахіальні нейрони до структур головного мозку, уся інформація проходить аналіз на рівні складних синаптичних мереж локальних інтернейронів, які складають близько 99% нейронів дорсального рогу [22]. Інтернейрони дорсального рогу можуть виділяти вивільняють  $\gamma$ -аміномасляну кислоту (ГАМК) та/або гліцин і бути гальмівними, збудливі (глутаматергічні) нейрони експресують везикулярний транспортер глутамату 2 (VGLUT2) [23]–[26].

Нейрони дорсального рогу демонструють дивовижну гетерогенність у морфології, електрофізіологічних властивостях та транскриптомічних профілях [27], [28]. Особливо цікавими у ролі терапевтичних мішеней для лікування болю є спинномозкові-парабрахіальні нейрони, оскільки ноцицептивні сигнали, що надходять з периферії, перед доставкою до центральних структур, обов'язково проходять спинномозкові-парабрахіальні нейрони на своєму шляху.

Методики ретроградного та антерградного маркування дозволили дослідити анатомію, кількість, здатність нейронів мати проекцію на декілька ділянок і картувати кінці цих висхідних проекцій [24], [29]–[35]. Наразі через значну гетерогенність спинномозкові-парабрахіальні нейрони у пластинці I не вдалося класифікувати їх на окремі популяції: за фізіологічними [21], [36], [37] та анатомічними властивостями [24], [38], що обумовлює необхідність подальших досліджень їх функціонування.

Спинний мозок є складною цитоархитектурною системою, у якій параметр щільності нейронів і нейробластів у дорсальних рогах має асинхронний внутрішньоутробний розвиток [39] і в подальшому формує високоорганізовану нейроанатомію висхідних і низхідних шляхів, які передають сенсорну, моторну та автономну інформацію [40]–[42]. Вихідні відростки нейронів I і II пластинок, після перехресту по переднім і боковим канатикам, що формують спинномозково-таламічні шляхи, які несуть інформацію про больову та температурну чутливість до головного мозку. В дорсальному розі існує чітко впорядкована пластинчаста система розгалуження первинних аферентів, в якій соматотопічний розподіл відбувається на основі діаметра та функції волокон. Ноцицептивні та терморцептивні аференти Ad та C іннервують пластину I та велику частину пластинки II, ноцицепторні Ad мають свої закінчення на пластинці I. Вони мають додаткові гілки до пластинок V та X [43], [44].

Було показано, що на больових волокнах експресуються рецептори транзиторного рецепторного потенціалу анкілоїдного рецептору 1 (ТПРА1) і

транзиторного рецепторного потенціалу ванілоїдного каналу 1 (TRPV1), вони відіграють важливу роль у розвитку хронічного болю [45]. Застосування в експериментальних умовах агоністу капсаїцину призводило до активації TRPV1 в нервових волокнах, вивільнення субстанції Р та пептиду пов'язаного з геном кальцитоніну, посилення кровотоку, виникнення набряку, що називається нейрогенним запаленням і призводить до ноцицепції у тварин [46]. Видалення TRPA1 і TRPV1 пригнічує розвиток хронічного болю, а блокатори цих каналів є перспективними кандидатами в розробці нового класу знеболюючих засобів [47]–[50].

Останні дослідження показують, що пластинка Х залучена в ноцицепції та локомоції, безпосередньо постачається високопороговими первинними аферентами [51] і є місцем, де термінують волокна, що починаються від супраспінальних моторних центрів [52]–[56].

Пластинка Х спинного мозку має важливу роль в соматосенсорній інтеграції [57], вісцеральній ноцицепції [58]–[60], та автономній регуляції [61]. Пластинка Х також задіяна в процесі модуляції виходів з мотонейронів [62]. Електрофізіологічні дослідження нейронів пластинки Х [63]–[67] були зосереджені переважно на нейрональних рецепторах і були проведені без функціонального дослідження нейронних зв'язків. Більше того, дослідження нейронів пластинки Х переважно проводилися з використанням зрізів спинного мозку [64], [68], де видалення дорсальних і вентральних корінців порушує справжній функціональний зв'язок, що підтверджує необхідність використання цілого препарату спинного мозку.

В даній роботі вперше було визначено різні субпопуляції спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки І дорсального рогу спинного мозку в залежності від кількості згенерованих потенціалів дії на супрамаксимальну стимуляцію первинних аферентів і вивчено кількісні та якісні характеристики активності аферентних входів С – волокон до спинномозкових-парабрахіальних нейронів.



Незважаючи на нещодавні досягнення в розумінні фізіології спинномозкових-парабрахіальних нейронів, доступно доволі мало інформації про зміни їх функціонування, що спричинені нейропатією. Було досліджено зміни функціонування нейронної мережі пластини I в моделі хронічного болю, що може прояснити основні механізми невропатичного болю.

Була підтверджена залученість пластинки X у регуляції больової сигналізації і шляхи регуляції первинних аферентних входів від нейронів пластинки X. А також перше було показано функціональну схожість пластинки X з основною ноцицептивно-проекційною пластинкою I дорсального рогу спинного мозку.

**Актуальність теми.** Біль є не тільки клінічною, але і значною соціальною проблемою [69]. Поточна відсутність належного кодування в Міжнародному класифікаторі хвороб ускладнює отримання точних епідеміологічних даних, пов'язаних з хронічним болем, перешкоджає належному виставлянню рахунків на медичні витрати, пов'язаних з лікуванням болю, і перешкоджає розробці та впровадженню нових методів лікування.

Гострий біль минуций і завершується відновленням організму при відсутності впливу больового стимулу, на відміну від хронічного, що зберігається навіть без наявності стимулу та призводить до розвитку вторинних ускладнень [8]. Такий патологічний біль знаходиться в першій десятці станів, що призводять до значного порушення якості життя [70]. Хронічний біль є частим захворюванням, що вражає приблизно 20% людей у всьому світі [11], [71], [72] і становить від 15% до 20% візитів у структурі відвідування лікаря [73]. Згідно до міжнародного діагностичного інтерв'ю, 60.4% опитаних людей в Україні колись відчували хронічний біль [12]. Обов'язком кожної системи охорони здоров'я є реалізація права людини на отримання ефективного лікування болю. Проблема хронічного болю має бути глобальним пріоритетом в системі охорони здоров'я.

Враховуючи, що кожен третій пацієнт із хронічним болем не реагує на доступні на даний момент методи лікування, очевидна потреба в більш ефективних анальгетиках [74]. Розробці методів лікування болю має приділятися більше уваги.

При отриманні больового стимулу інформація від рецепторного апарату тіла надходить і обробляється у дорсальному розі спинного мозку. Важливу роль в передачі ноцицептивних периферичних впливів від первинних аферентів волокон до супраспінальних центрів, відповідальних за формування відчуття болі, відіграють спинномозкові-парабрахіальні нейрони, більшість з яких знаходиться у I пластини сірої речовини. Висхідні гілки їх аксонів закінчуються в специфічних ядрах стовбуру мозку та таламусу і [75]. Відповіді спинномозкових-парабрахіальних нейронів на больову стимуляцію шкірних рецепторних полів достатньо досліджені [76], але досі не вивчено роль різних типів спинномозкових-парабрахіальних нейронів I пластинки дорсального рогу в передачі специфічної ноцицептивної інформації.

Нещодавні дослідження про те, що різні типи високопорогових первинних аферентів [77], [78] безпосередньо іннервують нейрони пластинки X, що підкреслює її безпосередню участь в обробці больового сигналу. На жаль, мало відомо про те як контролюються ці входи. Однак первинні аференти, що термінують в інші області спинного мозку, піддаються пресинаптичному гальмуванню опосередкованому низько- та високопороговими волокнами [51], а також низхідним сенсорним та моторним трактами. Оскільки область навколо центрального каналу має багато закінчень первинних аферентів, низхідних рухових волокон [79] енкефалін- та ендорфінергічних аксонів, можна обґрунтовано припустити, що входи від первинних аферентів до нейронів пластинки X модулюється різними нейронними шляхами. Терміналі, що містять ГАМК та енкефалін, у великій кількості містяться в пластинці X тому низхідні волокна ГАМК/енкефалінергічних нейронів від центру контролю болю в стовбурі головного мозку, є перспективними мішенями для гальмування. Таким чином, це може бути потенційним підходом у менеджменті больових синдромів. Тому, ця робота присвячена визначенню механізмів регуляції больової

сигналізації поперекового відділу спинного мозку у щурів з пошуком потенціальних ланок впливу при хронічному больовому синдромі.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.;** «Біофізичні та молекулярно-генетичні механізми регуляції фізіологічних та патологічних процесів» (2017 – 2021; номер державної реєстрації – 0116U004470) та «Функціональні характеристики нейронів спинного мозку та їх зміни при різноманітних патологіях та травмах» (2019 - 2023; номер державної реєстрації – 0118U007346).

**Мета дослідження.** Метою дослідження було визначення механізмів регуляції больової сигналізації поперекового відділу спинного мозку у щурів для пошуку потенціальних ланок впливу на хронічний больовий синдром.

Згідно з метою були поставлені **завдання:**

1. Визначити різні субпопуляції спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки I дорсального рогу спинного мозку в залежності від кількості згенерованих потенціалів дії на супрамаксимальну стимуляцію первинних аферентів та встановити їх можливу функціональну роль в кодуванні сили та інтенсивності ноцицептивного аферентного входу.
2. Встановити кількісні та якісні характеристики активності аферентних входів, насамперед С-волокон, до спинномозкових-парабрахіальних нейронів I та II-го типів.
3. Дослідити зміни функціонування нейронної мережі пластини I в моделі хронічного болю.
4. Підтвердити залученість пластинки X у регуляції больової сигналізації.
5. Визначити шляхи регуляції первинних аферентних входів від нейронів пластинки X.

*Об'єкт досліджень:* Збуджуюча та гальмівна синаптична активність у мережі нейронів I та X пластин дорсального рогу; прояви хронічного больового синдрому в експериментах на щурах.

*Предмет досліджень:* Клітинні й мережеві механізми обробки

ноцицептивних сигналів у спинному мозку та їх зміни при хронічному больовому синдромі;

*Методи дослідження:* поведінкові тести для оцінки механічної і температурної больової чутливості щурів; методики селективного маркування спинномозкових-парабрахіальних нейронів дорсального рогу спинного мозку щурів з використанням флуоресцентного ретроградного індикатора, що дозволяє отримати пряму візуалізацію; електрофізіологічна методика «patch clamp» для реєстрації електричної активності нейронів та іонних струмів у пластинках I і X; реєстрація відповіді нейронів на стимуляцію дорсального корінця у електрофізіологічні методики «patch clamp», методи математичної статистики (тест Шапіро-Вілка, t-тест Стюдента, достовірність відмінностей порівнювали за допомогою непараметричних тестів Манна-Вітні або Колмогорова-Смірнова, для аналізу категорійних даних використовували точний тест Фішера.

**Наукова новизна одержаних результатів.** В роботі вперше виявлено різну функціональну роль в кодуванні сили та інтенсивності ноцицептивного аферентного входу в різних субпопуляціях спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки I дорсального рогу спинного мозку. Відмічено, що кількість моносинаптичних аферентних входів, насамперед від C-волокон, суттєво відрізняється у спинномозкових-парабрахіальних нейронах I та II-го типів. Так, інтегральний струм, що виникає на мембрані під час супрамаксимальної стимуляції первинних аферентів значно більший у нейронах I-го типу.

На загальноприйнятій моделі хронічного болю нами вперше було продемонстровано, як змінюються патерни генерації потенціалів дії спинномозкових-парабрахіальних нейронів у патологічних умовах. Вперше було зроблено припущення, що ці патерни лежать в основі спонтанного болю, гіпералгезії та алодинії. Ми виявили, що спинномозкові-парабрахіальні нейрони можуть спонтанно генерувати групи потенціалів дії, без стимуляції первинних аферентів, що може відповідати спонтанному болю. Проявами гіпералгезії може бути довготривалі

генерації потенціалів дії, що тривають секунди і виникають при супрамаксимальній стимуляції С – аферентів, а довготривалі групи потенціалів дії, при стимуляції А-волокон, можуть свідчити про наявність алодинії.

Вперше була підтверджена залученість пластинки Х у регуляцію больової сигналізації. Показано, що значний вклад в цю регуляцію мають ТРПВ1-позитивні терміналі первинних ноцицепторів, а також що самі ТРПВ1 - рецептори представлені на мембранах нейронів пластинки Х. Також вперше доведено, що нейрони пластинки Х регулюються пресинаптично на сегментарному рівні від гомо- і гетеросегментарних аферентів та на супраспінальному рівні - по низхідним волокнам з кортикоспінального тракту, дорсолатерального канатика, переднього канатика. Низхідні волокна від дорсолатерального канатика мають прямі постсинаптичні впливи, як збуджуючі (моно- і полісинаптичні), так і гальмівні. Таким чином, первинно аферентний вхід до пластинки Х підлягає як спінальному, так і супраспінальному контролю, який регулюється щонайменше п'ятьма різними шляхами. Це дає можливість розглядати вплив на сегментарну, пре- і постсинаптичну низхідну регуляцію, як на потенційну ланку впливу при хронічному больовому синдромі.

Вперше було показано функціональну схожість пластинки Х з основною ноцицептивно-проекційною пластинкою І дорсального рогу спинного мозку.

**Практичне значення отриманих результатів.** Результати, отримані в роботі, мають як фундаментальне, так і практичне значення. Так, ми розділили на субпопуляції спинномозкових-парабрахіальних нейронів І пластинки дорсального рогу. Ділення цих детекторів больового сигналу, відбулося в залежності від кількості згенерованих потенціалів дії на супрамаксимальну стимуляцію первинних аферентів. Було встановлено їх можливу функціональну роль в кодуванні сили та інтенсивності ноцицептивного аферентного входу та кількісні та якісні характеристики активності аферентних входів, насамперед С-волокон, до спинномозкових-парабрахіальних нейронів І та ІІ-го типів. Була підтверджена залученість пластинки Х у регуляції

больової сигналізації і визначені шляхи регуляції первинних аферентних входів від нейронів пластинки X. Показано, що ТРПВ1 - рецептори представлені на мембранах нейронів пластинки X. Усі ці дані помітно покращують наше розуміння механізмів кодування та інтеграції ноцицептивних сигналів на люмбарному рівні спинного мозку.

Практична цінність даної роботи полягає у встановленні того факту, що спинномозкових-парабрахіальних нейронів I пластинки та терміналі, що містять ГАМК та енкефалін і у великій кількості містяться в пластинці X, тому низхідні волокна ГАМК/енкефалінергічних нейронів від центру контролю болю в стовбурі головного мозку, є перспективними мішенями для гальмування процесів хронічного болю.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем було проведено розробку основної наукової ідеї, аналіз літератури відповідно до теми дисертації, самостійне формулювання мети й завдань дослідження; разом зі співавторами були сплановані та розроблені експериментальні протоколи. Поведінкові тести, детекція збуджуючих та гальмівних синаптичних струмів, аналіз кількісних результатів електрофізіологічних експериментів та оформлення публікацій були проведені разом із співавторами опублікованих робіт (співробітниками інституту ім. О. О. Богомольця НАН України: кандидатом біологічних наук В. В. Кротовим та кандидатом медичних наук К. С. Агашковим.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення роботи доповідались на щорічній конференції Американського товариства нейронаук (Сан-Дієго, 2018), XI Форумі Федерації Європейських Товариств Нейронаук (Німеччина, Берлін, 2018), а також на семінарах сектора нейронаук Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України і Каролінського Інституту (Стокгольм, Швеція).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 9 друкованих робіт: 3 статті у міжнародних наукових журналах (усі входять до першого квартилю (Q1)

відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank) та 6 тез на наукових конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація представлена українською мовою на 137 сторінках, складається з анотації, змісту, переліку умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів, вступу, огляду літератури, матеріалів і основних методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів дослідження, висновків, списку із 238 використаних джерел. Дисертація ілюстрована 24 рисунками.

# РОЗДІЛ 1.

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Визначення ролі і класифікація болю

Біль - це неприємне чуттєве та емоційне переживання, яке сприймається як сигнал про фактичне або можливе пошкодження тканин (*Terminology / International Association for the Study of Pain, n.d.*). Визначення є широко відомим і загально прийнятим, було рекомендовано Комітетом з таксономії та затверджено Радою Міжнародної асоціація по вивченню болю ще у 1979 році. Визначення набуло широкого визнання фахівцями в галузі охорони здоров'я та дослідниками в області болю і прийнято кількома професійними, урядовими та неурядовими організаціями, включаючи ВООЗ. У 2020, після 2-х річних дискусій щодо перегляду терміну, Міжнародна асоціація по вивченню болю прийняла і затвердила незначні, але драматичні доповнення в терміні. Так, на сьогодні біль - це неприємне чуттєве та емоційне переживання, яке сприймається як сигнал про фактичне або можливе пошкодження тканин, а бо тим, що на нього схоже [1].

Біль можна класифікувати на основі патофізіологічного механізму, тривалості, анатомічної локалізації [2]. Біль може бути центрального чи периферичного генезу, місцевим чи системним. В залежності від глибини, біль поділяють на поверхневий соматичний (при ураженні слизових чи шкіри), глибокий соматичний (при ураженні суглобів, скелетних м'язів чи сполучної тканини), глибокий вісцеральний (при ураженні внутрішніх органів) [7], [80]–[82]. Вісцеральний біль охоплює безліч поширених гострих і хронічних клінічних станів, які турбують мільйони людей по всьому світу. Сюди входить раптовий біль, пов'язаний із серйозними клінічними проявами захворювання (кишкові виразки, холецистит та апендицит). Вісцеральний біль також охоплює хронічні синдроми широкого діапазону, включаючи несерцевий біль у грудях, функціональний біль у животі, ендометріоз, панкреатит, а також



хронічні болі сечового міхура і кишківника. Деякі з цих клінічних проявів мають патологічну основу, однак, у багатьох випадках - очевидної причини болю немає. Такі болі називають ідіопатичними або функціональними розладами [83]. Це є складною медико-соціальною проблемою, адже особливо турбує хвору людину, а процес постановки точного діагнозу утруднений.

За інтенсивністю і ступеням переносимості біль може бути слабким, середнім чи сильним або навіть нестерпним. Для оцінки сили болю використовують спеціальні шкали [84]. Часто біль є емоційно забарвленим і за суб'єктивними відчуттями його можна поділити на приступоподібний, пульсуючий, тупий, колючий, ріжучий, стріляючий, проєкційний, іррадіюючий, фантомний.

Гострий біль викликається стимуляцією ноцицептивних нейронів і має протекторну функцію, підгострий біль часто відносять до органічного болю, що виникає в процесі загоєння тканин і триває не більше 6-12 тижнів.

Хронічний біль визнається як біль, який зберігається після нормального часу загоєння, не має протекторної функції, триває або повторюється більше 3-6 місяців [85]. Поточна відсутність належного кодування в Міжнародному класифікаторі хвороб ускладнює отримання точних епідеміологічних даних, пов'язаних з хронічним болем. Відомо, що у США щонайменше 20% страждають хронічним болем [86]. Існують також дані, що від хронічного болю у розвинутих країнах страждають навіть 40% людей [11] В Україні було опитано 1720 людей, і з них 60.4 % стикалися з хронічним болем [12].

Кліффорд Вульф в 2010 році [87] запропонував наступну диференціацію болю: ноцицептивний, запальний, нейропатичний, функціональний. Ноцицептивний біль має таку силу подразнення, що є загрозовою, виникає після травми, запалення, ішемії, інфекції. Його характеристикою є високопороговий біль, що активується лише за наявності інтенсивних подразників [88]. Виражена захисна роль вимагає негайної уваги та дій, які відбуваються внаслідок активованого рефлексу відсторонення. Ноцицептивний біль представляє себе як те, чого слід уникати зараз.

Запальний вид болю також носить пристосувальний і захисний характер. Підвищуючи сенсорну чутливість після неминучого пошкодження тканин, цей біль сприяє загоєнню. Больова гіперчутливість знижує подальший ризик пошкодження та сприяє відновленню. Прикладом є стан, при якому нешкідливі подразники, які раніше не викликали реакції, починають викликати біль.

Патологічний біль - не є захисним, а є дезадаптивним, виникає внаслідок порушення нормального функціонування нервової системи. У разі пошкодження нервової системи - нейропатичний біль, а також при станах, при яких немає такого пошкодження чи запалення - дисфункціональний біль.

Захворювання, що викликають дисфункціональний біль, включають фіброміалгію, синдром подразненого кишечника, головний біль напруження, захворювання скронево-нижньощелепного суглоба, інтерстиціальний цистит та інші синдроми, при яких існує сильний біль, але немає шкідливого подразника та немає або є мінімальна периферична запальна реакція. Патологічний біль є значною мірою наслідком посиленних сенсорних сигналів у центральній нервовій системі, він є низькопороговим.

Було показано [19], що біль активно регулюється збудливими та гальмівними ланцюгами в центральній нервовій системі, що контролюється, в основному, ядрами в стовбурі мозку, які можуть або зменшувати, або посилювати біль залежно від настрою, когнітивних функцій і спогадів. Функція цих схем модуляції болю порушується при різноманітних патологічних станах, що сприяє аномальному посиленню болю. Хоча кортикальні впливи зазвичай посилюють біль, вони також можуть зменшувати його, і це є нейробіологічною основою ефекту плацебо [89].

Купування ноцицептивного болю не є клінічною проблемою, за винятком хірургії або болісних маніпуляцій, на сьогодні його відносно успішно можна пригнічувати місцевими та загальними анестетиками або високими дозами опіоїдів. Однак, потрібно бути обережними, щоб ноцицептивний біль пацієнтів не був настільки приглушений терапією, щоб була втрачена його захисна роль [90]. Треба

також враховувати значний рівень ускладнень і побічних ефектів при застосуванні опіодів, що є препаратами групи резерву [86], [91], [92]. Що стосується хронічного болю, на жаль, на даний час не існує високо специфічних препаратів з мінімальними побічними ефектами для вирішення проблеми його лікування.

За аналогією, якби біль був сигналом пожежної тривоги, ноцицептивний тип активувався б належним чином лише при наявності сильного полум'я, запальний біль активізувався б від високої температури, а патологічний біль був би помилковою тривоною, викликаною несправністю самої системи. Остаточний ефект у всіх трьох випадках — це відчуття, яке ми називаємо болем. Однак, оскільки патофізіологічні процеси досить різні, необхідне подальше вивчення механізмів різних типів болі з метою отримання ефективного лікування.

## 1.2. Хронічний біль

Нейропатичний біль – це патологічний процес, що протікає із залученням соматосенсорної системи і може бути вторинним по відношенню до уражень ЦНС (післяінсультний таламічний біль), або у разі периферичних розладів (діабетична нейропатія). Пошкодження або дисфункція нервової системи часто призводить до сенсорних розладів, які можуть включати саме нейропатичний біль. Клінічно нейропатичні болі є неоднорідними за своєю природою, але вони мають кілька спільних ознак, таких як спонтанний біль, гіпералгезія (підвищена чутливість до шкідливих подразників) і алодинія (больові реакції на зазвичай нешкідливі подразники), що вказує на їх загальні механізми. Останні повідомлення про нейропатичний біль свідчать про його поширеність у загальній популяції від 5 до 8% [13]–[16] у структурі хронічного болю, що складає від 20 до 25%. Клінічно нейропатичні больові синдроми характеризуються позитивними чи негативними феноменами. Позитивні включають парестезії та/або дизестезії з поколюваннями, оніміннями. До негативних явищ зазвичай відносять неврологічний сенсорний

дефіцит у ділянці локалізації болю з порушенням моторної чи когнітивної функції. Класична етіологія периферичного нейропатичного болю включає периферичні нейропатії, постгерпетичні невралгії та травматичні ушкодження нерва. Однак частіше присутні змішані больові синдроми, що включають нейропатичні та не нейропатичні механізми. Яскравим прикладом таких порушень є поперекові або шийні радикулопатії, які є однією з найбільших частих причини периферичного нейропатичного болю [15]. Центральні больові синдроми спостерігаються у 8% хворих після інсульту, у 30-50 % пацієнтів з травмою спинного мозку, у 20-25% хворих на розсіяний склероз [93]–[95]. Дослідження нейропатичного болю було дуже динамічними в останні два десятиліття. Було доведено, що через порушення балансу між збудженням і гальмуванням в ЦНС, відбуваються зміни електричних властивостей у сенсорних волокнах [96]–[99]. Зміни відбуваються через зміну щільності у немієлізованих С волокнах та слабкомієлізованих Ад волокнах, а також через зміни в самих нейронах з підвищенням їх збудливої активності [100].

Важливою медико-соціальною проблемою є дезадаптивна центральна сенситизація, що виникає при постійній периферичній нейропатії. Це явище Міжнародна асоціація болю визначає як «посилену чутливість ноцицептивних нейронів у центральній нервовій системі на їх нормальний або підпороговий аферентний вхід», також у роботах неодноразово показано, що необхідними умовами є доволі інтенсивні і повторювані стимуляції спинномозкових і супраспінальних [5]–[7]. Ще в 90-х роках Вульф показав який саме механізм призводить до таких змін. Досліджуючи нейрони другого порядку та їх синапси було показано, що наявні зміни в проникності кальцію, гіперсекреція рецепторів та зміна їх розташування в синаптичній щілині [101].

В процес підтримання хронічної алгезії також залучається мікроглія. Саме її надмірна активація призводить до вивільнення медіаторів, що ставить питання чи не є хронічний біль при периферичній нейропатії гліопатією [6].

Розвитку хронічного больового стану сприяє наявність дезадаптації і на підкірковому рівні, наявні також зміни кортикальної пластичності, що в сукупності призводять до сприйняття неболових стимулів, як ноцицептивних [102]. Відомо також про посилену активацію нейронів таламуса у тварин [103] і людей [104], яка відбувається через надмірне вивільнення збуджуючих амінокислот та нейропептидів і фосфорилування рецепторів NMDA та AMPA і, можливо, підвищеною втратою втратою ГАМК-ергічних інгібіторних інтернейронів [105].

Наявність ефективних моделей травматичного ушкодження сідничного нерва у щурів дала можливість вченим активно продовжити вивчення цих механізмів стійкого збудження [106], [107]. Такі моделі є зручними для вивчення процесів нейропатичного болю. У гризунів зміни в мієлінізованих А волокнах відбуваються вже через годину після травми, в немієлізованих С – від декількох днів до одного тижня і призводять до формування нейропатичної больової поведінки [107], [108].

Гостре запалення має важливе значення для захисту нашого організму, ремоделювання та відновлення тканин. Хронічне запалення, яке триває більше 6 тижнів, призводить до пошкодження тканин і не має в собі відомої корисної мети. Прозапальні медіатори, такі як простагландини, цитокіни, хемокіни, протеази, нейропептиди та фактори росту здатні сенсibiliзувати периферичні нейрони [109], [110]. Особливо схильні до розвитку запального болю шкіра, суглоби та кишечник. Атопічний дерматит, артрит та запальні захворювання кишечника становлять серйозний глобальний тягар, і дані свідчать про те, що поширеність кожного з них обов'язково зростає в майбутньому, якщо не буде вжито профілактичних заходів [111]–[113].

На щастя, наше розуміння механізмів що лежать в основі хронічного запалення, постійно зростає. Запалення тканин призводить до підвищення збудливості нейронів і зниження порога активації у відповідь на подразники навколишнього середовища [114].

Поверхневий дорсальний ріг спинного мозку є основною зоною для інтеграції ноцицептивної інформації з периферії. Нейрони, що експресують рецептори нейрокініну 1 типу щільно заселяють пластинку I [115] і пов'язані з розвитком і підтримкою постійного болю, оскільки селективна абляція цих нейронів призводить до майже повної втрати ноцицептивної поведінки в моделях запального та нейропатичного болю [116]. Постійне периферичне запалення змінює рецептор AMPA у нейронах дорсального рогу спинного мозку, сприяючи інтерналізації GluR2-вмісних, Ca(2+)-непроникних AMPA рецепторів із синапсів та збільшенням вставки GluR1-вмісних, Ca(2+)-проникних AMPA рецепторів в екстрасинаптичній плазматичній мембрані. Як було доведено, ці зміни сприяють підтримці постійного запального болю [117]–[119]. Використовуючи модель тривалого периферичного запалення, спричинену ад'ювантом Фройнда (CFA) було доведено, що помітна гіпералгезія та алодинія розвиваються через 1-3 години після внутрішньопідшківної ін'єкції [98], [119], [120]. Використовуючи запис електрофізіологічної активності в поєднанні з зображенням Ca(2+), було виявлено значне посилення екстрасинаптичних AMPA рецепторів в нейронах субстанції желатинози спинного мозку щура через 2-3 години після ін'єкції [121].

Незважаючи на значні зусилля в дослідженнях, хронічний запальний біль все ж таки погано піддається і супроводжується значними побічними ефектами від лікування, що представляє собою зростаючу клінічну проблему, яка потребує пошуку нових шляхів вирішення, заснованих на механізмі спрямованої терапії.

### 1.3. Організація сірої речовини спинного мозку: функціональні особливості I та X пластинок

Спинний мозок – це частина центральної нервової системи, що забезпечує зв'язок головного мозку з периферією і лежить в основі рефлекторної діяльності організму.

Сіра речовина спинного мозку містить тіла нейронів, що оточені білою речовиною, яка представлена мієліновими аксонами цих нейронів. У поперечних зрізах сіра і біла речовини спинного мозку симетрично розташовані у сагітальній площини та мають розширення. Виступи сірої речовини складаються з тіл нейронів і утворюють вентральний, латеральний та дорсальний роги.

Відомо, що спинний мозок є досить складною системою, з особливою цитоархітектурою. У функціональному аспекті це, фактично, система контролю роботи усієї кістково-м'язової системи саме через сенсорно-моторну інтеграцію. Протягом усього внутрішньоутробного періоду спостерігається тенденція до поступового зниження щільності нейронів і гліоцитів, а параметр щільності нейронів і нейроblastів у дорсальних рогах є кількісно асинхронним [39].

В 1952 році Рексед [122] вивчав сіру речовину спинного мозку котів і на основі розмірів та щільності нейронів виділив 10 пластинок. Пластинка I та II по іншому називаються маргінальна зона і жовта речовина або субстанція желатиноза. Вони утворюють поверхню дорсального рога і складаються з нейронів які, при окрашуванні за Нільсем, є дрібнішими в порівнянні з нейронами більш глибоких пластинок. Ця ділянка має незначну мієлінізацію, тому виглядає напівпрозорою у живій тканині. Окремо II пластинка може бути додатково розділена на зовнішню (IIo) та внутрішню (IIi) частини. Внутрішня частина III має дещо нижчу щільність нейронів. Пластинки III і IV включає власне ядро. Межа між пластинками III і IV зазвичай визначається неоднорідністю розміру нейронів пластинки IV порівняно з меншими клітинами пластинки III. Пластинка V відзначається наявністю численних мієлінових аферентів, які утворюють сітчасту область. Пластинка VI, яка існує лише в шийному та попереково-крижовому відділах, характеризується меншими та більш правильно розташованими клітинами, ніж пластинка V. V і VI пластинки отримують аферентні сигнали від м'язів, зв'язок і сухожилків. З цих пластинок виходять спинномозкові тракти (Флексига та Говерса). VII пластинка займає значну частину переднього рогу і складається в основному з вставних нейронів і через VII

пластинку, яка в основному має функцію пропріоспінального зв'язку, дає аксони IX пластинці. Сама по собі IX пластинка є первинною моторною ділянкою, що складається з мотонейронів.

Найменш вивченою є X пластинка, що розміщена навколо центрального спінального каналу і відповідає за комісуральні та пропріоспінальні зв'язки. Пластинка X спинного мозку має важливу роль в соматосенсорній інтеграції [57], вісцеральній ноцицепції [123]–[125], та автономній регуляції [126]. Пластинка X також задіяна в процесі модуляції виходів з мотонейронів [127]. Тим не менш, переважна частина цих знань спирається на набір морфологічних та імуногістохімічних методів, тоді як дослідження функціональних властивостей нейронів пластинки X залишаються досить винятковими. Були проведені електрофізіологічні дослідження нейронів пластинки X [63], [64], [66], [67], однак вони зосереджені переважно на нейрональних рецепторах і були проведені без функціонального дослідження нейронних зв'язків. Більше того, дослідження нейронів пластинки X переважно проводилися з використанням зрізів спинного мозку [64], [68], де видалення дорсальних і вентральних корінців порушує справжній функціональний зв'язок.

Останні дослідження показують, що пластинка X залучена в ноцицепції та локомоції, безпосередньо постачається високопороговими первинними аферентами і є місцем, де термінують волокна, що починаються від супраспінальних моторних центрів [52], [53], [55], [56].

#### 1.4. Організація нейронів в сірій речовині дорсального рогу і значення їх локальних нейронних мереж в обробці ноцицептивної інформації

Дорсальний ріг отримує входи від сенсорних первинних аферентів, включаючи больові рецептори, рецептори свербіжу, терморекцептори і низьпорогові механорецептори. Нейрони в цих областях дуже неоднорідні за своєю морфологією,



молекулярним фенотипом і внутрішніми властивостями [128], що ускладнює визначення функціонально відмінних популяцій клітин і визначення того, як вони задіяні в патофізіологічних станах. Вхідна інформація обробляється складними схемами, що включають збуджувальні, гальмівні інтернейрони і передається проєкційним нейронам. Інтернейрони становлять до 95% загальної кількості нейронів у пластинці I і практично всі нейрони пластинки II [24], [129] і близько 98% нейронів у пластинці III [22].

Раннє фарбування дорсального рогу за Гольджі довело, що нейрони в пластинці I мають пірамідальну, багатополярну та веретеноподібну морфологію [33]. Пірамідні клітини мають трикутну форму, з дендритами, які зазвичай залишаються в пластинці I на меді-латеральній осі. Мультиполярні клітини мають округлу форму з дендритами, що виступають у різних напрямках, тоді як веретеноподібні клітини подовжені з видовженими поздовжніми біполярними дендритами. Ці дослідження, однак, не відрізили інтернейрони від проєкційних нейронів, а це означає, що більшість цих морфологічних класів включають обидва типи клітин. Однак була виявлена певна кореляція між морфологією клітин та типом генерації потенціалів дії. Так, під час запису електрофізіологічної активності нейрони пластинки I можна було ідентифікувати як «тонічні», коли вони генерували потенціали дії повільно але безперервно, «фазові» - з фазовою активністю генерації потенціалів дії з високою частотою, «адаптивні» - з затримкою перед першим піком потенціалів дії та з одиничною генерацією потенціалів дії навіть на сильну деполяризацію [130].

Нейрони дорсального рогу можна розділити на дві великі групи на основі їх основного нейромедіатора. У дорсальному розі практично всі збуджувальні нейрони є глутаматергічними і експресують везикулярний транспортер глутамату 2 (VGLUT2) [23], [27]. Інгібіторні нейрони вивільняють  $\gamma$ -аміномасляну кислоту (ГАМК) та/або гліцин. Цікаво, що миші, у яких експресія EGFP обумовлена декарбоксилазою глутамінової кислоти 67 (GAD67) або промотором транспортера гліцину 2 (GLYT2), виявили, що ГАМКергічні гальмівні нейрони переважно

експресуються в пластинках II–III, тоді як ті, що синтезують гліцин, розташовані переважно в пластинках III–V та в пластинці I [26]. Інгібіторні нейрони, що синтезують ГАМК, становлять 30% нейронів у пластинці I, 24% у пластинці II і 38% у пластинці III дорсального рогу миші, і подібні пропорції спостерігалися у щурів [24], [131].

Сенсорна інформація, яка поступає до спинного мозку, обробляється складними синаптичними мережами перед передачею через спинномозкові-парабрахіальні нейрони до мозку (для свідомого сприйняття), а також до нейронів, що беруть участь у спинномозкових рефлекторних шляхах. Основні компоненти, що беруть участь у цих модуляторних мережах, - це локальні інтернейрони, яких надзвичайно багато, і, як вважають, вони складають близько 99% нейронів дорсального рогу [22]. Інтернейрони дорсального рогу можна розділити на два широкі функціональні класи: інгібіторні нейрони, які використовують ГАМК та / або гліцин як головний нейротрансмітер, і збудливі (глутаматергічні) нейрони [24], [26].

Нейрони дорсального рогу демонструють дивовижну гетерогенність у морфології, електрофізіологічних властивостях та транскриптомічних профілях [27], що відображає складну роль дорсального рогу в інтеграції та модуляції, а не просто передачі соматосенсорних вхідних даних до того, як вони досягнуть супраспінальних областей. Велика різноманітність нейронів дорсального рогу ускладнила розробку комплексної схеми класифікації як для інтернейронів, так і для проєкційних нейронів. Без такої схеми неможливо встановити функціональні ролі нейронів.

#### 1.5. Спинномозково-парабрахіальні нейрони спинного мозку і їх ролі і у передачі ноцицептивних стимулів

Спинномозкові-парабрахіальні нейрони передньолатерального шляху є основними нейросенсорними клітинами, що приймають участь в обробці і передачі

ноцицептивних стимулів. Вони безперечно є привабливими терапевтичними мішенями для лікування болю, оскільки ноцицептивні сигнали, що надходять з периферії, перед доставкою до центральних структур, обов'язково проходять спинномозкові-парабрахіальні нейрони на своєму шляху. Більшість спинномозкових-парабрахіальних нейронів поперекового відділу спинного мозку сконцентровані в пластинці I, деякі розкидані по пластинкам III-VI, дуже мала кількість розташована в пластинці II. Багато спинномозкових-парабрахіальних нейронів в пластинці I мають аксони, які перетинають середню лінію і рухаються рострально в контралатеральній білій речовині і мають закінчення в різних ядрах стовбура мозку і таламуса. Така сукупність шляхів лежить в основі сприйняття болю і температури. Ретроградне маркування дало можливість дослідити кількість, анатомію і здатність нейронів мати проекцію на декілька ділянок [24], [29], [30], [32], [35]. Для картування кінців цих висхідних проекцій використовується антероградне маркування [31], [34]. Ці два підходи показали, що основні супраспінальні мішені для пластинки I включають каудальний вентролатеральний мозок, ядро солітарного тракту, латеральну парабрахіальну область, периакведуктальную сіру речовину і певні ядра в таламусі [31]. Наявна колатералізація аксонів, причому деякі нейрони пластинки I виступають щонайменше на 3 мішені (латеральну парабрахіальну область, периакведуктальную сіру речовину і таламус). Кількісні дослідження з ретогоградним маркуванням на щурах показують, що в сегменті L4 спинномозкові-парабрахіальні нейрони становлять лише 5% нейронів пластинки I [24]. З них 95% проектується на латеральну парабрахіальну область, приблизно третина на парабрахіальну область, чверть на ядро солітарного тракту і менше ніж 5% на таламус. Низька кількість спиноталамічних клітин в пластинці I викликає подив, враховуючи передбачувану важливість цього шляху для сприйняття болю. Проте, це може бути лише особливістю поперекового відділу щура у місці розширення, адже електрофізіологія на щурах, котах, мавпах *in vivo* свідчать, що все ж більшість

спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки I реагують на больові подразники, деякі також мають реакцію на холодові стимули [132].

Спинномозкові-парабрахіальні нейрони пластинки I - гетерогенні, і було кілька спроб класифікувати їх на окремі популяції: за фізіологічними [21], [36], [37] та анатомічними властивостями [24], [35]. Так, особливу увагу привернув рецептор нейрокініну 1, який експресується багатьма нейронами пластинки I і є основною мішенню для речовини P. Його експресія обмежена нейронами, які активуються больовими подразниками [133], і видалення клітин, що експресують НК1-рецептори з кон'югатом P-сапорин запобігає розвитку гіпералгезії в моделях нейропатичного та запального болю [116], [134]. Близько 80% спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки I у щура демонструють імунореактивність до рецептору НК1 [35], [135], [136] і хоча рецептор також знаходиться на багатьох збудливих інтернейронах рівень його експресії набагато нижчий, ніж у спинномозкових-парабрахіальних нейронах [137], [138].

Велика кількість супраспінальних мішеней проєкційних клітин в пластинці I свідчить про те, що вони беруть участь у різноманітних функціях, включаючи сенсорно-дискримінаційні аспекти сприйняття болю, а також мотиваційно афективні та автономні компоненти.

1.6. Властивості та характеристики первинних аферентів та розподіл їх терміналей в структурі дорсального рогу спинного мозку

Спинний мозок має високоорганізовану нейроанатомію висхідних і низхідних шляхів, які передають сенсорну, моторну та автономну інформацію [42]. Зв'язок з периферією забезпечується через корінці спинного мозку, що представляють собою аксони нервових клітин. Передній корінець є руховим і складається з еферентних або вихідних волокон, що проводять рухові імпульси до поперечно-смугастих і гладких м'язів та до залоз. Задній або ДК складається з аферентних нервових

волокон, що проводять чутливі імпульси від периферії до центральної нервової системи.

Вихідні відростки нейронів I і II пластинок, після перехресту по переднім і боковим канатикам, що формують спинномозково-таламічні шляхи, які несуть інформацію про больову та температурну чутливість до головного мозку. II і III пластинки також отримують інформацію, по відросткам від спіно-таламічного тракту і передають інформацію до більш глибоких структур. Вони відповідають за контроль проведення больових сигналів. На нейронах IV пластинки замикаються рефлекторні дуги спинного мозку, через отримання інформацію від II і III пластинок.

Аксони первинних аферентів можна класифікувати за периферичними мішенями (наприклад: шкірним, суглобовим або вісцеральним аферентами), швидкістю проведення (яка пов'язана з розмірами та мієлінізацією), властивостями реагування (включаючи сенсорну модальність та інтенсивність стимулу, необхідних для їх активації) та нейрохімічним фенотипом (який визначається експресією пептидів).

Волокна типу C є демієлінізованими і їх діаметр 0,4-1,2 нм зі швидкістю проведення 0,5-2 м/с, мають термочутливі рецептори і механорецептори з низьким порогом чутливості.

A $\delta$  волокна є слабомієлінізованими, діаметром 2,0-6,0 нм, зі швидкістю проведення 12-30 м/с. Ці волокна поділяються на дві підгрупи. A $\delta$ -волокна типу I являють собою високорогові механорецептори, що слабо реагують на хімічні та термічні подразники. Тип II відповідає головним чином механотермічним рецепторам для високих температур та інтенсивного холоду.

A $\beta$ -волокна мієлінізовані, діаметр становить понад 10 нм, швидкість проведення 30-100 м/с. Ці волокна чутливі до дотиків, легкого тиску та вібрації, а також здійснюють пропріоцепцію. Їхня активація сприяє механізмам сегментарного пригнічення больового відчуття.

Активація волокон типу С і А $\delta$  веде до больового відчуття, що характеризуються суб'єктивно як різкий, пекучий біль. При патологічних станах ознаки нейропатичного болю, наприклад, дизестезія та парестезія, можуть виникнути внаслідок активації волокон А $\beta$ . Патологічне больове відчуття може проявлятися як гіпералгезія, яка опосередковується активацією С- та А $\delta$ -волокон. При патологічних станах активація низькопорогових механорецепторів (волокон А $\beta$ ) може викликати алодинію - біль внаслідок впливу подразнень, які зазвичай її не викликають.

В дорсальному розі існує чітко впорядкована система розгалуження первинних аферентів. Ця пластинчаста система є схематичною і являє собою систему, в якій соматотопічний розподіл відбувається на основі діаметра та функції волокон. За цією ламінарною схемою і визначається медіолатеральне чи ростокаудальне розташування мають аксони нейронів. Тактильні А $\beta$  та волоскові аференти закінчуються в основному на пластинках III-VI з деяким розширенням на пластину II [44].

Ноцицепторні А $\delta$  мають свої закінчення на пластинці I. Вони мають додаткові гілки до пластинок V та X. Між пластинками II/III проходять з обох боків волокна А $\delta$  від волосяних фолікулів. Були також вивчені мієлінізовані ноцицептори зі швидкістю провідності в діапазоні А $\beta$  волокон, які закінчуються на пластинках I-V [139]. Непептидергічні С волокна утворюють смугу, яка займає центральну частину пластинки II [140]. Пептидергічні первинні аференти, які представлені частиною С та деякими А $\delta$  ноцицепторами [141] закінчуються переважно в пластинках I та II, при цьому деякі волокна проникають глибше.

Взагалі, мієлінізовані низькопорогові механорецептивні аференти розгладжуються у зоні, що проходить між пластинками II-VI, тоді як ноцицептивні та терморецептивні аференти А $\delta$  та С іннервують пластину I та велику частину пластинки II, за винятком її найвентральнішої частини [43]. Існують дослідження, що визначили групу специфічних холодкових С-аферентів, які закінчуються в

пластинці I [142], а також два можливих кандидати для низькопорогових механорецептивних C волокон, які мають проекції у пластину II [143]. Ноцицептивні C волокна можна розділити на дві основні нейрохімічні групи: ті, що містять нейропептиди, такі як речовина P [141] та ті, що їх не мають [144]. Ці дві групи мають характерні зони закінчення в межах поверхневих пластинок. Непептидергічні C волокна, в основному, пов'язані зі шкірою, де вони іннервують епідерміс [145], тоді як пептидергічні волокна іннервують інші тканини, а також більш глибокі ділянки шкіри [146].

### 1.7. Роль каналів транз'єтного рецепторного потенціалу у больовій сигналізації

TRP канали – це велика група катіонних каналів, які беруть участь у визначенні температурних, больових та інших пошкоджувачих стимулів [45]. Канали були знайдені у всіх тварин, починаючи до від плодових мушок закінчуючи людиною, а також присутні у грибів [147]–[150]. Тільки рослини, бактерії та найпростіші не експресують TRP канали. Роль TRP каналів була вперше виявлена в клітинах сітківки дрозофіли ще в 1969 році [151]. Канали беруть участь у широкому спектрі фізіологічних і патофізіологічних процесів, що робить вивчення цих каналів необхідним для нашого розуміння субклітинної біохімії [152]. TRP є не тільки основними медіаторами болю, шкідливих подразників і температури в нервових волокнах, вони також були виявлені на лейкоцитах та клітинах сечовивідного, шлунково-кишкового тракту, дихальних шляхів та серця [148], [151]. У ссавців було виявлено 28 катіонних каналів, які згруповані в шість підродин на основі гомології послідовностей. Таким чином було виділено такі підродини: канонічну; ванілоїдну; меластинову, що включає деякі з небагатьох відомих біфункціональних іонних каналів з функціональними ферментативними доменами; анкіринову, яка вважається мішенню для анальгетиків; муколіпінову, що знаходяться в основному у

внутрішньоклітинних компартментах і має критичну ролі при муколіпідозі IV типу; полікістозну, що змінюється при полікістозі нирок.

ТРПВ 1 типу і ТРПА 1 типу приймають участь в больовій сигналізації. Нейронні компоненти дорсального рогу пов'язані між собою дуже складними синаптичними ланцюгами. Було показано, що ТПРА1 і ТРПВ1 експресуються на больових волокнах і відіграють важливу роль у розвитку хронічного болю [45].

ТПРА1 експресується переважно в нейронах гангліїв дорсального корінця і є детектором шкідливих холодних впливів. Активація цих рецепторів відбувається при температурі нижче 17 градусів за Цельсієм, а також брадикініном в рецепторах залежних від брадикініну [142], [153]. ТРПВ1 широко представлені в нервових волокнах, їх агоністом є капсаїцин. Його застосування в експериментальних умовах призводило до активації ТРПВ1 в нервових волокнах, вивільнення субстанції Р та пептиду пов'язаного з геном кальцитоніну, посилення кровотоку і виникнення набряку що називається нейрогенним запаленням і призводить до ноцицепції у тварин [46].

Видалення ТРПА1 і ТРПВ1 пригнічує розвиток хронічного болю , блокатори цих каналів є перспективними кандидатами в розробці нового класу знеболюючих засобів [47]–[50].

#### 1.8. Цільний препарат спинного мозку з візуалізацією нейронів I і X пластинок за технікою світлодіодного освітлення

Для отримання даних у функціональних дослідженнях нейрони мають бути візуалізовані і знаходитися в максимально природньому середовищі. Методика слайсів не може зберегти всю архітектоніку спинного мозку і структуру мережі, адже нервові волокна будуть перерізані. Тому вивчення функцій нейронів необхідно проводити на тканині зі значною товщиною чи навіть цілому мозку. Техніка світлодіодного косого освітлення, для візуалізації клітин в товщі тканини [154],



[155], надає унікальну можливість зберегти наївну архітектуру тканини разом з покращеною візуалізацією клітин. Методика добре застосовується для різних *ex-vivo* препаратів, включаючи спинний мозок і була багаторазово підтверджена в подальших дослідженнях інтеграції сенсорного входу в дорсального рогу [155]–[157]. За допомогою цієї методики ми можемо візуалізувати як аксони та дендрити (синій світлодіод, 470 нм), так і зображення глибоких клітин (інфрачервоний світлодіод, 940 нм). Для вивчення функцій нейронів спинного мозку анатомічні структури, синаптичні входи і обширні дендритні та аксональні розгалуження мають бути повністю збереженими. Це особливо важливо для запису електофізіологічної активності від поверхневих нейронів. В роботі з проекційними нейронами пластинки I спинного мозку, що були ретроградно марковані, візуалізація була можливою тільки з використанням техніки бічного світлодіодного освітлення. Для дослідження функціональної активності в пластинці X ми використовували комбінацію світлодіодного косого освітлення з препаруванням спинного мозку *ex vivo*, реалізуючи також поздовжню гемісекцію по сагітальній середній лінії [158]–[163] для прямого доступу до ділянки навколо центрального каналу.

## РОЗДІЛ 2.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Експериментальні тварини

Для даної роботи в експериментах використовували щурів лінії Вістар. Всі тварини утримувалися в віварії Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України та мали вільний доступ до їжі та води, сталу температуру повітря, природній світловий цикл і стандартне комбікормове харчування.

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

Усі експериментальні процедури були схвалені Комітетом з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України та виконані відповідно до Директиви Європейської Комісії (86/609/ЕЕС), етичних рекомендацій Міжнародної асоціації з вивчення болю та Товариство нейронаук з політики використання тварин і людей у дослідженнях нервової системи.

Вік щурів, яких брали в експерименти по дослідженню спинномозкових-парабрахіальних нейронів І пластинки становив 20-21 постнатальний день (P20- P21) обох статей. В цьому віці щурам була проведена стереотаксична інтратекальна

ін'єкція ретроградного барвника Флюороголд в латеральне парабрахіальне ядро, для виявлення спинномозкових-парабрахіальних нейронів дорсального рогу спинного мозку. Для дослідження активності спинномозкових-парабрахіальних нейронів дорсального рогу тварин брали в електрофізіологічні досліди у віці P24-P28.

Для експериментів по вивченню організації і регуляції X пластинки вік щурів лінії Вістар становив 11-13 постнатальний день (P11-P13) обох статей.

Щури були швидко вбиті шляхом декапітації, після чого їм було видалено хребет, який було поміщено в оксигенований розчин сахарози (20-22 °C), що містить (у ммоль): 200 сахарози, 2 KCl, 1,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 11 глюкози (при оксигенації 95% O<sub>2</sub> і 5% CO<sub>2</sub>). Спинний мозок із прикріпленими односторонніми L5 або L5 і L4 дорсальними корінцями видаляли та очищували від твердої мозкової оболонки. Спинний мозок з корінцями після гемісекції фіксували (бічної стороною вниз) до металевій пластини для подальшого дослідження. Всі речовини, що були використані були виробництва Sigma-Aldrich (MO, USA).

## 2.2. Модель хронічного нейропатичого болю

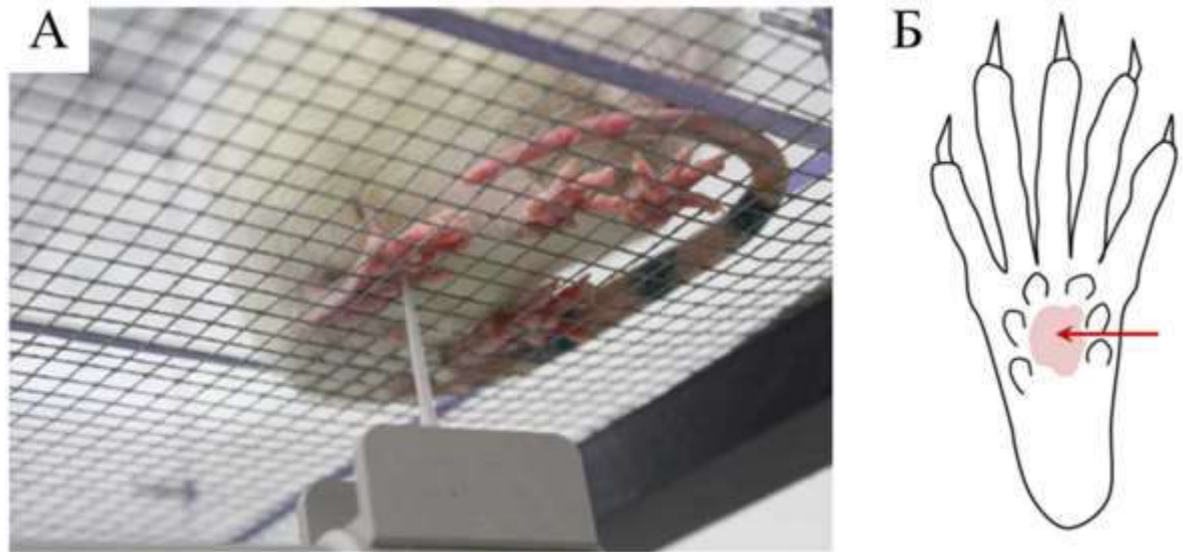
Хронічний нейропатичний біль було модельовано за загально відомою методикою часткового пошкодження сідничного нерва [164]. Процедура була стандартної [6], за винятком однієї основної модифікації: для отримання більш значимої аллодинії та спонтанного болю, великогомілкової та литкові гілки сідничного нерва аксотомували та лігували, тоді як загальну малогомілкову гілку залишали недоторканою. Щури були анестезовані введенням інтраперитонеально розчину кетаміну 65 мг/кг та ксилазину 10 мг/кг. В асептичних умовах хірургічну область голили та оброблювали розчином повідон йоду (Egis, Hungary). Після чого був зроблений розріз через біцепс стегна з візуалізацією сідничного нерва і його трьох кінцевих гілок (литкового, загального малогомілкового, великогомілкового).

Проводилася лігація і подальша аксонотомія великогомілкового і загального-малогомілкового. Литковий нерв залишався неушкодженим. Загальниймалогомілковий і великогомілковий нерви були туго ліговані з використанням шовного матеріалу 5,0 і розрізані дистальніше місця лігування з видаленням  $2\pm 4$  мм дистального відділу кукси нерва. Після пошарового ушивання рани, вона була повторно оброблена розчином повідом йоду (Egis, Hungary). Впродовж всієї операції до моменту відновлення від анестезії тварини знаходились на термостатичному килимі (30 °C). Оцінка поведінкової активності, визначення порогів больової та тактильної чутливості проводилися на 8 добу після операції. У контрольних тварин проводився розтин тканин без аксонотомії і лігації.

### 2.3. Поведінковий тести для оцінки механічної больової чутливості з використанням філаментів фон Фрея

Поведінкові тести мали на меті визначення механічної больової чутливості. Для визначення больової чутливості у відповідь на механічний стимул ми використовували набір філаментів фон Фрея [165]. Тварину розміщували в камері із сітчастою підлогою та давали час на адаптацію до експериментальних умов. Після чого через отвори в підлозі каліброваними філаментами різної жорсткості подразнювали подошвову поверхню шкіри задньої кінцівки. В даній роботі для визначення порогів механічної чутливості використовували набір філаментів фон Фрея виробництва BioSeb (Франція). Вимірювали кількість відсмикувань кінцівки, що було ознакою характерних больових реакцій, як свідчення досягнення порогу механічної больової чутливості при дії філаментів певної жорсткості. Поріг больової механічної чутливості визначався філаментом найменшої жорсткості, під час стимуляції яким тварина проявляла специфічну больову поведінку в 50 % випадків.

Зображення проведення тесту та місце прикладання філіменту для визначення порогу механічної чутливості представлені на Рис. 2.1.



**Рис. 2.1.** Оцінка порогів механічної чутливості методом філаментів фон Фрея. (А). Зображення досліду застосування філаментів фон Фрея. Тварина розміщена в камері з сітчастою підлогою, до підошвової поверхні шкіри задньої кінцівки підводяться калібровані філаменти фон Фрея. (Б). Схематичне зображення нижньої кінцівки. Стрілкою позначена ділянка, поріг механічної чутливості якої визначається філаментами фон Фрея. Зображення запозичене з роботи [166].

#### 2.4. Поведінковий тест Харгівса для оцінки термічної больової чутливості

Оцінка термічної больової чутливості проводилася методом Харгівса в умовах хронічного больового синдрому у піддослідних тварин. [167]. Для цього ми використовували пристрій, що складається із прозорих експериментальних камер, що встановлюються на пластині зі скла, та рухливого джерела

інфрачервоного випромінювання, що розташовується під скляною пластиною. ІЧ-промінь за допомогою системи лінз сфокусовано на верхній стороні скла. Дослідних тварин розміщали в експериментальній камері та давали час на адаптацію до експериментальних умов. ІЧ-випромінювач підводили під задню кінцівку тварини та вмикали, після чого проводили спостереження за твариною до появи специфічної больової реакції, а саме відсмикування кінцівки. Час фіксувався з моменту вмикання (з точністю до 0,1 с) до моменту больової реакції тварини автоматично. Для попередження тяжких опіків тривалість безперервної роботи джерела ІЧ-випромінювання була обмежена до 33 с.

В даній роботі для підшовного тесту Харгрівса використовували обладнання Ugo Basile (Італія). Зображення вищеназваного обладнання наводиться на Рис. 2.2



**Рис. 2.2.** Вимірювання термічної больової чутливості. Зображення експериментальної системи оцінки больової термічної чутливості за допомогою підшовного тесту Харгрівса виробництва Ugo Basile (Італія). Зображення отримано з сайту компанії <http://www.ugobasile.com>.

## 2.5. Методики отримання ex-vivo препаратів спинного мозку для дослідження I та X пластинок

Для вивчення тонко організованої взаємодії між нейронними мережами, що приймають участь в обробці ноцицептивної інформації спинного мозку, середовище для вивчення має бути максимально інтактним. Накопичено достатньо інформації по дослідженню нейронів з використанням зрізів спинного мозку, однак така модель порушує зв'язок та унеможлиблює вивчення мережі через переріз корінців. Моделі ex-vivo препаратів, в яких збережено мережеву взаємодію, описані вже були описані у деяких роботах [154], [155], [168]. Ці моделі дуже відрізняються від інших ex-vivo препаратів з тонкими зрізами спинного мозку, адже дозволяють зберігати рострально-каудальну, так і медіолатеральну архітектонічну будову, а також роблять набагато простішим збереження аферентних волокон.

У дослідження I пластинки у дослід були взяті щури лінії Вістар обох статей на 14-28 постнатальний день. Щури були вбиті шляхом декапітації, після чого їм було видалено хребет, який закріплювався за ребра в чашці Петрі з дном, вкритим силгардом. Усі маніпуляції з препаратом проводились в оксигенованому розчині сахарози, що містив (у мМ): 200 сахарози, 2 KCl, 1,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, 139 26 NaHCO<sub>3</sub>, 11 глюкози (рН 7,4 при насичені 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). Температура розчину відповідала кімнатній (20-24 °C). Спинний мозок було делікатно виділено зі збереженням дорсальних корінців сегментів L5 та L4. Тверда та м'яка оболонки спинного мозку у поперековому сегменті були видалені для того, щоб 1) покращити візуалізацію нейронів, 2) уникнути механічних перешкод для реєструючого електроду. За допомогою ціаноакрилового клею ex-vivo спинний мозок закріплювався до металевій пластинки. Після цього пластинка поміщалася в пластикову камеру, надруковану у 3D принтері. Експериментальна камера наповнювалася розчином бікарбонату Кребса, який містив (в мМ) 125 NaCl, 2,5 KCl,

26 NaHCO<sub>3</sub>, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 глюкози та постійно барботувався 95 % O<sub>2</sub> та 5% CO<sub>2</sub> (pH 7,3). Швидкість перфузії становила ~ 1,5–2 мл / хв.

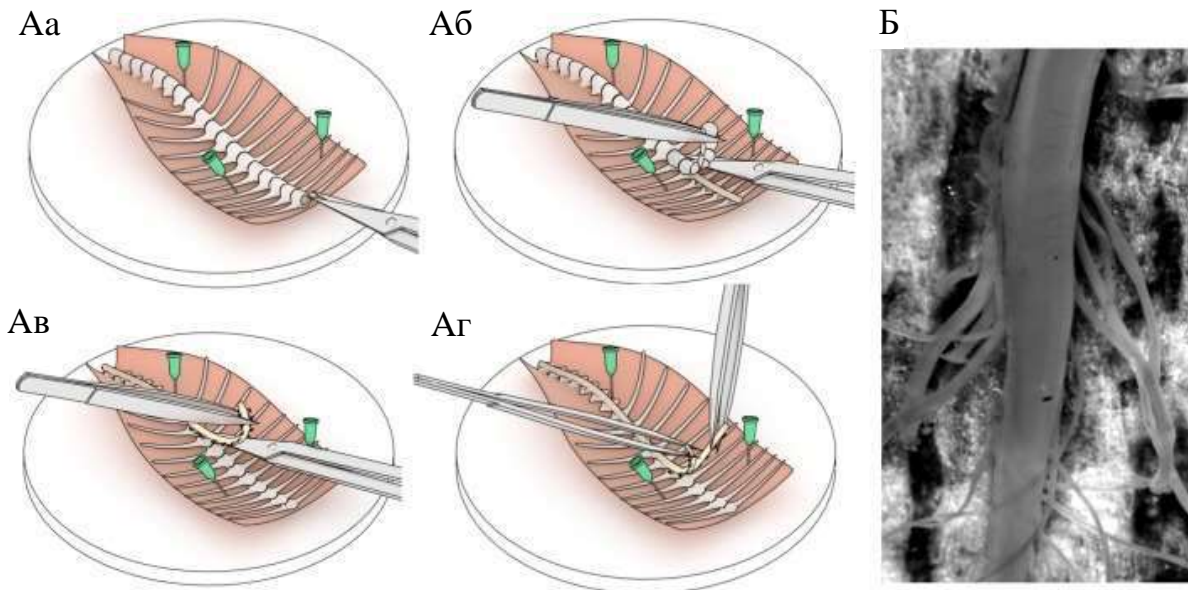
Для дослідження X пластинки спинного мозку нами були взяті щури лінії Вістар на 11-13 постнатальний день. Базуючись на нашому експериментальному досвіді тварини старше 15 днів, після виготовлення ex-vivo препарату спинного мозку, мали недостатню візуалізацію для проведення електрофізіологічних досліджень. Після декапітації тваринам обережно видаляли хребет та поміщали в чашку Петрі з дном, вкритим силгардом, в оксигенований розчин сахарози, що містив (у мМ): 200 сахарози, 2 KCl, 1,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, 139 26 NaHCO<sub>3</sub>, 11 глюкози (pH 7,4 при насичені 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). Температура розчину відповідала кімнатній (20-24 °C). Розсічену тканину прикріплювали на спинному боці рострально до експериментатора, як зображено (Рис. 2.3 Аа), а спинний мозок видаляли. Для обережного видалення спинного мозку ми розрізали хребці мікроножицями (Рис. 2Аб) під стереомікроскопом Olympus SZX7 і обрізали дорсальні/вентральні корінці якомога ближче до гангліїв спинного корінця (Рис. 1Ав). Тверду оболонку обережно розрізали над вентральною середньою лінією, а спинний мозок обережно розділили на дві рівні частини двома пінцетами (Рис. 1Аг). Процедура зазвичай займала 5–6 хвилин після декапітації тварини у сахарозному розчині, збагаченому киснем. Після цього одну частину спинного мозку відшаровували від залишків твердої оболонки та зайвих корінців (Рис. 1Б) і приклеювали до золотої пластини, щоб закріпити тканину для експериментів.

## 2.6. Методики селективного маркування спинномозкових-парабрахіальних нейронів у дорсальному році спинного мозку щурів

Методики селективного маркування спинномозкових-парабрахіальних нейронів у дорсальному році спинного мозку щурів з використанням



флуоресцентного ретроградного індикатора, дозволяє отримати пряму візуалізацію і підтвердження, що ми працюємо на необхідних нам нейронах.



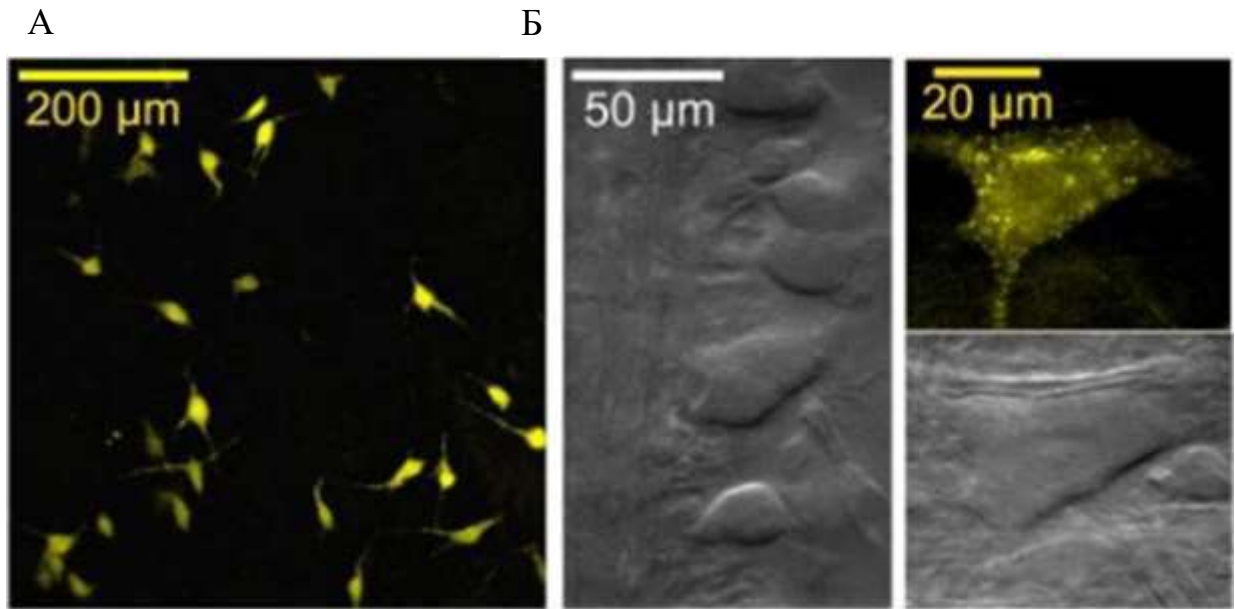
**Рис. 2.3.** Поетапна процедура підготовки тканин спинного мозку для дослідження пластинки X. Схематичні ілюстрації закріплення розсіченої тканини спинного мозку (Аа), вилучення спинного мозку (Аб, Ав) та оголення області X пластинки (Аг). (В) Препарат тканини спинного мозку з відкритою зоною X пластинки та прикріпленими дорсальними та вентральними корінцями [168].

Ще у 1970 році Крістенссон описав транспортування кон'югату альбуміну великої рогатої худоби та флуоресцентного барвника у периферичних нервах. У його дослідженнях кон'югат вводили в литковий м'яз щурів і сигнал флуоресценції виявляли в спінальних мотонейронах [169]. Це відкриття поклало початок різноманітним флуоресцентним барвникам. Окремі індикатори мають ряд переваг, а саме підвищений сигнал флуоресценції, високу ефективність, мінімальний час згасання та покращену стабільність під впливом ультрафіолету. Такі переваги має

неорганічний відстежувач Флюороголд або гідроксистилбамідин. Гідроксистилбамідин — потужний водорозчинний кристалічний ретроградний нейронний індикатор, що є слабкою основою і, після збудження під впливом ультрафіолету, дає яскраве золотисте або блакитне випромінювання. Після поглинання нервовими терміналами шляхом ендоцитозу рідкої фази, він транспортується ретроградно до клітинних сом у везикулах і накопичується в цитоплазмі, де барвник можна виявити протягом кількох місяців після ін'єкції [170], [171]. Барвник не транспортується трансинаптично, має сильну флуоресценцію, інтенсивно заповнює нейрони, не дифундує з мічених клітин. Гідроксистилбамідин можна використовувати в широкому діапазоні концентрацій, зазвичай 2–10%.

Для ретроградного мічення ми використали аналог Гідроксистилбамідину – Аміностілбамідин, який був стереотаксично ін'єктований в парабрахіальну зону заднього мозку, що дозволяє помітити більшість спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки I, які проектують саме в цю область [18], [24].

Процедура ретроградного мічення була наступною. Щури лінії Вістар (P20-21) були анестезовані інтраперитонеально розчином кетаміну 65 мг/кг та ксилазину 10 мг/кг. Голова тварини була зафіксована в стереотаксичному апараті. Розріз шкіри в рострокаудальному напрямку проводився по середній лінії для того, щоб візуалізувати брегму та потиличну кістку. Аміностілбамідин (200-300 нл, 2%) було введено за допомогою 1  $\mu$ л шприца з 32 -g голкою (Hamilton, USA), за такими стереотаксичними координатами (по відношенню до брегми): 13,2 мм рострокаудально, 2 мм медіолатерально та 5,6 мм дорсовентрально (кут 30 °). Після видалення голки, на шкіру накладалися шви та операційна рана оброблялася розчином повідом йоду (Egis, Hungary). Тварини знаходились на термостатичному килимі (30 °C) впродовж всієї операції до моменту відновлення від анестезії. За три дні, через процес ретроградного транспортування, барвник доставлявся до сом спинномозкових-парабрахіальних нейронів, після чого тварин брали в дослід.

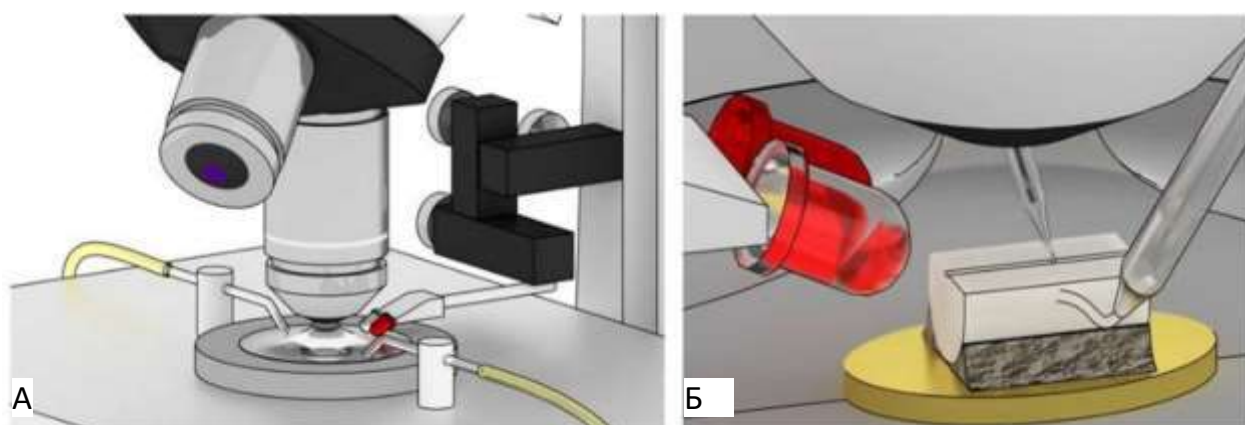


**Рис. 2.4** Різноманіття спинномозково-парабрахіальних нейронів пластинки I спинного мозку. (А) конфокальні зображення (Z-стек, 30 мкм, з кроком 3 мкм) мічених поперекових спинномозкових-парабрахіальних нейронів. (Б) (зліва) нейрони пластинки I у *ex-vivo* препараті спинного мозку з використанням косоного інфрачервоного світлодіодного освітлення; (праворуч) епіфлюоресцентні та інфрачервоні-світлодіодні зображення ретроградно мічених спинномозкових-парабрахіальних нейронів [78].

## 2.7. Використання бічного світлодіодного освітлення для візуалізації клітин інтактного *ex-vivo* препарату спинного мозку

Найбільш широковживаним методом візуалізації клітин в товстих шарах клітин є диференційно-інтерференційний контраст Номарського. Однак цей метод є дієвим лише для препаратів не товще 500-600 мкм. Оскільки товщина *ex-vivo* препарату спинного мозку є значно більшою, в роботі застосовувався метод бічного світлодіодного освітлення, Як джерело світла, ми

використовували вузько променевий інфрачервоний світлодіод (860 нм,  $\pm 3^\circ$ , SFH4550, Osram). Світлодіод був прикріплений до мікроманіпулятора (Рис. 2.5 А), що дозволило регулювати кут ( $10\text{--}20^\circ$ ) для кожного препарату (Рис. 2.5 Б) для досягнення максимальної інтенсивності відбитого світла, що сприяло кращій візуалізації клітин. Відбите світло збиралося водно-імерсійним об'єктивом  $60 \times$  (0,90NA, Olympus, Японія), розміщеному на мікроскопі BX50WI (Olympus, Японія), а зображення виводилося на екран за допомогою камери OLY-150IR (Olympus, Японія). Для позиціонування тканини був використаний додатковий білий світлодіод, розміщений паралельно до ІЧ-світлодіоду, у поєднанні з об'єктивом  $5 \times$  (Carl Zeiss, Jena, Німеччина). При цьому візуалізувалися нейрони, що знаходяться в ділянці між дорсолатеральним канатиком та зоною входу дорсального корінця спинного мозку [154], [155].



**Рис. 2.5** Модель бічного освітлення за допомогою світлодіодів. Ілюстрації налаштування оптичної системи для візуалізації та функціональних досліджень у препараті інтактного спинного мозку.

(А) Експериментальна установка включає мікроскоп, білі та ІЧ-світлодіоди, встановлені на мікроманіпуляторі та 3D-друковану камеру для розчинів. (Б) Розташування ІЧ-світлодіода для регулювання найкращого оптичного оптимуму для кожного препарату тканини спинного мозку *ex-vivo*. Зображення взято з [172]

## 2.8. «Patch-clamp» методика для реєстрації іонних струмів від нейронів I та X пластинок

За допомогою методики «patch-clamp» у конфігурації «ціла клітина» проводилось визначення різних електрофізіологічних характеристик нейронів дорсального рогу спинного мозку. Цей метод був запропонований у 1976 році Е. Неєром і Б. Сакманом [173]. Даний метод полягає у реєстрації електричних струмів, які протікають через ділянку мембрани яка електрично ізольована від зовнішнього розчину скляною мікропіпеткою. Технічно така ізоляція між середовищами відтворюється завдяки спроможності скла утворювати контакт із високим опором з мембранами клітин – так званий «гігаомний контакт». При утворенні гігаомного контакту з мембраною та з використанням високочутливого підсилювача виникає можливість здійснювати реєстрацію струмів пікоамперного діапазону, це відповідає величинам струмів, що протікають через одиночні канали. Для визначення струмів, що проходять через всю поверхню мембрани клітини була розроблена модифікація, яка отримала назву «ціла клітина». При роботі в даній конфігурації «ціла клітина» передбачається, що після утворення гігаомного контакту, ділянку мембрани під мікропіпеткою перфорується від'ємним тиском, після чого з внутрішньоклітинним середовищем встановлюється контакт із низьким опором, і створюються умови для реєстрації різниці потенціалів між зовнішньою та внутрішньою поверхнями клітинної мембрани, тобто трансмембранний потенціал. В даній роботі фіксація потенціалів проводилась за допомогою лише однієї мікропіпетки. Нейрони пластинки I та X дорсального рогу візуалізували за допомогою мікроскопу Olympus BX50WI (Olympus, Японія) з 60-кратним водно-імерсійним об'єктивом, використовуючи бічне світлодіодне освітлення. Скляні мікропіпетки витягували на пуллері Sutter P-87 (Sutter instruments, Сполучені Штати), із скляних

заготовок BF150-86-10 (зовнішній діаметр – 1,5 мм, внутрішній діаметр – 0,86 мм, довжина – 10 см) виробництва Sutter instrument (Сполучені Штати). Піпетки мали діаметр кінчика 1-2 мкм, а їх опір складав 3-4 МΩ при заповненні внутрішньоклітинним розчином наступного складу (у ммоль/л): калійглюконат – 133, NaCl – 5, MgCl<sub>2</sub> – 0,5, Mg-АТР – 2, Na- GTP – 0,5, HEPES – 10 та EGTA – 0,5. Рівень рН дорівнював 7,2 та досягався титруванням розчину за допомогою КОН. Осмолярність складала 290 мосм/л.

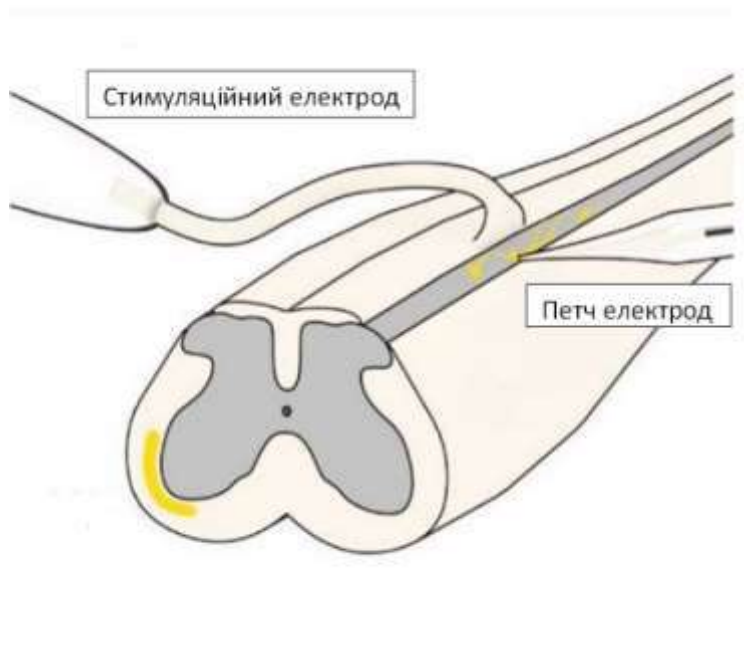
Заповнення піпетки внутрішньоклітинним розчином проводили за допомогою спеціального філаменту. Після цього піпетку опускали у зовнішньоклітинний експериментальний розчин, та здійснювали компенсацію різниці потенціалів на границі розподілу розчинів. Гігаомний контакт між піпеткою та клітинною мембраною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

Електричні записи від мічених спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки I поперекового сегменту L4-L5 проводились в режимі «ціла клітина» при кімнатній температурі (20-24°C) в оксигенованному розчині штучної спинномозкової рідини що містить (у мМ): NaCl 125, KCl 2,5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 26 і глюкоза 10 (рН 7,4, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Отриманий сигнал фільтрувався на 2,6 кГц, використовуючи підсилювач MultiClamp 700B (Molecular Devices, CA, USA); оцифрування проводилось на 10 кГц

використовуючи ЦАП/АЦП Digidata 1320A під контролем програмного забезпечення pClamp 9.2 (Molecular Devices, CA, USA). Для реєстрації збуджуючих постсинаптичних струмів потенціал на клітинній мембрані підтримували на рівні -60 мВ. Для реєстрації збуджуючих постсинаптичних потенціалів записи проводились в режимі фіксованих струмів при IS-0.

## 2.9. Стимуляція дорсальних корінців спинного мозку

За допомогою стимуляційного електроду з використанням стимулятора ISO-Flex (AMPI, Israel) [168], [174]: А $\beta$ - та А $\delta$ -волокна були активовані з використанням 50 мкс імпульсу з наростаючою амплітудою (10-100 мкА); для активації всіх волокон, в тому числі високопорогових А $\delta$ - та С-аферентів, використовувався імпульс 1 мс (30-140 мкА) (Рис. 2.6). Для того щоб запобігти феномену “wind-up”, який спостерігається в спинномозкових-парабрахіальних нейронах [175] частота стимуляції була 0,1 Гц. Визначення моносинаптичності збуджуючих постсинаптичних струмів (ЗПСС) проводилось на основі малого відсотку синаптичних збоїв та низькою варіацією латентності відповідей; детальний опис та обґрунтування цих критеріїв представлено у роботі [176], [177]. Вимірювання швидкості проведення по волокнам підраховувалась шляхом ділення довжини проведення на час проведення. Довжина включала довжину корінця від збуджуючого електроду до зони входу дорсального корінця та до встановленого електроду всередині спинного мозку. Спинномозковий шлях вимірювався за допомогою відеозображень та вираховувався як сума ростракаудальної та медіолатерально відстані між тілом клітини та відповідною зоною входу дорсального корінця. Час проведення підраховувався до початку моносинаптичного ЗПСС з допустимою латентністю в 1 мс для синаптичної передачі.



**Рис. 2.6.** Експериментальний дизайн. Зображено цільний препарат спинного мозку, ретроградно мічені спинномозкові-парабрахіальні нейрони пластинки I дорсального рогу спинного мозку, стимуляційний електрод, петч – електрод [78].

Волокна, що передають моносинаптичний сигнал до спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки I були класифіковані відповідно до критеріїв [156]. Якщо волокна активувалися імпульсом тривалістю 50 мкс та мали швидкість проведення  $> 0,5$  м/с, то вони визначалися як А $\delta$ -волокна; активація 1 мс імпульсом та швидкість проведення  $< 0,5$  м/с відповідала С-волокнам.

Аферентні волокна, які мали швидкість проведення притаманну А $\delta$ -волокнам, але активувались тільки при 1 мс стимуляції були класифіковані як високотривалі А $\delta$ -волокна [178], для спрощення А $\delta$ - та високотривалі А $\delta$ -волокна були проаналізовані як одна група. Волокна, які активувалися при стимуляції 50 мкс імпульсом та мали швидкість проведення  $< 0,5$  м/с були



віднесені до групи низькопорогових С-аферентів.

## 2.10. Статистична обробка результатів дослідження

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

Для аналізу категорійних даних використовували точний тест. Різницю порівнюваних величин вважали достовірною, якщо ймовірність гіпотези була меншою, ніж 5 % ( $p < ,05$ ). Після результатів наводили також значення числа експериментів (n), яке дорівнювало кількості клітин у електрофізіологічних або поведінкових дослідках.

### **Резюме із стислим викладенням матеріалу розділу:**

В рамках дослідження була розроблена система візуалізації нейронів у цілому препараті і система реєстрації електричної активності спинномозкових-

парабрахіальних нейронів у відповідь на стимуляцію корінця поперекового відділу спинного мозку.

**Публікації результатів, висвітлених у розділі:**

Концепція системи була представлена і опублікована в матеріалах конференції Agashkov K., Krotov V., **Krasniakova M.**, Shevchuk D., Safronov B., Belan P., Voitenko N. *New approaches in studies of molecular mechanisms of spinal cord neuronal signaling.* 8th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology, 18-21 June, 2017, Kosice, Slovakia.

### **РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

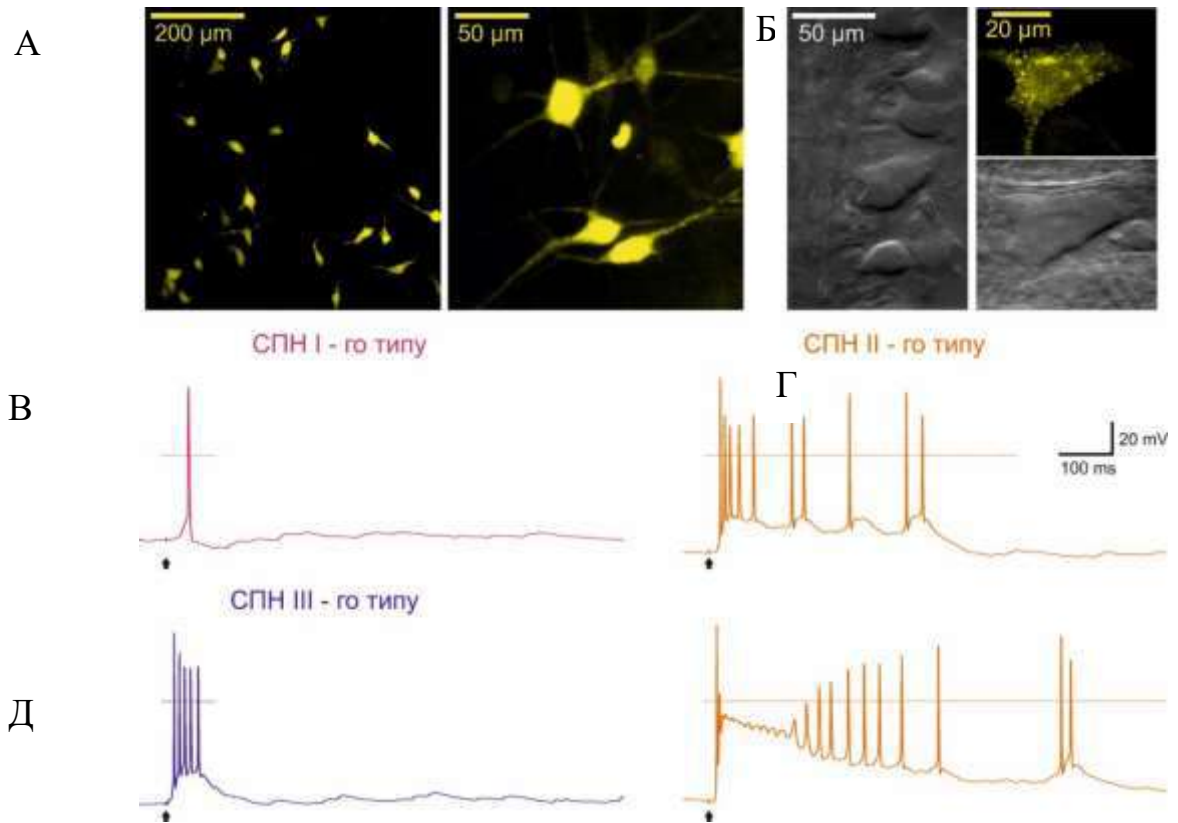
#### **ВІДМІННОСТІ АФЕРЕНТНИХ ВХОДІВ ТА КІЛЬКОСТІ ПОТЕНЦІАЛІВ ДІЇ ЗГЕНЕРОВАНИХ СПИННОМОЗКОВО-ПАРАБРАХІАЛЬНИМИ НЕЙРОНАМИ ПЛАСТИНКИ І СПИННОГО МОЗКУ ТА ЇХ ВІДПОВІДЬ НА РІЗНІ ТИПИ ЕЛЕКТРИЧНИХ СТИМУЛІВ**

В реєстраціях електрофізіологічної активності клітин використовувались спинномозкові-парабрахіальні нейрони пластинки I, які були, як описано раніше, попередньо марковані ретроградним барвником Флюороголд та візуалізовані шляхом використання комбінації флуоресцентного зображення та техніки бічного інфрачервоного світлодіодного освітлення (Рис. 3.1 А-Б).

Відповідно до характеру генерації потенціалів дії спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки I спинного мозку на супрамаксимальний стимул (1 мс, 140 мкА, 0,1 Гц) ДК вони були поділені на три типи (Рис. 3.1 В-Д).

Найбільша кількість спинномозкових-парабрахіальних нейронів ( $n = 36$ ) у відповідь на супрамаксимальний стимул дорсального корінця в середньому генерували один потенціал дії. Ми віднесли цю групу нейронів в групу з низьким рівнем потенціал дії-активності, у відповідь на стимуляцію первинних аферентів. В подальшому цю групу нейронів ми назвали спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го типу (Рис. 3.2 А).

Інша група спинномозкових-парабрахіальних нейронів, яку склали 11 клітин ( $n = 11$ ), значно відрізнялась від спинномозкових-парабрахіальних нейронів I-го типу, ці нейрони генерували від десяти до двадцяти потенціалів дії у відповідь на одну супрамаксимальну стимуляцію дорсального корінця. Ми віднесли їх в групу нейронів з високим рівнем потенціал дії-активності, у відповідь на стимуляцію первинних аферентів. В подальшому цю групу нейронів ми назвали спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу (Рис. 3.2 А).

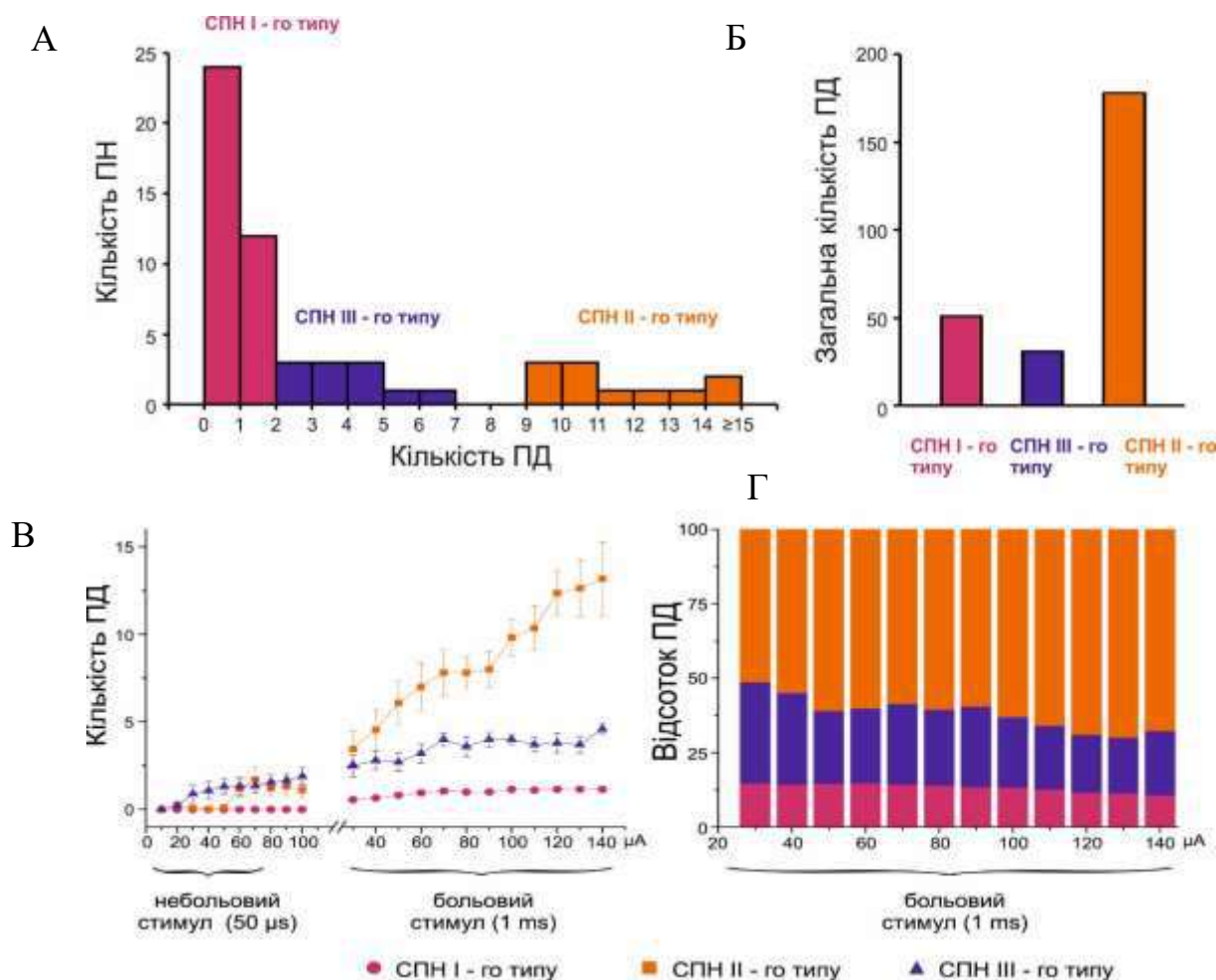


**Рис. 3.1** Характеристики генерації потенціалів дії спинномозково-парабрахіальних нейронів пластинки I спинного мозку у відповідь на супрамаксимальну стимуляцію первинних аферентів

(А) Мічені конфокальні зображення спинномозкових-парабрахіальних нейронів (Z-стек, 30 мкм, з кроком 3 мкм) поперекового відділу спинного мозку. (Б) (зліва) поверхневі нейрони пластинки I у ex-vivo препараті спинного мозку, візуалізовані за допомогою бічного інфрачервоного світлодіодного освітлення; (праворуч) епіфлюоресцентні та зображення отримані з використанням бічного інфрачервоного світлодіодного освітлення ретроградно мічених спинномозкових-парабрахіальних нейронів. (В-Д) Репрезентативні приклади різних відповідей спинномозкових-парабрахіальних нейронів у режимі фіксованого струму на супрамаксимальну стимуляцію (1 мс, 140 мкА) первинних аферентів. Час стимуляції зазначено стрілкою.

Остання група спинномозкових-парабрахіальних нейронів складалась з нейронів ( $n = 11$ ), які генерували від трьох до шести потенціалів дії у відповідь на

одну супрамаксимальну стимуляцію дорсального корінця. Ми віднесли цю групу нейронів до таких, що мають проміжний рівень потенціал дії-активності, у відповідь на стимуляцію первинних аферентів. В подальшому спинномозкові-парабрахіальні нейрони III-го типу (Рис. 3.2 А).



**Рис. 3.2** Якісна оцінка генерації потенціалів дії, викликаних аферентною стимуляцією в різних групах спинномозково-парабрахіальних нейронів (А) Загальна кількість потенціалів дії, які генерують різні типи спинномозкових-парабрахіальних нейронів, у відповідь на супрамаксимальну стимуляцію дорсального корінця. (Б) Сумарна кількість потенціалів дії, викликаних супрамаксимальною стимуляцією дорсального корінця у різних типах спинномозкових-парабрахіальних нейронів. (В) Характеристики різних типів спинномозкових-парабрахіальних нейронів у відповідь на стимуляцію дорсального корінця в небольвовому 50 мс та больвовому 1 мс діапазоні стимуляції

зі зростаючою силою стимулу (крок 10 мА). Кожна точка представлена як середня кількість потенціалів дії, викликана в конкретному типі спинномозкових-парабрахіальних нейронів при заданих параметрах стимуляції дорсального корінця. (Г) Відносний внесок в сумарну кількість потенціалів дії які генеруються всіма спинномозковими-парабрахіальними нейронами в ноцицептивному діапазоні С-волокон (1 мс).

Після аналізу всіх потенціалів дії, що були згенеровані спинномозковими-парабрахіальними нейронами, ми встановили, що спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу, які складають собою лише 19% всієї популяції спинномозкових-парабрахіальних нейронів, генерують 69% загальної вихідної потенціал дії-активності [78] (Рис. 3.2 Б).

Для того щоб становити відношення інтенсивності стимулу зі значенням вихідного сигналу, ми застосували такі електрофізіологічні протоколи стимуляції: для А-волокон довжина стимулу 50 мкс з поступово зростаючою інтенсивністю стимуляції (від 0 - 140 мА, крок 10 мА); для С-волокон довжина стимулу 1 мс з поступово зростаючою інтенсивністю стимуляції (від 0 - 140 мА, крок 10 мА). Відношення між інтенсивністю стимулу та характером вихідного сигналу була виражена в кількість згенерованих потенціалів дії відповідно до сили та тривалості струму, які поступово модифікували таким чином, щоб спочатку активувати Аδ-, а потім С-волокна.

Спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го типу генерували в середньому один потенціал дії в ноцицептивному діапазоні С-волокон (1 мс, 30-70 мА) навіть у відповідь на супрамаксимальний стимул ( $1,15 \pm 0,04$  потенціалів дії,  $n = 36$ ; Рис. 3.2 В). Отже, спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го типу генерували потенціали дії на одиничний ноцицептивний аферентний стимул за принципом «все або нічого».

Спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу мали початкову точку генерації потенціалів дії в діапазоні активації ноцицептивних Аδ-волокон (50 мкс, 60-70 мкА; 5 з 11 нейронів); кількість потенціалів дії, які вони подальше

генерували зростала в діапазоні активації С-волокон в залежності в сили стимуляції (Рис. 3.2 В). Виходячи з цього, спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу мали властивості нейронів, які кодують ноцицептивний сигнал у широкому діапазоні.

Характеристики спинномозкових-парабрахіальних нейронів III-го типу не були чітко ноцицептивно-специфічними, а проявляли гетерогенні параметри генерації потенціалів дії у відповідь на стимуляцію у діапазонах Аδ- та С-волокон. Частина клітин генерувала одиничні потенціали дії або невеликі групи потенціалів дії на стимул в невеликому ( $\leq 50$  мкА, 50 мкс; 5 з 11 клітин) або больовому ( $\geq 50$  мкА, 50 мкс; 3 з 11 клітин) діапазоні Аδ-волокон. Деякі з цих нейронів (n=4) генерували невелику групу потенціалів дії в результаті стимуляції в діапазоні Аδ-волокон, і при збільшенні сили стимулу до діапазону С-волокон, їх характеристика відповіді значно не змінювалась. Це свідчить про їх вибірковість при обробці сигналу від Аδ-аферентів. Інші клітини в цій групі (n=7), генерували потенціали дії у відповідь на невеликі стимуляції Аδ діапазону, та мали поступове збільшення кількості потенціалів дії при стимуляції ДК в ноцицептивному діапазоні С-волокон ( $4,4 \pm 0,4$  потенціалів дії при супрамаксимальному стимулі 140 мкА, 1 мс) (Рис. 3.2 В).

Деякі спинномозкові-парабрахіальні нейрони III-го типу (n=5) демонстрували характерні властивості для нейронів широкого динамічного діапазону [179], натомість коли інші (n=6) клітини цього типу мали властивості схожі на ті, що були в ноцицептивно-специфічних нейронах [21], [36]. Беручи до уваги таку різноманітність характеристик генерації потенціалів дії у відповідь на стимуляцію дорсального корінця, подальший детальний аналіз спинномозкових-парабрахіальних нейронів III-го типу не проводився.

Після створення та аналізу графіків генерації потенціалів дії у відповідь на стимуляцію дорсальних корінців, ми спостерігали значну функціональну відмінність між групами спинномозкових-парабрахіальних нейронів I-го типу та спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу (Рис. 3.2 В-Г).

Для спинномозкових-парабрахіальних нейронів I-го типу залежність генерації потенціалів дії в діапазоні активації C-волокон у відповідь на стимуляцію первинних аферентів, була простою та добре описувалася функцією Больтцмана ( $R^2 = 0.99$ ), насичення досягалось при значенні близькому до значення одного потенціалу дії ( $1,15 \pm 0,04$ , t-критерій = 28,02,  $p < 0,001$ ; Рис. 3.2 Г).

Так, спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го типу, можуть виконувати роль простих передавачів ноцицептивного входу з C-волокон до супраспінальних центрів. Характеристики генерації потенціалів дії спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу мають локальне насичення в діапазоні  $\Delta\delta$ -волокон в межах (70-100 мкА), після чого при збільшенні інтенсивності стимуляції, відбувається наростання до ноцицептивного діапазону C-волокон (Рис. 3.2 В). Це також добре описується функцією Больтцмана ( $R^2 = 0,98$ ) та досягає насичення при  $11,6 \pm 0,7$  потенціалів дії (t-критерій = 16,99,  $p < 0,001$ ). спн II-го типу мають можливість підсилювати ноцицептивний вхід з  $\Delta\delta$ -волокон, за допомогою генерації короткої групи потенціалів дії, та відображати силу входу з C-волокон в якості збільшеної кількості згенерованих потенціалів дії. Було встановлено, що спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу ( $n = 11$ ) генерують більше 50% від всіх потенціалів дії згенерованих популяцією спинномозкових-парабрахіальних нейронів ( $n = 58$ ) в ноцицептивному діапазоні C- волокон (Рис. 3.2 Г), підкреслюючи важливість цієї незначної популяції спинномозкових-парабрахіальних нейронів у ноцицептивній передачі. Також треба відмітити, що внесок спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу у загальну кількість згенерованих потенціалів дії збільшувався відповідно до зростання інтенсивності сили стимуляції в ноцицептивному діапазоні C-волокон (нахил кривої,  $1,44 \pm 0,19\%$  на 10 мкА,  $R^2 = 0,86$ ; Рис. 3.2 Г).

Отримані дані свідчать про різну функціональну роль спинномозкових-парабрахіальних нейронів в обробці ноцицептивних сигналів у спинному мозку. З фізіологічної точки зору спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го типу можуть бути простими передавачами ноцицептивних сигналів від C-волокон, в той час, як



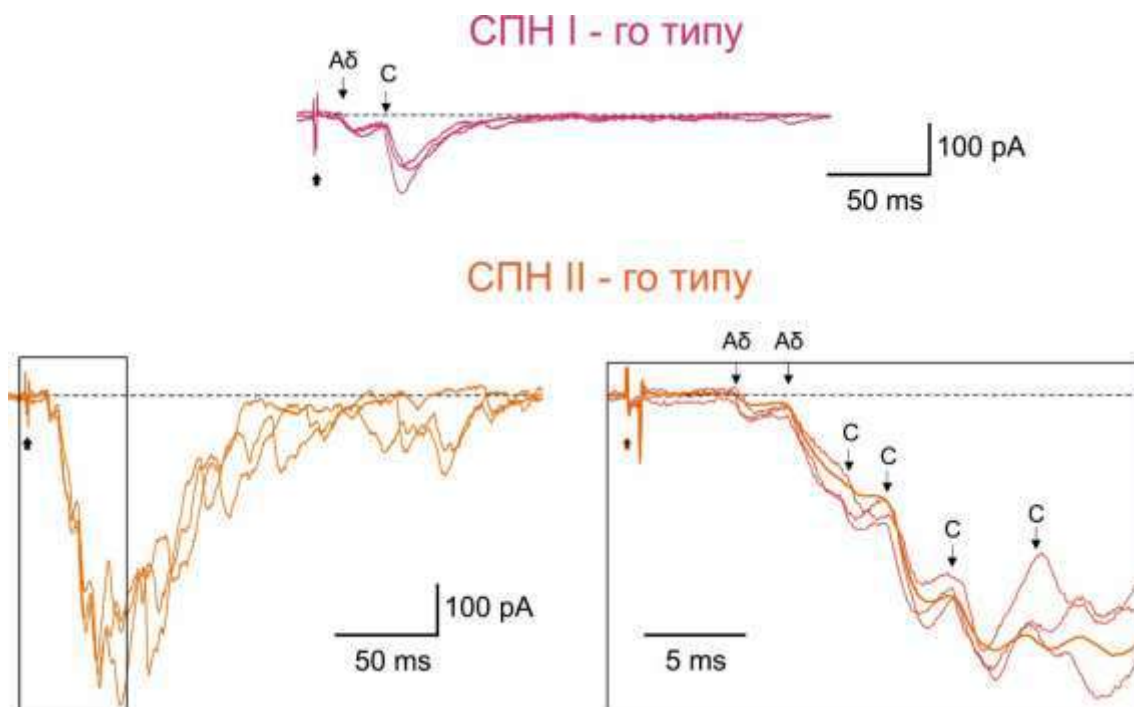
спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу ампліфікують вхід з А $\delta$ -ноцицептивних волокон та ймовірно приймають участь в кодуванні сили ноцицептивного входу по С-волоконах [43].

В подальших експериментах ми зосередились на визначенні аферентного постачання в популяціях спинномозкових-парабрахіальних нейронів I-го типу та спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу.

Для визначення аферентного забезпечення в спинномозкових-парабрахіальних нейронів дорсального рогу спинного мозку був використаний наступний електрофізіологічний протокол: реєстрація проводилась в режимі фіксації потенціалу (потенціал на мембрані – 70 мВ) з супрамаксимальною стимуляцією (1мс, 140 мА) дорсального корінця. Для того щоб оцінити моносинаптичні аферентні входи ми притримувались таких критеріїв: різниця в латентності аферентної відповіді не мала бути більшою за 1 мс. Класифікація аферентних волокон за їх типом проводилась шляхом вирахування швидкості проведення, що відповідала для А $\delta$ -волокон - більше 0,5 мс та С-волокон - менше 0,5 мс.

Остаточна характеристика в організації аферентних входів до спинномозкових-парабрахіальних нейронів проводилась в тих нейронах (спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го типу,  $n = 30$ ; спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу,  $n = 11$ ), в яких вдалось провести усі експериментальні електрофізіологічні протоколи реєстрацій (Рис. 3.3). Це дозволило виявити значну різницю в організації аферентних волокон в різних популяціях спинномозкових-парабрахіальних нейронів. Загальне число моносинаптичних входів було в 2,2 рази більше в групі спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу в порівнянні з спинномозковими-парабрахіальними нейронами I-го типу ( $p < 0,001$ ; Рис. 3.4 А, Б). Характерною особливістю спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу було те, що загальна кількість моносинаптичних входів була більшою від А $\delta$ - (в 2,6 рази,  $p < 0,01$ ), низькопорогових С- (у 5,1 рази,  $p < 0,05$ ), а також високопорогових С-волокон (1,6 разів,  $p < 0,05$ ; Рис. 3.4 А, Б).

Також, ми визначили значну різницю у відносній кількості аферентних входів які припадають на спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го та спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типів (Рис. 3.4 А).



**Рис. 3.3** Репрезентативні приклади моносинаптичних аферентних входів до різних типів Спинномозкових-парабрахіальних нейронів дорсального рогу спинного мозку. Моносинаптичні ЗПСС (відмічені стрілками), викликані Aδ та C волокнами у спинномозкових-парабрахіальних нейронах I-го та спинномозкових-парабрахіальних нейронах II-го типу. Виділено три окремі записи та накладені із середнім значенням від усіх 14 записів. Популяція спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу має значно більші значення інтегрального струму у відповідь на аферентну стимуляцію з більшою кількістю моносинаптичних компонентів. Потенціал утримування мембрани, -70 мВ. Стимуляція дорсального корінця, 1 мс, 140 мкА.

Але варто відмітити, що усі спинномозкові-парабрахіальні нейрони спинного мозку, в наших дослідках, мали моносинаптичні терміналі від C-волокон,

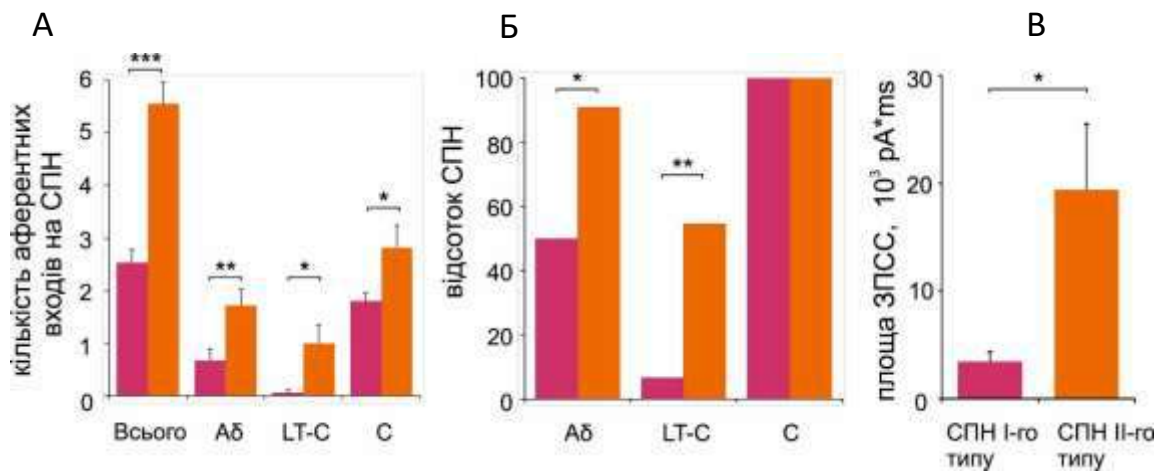
хоча істотно більший відсоток моносинаптичних аферентних входів від А $\delta$ -волокон (90,9% для спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу проти 46,7% для спинномозкових-парабрахіальних нейронів I-го типу,  $p < 0,05$ , точний тест Фішера) приходився на спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу (Рис 3.4 Б).

Більше того, аферентні терміналі від низькопорогових С-волокон були виявлені в значній кількості в групі спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу (54,5%), тоді як спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го типу майже не отримували таких входів (6,7%,  $p < 0,01$ , точний тест Фішера).

Щоб охарактеризувати силу впливу первинних аферентів (як моно-, так і полісинаптичних) ми проаналізували основні компоненти ЗПСС викликані А $\delta$ - та С-волокнами в якості площі інтегрального струму. У відповідь на супрамаксимальну стимуляцію, входи від С-волокон в групі спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу були в 5,5 разів сильніші в порівнянні з спинномозковими-парабрахіальними нейронами I-го типу (Рис. 3.4 В;  $p < 0,05$ ). Через те що, різниця в значеннях інтегрального струму була значно більшою, ніж середня кількість моносинаптичних входів на нейрон (у 2,2 рази), можливо припустити, що спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу також отримують значно сильніший полісинаптичний вплив від локальних нейронних мереж.

Отже, спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу мають значно більшу кількість моносинаптичних входів від ноцицептивних волокон, а загальний постсинаптичний струм, які вони генерують у відповідь на аферентну стимуляцію, є набагато сильнішим, в порівнянні з спинномозковими-парабрахіальними нейронами I-го типу.

Більше того, значна кількість моносинаптичних А $\delta$ -входів і характерний патерн генерації потенціалів дії, дають можливість спинномозковим-парабрахіальним нейронам II-го типу генерувати потенціали дії в ноцицептивному діапазоні А $\delta$ -волокон, в порівнянні з спинномозковими-парабрахіальними нейронами I-го типу [172].



**Рис. 3.4** Загальна характеристика моно- та полісинаптичного аферентного входу на спинномозково-парабрахіальні нейрони I-го та II-го типів (А) гістограма, що демонструє середні значення моносинаптичних входів на спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го типу (пурпурний) та спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу (помаранчевий). (Б) Відносні показники спинномозкових-парабрахіальних нейронів I-го типу (пурпурний) та спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу (помаранчевий), які мають моносинаптичні аферентні входи Aδ-, C-волокон та низькопорогових C (LT-C) волокон. (В) сила входу від первинних аферентів, підрахована як інтеграл викликаних ЗПСС. Позначення відповідають \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

### Резюме із стислим викладенням матеріалу розділу:

Після аналізу електрофізіологічної даних ми встановили, що спинномозково-парабрахіальні нейрони II-го типу, які складають собою лише 19% всієї популяції цих клітин, генерують 69% загальної вихідної потенціал дії-залежної активності і мають в 2,2 рази більше моносинаптичних входів. Ми

зробили висновок, що спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу ампліфікують вхід з А $\delta$ -ноцицептивних волокон та ймовірно приймають участь в кодуванні сили ноцицептивного входу по С-волоконах.

**Публікації результатів, висвітлених у розділі:**

1. Agashkov K, Krotov V, **Krasniakova M**, Shevchuk D, Andrianov Y, Zabenko Y, Safronov BV, Voitenko N, Belan P. (2019) *Distinct mechanisms of signal processing by lamina I spino-parabrachial neurons*. Sci Rep. 2019 Dec 17;9(1):19231. PMID: 31848358 (Q1)
2. Agashkov K., Krotov V., **Krasniakova M.**, Shevchuk D., Safronov B., Belan P., Voitenko N. *New approaches in studies of molecular mechanisms of spinal cord neuronal signaling*. 8th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology, 2017, Kosice, Slovakia
3. Agashkov K., Krotov V., **Krasniakova M.**, Safronov B., Voitenko V., Belan P. *Subpopulation of C-fiber-activated lamina I projection neurons with unique input-output characteristics for NMDAR-dependent nociceptive coding*, Polish Society for Neuroscience Meeting, 2017, Warsaw, Poland
4. Agashkov K., Krotov V., Rula H., **Krasniakova M.**, Shevchuk O., Liashenko A., Safronov B., Voitenko N., Belan P. *Specific C-fiber-activated lamina I projection neurons as major contributor of acute nociceptive transmission*. III International School in Biomedical Sciences “Cell Function in Health and Disease”, Kyiv-Lutsk, Ukraine, 17-22 September 2017
5. Voitenko N., Agashkov K., Krotov V., **Krasniakova M.**, Zaben Y., Safronov B., Belan P. *Spinal lamina I projection neurons play distinct roles in nociception*. Society for Neuroscience meeting 2018, 3-7 November 2018, San Diego, USA

## РОЗДІЛ 4

### ХАРАКТЕРНІ ЗМІНИ СПИННОМОЗКОВО-ПАРАБРАХІАЛЬНИХ НЕЙРОНІВ У МОДЕЛІ ХРОНІЧНОГО НЕЙРОПАТИЧНОГО БОЛЮ

Нейропатичний біль вражає до 17% населення та негативно впливає на якість життя[17] Цей виснажливий стан виникає після первинного ураження або захворювання соматосенсорної нервової системи і характеризується гіпералгезією (посиленою реакцією на шкідливі подразники), аллодинією (аномальна реакція на нешкідливі подразники) і спонтанним болем [17]Доступні методи лікування обмежені, і однією з головних причин цього є наше неповне розуміння клітинних і молекулярних механізмів, що лежать в основі нейропатичного болю.

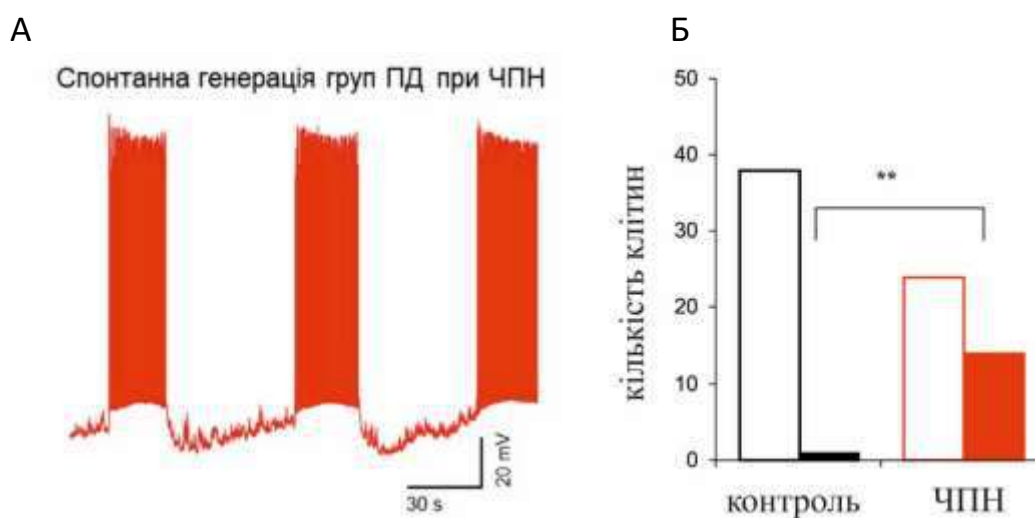
Для поставлених задач ми використовували принцип часткового пошкодження нерва, як ефективну модель хронічного нейропатичного болю. Процедура часткового пошкодження нерва проводили на щурах P19–20 і була стандартною, за винятком однієї основної модифікації: для отримання найсильнішої аллодинії та спонтанного болю, великогомілкову та литкову гілки сідничного нерва аксотомували та лігували, а загальну малоюмілкову гілку залишали недоторканою. Через сім днів після початку часткового пошкодження нерва підшовний тест Харгрівза не показав змін термочутливості. Затримка відведення лапи становила  $15,4 \pm 0,5$  с для конралатеральної та  $15,9 \pm 0,5$  с для іпсилатеральної лапи ( $p = 0,27$ ,  $n = 9$ , парний t-критерій Стьюдента). У той же час тест з філаментами фон Фрея продемонстрував глибоку механічну гіперчутливість: поріг відведення лапи становив  $5,9 \pm 1,0$  г для контра- та  $3,3 \pm 0,6$  г для іпсилатеральної лапи ( $p < 0,001$ ,  $n = 9$ , парний t-критерій Стьюдента). Усі тестовані тварини з частковим пошкодження нерва також демонстрували спонтанний біль, представлений у вигляді посмикування іпсилатеральної задньої кінцівки, який тривав кілька секунд і часто супроводжувався облизуванням лапи. Після визначення характерних нейропатичних змін за допомогою філаментів фон Фрея було проведено ретроградні мічення спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки I спинного мозку.

Ретроградне маркування спинномозково-парабрахіальних нейронів було досягнуто шляхом ін'єкції 200 нл флуоресцентного барвника (2% аміностильбамідину, Thermo Fisher Scientific, США) у парабрахіальну область, контралатеральну до травми (стереотаксичні координати щодо брегми: 13,2 мм rostroкаудально, 2 мм медіолатерально та 5,6 мм дорсовентрально, кут 30°).

Електрофізіологічні записи проводили через 7–10 днів після часткового пошкодження нерва (щури P27–30, інтактні тварини відповідного віку слугували контролем), як описано [10]. Експерименти проводили на *ex-vivo* інтактному препараті спинного мозку з прикріпленим дорсальним корінцем; клітини lamina I візуалізували за допомогою косого інфрачервоного світлодіодного освітлення, а спинномозкові-парабрахіальні нейрони були ідентифіковані на основі флуоресцентного сигналу. Електрофізіологічні записи були отримані від спинномозкових-парабрахіальних нейронів у ділянці L4-L5 за допомогою піпеток з боросилікатного скла 3–5 МОм, які були підготовлені з використанням пуллера P-97 (Sutter Instruments, США) і заповнювали внутрішньоклітинним розчином, що містив (у мМ): 145 К-глюконат, 2,5 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 2 Na<sub>2</sub>-АТФ, 0,5 Na-GTP і 0,5 EGTA (рН 7,3). Позаклітинний розчин мав такий склад (у мМ): NaCl 125, KCl 2,5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25, NaHCO<sub>3</sub> 26 і глюкоза 10 (рН 7,4 при барботуванні 95% O<sub>2</sub> і 5% CO<sub>2</sub>). Сигнали отримували та фільтрували на 2,6 кГц за допомогою підсилювача MultiClamp 700B і оцифровували на 10 кГц за допомогою Digidata 1320 А під керуванням програмного забезпечення pClamp 9 (усе Molecular Devices, США). Потенціал електроду був компенсований до утворення гіга-сили. Дорсальні корінці L4-L5 стимулювали за допомогою електроду і стимулятора ISO-Flex (AMPI, Ізраїль). Квадратні імпульси струму тривалістю 50 мкс були доставлені для залучення A $\beta$ /A $\delta$ -волокон; Інтенсивність 10–50 мкА вважалася низькопороговою, стимули 60–100 мкА представляли ноцицептивний діапазон A $\delta$ . Імпульс тривалістю 1 мс (30–140 мкА) активував усі типи волокон, включаючи високопорогові А- та С-аференти.

Однією з типових ознак хронічного нейропатичного болю є спонтанні болі. Для визначення як саме спинномозкові-парабрахіальні нейрони пластинки I

спинного мозку приймають участь в даному процесі нами були проведені реєстрації в режимі фіксованого струму ( $n=38$ ) з утриманням потенціалу на мембрані близьким до  $-60$  мВ, та виявлено, що значна частина спинномозкових-парабрахіальних нейронів ( $n=14$ ) спонтанно генерували значні групи потенціалів дії (12 потенціалів дії та більше), які тривали щонайменше 190 секунд. В порівнянні з контрольними умовами ( $n=39$ ) тільки 1 спинномозково-парабрахіальний нейрон мав здатність спонтанно генерувати невеликі групи потенціалів дії (точний тест Фішера  $p < 0,01$  Рис. 4.1).



**Рис. 4.1** Особливості спонтанної генерації груп потенціалів дії в спинномозково-парабрахіальних нейронах в умовах хронічного нейропатичного болю викликаного частковим пошкодженням нерву

(А) Репрезентативний запис генерації спонтанних груп потенціалів дії спинномозкових-парабрахіальних нейронів в умовах нейропатичного болю. (Б) Гістограма, що відображає значне збільшення спинномозкових-парабрахіальних нейронів, що спонтанно генерують групи потенціалів дії в умовах нейропатичного болю (заповнені стовпчики), позначення відповідають \*\* -  $p < 0,01$ .

Таким чином, патологічна зміна у функціонуванні спинномозкових-парабрахіальних нейронів І пластинки спинного мозку призводить до того, що



більша кількість інформації, яка кодується у вигляді спонтанно згенерованих груп потенціалів дії, доходить до супраспінальних структур та бере участь в формуванні відчуття спонтанного болю.

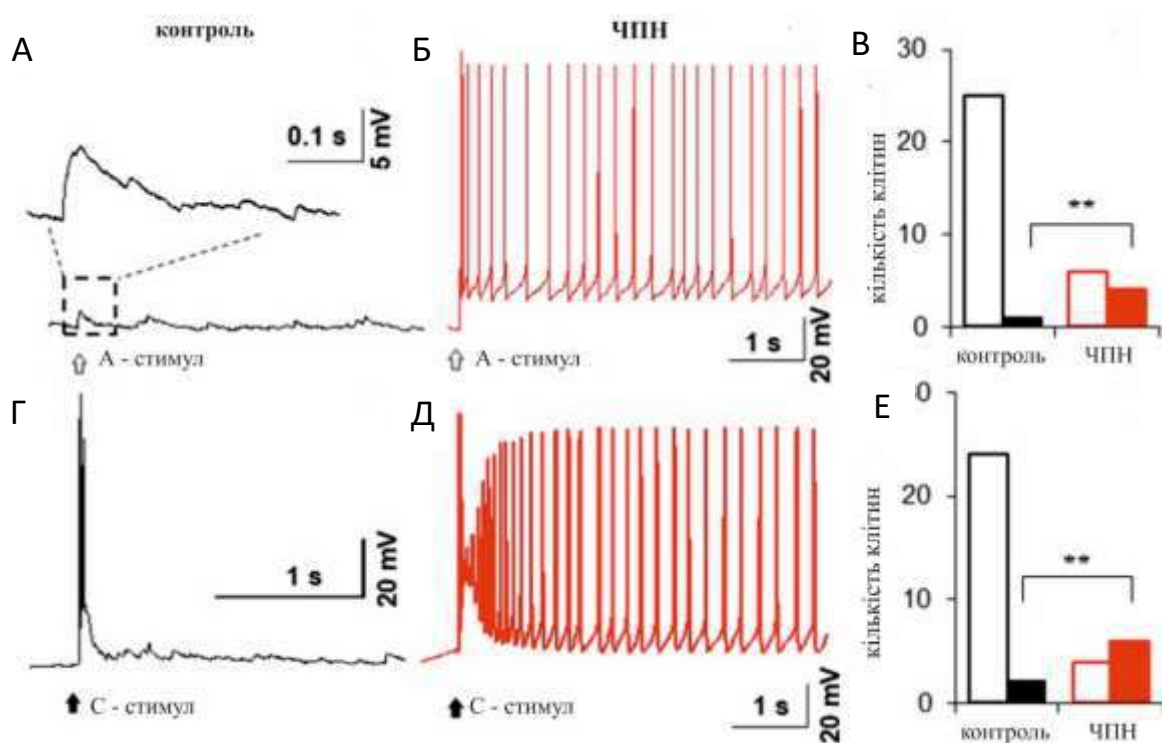
Наступне питання яке ми розглянули, це як змінює аферентний вплив на спинномозкові-парабрахіальні нейрони I пластинки в умовах хронічного нейропатичного болю. Для цього ми провели стимуляцію дорсального корінця в діапазонах активації А-волокон (100 мкА, 50 мкс  $n=19$ ) та С-волокон (140 мкА, 1 мс  $n=19$ ) та реєстрації в режимі фіксації струму, для оцінки характеру генерації потенціалів дії. Ми оцінили сумарний вихідний вплив, що генерують спинномозкові-парабрахіальні нейрони I пластинки, в умовах нейропатичного болю.

У відповідь на стимуляцію первинних аферентів при діапазоні активації А-волокон (100 мкА, 50 мкс ) в контрольних умовах, спинномозкові-парабрахіальні нейрони в більшості випадків ( $n=22$ ) мали допорогові відповіді, і тільки невелика кількість ( $n=3$ ) клітин генерували максимум один потенціал дії. Натомість, в умовах нейропатичного болю, характеристики А-відповідей ( $n=19$ ) суттєво відрізнялись, майже в половині симуляцій ( $n=9$ ). Спинномозкові-парабрахіальні нейрони I пластинки генерували щонайменше один потенціал дії (точний тест Фішера  $p < 0,01$ ).

Також, ми встановили, що значна частина цих клітин ( $n=7$ ) на один стимул в діапазоні активації А-волокон спинномозкових-парабрахіальних нейронів генерували більше 3 потенціалів дії та мали довготривале плато, що тривало секунди та на якому генерувались потенціали дії (точний тест Фішера  $p < 0,001$  Рис 4.2 А-В). Цікаво, що така характеристика А-відповідей в умовах нейропатичного болю має ключові характеристики С-відповідей в контрольних умовах [180]. Та може, у фізіологічному плані характеризувати феномен алодинії – коли невеликі стимули викликають відчуття сильного больового подразника.

На стимуляцію дорсального корінця в діапазоні активації С – волокон (140 мкА, 1 мс) у контролі, більшість спинномозкових-парабрахіальних нейронів генерували в середньому один потенціал дії ( $n=17$ ) та частина, у відповідь на

стимул, генерували невеликі групи потенціалів дії та мали плато потенціал (n=8), такі нейрони ми раніше віднесли до спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу. При реєстрації від спинномозкових-парабрахіальних нейронів в умовах хронічного нейропатичного болю (n=19) зростає кількість клітин, що генерують групи потенціалів дії та мають плато потенціал (n=11), в порівнянні з контролем. Хоча така відмінність була недостовірною, характеристики плато та сумарна кількість генерованих потенціалів дії значно відрізнялась в групі часткового пошкодження нерва (точний тест Фішера  $p < 0,01$  Рис. 4.2 Г-Д).



**Рис. 4.2** Характеристики потенціалів дії викликаних аферентною стимуляцією спинномозково-парабрахіальних нейронів в умовах хронічного нейропатичного болю викликаного частковим пошкодженням нерва та у контролі (А) Репрезентативний запис викликаних ЗПСП у відповідь на стимуляцію в А-діапазоні у контролі. (Б) Репрезентативний запис викликаних потенціалів дії у відповідь на стимуляцію в А-діапазоні в моделі часткового пошкодження нерва. (В) Гістограма, що відображає значне збільшення спинномозкових-парабрахіальних нейронів, які генерують потенціали дії у відповідь на А – стимул (в умовах нейропатичного болю заповнені стовпчики червоні, контроль –

заповнені стовпчики чорні, порожні стовпчики – допорогові викликані ЗПСЦ, сила стимулу для А- волокон 100 мкА, 50 мкс; позначення відповідають \*\* -  $p < 0,01$ ). (Г) Репрезентативний запис викликаних потенціалів дії у відповідь на стимуляцію в С-діапазоні у контролі. (Д) Репрезентативний запис викликаних потенціалів дії у відповідь на стимуляцію в С-діапазоні у моделі часткового пошкодження нерва. (Е) Гістограма, що відображає значне збільшення спинномозкових-парабрахіальних нейронів, які генерують плато більше 1 секунди у відповідь на С – стимул (в умовах нейропатичного болю заповнені стовпчики червоні, контроль – заповнені стовпчики чорні, порожні стовпчики – спинномозкові-парабрахіальні нейрони, які не генерують плато потенціал, сила стимулу для С- волокон 140 мкА, 1 мс позначення відповідають \*\* -  $p < 0,01$ ).

#### **Резюме із стислим викладенням матеріалу розділу:**

Нами було виявлено, що в умовах хронічного болю спинномозкові-парабрахіальні нейрони І пластинки спинного мозку у відповідь на невольовий А-стимул здатні генерувати значну кількість потенціалів дії. Це дає нам можливість припустити, що вони приймають роль у формуванні такого феномену, як алодинія.

Також спинномозкові-парабрахіальні нейрони в умовах нейропатичного болю здатні генерувати більш тривале плато, та відповідно більшу кількість потенціалів дії у відповідь на С – стимул, що дає нам підставу говорити, що за рахунок даного механізму може реалізовуватись феномен гіпералгезії.

#### **Публікації результатів, висвітлених у розділі:**

1. Krotov, Volodymyr & Agashkov, Kirill & Romanenko, Sergii & Koroid, Kostiantyn & **Krasniakova, Marharyta** & Belan, Pavel & Voitenko, Nana. (2023). Neuropathic pain changes the output of rat lamina I spino-parabrachial neurons. *BBA Advances*. 3. 100081. doi: 10.1016/j.bbadv.2023.100081

2. Krotov V., Agashkov K., **Krasniakova M.**, Safronov B.V., Voitenko N., Belan P.  
*Lamina I projection neuron outputs in physiological and neuropathic pain conditions.* 11<sup>th</sup> FENS Forum for Neuroscience, 7-11 July 2018, Berlin, Germany

## РОЗДІЛ 5

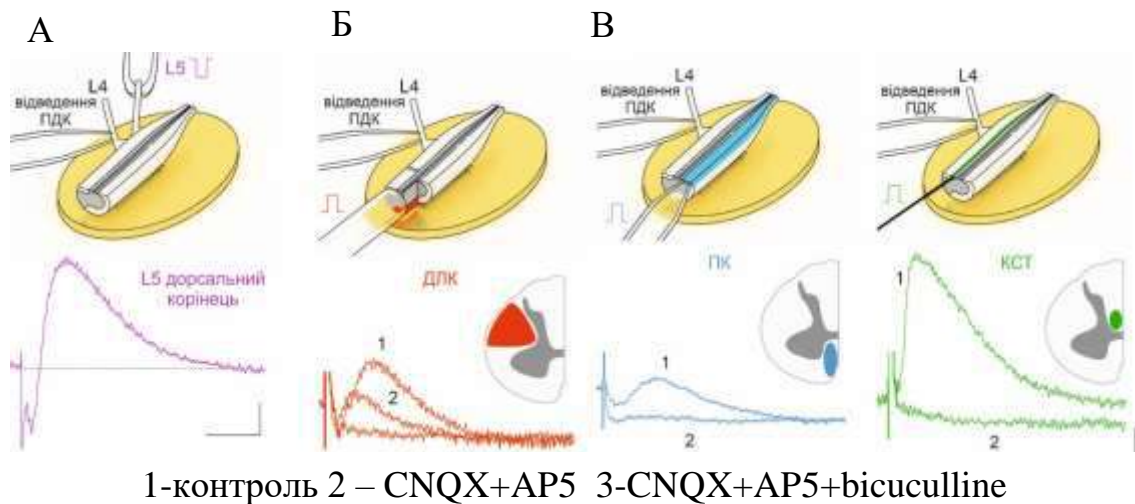
# ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕЙРОНІВ ПЛАСТИНКИ X СПИННОГО МОЗКУ І ЇХ ЗАЛУЧЕНІСТЬ У НОЦИЦЕПТИВНІЙ ПЕРЕДАЧІ

### 5.1. Пресинаптичне гальмування і первинна аферентна деполяризація

Пресинаптичне гальмування індукується первинною аферентною деполяризацією, яка викликається вивільненням ГАМК із інтернейронів спинного мозку [51], [181] і може бути експериментально зафіксовано як антидромне поширення потенціалів дії по дорсальному корінцю. Експериментально первинна аферентна деполяризація викликалися з використанням стимуляційного електрода від L4-L5 дорсальних коріців у місці їх входу в спинний мозок і може бути зареєстрована, як антидромне поширення потенціалів дорсального корінця. Спочатку ми перевірили, чи викликають потенціали дорсального корінця стимуляції аферентного та низхідного трактів. Так, потенціали дорсального корінця (пік на 100-150 мс) були надійно викликані шляхом стимуляції сусіднього корінця (рис. 5.1 А), дорсолатерального канатика, переднього канатика і кортикоспінального тракту (рис. 5.1 Б). Фармакологічні тести показали, що передньоканатикові - та кортикоспінальноотрактово-індуковані потенціали дорсального корінця опосередковуються глутаматергічними нейронами, тоді як ті, що індукуються стимуляцією дорсолатерального канатика, мають як глутаматергічний, так і ГАМКергічний компоненти (рис. 5.1 В). Таким чином, первинні аференти і низхідні шляхи можуть викликати пресинаптичне гальмування аферентних вхідних сигналів.

### 5.2. Залученість нейронів пластинки X у ноцицептивній передачі

Також ми перевірили, чи мають нейрони пластинки X терміналі від ноцицептивних аферентів, які експресують ТРП канали.

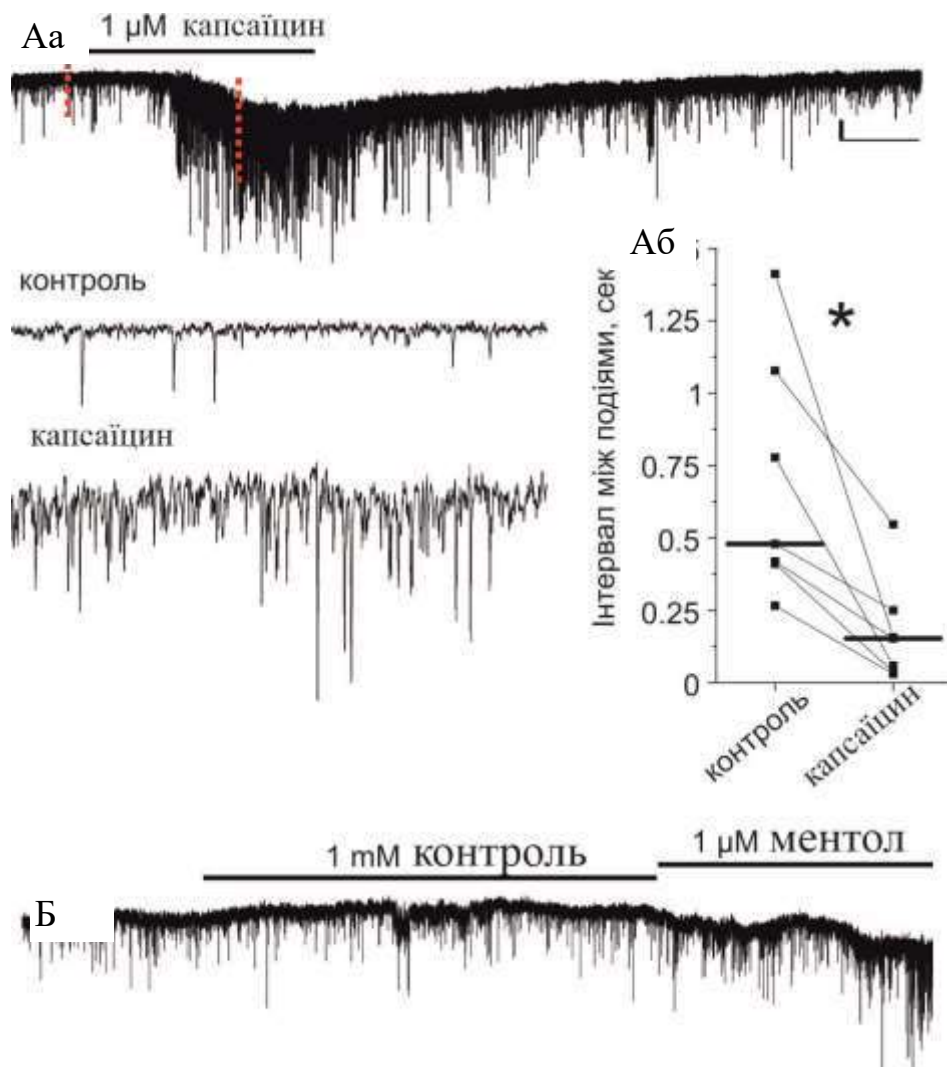


**Рис. 5.1.** Первинна аферентна деполяризація, викликана стимуляцією гетеросегментарних первинних аферентів та низхідних шляхів

А. Потенціал дорсального корінця L4, індукований стимуляцією корінця L5 (-150 мкА x 1 мс). Б. Потенціали дорсального корінця L4, викликані стимуляцією дорсолатерального канатика (+200 мкА x 1 мс, червоний), переднього канатика (+200 мкА x 1 мс, синій) та кортикоспінального тракту (500 мкА x 1 мс, зелений). Схеми запису показані вгорі. Дорсальний корінець, дорсолатеральний канатик і передній канатик стимулювали за допомогою стимуляційних електродів; кортикоспінальний тракт стимулювали за допомогою концентричного біполярного електрода. В експериментах з дорсолатеральним канатиком був перерізаний задній канатик. В. Застосування блокаторів глутаматних рецепторів AMPA (CNQX, 10 мкМ) і NMDA (AP5, 40 мкМ), а також рецепторів ГАМК (бікукулін, 10 мкМ) показало, що дорсолатерально канатиково-індукований потенціал дорсального корінця мають значний глутамат-незалежний ГАМКергічний компонент. Шкали: А (100 мс, 20 мкВ), В (100 мс, 10 мкВ).

Для цього ми проаналізували зміни частоти та амплітуди мініатюрних збуджуючих постсинаптичних струмів (мЗПСС), що викликаються агоністом рецептора TRPV1 капсаїцином та агоністом рецептора TRPM8 ментолом. Капсаїцин в концентрації (1 мкМ) викликав різке зменшення медіанного

інтервалу між подіями мЗПСС (479 мс у контролі проти 153 мс у досліді з капсаїцином,  $p = 0,01$ ,  $n = 7$ , рис. 5.2 Аа-б) без значної зміни амплітуд мЗПСС. У 3 із 7 протестованих нейронів капсаїцин також індукував вхідні струми (рис. 5.2 Аа).



**Рис. 5.2.** Капсаїцин, але не ментол, зменшує інтервали між подіями мЗПСС в нейронах пластинки X

Аа. Репрезентативний запис, що показує зменшення інтервалів між подіями під час застосування капсаїцину. Зверніть увагу, що капсаїцин викликав внутрішні струми в 3 з 7 нейронів пластинки X. Аб. Зміни інтервалів між подій мЗПСС для всіх тестованих нейронів; горизонтальні смуги вказують середні значення. Б. мЗПСС, записані в присутності ментолу (без ефекту) і капсаїцину. Шкали: А-В (1 хв, 10 пА). \* -  $p < 0,05$ .

Навпаки, ментол у концентрації (1 мМ) не мав жодного ефекту ( $n = 5$ ), тоді як подальше застосування капсаїцину зменшувало інтервал між подіями у всіх досліджених клітинах (рис. 5.2 Б).

Щоб вивчити, чи впливає пресинаптичне гальмування на активність нейронів пластинки X, ми зробили записи ЗПСС, викликаних стимуляцією ДК в режимі «ціла клітинна». Про пресинаптичні ефекти ми робили висновки по зменшенню моносинаптичних компонентів ЗПСС після попередньої стимуляції інших аферентів або низхідних шляхів.

### 5.3. Сегментарний контроль нейронів пластинки X

Вплив гомосегментарних А-волокон перевіряли за допомогою імпульсних стимулів 1 мс нормальної та інвертованої полярності (рис. 5.3 Аа).

У 42 % нейронів пластинки X анодний блок швидких А-волокон призвів до демаскування як моно-, так і полісинаптичних ЗПСС опосередкованих С-волоконми (рис. 5.3 Аб).

Повне (28 нейронів, рис. 2Абі і Абii) і часткове (3 нейрони, не показано) інгібування моносинаптичних ЗПСС дозволило припустити, що гомосегментарні А-волокна інгібують основні та кінцеві гілки С-волокон змінюють патерн генерації потенціалів дії (рис. 5.3 Абii).

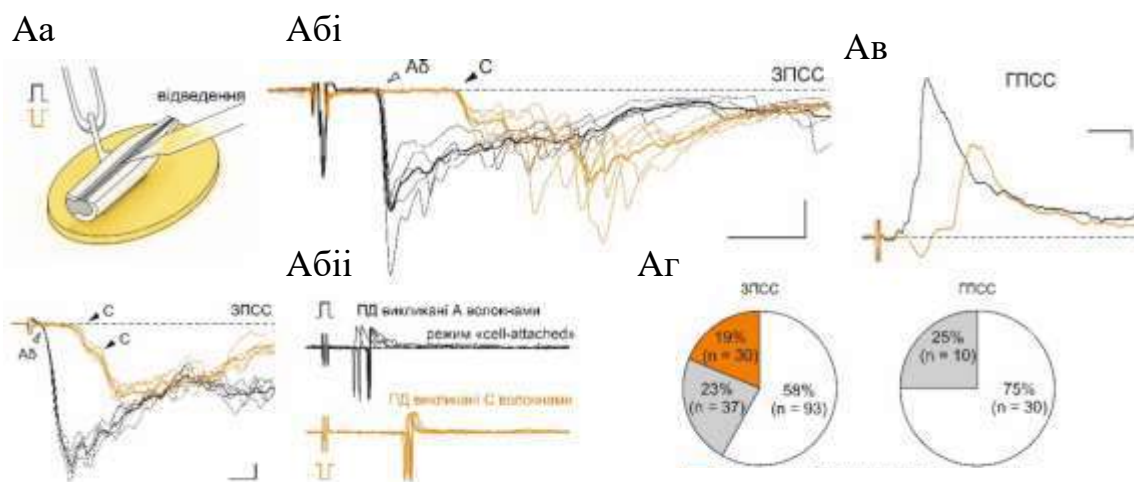
У 25 % клітин анодний блок А-волокон викликав деінгібування полісинаптичних ЗПСС, викликаних С-волоконми (рис. 5.3 Ав-г).

Таким чином, гомосегментарні А-волокна можуть як індукувати пресинаптичне інгібування С-волокон, так і контролювати гальмівний вплив опосередкований С-волоконми до нейронів пластинки X.

Ми також досліджували, чи можуть С-волокна викликати пресинаптичне гальмування гетеросегментарних Ад- і С-аферентів (Рис. 5.3 Ба). Попередня активація С-волокон у коренці L5 частково (14 нейронів) або повністю (6 нейронів) пригнічує моносинаптичні входи Ад- і С-волокон від корінця L4 (Рис. 5.3 Бб-г). Крім того, ми спостерігали зменшення інтегралів загальних

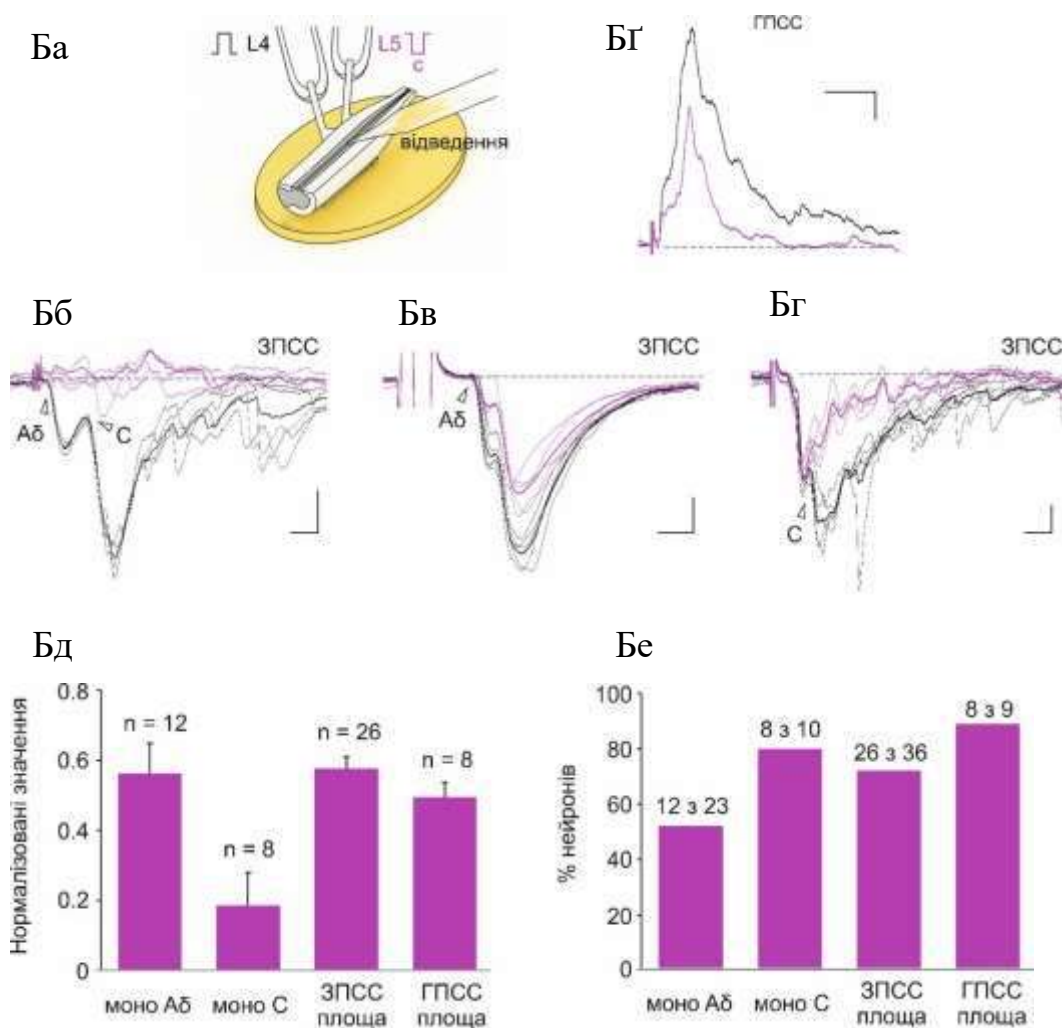


ЗПСС/ГПСС (Рис. Бг-е). Таким чином, наші результати показують фізіологічну важливість сегментарно керованого аферентно пресинаптичного гальмування первинних аферентів нейронів пластинки X.



**Рис 5.3 А** Пресинаптичне гальмування введення первинних аферентів до нейронів пластинки X гомо- та гетеросегментарними аферентами

Аа-г Пресинаптичне гальмування, викликане гомосегментарними А-афферентами. Звичайний імпульс (+150 мкА x 1 мс) використовувався для активації всіх ПА, тоді як імпульс інвертованої полярності (-150 мкА x 1 мс) був застосований для індукування анодного блоку А-волокон і вибіркової активації С-волокон. Абі-іі. Окремі (5 слідів) та усереднені (виділені жирним шрифтом) ЗПСС, викликані в нейронах пластинки X шляхом стимуляції ДК нормальним (чорний) та інвертованим (помаранчевий) імпульсами. Інвертований стимул викликав анодний блок А-волокон, що призвело до зникнення моносинаптичного Аδ-волокна ЗПСС (незаповнена стрілка), але появи нового моносинаптичного ЗПСС, керованого С-волокном (заповнена стрілка), який був звільнений від пресинаптичного блоку. Абіі, справа. Анодний блок А-волокон підвищив ефективність С-волокон у викликанних потенціалах нейронів. Ав. Усереднені полісинаптичні ГПСС, викликані в нейронах пластинки X звичайними (чорними) та інвертованими (помаранчевими) стимулами. Аг. Частка нейронів, що демонструють зміни в ЗПСС (ліворуч) і ГПСС (праворуч) після анодного блоку А-волокон: моносинаптичне с демаскуванням (помаранчевий), полісинаптичне демаскування (сірий), відсутність демаскування (прозорий). Шкали: Аб-Ав (10 мс, 50 пА);

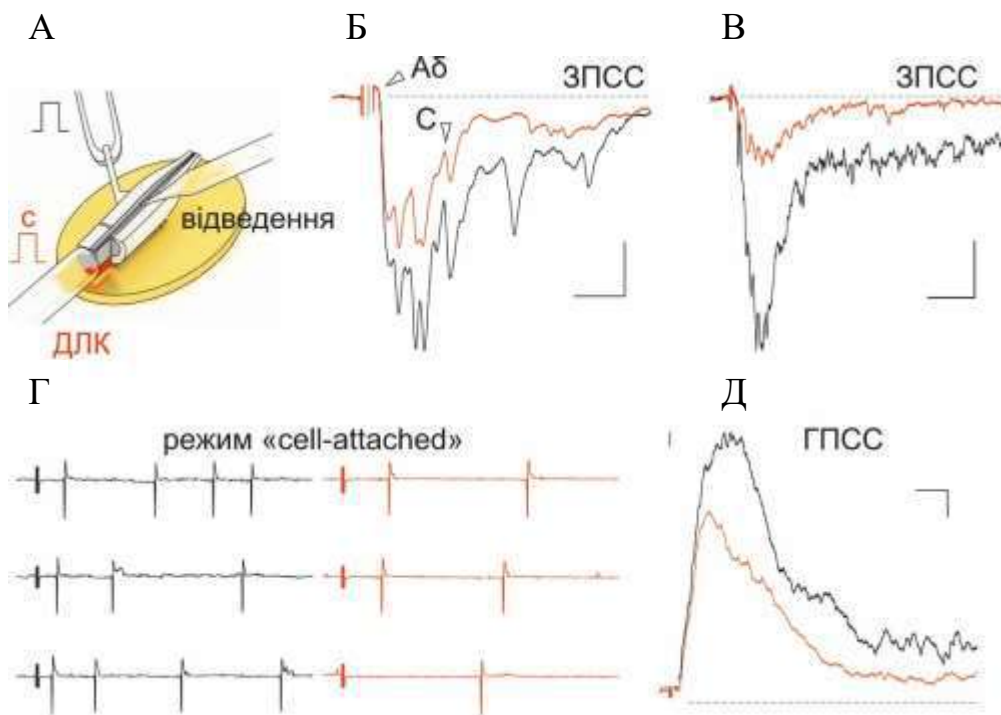


**Рис. 5.3 Б** Пресинаптичне гальмування введення первинних аферентів до нейронів пластинки X гомо- та гетеросегментарними аферентами

Ба. Проект експерименту для вивчення пресинаптичного гальмування, викликаного гетеросегментарними С-аферентами. ЗПСС були викликані стимулюванням кореня L4 (звичайний імпульс) у контролі (чорний) і після кондиціонування (інтервал 100 мс) стимуляцією кореня L5 (інвертований імпульс), що активує лише С-волокна (пурпурний). Таке гетеросегментарне кондиціонування С-волокна викликало повний (Бб, Бг) або частковий (Бв) блок моносинаптичних компонентів ЗПСС, опосередкованих Аδ- та/або С-волокном (одиначні та усереднені записи). Бг. ГПСС (усереднені) зменшені за рахунок кондиціонування гетеросегментного С-волокна. Бд. Відсоток нейронів, які демонструють значні зміни в амплітуді моносинаптичного входу та області ЗПСС та ГПСС. Бе. Зменшення моносинаптичної вхідної амплітуди та площі ЗПСС та ГПСС, викликане кондиціонуванням гетеросегментного С-волокна. Дані представлені як середнє  $\pm$  SEM. Шкали: Бб (10 мс, 50 пА); Бв (2 мс, 50 пА); Бг (10 мс, 25 пА); Бг (50 мс, 100 пА).

#### 5.4. Низхідна регуляція нейронів пластинки X

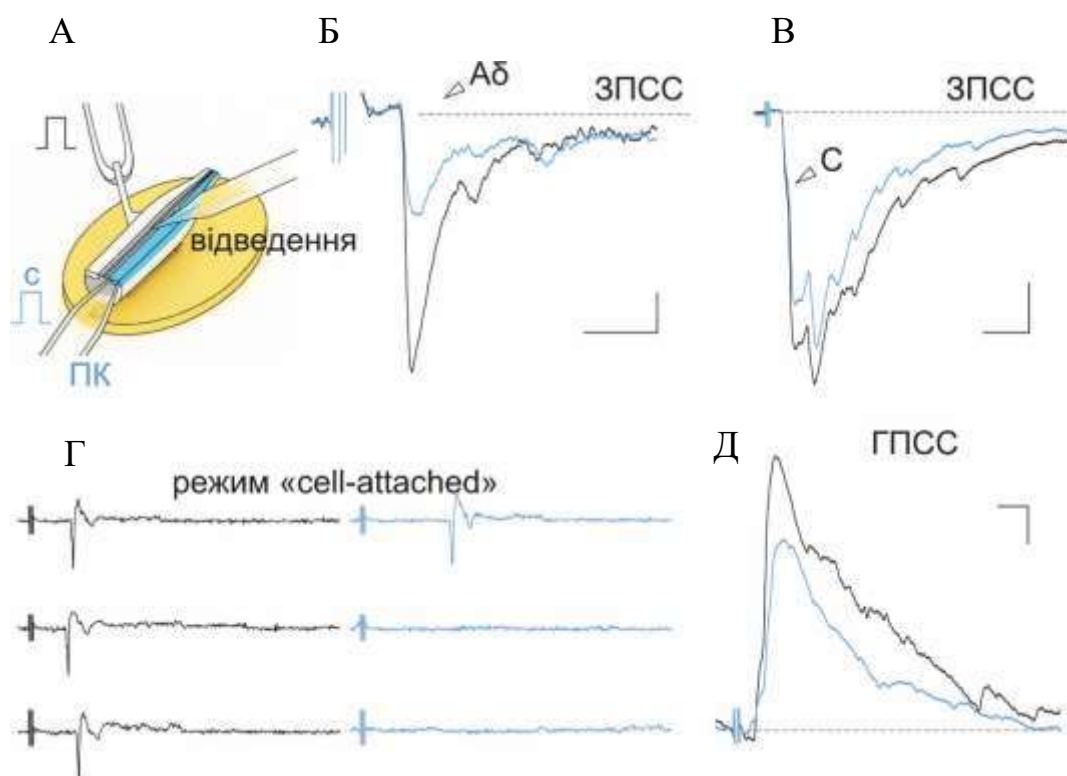
У наступних експериментах ми вивчали роль активації низхідних трактів та вплив первинних аферентів на нейрони пластинки X. Повторна стимуляція (при 5 Гц) дорсолатерального канатика або переднього канатика зменшувала аферентно-опосередковані ЗПСС/ГПСС і кількість потенціалів дії, що викликаються в нейронах пластинки X (рис. 5.4 А, Б).



**Рис. 5.4 А** Пресинаптичний ефект стимуляції дорсолатерального канатика

А. Проект експерименту для вивчення ефектів стимуляції дорсолатерального канатика на вхід первинних аферентів до нейронів пластинки X. ПА-опосередковані ЗПСС (Б-В) та ГПСС (Д) у контролі (чорний) та під час 5 Гц стимуляції низхідних шляхів (помаранчевий). Стрілки вказують пресинаптично інгібовані моносинаптичні Аδ- та С- входи. (Г) Стимуляція дорсолатерального канатика зменшує кількість потенціалів дії залежних від активації первинних аферентів, в нейронах пластинки X. Шкали: Б (10 мс, 50 пА); В (50 мс, 50 пА); Д (20 мс, 25 пА).

Послаблення або повне пригнічення моносинаптичних ЗПСС, опосередкованих А $\delta$ - і С-волоконми, вказує на пресинаптичну природу цього гальмування.

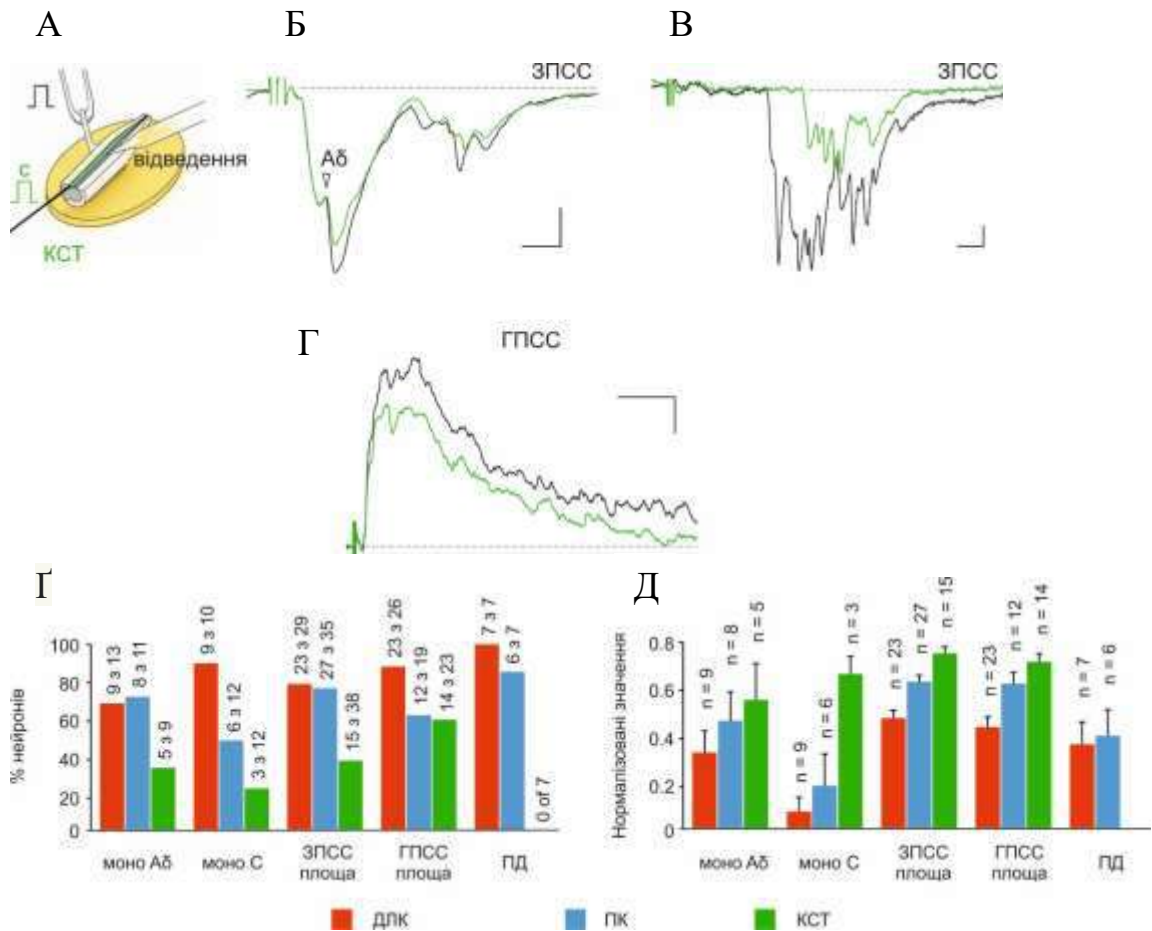


**Рис. 5.4 Б** Пресинаптичні ефект стимуляції переднього корінця

А. Проект експерименту для вивчення ефектів стимуляції переднього канатика від входів первинних аферентів до нейронів пластинки Х. Первинно аферентно-опосередковані ЗПСС (Б-В) та ГПСС (Д) у контролі (чорний) та під час 5 Гц стимуляції низхідних шляхів (блакитний). Стрілки вказують пресинаптично інгібовані моносинаптичні А $\delta$ - та С- входи. (Г) Стимуляція переднього канатика зменшує кількість потенціалів дії залежних від активації первинних аферентів, в нейронах пластинки Х. Шкали: Б (10 мс, 5 пА); В (25 мс, 20 пА); Д (10 мс, 50 пА).

Подібні ефекти викликала стимуляція КСТ. Однак вони були менш вираженими (рис. 5.4 В), спостерігалися в меншій популяції нейронів і не змінювали картину генерації викликаних потенціалів дії. Одноразова попередня стимуляція низхідних шляхів мала вплив на аферентно-опосередковані входи в 44 % нейронів (зниження на 10-30 % інтеграла ЗПСС/ГПСС, не показано), що вказує

на те, що для індукції функціонально значущих змін необхідна повторювана активація.



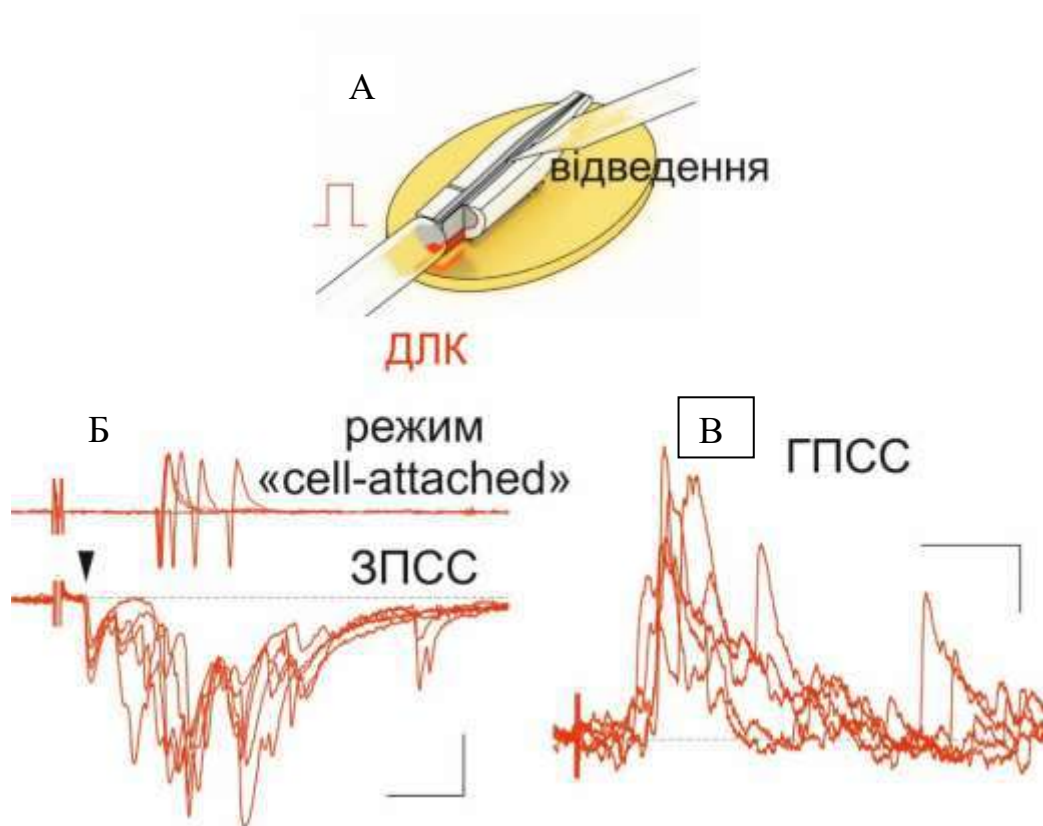
**Рис. 5.4 В** Пресинаптичні ефект стимуляції дорсолатерального канатика

А. Проект експерименту для вивчення ефектів стимуляції кортикоспінального тракту на вхід первинних аферентів до нейронів пластинки Х. ПА-опосередковані ЗПСС (Б-В) та ГПСС (Г) у контролі (чорний) та під час 5 Гц стимуляції низхідних шляхів (зелений). Стрілки вказують пресинаптично інгібовані моносинаптичні Аδ- та С- входи. Шкали: Б (5 мс, 25 пА); В (10 мс, 5 пА); Г (50 мс, 25 пА). (Г) Відсоток нейронів, які демонструють значні зміни амплітуд моносинаптичних Аδ- і С-ЗПСС, а також областей ЗПСС і ГПСС. (Д). Зниження моносинаптичних Аδ- і С-ЗПСС, а також областей ЗПСС і ГПСС під час безперервної стимуляції низхідного тракту. Дані представлені як середнє ± SEM.

Таким чином, основні низхідні тракти пресинаптично контролюють Ад- і С-аферентні входи до пластинки Х.

### 5.5 Характеристика еферентних входів до нейронів пластинки Х

Нарешті, ми перевірили, чи викликає стимуляція низхідних шляхів синаптичні відповіді в нейронах пластинки Х. У 63 % досліджених нейронів одноразова стимуляція дорсолатерального канатика викликала збуджувальні відповіді, які в 5 із 138 клітин викликали потенціали дії (рис. 5.5 А).

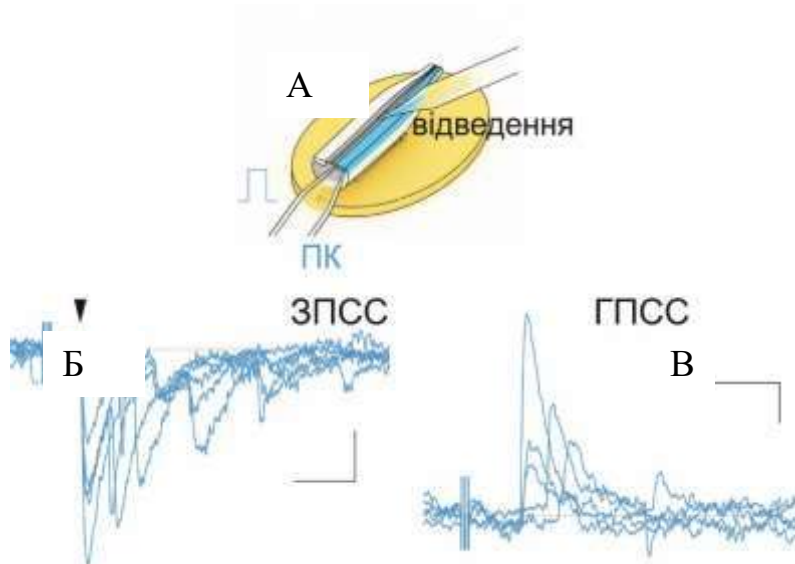


**Рис 5.5 А** Прямі еферентні входи до нейронів пластинки Х через дорсолатеральний канатик

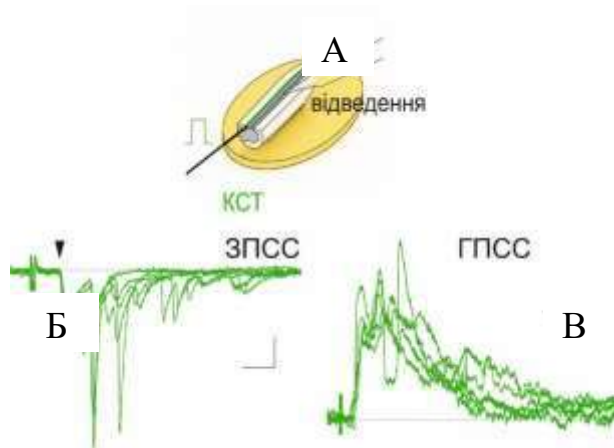
(А). Схема досліджу. ЗПСС (Б) і ГПСС (В), викликані в нейронах пластинки Х за допомогою одного стимулу. Стрілка вказує на моносинаптичні реакції. Входи, викликані через дорсолатеральний канатик, можуть викликати потенціали дії в нейронах пластинки Х (Б вгору). Шкали: Б (20 мс, 50 пА); В (50 мс, 50 пА).



Дорсолатерально канатиково-опосередковані ЗПСС були переважно полісинаптичними. Моносинаптичні ЗПСС можна було ідентифікувати за на основі малого відсотку синаптичних збоїв (< 30%) і невеликою латентністю (< 1 мс) лише у 7 із 112 нейронів.

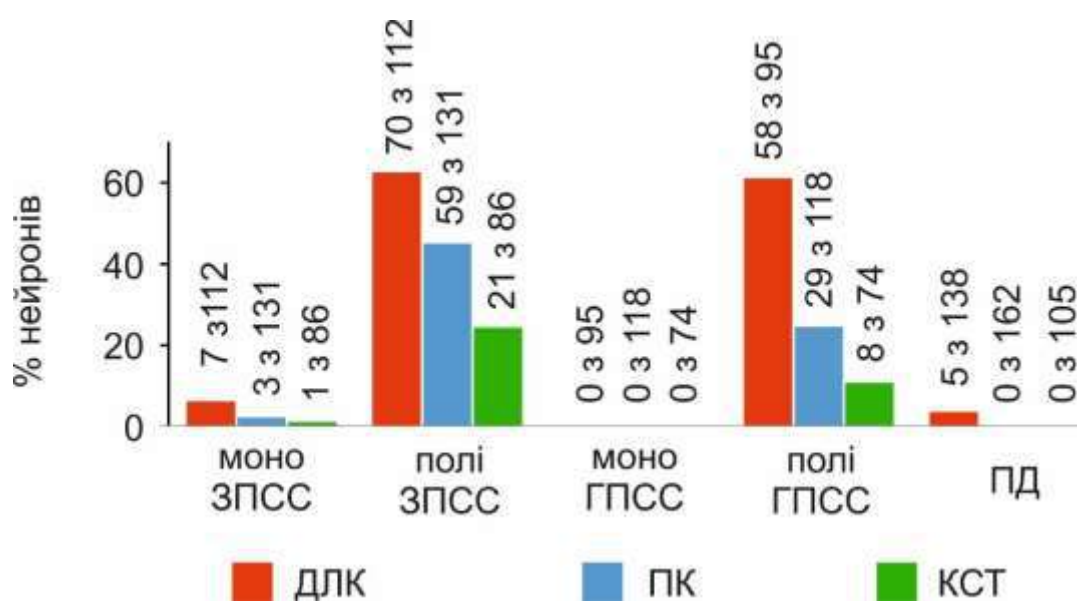


**Рис 5.6 Б** Прямі еферентні входи до нейронів пластинки X через передній канатик (А). Схема досліду. ЗПСС (Б) і ГПСС (В), викликані в нейронах пластинки X за допомогою одного стимулу. Стрілка вказує на моносинаптичні реакції. Шкали: Б (20 мс, 20 пА); В (20 мс, 50 пА).



**Рис 5.6 В** Прямі еферентні входи до нейронів пластинки X через кортикоспінальний тракт (А). Схема досліду. ЗПСС (Б) і ГПСС (В), викликані в нейронах пластинки X за допомогою одного стимулу. Стрілка вказує на моносинаптичні реакції. Шкали: Б (20 мс, 20 пА); В (20 мс, 50 пА).

ЗПСС мали короткі затримки і могли витримати стимуляцію 10 Гц, що вказує на те, що вони опосередковувалися мієлінізованими аксонами, які проводять імпульс зі швидкістю  $\geq 1$  м/с. Дорсолатерально канатиково-опосередковані ГПСС (рис. 5.5), усі з яких були полісинаптичними, були зареєстровані у 61 % нейронів. Входи переднього канатика і КСТ до нейронів пластинки X були менш численними в порівнянні з тими, що походять від дорсолатерального канатика. Стимуляція переднього канатика та КСТ викликала ЗПСС/ГПСС, але не викликала потенціали дії (рис. 5.7).



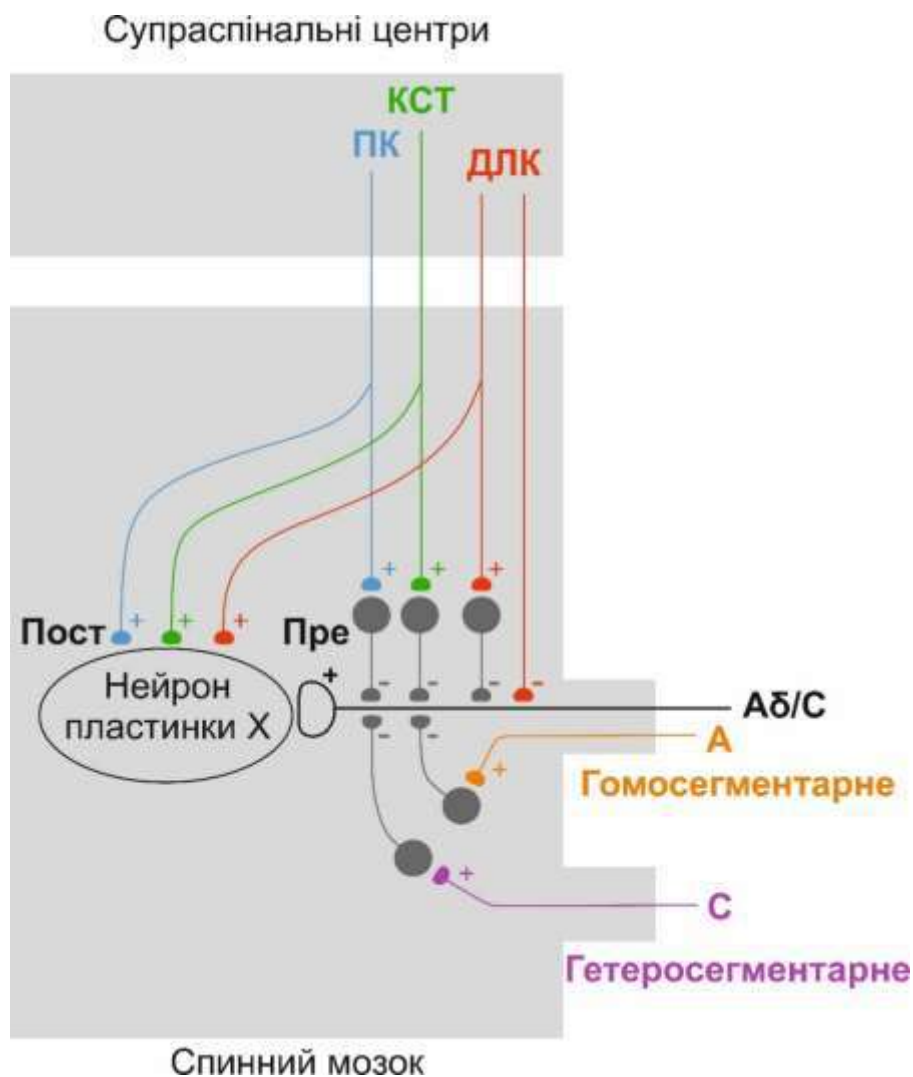
**Рис 5.7** Прямі еферентні входи до нейронів пластинки X

Відсоток нейронів, які отримують моно- та полісинаптичні вхідні сигнали та генерують потенціали дії у відповідь на стимуляцію низхідного тракту

Прямі відповіді були рідкісними; моносинаптичні ЗПСС були опосередковані волокнами переднього канатика і КСТ в 3 і 1 нейронах пластинки X відповідно. Ми не спостерігали моносинаптичних гальмівних входів.

На завершення, наші експерименти встановили, що вхід первинних аферентів до нейронів пластинки X регулюється кількома спинномозковими та супраспінальними шляхами (рис. 5.8).





**Рис. 5.8** П'ять різних шляхів, що регулюють входи ПА до нейронів пластинки Х

Низхідні шляхи (дорсолатеральний канатик, передній канатик і кортико-спінальний тракт) надають як пре-, так і постсинаптичні ефекти. Для гомо- та гетеросегментарних первинних аферентів проявляється лише пресинаптична дія. Зверніть увагу, що дорсолатеральний канатик може інгібувати терміналі первинних аферентів, як через гальмівний інтернейрон, так і безпосередньо. Постсинаптичний вхід із низхідних шляхів може бути прямим або полісинаптичним.

**Резюме із стислим викладенням матеріалу розділу:**

Первинні аференти і низхідні шляхи можуть викликати пресинаптичне гальмування аферентних вхідних сигналів. Вхід ПА до нейронів пластинки Х регулюється кількома спинномозковими та супраспінальними шляхами. Основні низхідні тракти пресинаптично контролюють А $\delta$ - і С-аферентні входи до пластинки Х. Нейрони пластинки Х мають терміналі від ноцицептивних аферентів, які експресують ТРП канали. Отриманні данні свідчать про залученість пластинки Х у ноцицептивну сигналізацію.

#### **Публікації результатів, висвітлених у розділі:**

1. Krotov V, Agashkov K, **Krasniakova M**, Safronov B, Belan P, Voitenko N. (2022) *Segmental and descending control of primary afferent input to the spinal lamina X*. PAIN 2022 Jan 31; doi: 10.1097/j.pain.0000000000002597 (Q1)

## РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

### Феномен центральної сенситизації та розвиток хронічного больового синдрому

Гострий біль виконує роль фізіологічного сигналу про можливе або вже наявне пошкодження тканин організму, натомість як хронічний біль є патологічним станом. При хронічному больовому синдромі, незалежно від його генезу, больові відчуття не зникають при нейтралізації причини пошкодження. Близько 30 відсотків пацієнтів відмічають наявність помірного або сильного больового синдрому, що триває більше шести місяців [86]. Хронічний біль знаходиться в десятці станів які значно порушують якість життя пацієнтів [70]. Приблизно 40% людей в розвинених країнах стикаються з проблемою хронічного болю [11]. 60.4 % відсотка з опитаних людей в Україні, відповідно до міжнародного діагностичного інтерв'ю CIDI 2,0, стикались з хронічним болем (n = 1720) [182]. Отже, хронічні больові синдроми є суттєвою клініко - соціальною проблемою, проте створення нових та ефективних терапевтичних методів лікування відбувається повільно.

Недостатньо вивчені механізми кодування ноцицептивних сигналів за фізіологічних умов і зміни, що відбуваються при розвитку хронічного больового синдрому. Ці факти безперечно уповільнюють швидкість розробки новітніх лікувальних підходів при хронічному больовому синдромі.

Центральна сенситизація лежить в основі хронізації процесу болю, та визначається як підвищення функціонального статусу нейронів та мереж ноцицептивних шляхів вздовж всієї нервової системи, викликаного підвищенням мембранної збудливості, синаптичної ефективності і/або зменшенням гальмування [183].

Пластинки I і X дорсального рогу спинного мозку відіграють одну з основних ролей в обробці ноцицептивної інформації. Проявом центральної сенситизації є гіперзбудливість нейронних мереж цих пластинок. Ця

гіперзбудливість проявляється у зменшенні гальмування в середині нейронних мереж спинного мозку, і відповідно, призводить до підвищення загального рівня збудження в цих же системах, що наявне при хронічному больовому синдромі.

В цій роботі були показані основні механізми інтеграції ноцицептивної інформації та її передачі до супраспінальних центрів. Було визначено загальне збільшення викликаних ЗПСС та ЗПСП в спинномозкових-парабрахіальних нейронах I дорсального рогу спинного мозку у відповідь на дію ноцицептивного стимулу у фізіологічних умовах та в умовах індукованого хронічного нейропатичного болю. Данні зміни можна віднести до змін, що викликають підвищену активність інтернейронів спинного мозку на больові та не больові стимули [184], [185], пов'язати зі змінами потенціал-керованих натрієвих каналів [186], [187], які підвищують збудливість нейронів дорсально-корінцевого ганглія та призводять до збільшеного викиду глутамату з центральних терміналей. При нейропатичному хронічному болю, викликаному травмою периферичного нерву, було виявлено схожість у загальному підвищенні збудження у нейронах поверхневих пластинок дорсального рогу спинного мозку [188]–[192]. Так, вважається, що саме ці зміни і призводять до розвитку та підтримання хронічного болю [105], [193], [194].

Ймовірніше за все, периферичне запалення або травма периферичного нерва викликають підвищення генерації груп потенціалів дії нейронами дорсального корінцевого ганглію [195], що збільшує викид глутамату з первинних аферентних терміналей нейронів та призводить до збільшення збуджуючого тону в нейронній мережі поверхневих пластинок дорсального рогу спинного мозку, яке підтримується за рахунок пресинаптичних і постсинаптичних змін.

Аферентні входи до спіно-парабрахіальних нейронів пластинки I дорсального рогу спинного мозку

Наше уявлення про обробку ноцицептивного сигналу в спинномозкових-парабрахіальних нейронах пластинки I, здебільшого, базується на реєстраціях від

нейронів *in vitro* з тонких зрізів спинного мозку. Ці дослідження показують, що тільки менша частина спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки I отримує прямий вхід від Аδ- та С-аферентів (9% та 32% спинномозкових-парабрахіальних нейронів відповідно [196]. В інших роботах також припускають, що кілька класів ноцицепторів не збуджують спинномозкові-парабрахіальні нейрони безпосередньо, але роблять це за допомогою активації конкретних популяцій інтернейронів дорсального рогу [197], [198]. В даній роботі використовувався препарат, в якому збережено як центральні терміналі первинних аферентів, так і дендритну структуру нейронів спинного мозку [156], [157], [199]–[201], щоб мати можливість зробити детальний аналіз аферентного сигналу до спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки I так і нейрони пластинки X.

У проведених дослідах усі спинномозкові-парабрахіальні нейрони пластинки I отримували моносинаптичні входи від С-волокон, і більша частина з них додатково мала прямий вхід від Аδ-волокон. Така суттєва аферентна іннервація спинномозкових-парабрахіальних нейронів від ноцицептивних волокон добре корелює з імуноцитохімічними дослідженнями, що показують значну кількість прямих контактів, утворених Аδ- та С аферентами з сомою та проксимальними дендритами спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки I [202]–[204]. Відповідно до функції, ці надпорогові входи Аδ- / С-волокон дозволяють спинномозковим-парабрахіальним нейронам безпосередньо мати можливість передавати сигнали про можливі больові подразники.

Також характерні реакції спинномозкових-парабрахіальних нейронів на одиничний черезшкірний стимул вивчалися за допомогою позаклітинних *in vivo* реєстрації у щурів та котів [21], [36], [76], [205]. Ці експерименти ідентифікували ранні та пізні фази генерації потенціалів дії, які були охарактеризовані як опосередковані периферичними Аδ- та С-волокнами відповідно. Відповідні ранні та пізні фази генерації потенціалів дії, які спостерігалися і у наших дослідженнях, можуть мати інші пояснення. Відповідний аналіз синаптичного входу, що дозволив оцінити нам властивості та особливості генерації патернів потенціалів

дії в спн. Рання фаза генерація потенціалу дії залежить від моносинаптичних входів від Ад- і С-волокон. Пізня фаза генерації потенціалу дії яка за фізіологічних умов відмічалась в спинномозкових-парабрахіальних нейронах II-го типу, та яка триває секунди після одиничного супрамаксимального стимулу первинних аферентів, залежить від активності локальних нейронних мереж.

Ми показали принципово різні механізми обробки ноцицептивного сигналу в спинномозкових-парабрахіальних нейронах I-го та II-го типу. Спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го типу мають прямі входи від кількох С- і Ад-волокон і генерують в середньому 1 потенціал дії. В більшості випадків відповідь на стимуляцію в діапазоні Ад-волокон завжди була допорогова. Відповідно спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го мають значно більшу кількість моносинаптичних входів від Ад- і С- волокон, а також їх сила більше. Також завдяки внутрішнім властивостям цих нейронів відбувається ампліфікація аферентного входу. Все це впливає на утворення ранньої фази генерації потенціалу дії. Цей механізм ампліфікації аферентного вхідного сигналу є особливо важливим в конвертації Ад-ноцицептивного входу в коротку групу потенціалів дії. Крім того, більш сильний вхід і більша частота активності лежать в основі поступового збільшення кількості потенціалів дії на початку в діапазоні активації ноцицептивних С-волокон.

В спинномозкових-парабрахіальних нейронах II-го типу відмічається наявність повільного деполяризуючого струму завдяки чому можливо сформуванню пізньої фази генерації потенціалу дії. Також цей механізм реалізується завдяки NMDA залежним процесам та значною мережевою активністю.

Повільний деполяризуючий струм формує плато-потенціал, що призводить до генерації потенціалів дії за рахунок мережевої активності локальних нейронів. Цікавий факт, що при збільшенні інтенсивності стимуляції С-волокон тривалість та кількість ЗПСС викликаних мережевою активністю значно змінюється. Отже, за рахунок наявного плато-потенціалу створюється часове вікно, завдяки якому підвищення активності локальних нейронних мереж може кодуватись у кількості згенерованих потенціалів дії. Як показують наші дані, ця мережева активність

генерується конкретною нейронною мережею, орієнтованою на спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу, а не спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го типу. Така активність може бути опосередкована як поверхневими, так і глибокими інтернейронами дорсального рогу, які спрацьовують подібним чином у відповідь на аферентну стимуляцію С-волокон [156], [206].

Спинномозкові-парабрахіальні нейрони пластинки I можна розділити щонайменше на дві окремі групи, спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го та II-го типів. Спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го типу, що представляють більшість спинномозкових-парабрахіальних нейронів, генерують один потенціал дії у відповідь на одиничний супрамаксимальний стимул в діапазоні С-волокон. Таким чином, вони просто передають аферентну активність до супраспінальних структур і, ймовірно, функціонують як ноцицептивні датчики. Вони отримують дані від кількох первинних аферентів, що може відображати факт наявності невеликих периферичних рецепторних полів, як показано для клітин пластинки I у дослідженнях *in vivo* [207]. Ці властивості можуть бути важливими для кодування локації больового подразника. Відповідно до цього, на вихідний сигнал спинномозкових-парабрахіальних нейронів I-го типу суттєво не впливає активація локальних нейронних мереж, викликана аферентним входом. Таким чином, спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го типу є хорошими кандидатами на роль передавачів інформації про розташування шкідливого подразника.

Навпаки, спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу інтегрують прямі входи від більшої кількості ноцицептивних аферентів та локальних нейронних мереж і, отже, менш придатні для кодування точного розташування стимулу. Натомість спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу можуть кодувати інтенсивність больового подразника. У широкому діапазоні стимуляції, сила ноцицептивного входу перетворюється на кількість потенціалів дії. Деякі спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу також використовують коротку групу потенціалів дії для передачі інформації про активацію Ad ноцицептивного входу. Загальне значення спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу для ноцицептивної обробки підкреслюється тим, що ці нейрони генерують

основну частину вихідної активності пластинки I, направлену до супраспінальних структур.

Можливо, що ранні та пізні фази генерації потенціалів дії від спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу кодують різні аспекти ноцицептивного входу. Рання фаза генерації потенціалів дії, безпосередньо викликана аферентним стимулом, поступово збільшується при підсиленні інтенсивності стимуляції дорсального корінця в діапазоні C-волокон (від 2 до 8 потенціалів дії). Таким чином, ранній компонент кодує кількісний аспект моно- та полісинаптичного аферентного входу. На відміну від цього, пізня фаза генерації потенціалів дії відображає викликану стимуляцією через тривалу активацію нейронних мереж дорсального рогу спинного мозку. Ця активність викликана потужним аферентним входом до цієї конкретної мережі. Таким чином, пізня фаза генерації потенціалів дії, ймовірно, кодує загальну кількість ноцицептивних C-волокон, що іннервують цю мережу. Часові структури ранніх та пізніх фаз генерації потенціалів дії також різні. Перші потенціали дії здебільшого фіксовані у часі, мають високу частоту і утворюються протягом 200 мс після стимуляції, тоді як пізні потенціали дії не є фіксованими в часі, мають меншу частоту і генеруються на протязі секунд після стимуляції. Таким чином, спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу, що мають ранні та пізні фази генерації потенціалів дії, можуть використовувати різні часові межі для кодування і передачі різних аспектів ноцицептивної інформації через один і той самий висхідний аксон.

### Функціональне ролі спинномозкових-парабрахіальних нейронів різних типів

З наших дослідів можливо зробити висновок про різну функціональну залученість спинномозкових-парабрахіальних нейронів I-го та спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типів. Спинномозкові-парабрахіальні нейрони, здебільшого, мають свої закінчення в парабрахіальній області, яка, в свою чергу, контактує з мигдалевидним тілом, ділянкою, яка бере участь в обробці



емоційного аспекту болю [208]–[210] Емоційна складова болю може по різному кодуватись. Нами було відмічено, що спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу мають специфічний характер генерації потенціалів дії, вони мали тенденцію до зростання у широкому діапазоні больових стимулів. Процес кодування сили емоційного компонента болю пов'язаний з тим, що рецепторні поля парабрахіальних нейронів значно більші, ніж поля спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки I. Так, ми можемо стверджувати, що існує конвергенційний вплив парабрахіальних нейронів і сигнали від спинномозкових-парабрахіальних нейронів I-го типу, що спрямовані на одну парабрахіальну мішень, також можуть кодувати силу емоційного сприйняття болю. Однак окремі спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го типу навряд чи можуть кодувати емоційний компонент болю.

З іншого боку, окремі нейрони пластинки I проектується на більш ніж одну супраспінальну область [135], [211], тож спинномозкові-парабрахіальні нейрони, які термінують у парабрахіальній області, також можуть проектувати і на таламус [24], [31], [135], [212], [213] Спинномозково-таламічний шлях, що входить в первинну соматосенсорну кору, бере участь в обробці різних аспектів болю [24]. В умовах диференційної обробки спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го типу можуть локалізувати стимул, тоді як спинномозкові-парабрахіальні нейрони II-го типу можуть кодувати його силу.

Таким чином, спинномозкові-парабрахіальні нейрони I-го та II-го типів, ймовірно, відіграють різну роль у ноцицепції і виступають, як прості передавачі або кодувальники інтенсивності периферичного сигналу. Вони можуть також брати участь у кодуванні висхідних сигналів, описуючи емоційні та дискримінаційні аспекти болю. Крім того, специфічне зниження активності або виключення малої популяції спинномозкових-парабрахіальних нейронів II-го типу може істотно послабити передачу ноцицептивних сигналів до супраспінальних структур. Таким чином ці нейрони можуть представляти адекватну мішень для терапії болю без побічного впливу на інші сенсорні модальності.

Зміни вихідних характеристик від спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки I щура в умовах нейропатичного болю

Нейропатичний біль – це, безперечно, дуже виснажливий стан, що є не тільки медичною, але і соціально-економічною проблемою. Такий характер болю виникає після первинного ураження або захворювання соматосенсорної нервової системи і є опосередкованим порушення взаємодії у системі периферичної нервової системи, спинного і головного мозку. Ознаками нейропатичного болю є гіпералгезія, аллодінія і спонтанні болі. Гіпералгезія характеризується посиленою реакцією на шкідливі подразники, у той час, як аллодінія є аномальною реакцією на нешкідливі подразники і може викликати спонтанні болі.

Згідно статистичних даних нейропатичний біль відчуває до 17% населення, що дуже негативно відображається на їх якості життя [17]. Доступні методи лікування дуже обмежені, адже існуючі засоби незавжди є достатньо ефективними, або мають виражені побічні дії. Саме наше неповне розуміння клітинних та молекулярних механізмів, що лежать в основі невропатичного болю є однією із головних причин такого обмеження у результатах лікування больвих синдромів нейропатичного генезу.

Хоча місцем першого синапсу в ноцицептивних шляхах є спинний мозок, раніше вважалося, що багато симптомів невропатичного болю є результатом аномальної обробки в центральній нервовій системі. Проте Зараз відомо, що аномальний процес відбувається в спинному мозку, оскільки це місце, і там може відбуватися значна інтеграція та модуляція.

Зараз вже загальновідомим є факт важливості спинномозково-парабрахіальних нейронів дорсального рогу I пластинки спинного мозку у передачі сенсорної інформації від спинного мозку до супраспінальних центрів [18]. Індуковане нейропатією посилення відповідей від спинномозкових-парабрахіальних нейронів на периферичні подразники спостерігалось *in vivo* раніше [214]. Деякі дослідження показали, що периферичні ноцицептори можуть

стати гіперчутливими після пошкодження нерва [215]. Незважаючи на останні досягнення в розумінні фізіології спинномозково-парабрахіальних нейронів спинного мозку щурів, ми маємо достатньо мало інформації про індуковані нейропатією зміни функціонування спинномозково-парабрахіальних нейронів. Тим не менш, таке дослідження може бути дуже корисним для розуміння основних механізмів невропатичного болю. Саме тому ми намагалися з'ясувати, чи змінює вихідні характеристики від спинномозкових-парабрахіальних нейронів периферична нейропатія, а також дослідити характер цих змін у разі їх наявності.

Ми виявили, що спинномозково-парабрахіальні нейрони змінюють вихідні сигнали від пластинки I у дуже специфічний для клітин спосіб. Так, хронічний нейропатичний біль змінює функціональні ролі, які спинномозково-парабрахіальні нейрони мають у фізіологічних умовах.

Записи від цілої клітини у режимі фіксації струму в поєднанні зі стимуляцією дорсального корінця і утриманням потенціалу на мембрані близьким до -60 мВ показали, що вихідні характеристики від спинномозкових-парабрахіальних нейронів у щурів з частковим пошкодженням нерву не є ідентичними з щурами, що не мали жодних пошкоджень. У ході досліджень характеру таких змін ми виявили, що патологічна зміна у функціонуванні спинномозкових-парабрахіальних нейронів I пластинки спинного мозку призводить до того, що більша кількість інформації, яка кодується у вигляді спонтанно згенерованих груп потенціалів дії, доходить до супраспінальних структур та бере участь в формуванні відчуття спонтанного болю.

При аналізі змін аферентного впливу на спинномозкові-парабрахіальні нейрони I пластинки в умовах хронічного нейропатичного болю ми провели оцінку характеру генерації потенціалів дії, також ми оцінили сумарний вихідний вплив, що генерують спинномозкові-парабрахіальні нейрони I пластинки, в умовах нейропатичного болю.

У відповідь на стимуляцію первинних аферентів при діапазоні активації А-волокон (100 мкА, 50 мкс) в контрольних умовах, спинномозкові-парабрахіальні нейрони в більшості випадків мали допорогові відповіді, і тільки невелика

кількість клітин генерували максимум один потенціал дії. Натомість, в умовах нейропатичного болю, характеристики А-відповідей суттєво відрізнялись, майже в половині симуляцій.

Також, ми встановили, що значна частина цих клітин на один стимул в діапазоні активації А-волокон спинномозкових-парабрахіальних нейронів генерували більше 3 потенціалів дії та мали довготривале плато, що тривало секунди та на якому генерувались потенціали дії. Цікаво, що така характеристика А-відповідей в умовах нейропатичного болю може, у фізіологічному плані характеризувати феномен алодинії.

На стимуляцію дорсального корінця в діапазоні активації С – волокон (140 мкА, 1 мс) у контролі, більшість спинномозкових-парабрахіальних нейронів генерували в середньому один потенціал дії. При реєстрації від спинномозкових-парабрахіальних нейронів в умовах хронічного нейропатичного болю зростає кількість клітин, що генерують групи потенціалів дії та мають плато потенціал, в порівнянні з контролем.

Спинномозкові-парабрахіальні нейрони в умовах нейропатичного болю здатні генерувати більш тривале плато, та відповідно більшу кількість потенціалів дії у відповідь на С – стимул, що дає нам підставу говорити, що за рахунок даного механізму може реалізовуватись феномен гіпералгезії.

В умовах хронічного болю спинномозкові-парабрахіальні нейрони І пластинки спинного мозку у відповідь на невольовий А-стимул здатні генерувати значну кількість потенціалів дії. На основі цих даних ми можемо виставити припущення, що спинномозкові-парабрахіальні нейрони дорсального рогу І пластинки спинного мозку щурів приймають роль у формуванні такого феномену, як алодинія.

Синаптичні механізми, що лежать в основі зміненого вихідного сигналу від спинномозкових-парабрахіальних нейронів щурів в умовах хронічного нейропатичного болю, можуть бути досить різноманітними та включати як первинні аференти, так і спинний мозок. Наприклад, синергія між гіперзбудливістю ноцицепторів, що є результатом регуляції натрієвих потенціал-

залежних каналів [216], [217], і залежне від мікроглії збільшення відповідей, від AMPA та NMDR-рецепторів, може бути причиною аллодічного зсуву вихідних характеристик від спинномозкових-парабрахіальних нейронів [218]. Цей зсув також може виникнути внаслідок постсинаптичного посилення глутаматергічної синаптичної передачі, викликаного гліальними медіаторами, що вивільняються астроцитами спинного мозку [219]. Останнє також може сприяти зміні функціонування спинномозкових-парабрахіальних нейронів через зниження регуляції транспортерів глутамату [219], що призводить до тривалої присутності глутамату в синаптичній щілині. Нарешті, індуковане невропатією порушення гальмівного тону в схемі спинного рогу [216] може відігравати важливу роль у підтримці викликаного та спонтанної активності спинномозкових-парабрахіальних нейронів. З огляду на те, що зміни вихідного сигналу від спинномозкових-парабрахіальних нейронів є специфічними для клітини, можна припустити, що і основні механізми також. Тому необхідні подальші дослідження синаптичних і внутрішніх клітинних механізмів для кращого розуміння зміненого виходу від спинномозкових-парабрахіальних нейронів, зокрема, та нейропатичного болю в цілому.

Характеристика нейронів пластинки X спинного мозку та їх значення в ноцицептивній регуляції

Цікавою та маловивченою ділянкою спинного мозку є пластинка X, хоча все більше даних заявляються про її залученість в обробці соматосенсорної і вісцероцептивної інформації [123]–[125], [220]–[223]. Показано, що популяція нейронів X пластинки є неоднорідною за своїми внутрішніми властивостями генерації потенціалів дії [224], має схожий розподілом клітин, що можуть генерувати невеликі групи потенціалів дії та має повільно деполяризуючий струм, а отже проявляє схожі властивості з спинномозковими-парабрахіальними нейронами II – го типу [78]; Також було показано, що більшість нейронів пластинки X отримують функціональні моносинаптичні входи від

високопорогових  $A\delta$  - і C-аферентів [224]. Нейрони пластинки X можуть бути збуджені ноцицептивним первинними аферентами. Більшість нейронів генерують потенціали дії, що викликані активністю в локальній нейронній мережі після одиничного стимулу первинних аферентів. Такий характер генерації потенціалів дії також свідчить про значну схожість з спинномозковими-парабрахіальними нейрони II- го типу в I пластинці спинного мозку щурів. Приблизно половина нейронів демонструють первинне полісинаптичне гальмування викликане стимуляцією первинних аферентів.

Таким чином, нейрони, що оточують центральний канал, є активними елементами нейронних мереж спинного мозку щурів, на які безпосередньо спрямовані ноцицептивні первинні аферентні волокна і нейрони пластинки X можуть обробляти первинний сигнал різних модальностей. Безперечно, нейрони X пластинки мають схожість із нейронами пластинки I дорсального рогу спинного мозку щурів, яка є основною у больовій сигналізації і ноцицептивно специфічних процесах. Нейрони пластинки X беруть участь у ряді фізіологічних процесів.

У лумбарному відділі спинного мозку, на рівні L4-L5 практично відсутні симпатичні та парасимпатичні прегангліонарні нейрони, які в свою чергу приймають участь у автономній регуляції спинного мозку. Згідно з попереднім дослідженнями, нейрони які модулюють вихід від спінальних мотонейронів малочисельні у пластинці X [127], [225]. Нейрони в цій ділянці, швидше за все, належать до мереж, що приймають участь в обробці соматосенсорної і вісцероцептивної інформація [123]–[125], [220]–[223].

Більшість досліджень *in vitro* пов'язані із властивостями нейронів та їх ноцицептивними аферентами були зосереджені на нейронах в поверхневих та глибоких пластин дорсального рогу спинного мозку. Такі дослідження обумовлюють те, що наші знання про властивості нейронів пластинки X, яка оточує центральний канал, дуже обмежені.

Наразі, можна сказати, що популяція нейронів пластинки X неоднорідна і проявляє характерні властивості, схожі на властивості нейронів пластинки I дорсального рогу спинного мозку [156], [157], [200], [226]. Приблизно одна десята

нейронів пластинки X могли генерувати групи потенціалів дії, що в поверхневих нейронах пластинки I, відноситься до підкласу проєкційних нейронів передньолатерального тракту [157], [226]. Тому не можна виключати можливість того, що ці нейрони мають унікальний профіль характерний для групи проєкційних нейронів, що знаходяться в пластинці X [30], [168].

Ми виявили, що більшість нейронів пластинки X отримували аферентний вхід від  $A\delta$  - і C-волокон, багато з яких є ноцицептивними. Можливість наявного прямого первинно аферентного входу до нейронів пластинки X можна було передбачити згідно з попередніми морфологічними дослідженнями, які показують, що центральні проєкції тонких волокон [227]–[229] можуть досягати області, зайнятої дендритами нейронів, що оточують центральний канал [221], [222], [230]. В цій роботі ми надаємо фізіологічні докази того, що нейрони пластинки X мають значну кількість моносинаптичних первинно аферентних входів і що вони представлені різноманітними волокнами з різним функціональним значенням.

Первинні аференти, які термінують на нейрони пластинки X, представлені  $A\delta$ , вископороговими  $A\delta$ , низькопороговими C та C волокнами, відповідно до латентностей відповідей та швидкості проведення [224]. Стимуляція дорсального корінця також викликала полісинаптичний компонент ЗПСС, що підвищило загальну ефективність збудження. Подібна картина первинного аферентного входу спостерігалася в поверхневих нейронах спинного рогу пластинки I [200], [223]. Крім того, не було виявлено жодного моносинаптичного чи полісинаптичного входу, що був опосередкований низькопороговими  $A\beta/A\delta$  – афферентами. Ймовірно, що нейрони пластинки X беруть участь у обробці сенсорної інформації від високопорогових ноцицептивних аферентів. Ця переважно ноцицептивна іннервація нейронів і велика кількість пептидергічних аферентних терміналів у зоні біля центрального каналу [223] свідчать про важливу роль пластинки X в обробці больових сигналів.

Отже, нейрони пластинки X, що оточують центральний канал демонструють неоднорідні властивості генерації потенціалів дії і отримують

численні прямі входи від ноцицептивних аферентних волокон. Багато цих нейронів спрацьовують у відповідь на стимуляцію високопорогових первинних аферентів. Таким чином, незважаючи на їх різноманітні функції, нейрони пластинки X мають багато властивостей, спільних для нейронів поверхневих пластинок дорсального рогу спинного мозку, що мають ключове значення в обробці болю.

#### Сегментарна та низхідна регуляція нейронів пластинки X спинного мозку

Нещодавні дослідження про те, що різні типи високопорогових первинних аферентів безосередньо іннервують нейрони пластинки X [77], [201] підкреслює її безпосередню участь в обробці больового сигналу. На жаль, мало відомо про те як контролюються ці входи, хоча первинні аференти, що термінують в інші області спинного мозку, піддаються пресинаптичному гальмуванню опосередкованому низько- та високопороговими первинними аферентами [51], а також низхідним сенсорним [132] та моторним [231] трактами.

У наших експериментах первинна аферента деполяризація можна було індукувати шляхом стимуляції як дорсальних корінців, так і низхідних шляхів; тому пресинаптичне гальмування входів первинних аферентів контролюється на сегментарному та супраспінальному рівнях. Ми також виявили, що центральні терміналі С-волокон, що іннервують нейрони пластинки X, інгібуються гомосегментарними А- і гетеросегментарними С-аферентами. У цьому відношенні пластинка X демонструє схожість з основною спинною ноцицептивно-проекційною пластинкою I.

Наші дані показують, що кілька низхідних шляхів можуть опосередковувати пресинаптичне гальмування А $\delta$ - і С-волокон до нейронів пластинки X. Фізіологічне значення цього гальмування було продемонстровано зменшенням генерації потенціалів дії у відповідь на високопорогову стимуляцію первинних аферентів, як описано раніше для нейронів широкого динамічного діапазону [232]. Цікаво, що повторювана стимуляція низхідних шляхів



спричинила більш сильний ефект, що свідчить про те, що нейрони, які ритмічно розряджаються, а саме ноцицептивні ON- та OFF-клітини або пейсмейкерні клітини [233] в стовбурі мозку, можуть відігравати вирішальну роль у низхідному пресинаптичному контролі. В якості альтернативи можна розглядати ростровентромедулярні або ендорфіновмісні терміналі, які є у великій кількості в сірій речовині навколо центрального каналу [234], [235]. Наше фармакологічне тестування переднього дорсального корінця показало, що механізми низхідної модуляції можуть бути різними для різних досліджуваних трактів. На відміну від переднього канатика і кортикоспінального тракту, дорсолатерально канатиково-індуковані потенціали дорсального корінця мали незалежний від AMPA/NMDA-рецептора бікукулін-чутливий компонент, що передбачає пряме вивільнення ГАМК на терміналі первинних аферентів. Низхідні волокна ГАМК/енкефалінергічних нейронів від ростровентромедулярних (RVM) нейронів [234], [235] в центрі контролю болю в стовбурі головного мозку, є хорошими кандидатами для цього гальмування, оскільки терміналі, що містять ГАМК та енкефалін, у великій кількості містяться в пластинці X. Церебрально-поперекові проєкційні нейрони [56], чії аксони спускаються в передній і латеральний канатик і залишають VGAT-позитивні терміналі в пластинці X, можуть бути іншим кандидатом для прямого пресинаптичного гальмування. Оскільки вважається, що гліцин не здатний індукувати первинну аференту деполяризацію [140], інгібуючі vGluT2-позитивні терміналі, знайдені в пластинці X [53], навряд чи будуть залучені до прямого пресинаптичного гальмування. Глутаматергічні низхідні волокна можуть також інгібувати первинні аференти через активацію гальмівних нейронів спинного мозку. Однак, враховуючи, що потенціали дорсального корінця, індуковані С-волокном, мають ГАМК-незалежний компонент [51], [181], не можна виключити пресинаптичну дію vGluT2 позитивних низхідних волокон [52], [53], [56].

Цікаво відзначити, що ступінь сегментарного та супраспінального пресинаптичного гальмування аферентного входу до нейронів пластинки X була однаковою. Це може означати однакове фізіологічне значення сегментарного та

низхідного контролю в цій області спинного мозку. Також можливо, що глутаматергічні сегментарні та супраспінальні волокна закінчуються на одному наборі гальмівних інтернейронів. Пресинаптичне гальмування, опосередковане як сегментарними, так і супраспінальними шляхами, впливало на більшість проаналізованих нейронів пластинки X. Ми спостерігали це гальмування в клітинах з різними патернами генерації потенціалів дії, що, як було показано, корелює з нейрохімічним фенотипом нейронів [236]. Оскільки навколо центрального каналу багато ноцицептивних аферентних терміналів [77], [237], можна обґрунтовано припустити, що значна частина нейронів належить нейронним мережам пластинки X, які обробляють ноцицептивний сигнал.

Хоча низхідні тракти викликають сильний пресинаптичний ефект, їхні прямі постсинаптичні термінали були помічені лише у декількох нейронах. Усі ці входи були збудливими. Тому ми не знайшли жодних електрофізіологічних доказів гальмівних синапсів між волокнами низхідного тракту та нейронами пластинки X. Можливо, що велика кількість ГАМК- і гліцинергічних терміналей волокон, що спускаються від моторних центрів [53], [56] та ростровентромедулярних (RVM) [132], беруть участь у пре-, а не постсинаптичному гальмуванні, утворюючи аксо-аксональні синапси на волокнах первинних аферентів та інтернейронах [178].

Прямі низхідні збуджувальні входи були функціонально важливими, оскільки стимуляція дорсолатерального канатика викликала потенціали дії у нейронах пластинки X. Ці прямі збудливі входні сигнали можуть бути з різних джерел, таких як специфічні для локомоції церебро-поперекові проекційні нейрони [56], нейрони з латерального парагігантоклітинного ядра [53], V2a stop нейрони стовбура мозку [52], ретикулоспінальні нейрони лінії Chx10 [54] або з нейронів латерального вестибулярного ядра [55]. Рідкість прямих кортикоспінальнотрактових-входів можна пояснити тим фактом, що цей тракт переважно націлений на нейрони, які отримують неноцицептивний A $\beta$ -аферентний вхід [238], тоді як пластинка X в основному постачається високопороговими первинними аферентами [77], [201], [237]. У свою чергу,

низька кількість прямих вхідних сигналів від дорсолатерального канатика і переднього канатика може бути наслідком функціональної гетерогенності нейронів пластинки X, лише незначна частина яких спрямована на ці тракти. Слід зазначити, що ми досліджували клітини, розташовані близько до центрального каналу (в межах 40 мкм), тоді як найвища щільність низхідних терміналів (збуджуюча та гальмівна) була виявлена більш латерально [53], [55], [56]. Таким чином, численні непрямі вхідні сигнали, викликані стимуляцією низхідного тракту, можуть бути опосередковані нейронами пластинки X, а також інтернейронами спинного мозку з сусідніх пластин.

На завершення, наші експерименти встановили, що вхід первинних аферентів до нейронів пластинки X регулюється кількома спинномозковими та супраспінальними шляхами.

## ВИСНОВКИ

Згідно поставлених у дисертаційній роботі цілей і завдань була досліджена регуляція больової сигналізації поперекового відділу спинного мозку щурів та зроблені наступні висновки:

1. Визначено різні субпопуляції спинномозкових-парабрахіальних нейронів пластинки I дорсального рогу спинного мозку в залежності від кількості згенерованих потенціалів дії на супрамаксимальну стимуляцію первинних аферентів. Встановлена їх можлива функціональна роль в кодуванні сили та інтенсивності ноцицептивного аферентного входу.
2. Кількість моносинаптичних аферентних входів, насамперед від C-волокон, суттєво відрізняється у спинномозкових-парабрахіальних нейронів I та II-го типів. Інтегральний струм, що виникає на мембрані під час супрамаксимальної стимуляції первинних аферентів, значно більший у нейронах II-го типу.
3. В моделі хронічного болю виражено змінюється патерн роботи спинномозкових-парабрахіальних нейронів : i) спинномозкові-парабрахіальні нейрони можуть спонтанно генерувати групи потенціалів дії, без стимуляції первинних аферентів, що може відповідати спонтанному болю; ii) при супрамаксимальній стимуляції C – аферентів виникають довготривалі генерації потенціалів дії, що тривають секунди, що може бути визначено як прояв гіпералгезії; iii) при стимуляції A- волокон виникають довготривалі групи потенціалів дії, що фізіологічно можуть свідчити про наявність алодії.
4. Підтверджена залученість пластинки X у регуляцію больової сигналізації через те, що: i) нейрони пластинки X можуть обробляти ноцицептивну інформацію за рахунок моносинаптичних Ad- і C-аферентів; ii) ТРПВ1-позитивні терміналі первинних ноцицепторів мають значний вклад в регуляцію даних нейронних мереж; iii) ТРПВ1 - рецептори представлені на мембранах нейронів пластинки X.

5. Нейрони пластинки X регулюються пресинаптично на сегментарному рівні від гомо- і гетеросегментарних аферентів та на супраспінальному рівні по низхідним волокнам з кортикоспінального тракту, дорсолатерального канатика і переднього канатика. Низхідні волокна від дорсолатерального канатика мають прямі постсинаптичні впливи, як збуджуючі (моно- і полісинаптичні) так і гальмівні. Таким чином, первинний аферентний вхід до пластинки X підлягає як спинальному, так і супраспінальному контролю, який регулюється щонайменше п'ятьма різними шляхами.

Загалом, нами виявлено функціональну схожість пластинки X з основною ноцицептивно-проекційною пластинкою I дорсального рогу спинного мозку. Специфічний вплив як на сегментарну, так і на пре- і постсинаптичну низхідну регуляцію може бути стати потенційною ланкою для впливу і менеджменту хронічних больових синдромів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. S. N. Raja *et al.*, “The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises,” *Pain*, vol. 161, no. 9, pp. 1976–1982, Sep. 2020, doi: 10.1097/J.PAIN.0000000000001939.
2. A. Abd-Elsayed and T. R. Deer, “Different Types of Pain,” *Pain*, pp. 15–16, 2019, doi: 10.1007/978-3-319-99124-5\_3.
3. A. Kucyi and K. D. Davis, “The dynamic pain connectome,” *Trends in Neurosciences*, vol. 38, no. 2. Elsevier Ltd, pp. 86–95, Feb. 2015. doi: 10.1016/j.tins.2014.11.006.
4. K. J. Mason, T. W. O’Neill, M. Lunt, A. K. P. Jones, and J. McBeth, “Psychosocial factors partially mediate the relationship between mechanical hyperalgesia and self-reported pain,” *Scand J Pain*, vol. 18, no. 1, pp. 59–69, Feb. 2018, doi: 10.1515/sjpain-2017-0109.
5. M. Deng, S. R. Chen, and H. L. Pan, “Presynaptic NMDA receptors control nociceptive transmission at the spinal cord level in neuropathic pain,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 76, no. 10. Birkhauser Verlag AG, pp. 1889–1899, May 2019. doi: 10.1007/s00018-019-03047-y.
6. R. R. Ji, T. Berta, and M. Nedergaard, “Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy?,” in *Pain*, Elsevier B.V., 2013. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.022.
7. A. Macone and J. A. D. Otis, “Neuropathic Pain,” *Semin Neurol*, vol. 38, no. 6, pp. 644–653, 2018, doi: 10.1055/s-0038-1673679.
8. T. J. Price and P. R. Ray, “Recent advances toward understanding the mysteries of the acute to chronic pain transition,” *Curr Opin Physiol*, vol. 11, pp. 42–50, Oct. 2019, doi: 10.1016/J.COPHYS.2019.05.015.
9. M. C. Ferraro, W. Gibson, A. S. C. Rice, L. Vase, D. Coyle, and N. E. O’Connell, “Spinal cord stimulation for chronic pain,” *Lancet Neurol*, vol. 21, no. 5, p. 405, May 2022, doi: 10.1016/S1474-4422(22)00096-5.
10. V. Krotov *et al.*, “Neuropathic pain changes the output of rat lamina I spino-parabrachial neurons,” *BBA Advances*, vol. 3, p. 100081, Jan. 2023, doi: 10.1016/J.BBADVA.2023.100081.
11. H. Breivik, E. Eisenberg, and T. O’Brien, “The individual and societal burden of chronic pain in Europe: The case for strategic prioritisation and action to improve knowledge and availability of appropriate care,” *BMC Public Health*, vol. 13, no. 1, Dec. 2013, doi: 10.1186/1471-2458-13-1229.
12. A. Xu, E. Hilton, R. Arkema, N. L. Tintle, and L. M. Helming, “Epidemiology of chronic pain in Ukraine: Findings from the world mental health survey,” *PLoS One*, vol. 14, no. 10, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0224084.

13. N. Attal *et al.*, “EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision,” *Eur J Neurol*, vol. 17, no. 9, pp. 1113–e88, Sep. 2010, doi: 10.1111/J.1468-1331.2010.02999.X.
14. L. E. Chaparro, P. J. Wiffen, R. A. Moore, and I. Gilron, “Combination pharmacotherapy for the treatment of neuropathic pain in adults,” *Cochrane Database Syst Rev*, vol. 2012, no. 7, Jul. 2012, doi: 10.1002/14651858.CD008943.PUB2.
15. D. Bouhassira, “Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology,” *Revue Neurologique*, vol. 175, no. 1–2. Elsevier Masson SAS, pp. 16–25, Jan. 2019. doi: 10.1016/j.neurol.2018.09.016.
16. N. Torrance, B. H. Smith, M. I. Bennett, and A. J. Lee, “The Epidemiology of Chronic Pain of Predominantly Neuropathic Origin. Results From a General Population Survey,” *Journal of Pain*, vol. 7, no. 4, pp. 281–289, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.jpain.2005.11.008.
17. E. Cavalli, S. Mammana, F. Nicoletti, P. Bramanti, and E. Mazzon, “The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches,” <https://doi.org/10.1177/2058738419838383>, vol. 33, Mar. 2019, doi: 10.1177/2058738419838383.
18. A. J. Todd, “Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn,” *Nat Rev Neurosci*, vol. 11, no. 12, pp. 823–836, Dec. 2010, doi: 10.1038/nrn2947.
19. M. H. Ossipov, G. O. Dussor, and F. Porreca, “Central modulation of pain,” *J Clin Invest*, vol. 120, no. 11, pp. 3779–3787, Nov. 2010, doi: 10.1172/JCI43766.
20. J. Li *et al.*, “Activation of locus coeruleus-spinal cord noradrenergic neurons alleviates neuropathic pain in mice via reducing neuroinflammation from astrocytes and microglia in spinal dorsal horn,” *J Neuroinflammation*, vol. 19, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/S12974-022-02489-9.
21. H. Bester, V. Chapman, J. M. Besson, and J. F. Bernard, “Physiological properties of the lamina I spinoparabrachial neurons in the rat,” *J Neurophysiol*, vol. 83, no. 4, pp. 2239–2259, 2000, doi: 10.1152/jn.2000.83.4.2239.
22. V. E. Abraira and D. D. Ginty, “The sensory neurons of touch,” *Neuron*, vol. 79, no. 4, pp. 618–639, Aug. 2013. doi: 10.1016/j.neuron.2013.07.051.
23. A. L. R. Oliveira *et al.*, “Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia,” *Synapse*, vol. 50, no. 2, pp. 117–129, Nov. 2003, doi: 10.1002/SYN.10249.
24. R. C. Spike, Z. Puskár, D. Andrew, and A. J. Todd, “A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord,” *Eur J Neurosci*, vol. 18, no. 9, pp. 2433–2448, Nov. 2003, doi: 10.1046/J.1460-9568.2003.02981.X.

25. A. J. Todd *et al.*, “The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn,” *Eur J Neurosci*, vol. 17, no. 1, pp. 13–27, 2003, doi: 10.1046/J.1460-9568.2003.02406.X.
26. H. U. Zeilhofer, E. Neumann, and G. Munro, “Spinal GABAA receptors for pain control: back to the future?,” *British Journal of Anaesthesia*, vol. 123, no. 2. Elsevier Ltd, pp. e176–e179, Aug. 2019. doi: 10.1016/j.bja.2019.01.030.
27. A. J. Todd, “Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn,” *Mol Pain*, vol. 13, 2017, doi: 10.1177/1744806917693003.
28. M. J. Alam and J. D. Z. Chen, “Electrophysiology as a Tool to Decipher the Network Mechanism of Visceral Pain in Functional Gastrointestinal Disorders,” *Diagnostics (Basel)*, vol. 13, no. 4, Feb. 2023, doi: 10.3390/DIAGNOSTICS13040627.
29. L. Almarestani, S. M. Waters, J. E. Krause, G. J. Bennett, and A. Ribeiro-Da-Silva, “Morphological characterization of spinal cord dorsal horn lamina I neurons projecting to the parabrachial nucleus in the rat,” *Journal of Comparative Neurology*, vol. 504, no. 3, pp. 287–297, Sep. 2007, doi: 10.1002/cne.21410.
30. R. Burstein, R. J. Dado, and G. J. Giesler, “The cells of origin of the spinothalamic tract of the rat: a quantitative reexamination,” *Brain Res*, vol. 511, no. 2, pp. 329–337, Mar. 1990, doi: 10.1016/0006-8993(90)90179-F.
31. C. Gauriau and J. F. Bernard, “A Comparative Reappraisal of Projections from the Superficial Laminae of the Dorsal Horn in the Rat: The Forebrain,” *Journal of Comparative Neurology*, vol. 468, no. 1, pp. 24–56, Jan. 2004, doi: 10.1002/cne.10873.
32. J. L. K. Hylden, F. Anton, and R. L. Nahin, “Spinal lamina I projection neurons in the rat: Collateral innervation of parabrachial area and thalamus,” *Neuroscience*, vol. 28, no. 1, pp. 27–37, 1989, doi: 10.1016/0306-4522(89)90229-7.
33. D. Lima and A. Coimbra, “The spinothalamic system of the rat: Structural types of retrogradely labelled neurons in the marginal zone (lamina I),” *Neuroscience*, vol. 27, no. 1, pp. 215–230, Oct. 1988, doi: 10.1016/0306-4522(88)90232-1.
34. R. M. Slugg and A. R. Light, “Spinal cord and trigeminal projections to the pontine parabrachial region in the rat as demonstrated with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin,” *Journal of Comparative Neurology*, vol. 339, no. 1, pp. 49–61, Jan. 1994, doi: 10.1002/cne.903390106.
35. A. J. Todd, M. M. McGill, and S. A. S. Shehab, “Neurokinin 1 receptor expression by neurons in laminae I, III and IV of the rat spinal dorsal horn that project to the brainstem,” *Eur J Neurosci*, vol. 12, no. 2, pp. 689–700, 2000, doi: 10.1046/J.1460-9568.2000.00950.X.



36. D. Andrew, "Sensitization of lamina I spinoparabrachial neurons parallels heat hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain," *Journal of Physiology*, vol. 587, no. 9, pp. 2005–2017, 2009, doi: 10.1113/jphysiol.2009.170290.
37. Z. S. Ran, E. T. Zhang, and A. D. Craig, "Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct," *Nat Neurosci*, vol. 1, no. 3, pp. 218–225, Jul. 1998, doi: 10.1038/665.
38. A. J. Todd, M. M. McGill, and S. A. S. Shehab, "Neurokinin 1 receptor expression by neurons in laminae I, III and IV of the rat spinal dorsal horn that project to the brainstem," *European Journal of Neuroscience*, vol. 12, no. 2, pp. 689–700, 2000, doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00950.x.
39. S. O. Prykhodko and V. S. Shkolnikov, "Neuron-glia relations of the posterior horns of the spinal cord of human fetuses," *Reports of Morphology*, vol. 28, no. 4, pp. 18–26, Dec. 2022, doi: 10.31393/MORPHOLOGY-JOURNAL-2022-28(4)-03.
40. Y. Huang, S. R. Chen, H. Chen, J. J. Zhou, D. Jin, and H. L. Pan, "Theta-Burst Stimulation of Primary Afferents Drives Long-Term Potentiation in the Spinal Cord and Persistent Pain via  $\alpha 2\delta$ -1-Bound NMDA Receptors," *J Neurosci*, vol. 42, no. 3, pp. 513–527, Jan. 2022, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1968-21.2021.
41. J. Li, T. J. Price, and M. L. Bacceti, "D1/D5 Dopamine Receptors and mGluR5 Jointly Enable Non-Hebbian Long-Term Potentiation at Sensory Synapses onto Lamina I Spinoparabrachial Neurons," *J Neurosci*, vol. 42, no. 3, pp. 350–361, Jan. 2022, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1793-21.2021.
42. T. A. Hardy, "Spinal Cord Anatomy and Localization," *Continuum (Minneapolis)*, vol. 27, no. 1, pp. 12–29, Feb. 2021, doi: 10.1212/CON.0000000000000899.
43. K. Agashkov, V. Krotov, M. Krasniakova, B. Safronov, V. Voitenko, and P. Belan, "Encoding of acute nociception by specific population of lamina I projection neurons," *Neuroscience 2017*, 2017.
44. A. G. Brown and R. E. Fyffe, "Form and function of dorsal horn neurones with axons ascending the dorsal columns in cat.," *J Physiol*, vol. 321, no. 1, p. 31, Dec. 1981, doi: 10.1113/JPHYSIOL.1981.SP013970.
45. A. T. Billeter, J. L. Hellmann, A. Bhatnagar, and H. C. Polk, "Transient receptor potential ion channels: Powerful regulators of cell function," *Ann Surg*, vol. 259, no. 2, pp. 229–235, Feb. 2014, doi: 10.1097/SLA.0B013E3182A6359C.
46. I. Nagy, P. Sántha, G. Jancsó, and L. Urbán, "The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology," *Eur J Pharmacol*, vol. 500, no. 1-3 SPEC. ISS., pp. 351–369, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.ejphar.2004.07.037.

47. D. M. Bautista *et al.*, “TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents,” *Cell*, vol. 124, no. 6, pp. 1269–1282, Mar. 2006, doi: 10.1016/J.CELL.2006.02.023.
48. T. Christoph *et al.*, “Silencing of vanilloid receptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain in vivo,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 350, no. 1, pp. 238–243, Nov. 2006, doi: 10.1016/J.BBRC.2006.09.037.
49. T. Christoph *et al.*, “Antinociceptive effect of antisense oligonucleotides against the vanilloid receptor VR1/TRPV1.,” *Neurochem Int*, vol. 50, no. 1, pp. 281–290, Oct. 2006, doi: 10.1016/J.NEUINT.2006.08.017.
50. K. Y. Kwan *et al.*, “TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction,” *Neuron*, vol. 50, no. 2, pp. 277–289, Apr. 2006, doi: 10.1016/J.NEURON.2006.03.042.
51. E. C. Fernandes, C. Pechincha, L. L. Luz, E. Kokai, P. Szucs, and B. v. Safronov, “Primary afferent-driven presynaptic inhibition of C-fiber inputs to spinal lamina I neurons,” *Prog Neurobiol*, vol. 188, May 2020, doi: 10.1016/J.PNEUROBIO.2020.101786.
52. J. Bouvier *et al.*, “Descending Command Neurons in the Brainstem that Halt Locomotion,” *Cell*, vol. 163, no. 5, pp. 1191–1203, Nov. 2015, doi: 10.1016/J.CELL.2015.10.074.
53. P. Capelli, C. Pivetta, M. S. Esposito, and S. Arber, “Locomotor speed control circuits in the caudal brainstem,” *Nature*, vol. 551, no. 7680, pp. 373–377, Nov. 2017, doi: 10.1038/NATURE24064.
54. J. M. Cregg, R. Leiras, A. Montalant, P. Wanken, I. R. Wickersham, and O. Kiehn, “Brainstem neurons that command mammalian locomotor asymmetries,” *Nat Neurosci*, vol. 23, no. 6, pp. 730–740, Jun. 2020, doi: 10.1038/S41593-020-0633-7.
55. A. J. Murray, K. Croce, T. Belton, T. Akay, and T. M. Jessell, “Balance Control Mediated by Vestibular Circuits Directing Limb Extension or Antagonist Muscle Co-activation,” *Cell Rep*, vol. 22, no. 5, pp. 1325–1338, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.CELREP.2018.01.009.
56. L. Ruder, A. Takeoka, and S. Arber, “Long-Distance Descending Spinal Neurons Ensure Quadrupedal Locomotor Stability,” *Neuron*, vol. 92, no. 5, pp. 1063–1078, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.NEURON.2016.10.032.
57. T. J. Ness and G. F. Gebhart, “Characterization of neuronal responses to noxious visceral and somatic stimuli in the medial lumbosacral spinal cord of the rat,” *J Neurophysiol*, vol. 57, no. 6, pp. 1867–1892, 1987, doi: 10.1152/JN.1987.57.6.1867.
58. N. Eijkelkamp, A. Kavelaars, S. Elsenbruch, M. Schedlowski, G. Holtmann, and C. J. Heijnen, “Increased visceral sensitivity to capsaicin after DSS-induced colitis in mice: spinal cord c-Fos

- expression and behavior,” *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 293, no. 4, Oct. 2007, doi: 10.1152/AJPGI.00114.2007.
59. F. Cervero and J. M. A. Laird, “Understanding the signaling and transmission of visceral nociceptive events,” *J Neurobiol*, vol. 61, no. 1, pp. 45–54, 2004, doi: 10.1002/NEU.20084.
60. M. Lantéri-Minet, P. Isnardon, J. De Pommery, and D. Menétrey, “Spinal and hindbrain structures involved in visceroreception and visceronociception as revealed by the expression of Fos, Jun and Krox-24 proteins,” *Neuroscience*, vol. 55, no. 3, pp. 737–753, 1993, doi: 10.1016/0306-4522(93)90439-M.
61. S. A. Deuchars and V. K. Lall, “Sympathetic preganglionic neurons: properties and inputs,” *Compr Physiol*, vol. 5, no. 2, pp. 829–869, Apr. 2015, doi: 10.1002/CPHY.C140020.
62. S. S. Bertrand and J. R. Cazalets, “Cholinergic partition cells and lamina x neurons induce a muscarinic-dependent short-term potentiation of commissural glutamatergic inputs in lumbar motoneurons,” *Front Neural Circuits*, vol. 5, no. NOV, Nov. 2011, doi: 10.3389/FNCIR.2011.00015.
63. A. Bordey, P. Feltz, and J. Trouslard, “Nicotinic actions on neurones of the central autonomic area in rat spinal cord slices,” *J Physiol*, vol. 497 ( Pt 1), no. Pt 1, pp. 175–187, Nov. 1996, doi: 10.1113/JPHYSIOL.1996.SP021758.
64. A. Bradaïa and J. Trouslard, “Nicotinic receptors regulate the release of glycine onto lamina X neurones of the rat spinal cord,” *Neuropharmacology*, vol. 43, no. 6, pp. 1044–1054, Nov. 2002, doi: 10.1016/S0028-3908(02)00121-1.
65. A. Bradaïa and J. Trouslard, “Fast synaptic transmission mediated by alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in lamina X neurones of neonatal rat spinal cord,” *J Physiol*, vol. 544, no. 3, pp. 727–739, Nov. 2002, doi: 10.1113/JPHYSIOL.2002.028894.
66. R. Seddik, R. Schlichter, and J. Trouslard, “Modulation of GABAergic synaptic transmission by terminal nicotinic acetylcholine receptors in the central autonomic nucleus of the neonatal rat spinal cord,” *Neuropharmacology*, vol. 51, no. 1, pp. 77–89, Jul. 2006, doi: 10.1016/J.NEUROPHARM.2006.03.007.
67. R. Seddik, R. Schlichter, and J. Trouslard, “Corelease of GABA/glycine in lamina-X of the spinal cord of neonatal rats,” *Neuroreport*, vol. 18, no. 10, pp. 1025–1029, Jul. 2007, doi: 10.1097/WNR.0B013E3281667C0C.
68. K. D. Phelan and B. W. Newton, “Intracellular recording of lamina X neurons in a horizontal slice preparation of rat lumbar spinal cord,” *J Neurosci Methods*, vol. 100, no. 1–2, pp. 145–150, Jul. 2000, doi: 10.1016/S0165-0270(00)00247-8.

69. A. Danilov, A. Danilov, A. Barulin, O. Kurushina, and N. Latysheva, "Interdisciplinary approach to chronic pain management," <https://doi.org/10.1080/00325481.2020.1757305>, vol. 132, no. sup3, pp. 5–9, 2020, doi: 10.1080/00325481.2020.1757305.
70. T. Vos *et al.*, "Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016," *The Lancet*, vol. 390, no. 10100, pp. 1211–1259, Sep. 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(17)32154-2.
71. D. S. Goldberg and S. J. McGee, "Pain as a global public health priority," *BMC Public Health*, vol. 11, 2011, doi: 10.1186/1471-2458-11-770.
72. O. Gureje *et al.*, "The relation between multiple pains and mental disorders: results from the World Mental Health Surveys," *Pain*, vol. 135, no. 1–2, pp. 82–91, Mar. 2008, doi: 10.1016/J.PAIN.2007.05.005.
73. P. Mäntyselkä *et al.*, "Pain as a reason to visit the doctor: a study in Finnish primary health care," *Pain*, vol. 89, no. 2–3, pp. 175–180, 2001, doi: 10.1016/S0304-3959(00)00361-4.
74. D. I. Hughes and A. J. Todd, "Central Nervous System Targets: Inhibitory Interneurons in the Spinal Cord," *Neurotherapeutics*, vol. 17, no. 3, pp. 874–885, Jul. 2020, doi: 10.1007/S13311-020-00936-0.
75. M. C. Chiang, E. K. Nguyen, M. Canto-Bustos, A. E. Papale, A.-M. M. Oswald, and S. E. Ross, "Divergent Neural Pathways Emanating from the Lateral Parabrachial Nucleus Mediate Distinct Components of the Pain Response.," *Neuron*, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.neuron.2020.03.014.
76. J. Allard, "Physiological properties of the lamina I spinoparabrachial neurons in the mouse," *Journal of Physiology*, vol. 597, no. 7, pp. 2097–2113, Apr. 2019, doi: 10.1113/JP277447.
77. J. J. DeBerry *et al.*, "Differential Regulation of Bladder Pain and Voiding Function by Sensory Afferent Populations Revealed by Selective Optogenetic Activation," *Front Integr Neurosci*, vol. 12, Feb. 2018, doi: 10.3389/FNINT.2018.00005.
78. K. Agashkov *et al.*, "Distinct mechanisms of signal processing by lamina I spino-parabrachial neurons," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-55462-7.
79. J. M. Cregg, R. Leiras, A. Montalant, P. Wanken, I. R. Wickersham, and O. Kiehn, "Brainstem neurons that command mammalian locomotor asymmetries," *Nature Neuroscience* 2020 23:6, vol. 23, no. 6, pp. 730–740, May 2020, doi: 10.1038/s41593-020-0633-7.
80. T. K. Lapointe and C. Altier, "Channels The role of TRPA1 in visceral inflammation and pain," 2011, doi: 10.4161/chan.5.6.18016.
81. L. A. Zilliox, "Neuropathic Pain," *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*, vol. 23, no. 2. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 512–532, Apr. 2017. doi: 10.1212/CON.0000000000000462.

82. V. A. Maslii, M. Gomon, M. Burkovsky, P. Chornopyshchuk, and V. P. Maslii, “МОДЕЛЬ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОСТХОЛЕЦИСТЕКТОМІЧНОГО БОЛЬОВОГО СИНДРОМУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ,” *Клінічна анатомія та оперативна хірургія*, vol. 21, no. 2, pp. 38–45, May 2022, doi: 10.24061/1727-0847.21.2.2022.21.
83. L. Grundy, A. Erickson, and S. M. Brierley, “Visceral Pain,” *Annu Rev Physiol*, vol. 81, pp. 261–284, Feb. 2019, doi: 10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-020518-114525.
84. O. Karcioglu, H. Topacoglu, O. Dikme, and O. Dikme, “A systematic review of the pain scales in adults: Which to use?,” *Am J Emerg Med*, vol. 36, no. 4, pp. 707–714, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.AJEM.2018.01.008.
85. R. D. Treede *et al.*, “A classification of chronic pain for ICD-11,” *Pain*, vol. 156, no. 6, p. 1003, 2015, doi: 10.1097/J.PAIN.000000000000160.
86. J. M. Dahlhamer *et al.*, “Prevalence of chronic pain and high-impact chronic pain among adults — United States, 2016,” *Morbidity and Mortality Weekly Report*, vol. 67, no. 36. Department of Health and Human Services, pp. 1001–1006, Sep. 2018. doi: 10.15585/mmwr.mm6736a2.
87. C. J. Woolf, “What is this thing called pain?,” *J Clin Invest*, vol. 120, no. 11, p. 3742, Nov. 2010, doi: 10.1172/JCI45178.
88. A. I. Basbaum, D. M. Bautista, G. Scherrer, and D. Julius, “Cellular and molecular mechanisms of pain,” *Cell*, vol. 139, no. 2, pp. 267–284, Oct. 2009, doi: 10.1016/J.CELL.2009.09.028.
89. P. Petrovic, E. Kalso, K. M. Petersson, J. Andersson, P. Fransson, and M. Ingvar, “A prefrontal non-opioid mechanism in placebo analgesia,” *Pain*, vol. 150, no. 1, pp. 59–65, Jul. 2010, doi: 10.1016/J.PAIN.2010.03.011.
90. J. D. Clark, “The pitfalls of profoundly effective analgesic therapies,” *Clin J Pain*, vol. 24, no. 9, pp. 825–831, 2008, doi: 10.1097/AJP.0B013E3181773B7F.
91. J. Goesling, L. A. Lin, and D. J. Clauw, “Psychiatry and Pain Management: at the Intersection of Chronic Pain and Mental Health,” *Curr Psychiatry Rep*, vol. 20, no. 2, p. 12, Feb. 2018, doi: 10.1007/s11920-018-0872-4.
92. N. Hylands-White, R. v Duarte, and J. H. Raphael, “An overview of treatment approaches for chronic pain management,” *Rheumatology International*, vol. 37, no. 1. Springer Verlag, pp. 29–42, Jan. 2017. doi: 10.1007/s00296-016-3481-8.
93. N. B. Finnerup and C. Baastrup, “Spinal Cord Injury Pain: Mechanisms and Management,” *Current Pain and Headache Reports 2012 16:3*, vol. 16, no. 3, pp. 207–216, Mar. 2012, doi: 10.1007/S11916-012-0259-X.
94. P. L. Foley *et al.*, “Prevalence and natural history of pain in adults with multiple sclerosis: Systematic review and meta-analysis,” *Pain*, vol. 154, no. 5, pp. 632–642, May 2013, doi: 10.1016/J.PAIN.2012.12.002.

95. H. Klit, N. B. Finnerup, and T. S. Jensen, "Central post-stroke pain: clinical characteristics, pathophysiology, and management," *Lancet Neurol*, vol. 8, no. 9, pp. 857–868, Sep. 2009, doi: 10.1016/S1474-4422(09)70176-0.
96. R. Aiyer, N. Mehta, S. Gungor, and A. Gulati, "A Systematic Review of NMDA Receptor Antagonists for Treatment of Neuropathic Pain in Clinical Practice," *Clinical Journal of Pain*, vol. 34, no. 5. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 450–467, 2018. doi: 10.1097/AJP.0000000000000547.
97. B. Hong, L. L. Yao, L. Ni, L. Wang, and X. Y. Hu, "Antinociceptive effect of botulinum toxin A involves alterations in AMPA receptor expression and glutamate release in spinal dorsal horn neurons," *Neuroscience*, vol. 357, pp. 197–207, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.06.004.
98. O. Kopach, V. Krotov, J. Goncharenko, and N. Voitenko, "Inhibition of Spinal Ca<sup>2+</sup>-Permeable AMPA Receptors with Dicationic Compounds Alleviates Persistent Inflammatory Pain without Adverse Effects," *Front Cell Neurosci*, vol. 10, no. FEB, Feb. 2016, doi: 10.3389/FNCEL.2016.00050.
99. M. Zhuo, "Ionotropic glutamate receptors contribute to pain transmission and chronic pain," *Neuropharmacology*, vol. 112. Elsevier Ltd, pp. 228–234, Jan. 2017. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.014.
100. F. A. White, H. Jung, and R. J. Miller, "Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 51. pp. 20151–20158, Dec. 2007. doi: 10.1073/pnas.0709250104.
101. C. J. Woolf, P. Shortland, and R. E. Coggeshall, "Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents," *Nature*, vol. 355, no. 6355, pp. 75–78, Jan. 1992, doi: 10.1038/355075a0.
102. A. V. Apkarian *et al.*, "Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density," *Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 46, pp. 10410–10415, Nov. 2004, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2541-04.2004.
103. R. Patel and A. H. Dickenson, "Neuronal hyperexcitability in the ventral posterior thalamus of neuropathic rats: Modality selective effects of pregabalin," *J Neurophysiol*, vol. 116, no. 1, pp. 159–170, Jul. 2016, doi: 10.1152/jn.00237.2016.
104. R. Peyron, "Functional brain imaging: What has it brought to our understanding of neuropathic pain? A special focus on allodynic pain mechanisms," in *Pain*, Lippincott Williams and Wilkins, Feb. 2016, pp. S67–S71. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000387.

105. M. Tsuda, K. Inoue, and M. W. Salter, "Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in 'small' glia.," *Trends Neurosci*, vol. 28, no. 2, pp. 101–107, Feb. 2005, doi: 10.1016/j.tins.2004.12.002.
106. M. Colleoni and P. Sacerdote, "Murine models of human neuropathic pain," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, vol. 1802, no. 10, pp. 924–933, Oct. 2010. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.10.012.
107. Y. Zou *et al.*, "Distinct calcitonin gene-related peptide expression pattern in primary afferents contribute to different neuropathic symptoms following chronic constriction or crush injuries to the rat sciatic nerve," *Mol Pain*, vol. 12, Dec. 2016, doi: 10.1177/1744806916681566.
108. A. Latremoliere and C. J. Woolf, "No Title," vol. 10, no. 9, pp. 895–926, Sep. 2009. doi: 10.1016/j.jpain.2009.06.012.
109. B. L. Kidd and L. A. Urban, "Mechanisms of inflammatory pain," *Br J Anaesth*, vol. 87, no. 1, pp. 3–11, 2001, doi: 10.1093/BJA/87.1.3.
110. M. Lipnik-Stangelj, "Mediators of inflammation as targets for chronic pain treatment," *Mediators Inflamm*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/783235.
111. C. Flohr and J. Mann, "New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis," *Allergy*, vol. 69, no. 1, pp. 3–16, Jan. 2014, doi: 10.1111/ALL.12270.
112. E. V. Loftus and W. J. Sandborn, "Epidemiology of inflammatory bowel disease," *Gastroenterol Clin North Am*, vol. 31, no. 1, pp. 1–20, 2002, doi: 10.1016/S0889-8553(01)00002-4.
113. J. Widdifield *et al.*, "The epidemiology of rheumatoid arthritis in Ontario, Canada," *Arthritis Rheumatol*, vol. 66, no. 4, pp. 786–793, 2014, doi: 10.1002/ART.38306.
114. M. M. Muley, E. Krustev, and J. J. Mcdougall, "Preclinical Assessment of Inflammatory Pain," *CNS Neurosci Ther*, vol. 22, no. 2, pp. 88–101, Feb. 2016, doi: 10.1111/CNS.12486.
115. G. E. Marshall, S. A. S. Shehab, R. C. Spike, and A. J. Todd, "Neurokinin-1 receptors on lumbar spinothalamic neurons in the rat," *Neuroscience*, vol. 72, no. 1, pp. 255–263, May 1996, doi: 10.1016/0306-4522(95)00558-7.
116. H. Liu, P. W. Mantyh, and A. I. Basbaum, "NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors.," *Nature*, vol. 386, no. 6626, pp. 721–724, Apr. 1997, doi: 10.1038/386721a0.
117. K. S. Vikman, B. K. Rycroft, and M. J. Christie, "Switch to Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA and reduced NR2B NMDA receptor-mediated neurotransmission at dorsal horn nociceptive synapses during inflammatory pain in the rat," *J Physiol*, vol. 586, no. Pt 2, p. 515, Jan. 2008, doi: 10.1113/JPHYSIOL.2007.145581.

118. T. Katano *et al.*, “N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) is involved in central sensitization in the spinal cord through GluR2 subunit composition switch after inflammation,” *Eur J Neurosci*, vol. 27, no. 12, pp. 3161–3170, Jun. 2008, doi: 10.1111/J.1460-9568.2008.06293.X.
119. O. Kopach, V. Viatchenko-Karpinski, F. E. Atianjoh, P. Belan, Y. X. Tao, and N. Voitenko, “PKC $\alpha$  is required for inflammation-induced trafficking of extrasynaptic AMPA receptors in tonically firing lamina II dorsal horn neurons during the maintenance of persistent inflammatory pain,” *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*, vol. 14, no. 2, p. 182, Feb. 2013, doi: 10.1016/J.JPAIN.2012.10.015.
120. J. S. Park *et al.*, “Persistent Inflammation Induces GluR2 Internalization via NMDA Receptor-Triggered PKC Activation in Dorsal Horn Neurons,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 29, no. 10, p. 3206, Mar. 2009, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4514-08.2009.
121. O. Kopach, V. Viatchenko-Karpinski, P. Belan, and N. Voitenko, “Development of inflammation-induced hyperalgesia and allodynia is associated with the upregulation of extrasynaptic AMPA receptors in tonically firing lamina II dorsal horn neurons,” *Front Physiol*, vol. 3, 2012, doi: 10.3389/FPHYS.2012.00391.
122. B. Rexed, “The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat,” *J Comp Neurol*, vol. 96, no. 3, pp. 415–495, 1952, doi: 10.1002/CNE.900960303.
123. F. Cervero and J. M. A. Laird, “Understanding the signaling and transmission of visceral nociceptive events,” *J Neurobiol*, vol. 61, no. 1, pp. 45–54, 2004, doi: 10.1002/NEU.20084.
124. N. Eijkelkamp, A. Kavelaars, S. Elsenbruch, M. Schedlowski, G. Holtmann, and C. J. Heijnen, “Increased visceral sensitivity to capsaicin after DSS-induced colitis in mice: spinal cord c-Fos expression and behavior,” *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 293, no. 4, Oct. 2007, doi: 10.1152/AJPGI.00114.2007.
125. M. Lantéri-Minet, P. Isnardon, J. de Pommery, and D. Menétrey, “Spinal and hindbrain structures involved in visceroreception and visceronociception as revealed by the expression of Fos, Jun and Krox-24 proteins,” *Neuroscience*, vol. 55, no. 3, pp. 737–753, 1993, doi: 10.1016/0306-4522(93)90439-M.
126. S. A. Deuchars and V. K. Lall, “Sympathetic preganglionic neurons: properties and inputs,” *Compr Physiol*, vol. 5, no. 2, pp. 829–869, Apr. 2015, doi: 10.1002/CPHY.C140020.
127. S. S. Bertrand and J. R. Cazalets, “Cholinergic partition cells and lamina x neurons induce a muscarinic-dependent short-term potentiation of commissural glutamatergic inputs in lumbar motoneurons,” *Front Neural Circuits*, vol. 5, no. NOV, Nov. 2011, doi: 10.3389/FNCIR.2011.00015.



128. G. Gatto, K. M. Smith, S. E. Ross, and M. Goulding, "Neuronal diversity in the somatosensory system: bridging the gap between cell type and function," *Curr Opin Neurobiol*, vol. 56, pp. 167–174, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.CONB.2019.03.002.
129. J. A. Beal and T. N. Bice, "Neurogenesis of spinothalamic and spinocerebellar tract neurons in the lumbar spinal cord of the rat," *Developmental Brain Research*, vol. 78, no. 1, pp. 49–56, Mar. 1994, doi: 10.1016/0165-3806(94)90008-6.
130. S. A. Prescott and Y. de Koninck, "Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat," *J Physiol*, vol. 539, no. Pt 3, pp. 817–836, Mar. 2002, doi: 10.1113/JPHYSIOL.2001.013437.
131. E. Polgár, D. I. Hughes, J. S. Riddell, D. J. Maxwell, Z. Puskár, and A. J. Todd, "Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain," *Pain*, vol. 104, no. 1–2, pp. 229–239, 2003, doi: 10.1016/S0304-3959(03)00011-3.
132. X. Zhang and G. J. Giesler, "Response characteristics of spinothalamic tract neurons that project to the posterior thalamus in rats," *J Neurophysiol*, vol. 93, no. 5, pp. 2552–2564, May 2005, doi: 10.1152/jn.01237.2004.
133. M. W. Salter and J. L. Henry, "Responses of functionally identified neurones in the dorsal horn of the cat spinal cord to substance P, neurokinin A and physalamin," *Neuroscience*, vol. 43, no. 2–3, pp. 601–610, 1991, doi: 10.1016/0306-4522(91)90319-J.
134. M. L. Nichols *et al.*, "Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor," *Science*, vol. 286, no. 5444, pp. 1558–1561, Nov. 1999, doi: 10.1126/SCIENCE.286.5444.1558.
135. K. M. Al-Khater and A. J. Todd, "Collateral projections of neurons in laminae I, III, and IV of rat spinal cord to thalamus, periaqueductal gray matter, and lateral parabrachial area," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 515, no. 6, pp. 629–646, Aug. 2009, doi: 10.1002/cne.22081.
136. R. C. Spike, Z. Puskár, D. Andrew, and A. J. Todd, "A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord," *European Journal of Neuroscience*, vol. 18, no. 9, pp. 2433–2448, Nov. 2003, doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02981.x.
137. K. S. Al Ghamdi, E. Polgár, and A. J. Todd, "Soma size distinguishes projection neurons from neurokinin 1 receptor-expressing interneurons in lamina I of the rat lumbar spinal dorsal horn," *Neuroscience*, vol. 164, no. 4, p. 1794, Dec. 2009, doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2009.09.071.

138. N. K. Littlewood, A. J. Todd, R. C. Spike, C. Watt, and S. A. S. Shehab, "The types of neuron in spinal dorsal horn which possess neurokinin-1 receptors," *Neuroscience*, vol. 66, no. 3, pp. 597–608, 1995, doi: 10.1016/0306-4522(95)00039-L.
139. C. J. Woodbury, F. A. Kullmann, S. L. McIlwrath, and H. R. Koerber, "Identity of myelinated cutaneous sensory neurons projecting to nociceptive laminae following nerve injury in adult mice," *Journal of Comparative Neurology*, vol. 508, no. 3, pp. 500–509, May 2008, doi: 10.1002/cne.21693.
140. L.-E. Lorenzo, M. Ramien, M. St Louis, Y. de Koninck, and A. Ribeiro-da-Silva, "Postnatal changes in the Rexed lamination and markers of nociceptive afferents in the superficial dorsal horn of the rat.," *J Comp Neurol*, vol. 508, no. 4, pp. 592–604, Jun. 2008, doi: 10.1002/cne.21691.
141. S. N. Lawson, B. A. Crepps, and E. R. Perl, "Relationship of substance P to afferent characteristics of dorsal root ganglion neurones in guinea-pig," *Journal of Physiology*, vol. 505, no. 1, pp. 177–191, Nov. 1997, doi: 10.1111/j.1469-7793.1997.00177.x.
142. A. Dhaka, V. Viswanath, and A. Patapoutian, "Trp ion channels and temperature sensation," *Annu Rev Neurosci*, vol. 29, pp. 135–161, 2006, doi: 10.1146/ANNUREV.NEURO.29.051605.112958.
143. R. P. Seal *et al.*, "Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors," *Nature*, vol. 462, no. 7273, pp. 651–655, Dec. 2009, doi: 10.1038/nature08505.
144. W. D. Snider and S. B. McMahon, "Tackling pain at the source: New ideas about nociceptors," *Neuron*, vol. 20, no. 4. Cell Press, pp. 629–632, 1998. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81003-X.
145. B. K. Taylor, "Spinal inhibitory neurotransmission in neuropathic pain," *Current Pain and Headache Reports*, vol. 13, no. 3. pp. 208–214, 2009. doi: 10.1007/s11916-009-0035-8.
146. G. J. Michael *et al.*, "Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord," *Journal of Neuroscience*, vol. 17, no. 21, pp. 8476–8490, 1997, doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-21-08476.1997.
147. D. E. Clapham, L. W. Runnels, and C. Strübing, "The TRP ion channel family," *Nat Rev Neurosci*, vol. 2, no. 6, pp. 387–396, Jun. 2001, doi: 10.1038/35077544.
148. B. Nilius and G. Owsianik, "The transient receptor potential family of ion channels," *Genome Biol*, vol. 12, no. 3, pp. 1–11, Mar. 2011, doi: 10.1186/GB-2011-12-3-218/TABLES/2.
149. B. Nilius, G. Owsianik, T. Voets, and J. A. Peters, "Transient receptor potential cation channels in disease," *Physiol Rev*, vol. 87, no. 1, pp. 165–217, Jan. 2007, doi: 10.1152/PHYSREV.00021.2006.

150. T. Voets, K. Talavera, G. Owsianik, and B. Nilius, “Sensing with TRP channels,” *Nat Chem Biol*, vol. 1, no. 2, pp. 85–92, 2005, doi: 10.1038/NCHEMBIO0705-85.
151. D. J. Cosens and A. Manning, “Abnormal Electroretinogram from a *Drosophila* Mutant,” *Nature* 1969 224:5216, vol. 224, no. 5216, pp. 285–287, 1969, doi: 10.1038/224285a0.
152. A. Samanta, T. E. T. Hughes, and V. Y. Moiseenkova-Bell, “Transient Receptor Potential (TRP) Channels,” *Subcell Biochem*, vol. 87, p. 141, 2018, doi: 10.1007/978-981-10-7757-9\_6.
153. D. D. McKemy, “How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation,” *Mol Pain*, vol. 1, Apr. 2005, doi: 10.1186/1744-8069-1-16.
154. P. Szűcs, V. Pinto, B. v Safronov, P. Szucs, V. Pinto, and B. v Safronov, “Advanced technique of infrared LED imaging of unstained cells and intracellular structures in isolated spinal cord, brainstem, ganglia and cerebellum,” *J Neurosci Methods*, vol. 177, no. 2, pp. 369–380, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.10.024.
155. B. v Safronov, V. Pinto, and V. A. Derkach, “High-resolution single-cell imaging for functional studies in the whole brain and spinal cord and thick tissue blocks using light-emitting diode illumination,” *J Neurosci Methods*, vol. 164, no. 2, pp. 292–298, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.jneumeth.2007.05.010.
156. E. C. Fernandes, L. L. Luz, O. Mytakhir, N. v Lukoyanov, P. Szucs, and B. v Safronov, “Diverse firing properties and A $\beta$ -, A $\delta$ -, and C-afferent inputs of small local circuit neurons in spinal lamina I,” *Pain*, vol. 157, no. 2, pp. 475–487, Feb. 2016, doi: 10.1097/j.pain.0000000000000394.
157. L. L. Luz, P. Szucs, and B. v Safronov, “Peripherally driven low-threshold inhibitory inputs to lamina I local-circuit and projection neurones: A new circuit for gating pain responses,” *Journal of Physiology*, vol. 592, no. 7, pp. 1519–1534, Apr. 2014, doi: 10.1113/jphysiol.2013.269472.
158. T. V. Bui, T. Akay, O. Loubani, T. S. Hnasko, T. M. Jessell, and R. M. Brownstone, “Circuits for grasping: spinal dI3 interneurons mediate cutaneous control of motor behavior,” *Neuron*, vol. 78, no. 1, p. 191, Apr. 2013, doi: 10.1016/J.NEURON.2013.02.007.
159. D. L. Garcá-Ramrez, J. R. Calvo, S. Hochman, and J. N. Quevedo, “Serotonin, Dopamine and Noradrenaline Adjust Actions of Myelinated Afferents via Modulation of Presynaptic Inhibition in the Mouse Spinal Cord,” *PLoS One*, vol. 9, no. 2, p. 89999, Feb. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0089999.
160. C. A. Hinckley, E. P. Wiesner, G. Z. Mentis, D. J. Titus, and L. Ziskind-Conhaim, “Sensory Modulation of Locomotor-Like Membrane Oscillations in Hb9-Expressing Interneurons,” *J Neurophysiol*, vol. 103, no. 6, p. 3407, Jun. 2010, doi: 10.1152/JN.00996.2009.
161. A. Meyer, B. W. Gallarda, S. Pfaff, and W. Alaynick, “Spinal Cord Electrophysiology,” *J Vis Exp*, vol. 35, no. 35, 2010, doi: 10.3791/1660.

162. J. M. Wilson, E. Blagovechtchenski, and R. M. Brownstone, “Genetically Defined Inhibitory Neurons in the Mouse Spinal Cord Dorsal Horn: A Possible Source of Rhythmic Inhibition of Motoneurons during Fictive Locomotion,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 3, p. 1137, Jan. 2010, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1401-09.2010.
163. J. M. Wilson, A. I. Cowan, and R. M. Brownstone, “Heterogeneous electrotonic coupling and synchronization of rhythmic bursting activity in mouse Hb9 interneurons,” *J Neurophysiol*, vol. 98, no. 4, pp. 2370–2381, Oct. 2007, doi: 10.1152/JN.00338.2007.
164. I. Decosterd and C. J. Woolf, “Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain,” *Pain*, vol. 87, no. 2, pp. 149–158, Aug. 2000, doi: 10.1016/S0304-3959(00)00276-1.
165. M. von Frey, “Untersuchungen über die sinnesfunctionen der menschlichen haut: 1. abhandlung: Druckempfindung und schmerz,” 1896.
166. J. Ferrier, F. Marchand, and D. Balayssac, “Assessment of Mechanical Allodynia in Rats Using the Electronic Von Frey Test,” *Bio Protoc*, vol. 6, no. 18, 2016, doi: 10.21769/BioProtoc.1933.
167. K. Hargreaves, R. Dubner, F. Brown, C. Flores, and J. Joris, “A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia,” *Pain*, vol. 32, no. 1, pp. 77–88, 1988, doi: 10.1016/0304-3959(88)90026-7.
168. V. Krotov *et al.*, “Functional Characterization of Lamina X Neurons in ex-Vivo Spinal Cord Preparation,” *Front Cell Neurosci*, vol. 11, p. 342, Nov. 2017, doi: 10.3389/fncel.2017.00342.
169. K. Kristensson, “Transport of fluorescent protein tracer in peripheral nerves,” *Acta Neuropathol*, vol. 16, no. 4, pp. 293–300, Dec. 1970, doi: 10.1007/BF00686894.
170. C. Köbbert, R. Apps, I. Bechmann, J. L. Lanciego, J. Mey, and S. Thanos, “Current concepts in neuroanatomical tracing,” *Progress in Neurobiology*, vol. 62, no. 4, pp. 327–351, Nov. 2000. doi: 10.1016/S0301-0082(00)00019-8.
171. J. L. Lanciego and F. G. Wouterlood, “A half century of experimental neuroanatomical tracing,” *Journal of Chemical Neuroanatomy*, vol. 42, no. 3, pp. 157–183, Nov. 2011. doi: 10.1016/j.jchemneu.2011.07.001.
172. K. Agashkov *et al.*, “Distinct mechanisms of signal processing by lamina I spino-parabrachial neurons,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-55462-7.
173. E. Neher and B. Sakmann, “Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres.,” *Nature*, vol. 260, no. 5554, pp. 799–802, Apr. 1976.
174. V. Pinto, V. A. Derkach, and B. v. Safronov, “Role of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium channels in Delta- and C-fiber conduction and synaptic transmission,” *J Neurophysiol*, vol. 99, no. 2, pp. 617–628, Feb. 2008, doi: 10.1152/JN.00944.2007.

175. J. Hachisuka, Y. Omori, M. C. Chiang, M. S. Gold, H. Richard Koerber, and S. E. Ross, “Wind-up in lamina I spinoparabrachial neurons: A role for reverberatory circuits,” *Pain*, vol. 159, no. 8, pp. 1484–1493, Aug. 2018, doi: 10.1097/j.pain.0000000000001229.
176. L. L. Luz, P. Szucs, R. Pinho, and B. v Safronov, “Monosynaptic excitatory inputs to spinal lamina I anterolateral-tract-projecting neurons from neighbouring lamina I neurons,” *Journal of Physiology*, vol. 588, no. 22, pp. 4489–4505, Nov. 2010, doi: 10.1113/jphysiol.2010.197012.
177. V. Pinto, P. Szucs, D. Lima, and B. v Safronov, “Multisegmental A $\delta$ - and C-fiber input to neurons in lamina I and the lateral spinal nucleus,” *Journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 6, pp. 2384–2395, Feb. 2010, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3445-09.2010.
178. V. Krotov *et al.*, “Spinal lamina I projection neurons play distinct roles in nociception.,” *Society for Neuroscience meeting 2018, 3-7 November 2018, San Diego, USA*, 2018.
179. D. Andrew, “Quantitative characterization of low-threshold mechanoreceptor inputs to lamina I spinoparabrachial neurons in the rat,” *Journal of Physiology*, vol. 588, no. 1, pp. 117–124, Jan. 2010, doi: 10.1113/jphysiol.2009.181511.
180. V. Krotov, K. Agashkov, M. Krasniakova, B. Safronov, V. Voitenko, and P. Belan, “Lamina I projection neuron outputs in physiological and neuropathic pain conditions,” *11th FENS Forum for Neuroscience, 7-11 July 2018, Berlin, Germany*, 2018.
181. A. L. Zimmerman, E. M. Kovatsis, R. Y. Pozsgai, A. Tasnim, Q. Zhang, and D. D. Ginty, “Distinct Modes of Presynaptic Inhibition of Cutaneous Afferents and Their Functions in Behavior,” *Neuron*, vol. 102, no. 2, pp. 420-434.e8, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.NEURON.2019.02.002.
182. C. Xu *et al.*, “Increasing impacts of extreme droughts on vegetation productivity under climate change,” *Nat Clim Chang*, vol. 9, no. 12, pp. 948–953, Dec. 2019, doi: 10.1038/S41558-019-0630-6.
183. A. Latremoliere and C. J. Woolf, “Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity.,” *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*, vol. 10, no. 9, pp. 895–926, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.jpain.2009.06.012.
184. Y. S. Gwak, J. Kang, J. W. Leem, and C. E. Hulsebosch, “Spinal AMPA receptor inhibition attenuates mechanical allodynia and neuronal hyperexcitability following spinal cord injury in rats.,” *J Neurosci Res*, vol. 85, no. 11, pp. 2352–2359, Aug. 2007, doi: 10.1002/jnr.21379.
185. J.-X. Hao, R. C. Kupers, and X.-J. Xu, “Response characteristics of spinal cord dorsal horn neurons in chronic allodynic rats after spinal cord injury.,” *J Neurophysiol*, vol. 92, no. 3, pp. 1391–1399, 2004, doi: 10.1152/jn.00121.2004.

186. B. C. Hains and S. G. Waxman, "Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury," *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 16, pp. 4308–4317, Apr. 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0003-06.2006.
187. A. Lampert, B. C. Hains, and S. G. Waxman, "Upregulation of persistent and ramp sodium current in dorsal horn neurons after spinal cord injury.," *Exp Brain Res*, vol. 174, no. 4, pp. 660–666, 2006, doi: 10.1007/s00221-006-0511-x.
188. S. Balasubramanian, P. L. Stemkowski, M. J. Stebbing, and P. A. Smith, "Sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons.," *J Neurophysiol*, vol. 96, no. 2, pp. 579–590, 2006, doi: 10.1152/jn.00087.2006.
189. Y. Chen, S. Balasubramanian, A. Y. Lai, K. G. Todd, and P. A. Smith, "Effects of sciatic nerve axotomy on excitatory synaptic transmission in rat substantia gelatinosa.," *J Neurophysiol*, vol. 102, no. 6, pp. 3203–3215, 2009, doi: 10.1152/jn.00296.2009.
190. T. Fukushima, T. Takasusuki, H. Tomitori, and Y. Hori, "Possible involvement of syntaxin 1A downregulation in the late phase of allodynia induced by peripheral nerve injury.," *Neuroscience*, vol. 175, pp. 344–357, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.11.049.
191. P. Inquimbert, K. Bartels, O. B. Babaniyi, L. B. Barrett, I. Tegeder, and J. Scholz, "Peripheral nerve injury produces a sustained shift in the balance between glutamate release and uptake in the dorsal horn of the spinal cord.," *Pain*, vol. 153, no. 12, pp. 2422–2431, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.pain.2012.08.011.
192. X. Yan and H.-R. Weng, "Endogenous interleukin-1 $\beta$  in neuropathic rats enhances glutamate release from the primary afferents in the spinal dorsal horn through coupling with presynaptic N-methyl-D-aspartic acid receptors.," *J Biol Chem*, vol. 288, no. 42, pp. 30544–30557, Oct. 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.495465.
193. J. Sandkühler, "Understanding LTP in pain pathways.," *Mol Pain*, vol. 3, p. 9, Jan. 2007, doi: 10.1186/1744-8069-3-9.
194. J. Scholz and C. J. Woolf, "The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia.," *Nat Neurosci*, vol. 10, no. 11, pp. 1361–1368, Nov. 2007, doi: 10.1038/nn1992.
195. W. Xie, J. A. Strong, J. T. A. Meij, J.-M. Zhang, and L. Yu, "Neuropathic pain: early spontaneous afferent activity is the trigger.," *Pain*, vol. 116, no. 3, pp. 243–256, Aug. 2005, doi: 10.1016/j.pain.2005.04.017.
196. R. Ruscheweyh, H. Ikeda, B. Heinke, and J. Sandkühler, "Distinctive membrane and discharge properties of rat spinal lamina I projection neurones in vitro," *Journal of Physiology*, vol. 555, no. 2, pp. 527–543, Mar. 2004. doi: 10.1113/jphysiol.2003.054049.

197. B. Duan, L. Cheng, and Q. Ma, “Spinal Circuits Transmitting Mechanical Pain and Itch,” *Neuroscience Bulletin*, vol. 34, no. 1. Springer, pp. 186–193, Feb. 2018. doi: 10.1007/s12264-017-0136-z.
198. B. Duan *et al.*, “Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain,” *Cell*, vol. 159, no. 6, pp. 1417–1432, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.11.003.
199. J. Hachisuka, K. M. Baumbauer, Y. Omori, L. M. Snyder, H. R. Koerber, and S. E. Ross, “Semi-intact ex vivo approach to investigate spinal somatosensory circuits,” *Elife*, vol. 5, Dec. 2016, doi: 10.7554/eLife.22866.
200. J. Li and M. L. Bacceti, “Functional organization of cutaneous and muscle afferent synapses onto immature spinal lamina I projection neurons,” *Journal of Neuroscience*, vol. 37, no. 6, pp. 1505–1517, Feb. 2017, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3164-16.2016.
201. V. Krotov, A. Tokhtamysh, B. v Safronov, P. Belan, and N. Voitenko, “High-threshold primary afferent supply of spinal lamina X neurons,” *Pain*, vol. 160, no. 9, pp. 1982–1988, Sep. 2019, doi: 10.1097/j.pain.0000000000001586.
202. N. Baseer, A. S. Al-Baloushi, M. Watanabe, S. A. S. Shehab, and A. J. Todd, “Selective innervation of NK1 receptor-lacking lamina I spinoparabrachial neurons by presumed nonpeptidergic Ad nociceptors in the rat,” *Pain*, vol. 155, no. 11, pp. 2291–2300, 2014, doi: 10.1016/j.pain.2014.08.023.
203. E. Polgár, L. L. Wright, and A. J. Todd, “A quantitative study of brainstem projections from lamina I neurons in the cervical and lumbar enlargement of the rat,” *Brain Res*, vol. 1308, pp. 58–67, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.brainres.2009.10.041.
204. A. J. Todd, Z. Puskár, R. C. Spike, C. Hughes, C. Watt, and L. Forrest, “Projection Neurons in Lamina I of Rat Spinal Cord with the Neurokinin 1 Receptor Are Selectively Innervated by Substance P-Containing Afferents and Respond to Noxious Stimulation,” *Journal of Neuroscience*, vol. 22, no. 10, pp. 4103–4113, May 2002, doi: 10.1523/jneurosci.22-10-04103.2002.
205. D. Andrew and A. D. Craig, “Quantitative responses of spinothalamic lamina I neurones to graded mechanical stimulation in the cat,” *Journal of Physiology*, vol. 545, no. 3. pp. 913–931, Dec. 2002. doi: 10.1113/jphysiol.2002.027342.
206. E. C. Fernandes, I. C. Santos, E. Kokai, L. L. Luz, P. Szucs, and B. v Safronov, “Low-and high-threshold primary afferent inputs to spinal lamina III antenna-type neurons,” *Pain*, vol. 159, no. 11, pp. 2214–2222, 2018, doi: 10.1097/j.pain.0000000000001320.
207. C. J. Woolf and M. Fitzgerald, “Somatotopic organization of cutaneous afferent terminals and dorsal horn neuronal receptive fields in the superficial and deep laminae of the rat lumbar spinal

- cord,” *Journal of Comparative Neurology*, vol. 251, no. 4, pp. 517–531, 1986, doi: 10.1002/cne.902510407.
208. C. Gauriau and J. F. Bernard, “Pain pathways and parabrachial circuits in the rat,” *Exp Physiol*, vol. 87, no. 2, pp. 251–258, 2002, doi: 10.1113/eph8702357.
  209. C. Peirs and R. P. Seal, “Neural circuits for pain: Recent advances and current views,” *Science*, vol. 354, no. 6312. American Association for the Advancement of Science, pp. 578–584, Nov. 2016. doi: 10.1126/science.aaf8933.
  210. P. Schweinhardt and M. C. Bushnell, “Pain imaging in health and disease - How far have we come?,” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, no. 11. pp. 3788–3797, Nov. 2010. doi: 10.1172/JCI43498.
  211. K. M. Al-Khater, R. Kerr, and A. J. Todd, “A quantitative study of spinothalamic neurons in laminae I, III, and IV in lumbar and cervical segments of the rat spinal cord,” *J Comp Neurol*, vol. 511, no. 1, p. 1, Nov. 2008, doi: 10.1002/CNE.21811.
  212. K. M. Al-Khater, R. Kerr, and A. J. Todd, “A quantitative study of spinothalamic neurons in laminae I, III and IV in lumbar and cervical segments of the rat spinal cord,” *Journal of Comparative Neurology*, vol. 511, no. 1, pp. 1–18, Nov. 2008, doi: 10.1002/cne.21811.
  213. R. Burstein, R. J. Dado, and G. J. Giesler, “No Title,” vol. 511, no. 2, Mar. 1990, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2334851>
  214. “Scopus preview - Scopus - Document details - Sensitization of lamina I spinoparabrachial neurons parallels heat hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain.” <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-65549132753&origin=inward&txGid=b641093341e469f02e3fc7de3f8c2ec1> (accessed Apr. 12, 2023).
  215. D. Andrew and J. D. Greenspan, “Modality-specific hyper-responsivity of regenerated cat cutaneous nociceptors,” *J Physiol*, vol. 516, no. Pt 3, p. 897, May 1999, doi: 10.1111/J.1469-7793.1999.0897U.X.
  216. S. J. West, K. Bannister, A. H. Dickenson, and D. L. Bennett, “Circuitry and plasticity of the dorsal horn – Toward a better understanding of neuropathic pain,” *Neuroscience*, vol. 300, pp. 254–275, Aug. 2015, doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.05.020.
  217. M. Cachemaille, C. J. Laedermann, M. Pertin, H. Abriel, R. D. Gosselin, and I. Decosterd, “Neuronal expression of the ubiquitin ligase Nedd4-2 in rat dorsal root ganglia: Modulation in the spared nerve injury model of neuropathic pain,” *Neuroscience*, vol. 227, pp. 370–380, Dec. 2012, doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2012.09.044.



218. K. Inoue and M. Tsuda, “Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential,” *Nature Reviews Neuroscience* 2018 19:3, vol. 19, no. 3, pp. 138–152, Feb. 2018, doi: 10.1038/nrn.2018.2.
219. R. R. Ji, T. Berta, and M. Nedergaard, “Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy?,” *Pain*, vol. 154, no. SUPPL. 1, pp. S10–S28, Dec. 2013, doi: 10.1016/J.PAIN.2013.06.022.
220. D. Bouhassira, M. Lantéri-Minet, N. Attal, B. Laurent, and C. Touboul, “Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population,” *Pain*, vol. 136, no. 3, pp. 380–387, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.pain.2007.08.013.
221. R. L. Nahin, A. M. Madsen, and G. J. Giesler, “Anatomical and physiological studies of the gray matter surrounding the spinal cord central canal,” *J Comp Neurol*, vol. 220, no. 3, pp. 321–335, 1983, doi: 10.1002/CNE.902200306.
222. C. N. Honda, “Visceral and somatic afferent convergence onto neurons near the central canal in the sacral spinal cord of the cat,” *J Neurophysiol*, vol. 53, no. 4, pp. 1059–1078, 1985, doi: 10.1152/JN.1985.53.4.1059.
223. C. N. Honda and E. R. Perl, “Functional and morphological features of neurons in the midline region of the caudal spinal cord of the cat,” *Brain Res*, vol. 340, no. 2, pp. 285–295, Aug. 1985, doi: 10.1016/0006-8993(85)90925-4.
224. V. Krotov, A. Tokhtamysh, B. V. Safronov, P. Belan, and N. Voitenko, “High-threshold primary afferent supply of spinal lamina X neurons,” *Pain*, vol. 160, no. 9, pp. 1982–1988, Sep. 2019, doi: 10.1097/J.PAIN.0000000000001586.
225. A. E. Stepien, M. Tripodi, and S. Arber, “Monosynaptic rabies virus reveals premotor network organization and synaptic specificity of cholinergic partition cells,” *Neuron*, vol. 68, no. 3, pp. 456–472, Nov. 2010, doi: 10.1016/J.NEURON.2010.10.019.
226. R. Ruscheweyh, H. Ikeda, B. Heinke, and J. Sandkühler, “Distinctive membrane and discharge properties of rat spinal lamina I projection neurones in vitro,” *J Physiol*, vol. 555, no. Pt 2, pp. 527–543, Mar. 2004, doi: 10.1113/JPHYSIOL.2003.054049.
227. A. R. Light and E. R. Perl, “Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers,” *J Comp Neurol*, vol. 186, no. 2, pp. 133–150, 1979, doi: 10.1002/CNE.901860203.
228. C. Morgan, I. Nadelhaft, and W. C. de Groat, “The distribution of visceral primary afferents from the pelvic nerve to Lissauer’s tract and the spinal gray matter and its relationship to the sacral parasympathetic nucleus,” *J Comp Neurol*, vol. 201, no. 3, pp. 415–440, 1981, doi: 10.1002/CNE.902010308.

229. Y. Sugiura, N. Terui, and Y. Hosoya, "Difference in distribution of central terminals between visceral and somatic unmyelinated (C) primary afferent fibers," *J Neurophysiol*, vol. 62, no. 4, pp. 834–840, 1989, doi: 10.1152/JN.1989.62.4.834.
230. C. N. Honda and C. L. Lee, "Immunohistochemistry of synaptic input and functional characterizations of neurons near the spinal central canal," *Brain Res*, vol. 343, no. 1, pp. 120–128, Sep. 1985, doi: 10.1016/0006-8993(85)91165-5.
231. K. Seki, S. I. Perlmutter, and E. E. Fetzi, "Sensory input to primate spinal cord is presynaptically inhibited during voluntary movement," *Nat Neurosci*, vol. 6, no. 12, pp. 1309–1316, Dec. 2003, doi: 10.1038/NN1154.
232. M. Fitzgerald and M. Koltzenburg, "The functional development of descending inhibitory pathways in the dorsolateral funiculus of the newborn rat spinal cord," *Brain Res*, vol. 389, no. 1–2, pp. 261–270, 1986, doi: 10.1016/0165-3806(86)90194-X.
233. Y. Lin and D. O. Carpenter, "Medial vestibular neurons are endogenous pacemakers whose discharge is modulated by neurotransmitters," *Cell Mol Neurobiol*, vol. 13, no. 6, pp. 601–613, Dec. 1993, doi: 10.1007/BF00711560.
234. S. J. Gibson, J. M. Polak, S. R. Bloom, and P. D. Wall, "The distribution of nine peptides in rat spinal cord with special emphasis on the substantia gelatinosa and on the area around the central canal (lamina X)," *J Comp Neurol*, vol. 201, no. 1, pp. 65–79, 1981, doi: 10.1002/CNE.902010106.
235. J. C. G. Marvizón, W. Chen, and N. Murphy, "Enkephalins, dynorphins, and beta-endorphin in the rat dorsal horn: an immunofluorescence colocalization study," *J Comp Neurol*, vol. 517, no. 1, pp. 51–68, 2009, doi: 10.1002/CNE.22130.
236. P. Punnakkal, C. von Schoultz, K. Haenraets, H. Wildner, and H. U. Zeilhofer, "Morphological, biophysical and synaptic properties of glutamatergic neurons of the mouse spinal dorsal horn," *J Physiol*, vol. 592, no. Pt 4, p. 759, Feb. 2014, doi: 10.1113/JPHYSIOL.2013.264937.
237. B. Graham and R. J. Callister, "Pain," *The Mouse Nervous System*, pp. 589–606, Jan. 2012, doi: 10.1016/B978-0-12-369497-3.10023-8.
238. Y. Liu *et al.*, "Touch and tactile neuropathic pain sensitivity are set by corticospinal projections," *Nature*, vol. 561, no. 7724, pp. 547–550, Sep. 2018, doi: 10.1038/S41586-018-0515-2.

## ДОДАТКИ

### ДОДАТОК А

#### НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІ

1. Agashkov K, Krotov V, **Krasniakova M**, Shevchuk D, Andrianov Y, Zabenko Y, Safronov BV, Voitenko N, Belan P. (2019) Distinct mechanisms of signal processing by lamina I spino-parabrachial neurons. *Sci Rep.* 2019 Dec 17;9(1):19231. PMID: 31848358 (Q1)
2. Krotov V, Agashkov K, **Krasniakova M**, Safronov B, Belan P, Voitenko N. (2022) Segmental and descending control of primary afferent input to the spinal lamina X. *PAIN* 2022 Jan 31; doi: 10.1097/j.pain.0000000000002597 (Q1)
3. Krotov, Volodymyr & Agashkov, Kirill & Romanenko, Sergii & Koroid, Kostiantyn & **Krasniakova, Marharyta** & Belan, Pavel & Voitenko, Nana. (2023). Neuropathic pain changes the output of rat lamina I spino-parabrachial neurons. *BBA Advances.* 3. 100081. 10.1016/j.bbadv.2023.100081.

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

4. Agashkov K., Krotov V., **Krasniakova M.**, Shevchuk D., Safronov B., Belan P., Voitenko N. New approaches in studies of molecular mechanisms of spinal cord neuronal signaling. 8th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology, 18-21 June, 2017, Kosice, Slovakia
5. Agashkov K., Krotov V., **Krasniakova M.**, Safronov B., Voitenko V., Belan P. Subpopulation of C-fiber-activated lamina I projection neurons with unique input-output characteristics for NMDAR-dependent nociceptive coding, Polish Society for Neuroscience Meeting, 28-31 August 2017, Warsaw, Poland

6. Agashkov K., Krotov V., Rula H., **Krasniakova M.**, Shevchuk O., Liashenko A., Safronov B., Voitenko N., Belan P. Specific C-fiber-activated lamina I projection neurons as major contributor of acute nociceptive transmission. III International School in Biomedical Sciences “Cell Function in Health and Disease”, Kyiv- Lutsk, Ukraine, 17-22 September 2017

7. Krotov V., Agashkov K., **Krasniakova M.**, Safronov B.V., Voitenko N., Belan P. Lamina I projection neuron outputs in physiological and neuropathic pain conditions. 11th FENS Forum for Neuroscience, 7-11 July 2018, Berlin, Germany

8. Voitenko N., Agashkov K., Krotov V., **Krasniakova M.**, Zaben Y., Safronov B., Belan P. Spinal lamina I projection neurons play distinct roles in nociception. Society for Neuroscience meeting 2018, 3-7 November 2018, San Diego, USA

9. **Краснякова М. Є.** (2023). Регуляція больової сигналізації поперекового відділу спинного мозку щурів. Матеріали XX наукової конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Перший крок в науку-2023», Вінниця, 21-22 квітня 2023 р., Вінниця: Міністерство охорони здоров'я України, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

### **АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ**

- Society for Neuroscience meeting 2018, 3-7 November 2018, San Diego, USA – постерна доповідь, публікація.
- 11-th FENS Forum for Neuroscience, 7-11 July 2018, Berlin, Germany – постерна доповідь, публікація.
- III International School in Biomedical Sciences “Cell Function in Health and Disease”, Kyiv- Lutsk, Ukraine, 17-22 September 2017 – постерна доповідь.
- Polish Society for Neuroscience Meeting, 28-31 August 2017, Warsaw, Poland – постерна доповідь, публікація.
- 8th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology, 18-21 June, 2017, Kosice, Slovakia – постерна доповідь, публікація.

- XX наукова конференція студентів та молодих вчених «Перший крок в науку-2023» (21-22 квітня 2023 р.) Вінниця, Україна – публікація, стендова доповідь.

ДОДАТОК Б  
Акти впровадженнь  
Додаток Б1



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор  
з науково-педагогічної роботи  
Львівського національного  
медичного університету  
імені Данила Галицького

І.Б.в., доцент

*[Signature]*  
Солонинко Ірина Іллівна

«29» 03 2023р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Функціональні зміни/функціонування нейронної мережі спинного мозку при хронічному болю
2. **Заклад, що розробив, його поштова адреса:** Вінницький національний університет ім. М.І. Пирогова, МОЗ України, м.Вінниця, вул. Пирогова, 56, 21018
3. **Прізвище, ім'я по батькові автора:** Краснякова Маргарита Євгенівна.
4. **Джерело інформації:** Volodymyr Krotov; Kirill Agashkov; Sergii Romanenko; Kostiantyn Koroid; Marharyta Krasniakova; Pavel Belan; Nana Voitenko.(2023) Neuropathic pain changes the output of rat laminate I spinoparabrachial neurons. BVA Advances 2023.
5. **Назва установи, яка проводить впровадження:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького.
6. **Впроваджено:** в навчальний процес кафедри нормальної фізіології.
7. **Термін впровадження:** січень - березень 2023 р.
8. **Результат впровадження:** вперше підтверджено, що спинномозково-парабрахіальні нейрони I пластинки спинного мозку в умовах хронічного болю приймають роль у формуванні таких феноменів, як гіпералгезія та алодинія.
9. **Ефективність впровадження:** поглиблення знань про організацію спинного мозку і його функції в умовах хронічного больового синдрому.
10. **Зауваження та пропозиції організації, що впровадила розробку:** не має.

Відповідальний за впровадження

*[Signature]*

доцент Мар'яна Савицька

## Додаток Б2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»  
Проректор ЗВО з наукової роботи  
Тернопільського національного медичного  
університету імені І. Горбачевського МОЗ України  
Заслужений діяч науки і техніки України,  
доктор біологічних наук, професор ЗВО



Іван КЛІЩ  
квітня 2023 р.

АКТ

### ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: Функціональні зміни нейронної мережі І пластинки спинного мозку при хронічному болю.
2. Заклад, що розробив, його поштова адреса: Вінницький національний університет ім. М.І. Пирогова, МОЗ України, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, 21018.
3. Прізвище, ім'я по батькові автора: Чайковська Ольга Валеріївна.  
Джерела інформації: Volodymyr Krotov; Kirill Agashkov; Sergii Romanenko; Kostiantyn Koroid; Mariyeta Krasniakova; Pavel Belan; Nana Vcitenko.(2023) Neuropathic pain changes the output of rat laminate I spino-parabrachial neurons. BBA Advances 2023.
4. Назва установи, яка проводить впровадження: Тернопільський національний медичний університет імені І. Горбачевського
5. Впроваджено: в навчальний процес кафедри фізіології з основами бісетики та безпеки
6. Термін впровадження: лютий 2023 – квітень 2023 р.
7. Ефективність впровадження вперше підтверджено, що спинномозково-парабрахіальні нейрони І пластинки спинного мозку в умовах хронічного болю приймають роль у формуванні алодинії та гіпералгезії.
8. Зауваження та пропозиції організації, що впровадила розробку: не має.
9. Відповідальний за впровадження: доц. Оксана РАТИНСЬКА.

Завідувач кафедри фізіології з основами бісетики та безпеки  
Тернопільського національного медичного  
університету імені І. Горбачевського,  
заслужений діяч науки і техніки України  
д-р. мед. наук, професор



Степан ВАДЗІЮК



## Додаток БЗ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»  
Ректор Приватного закладу  
вищої освіти «Академія Добробут»  
професор, доктор біологічних наук

  
ВОЙТЕНКО Нана Володимирівна  
«25» січня 2023 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** пластинка X залучена у регуляцію больової сигналізації.
2. **Заклад, що розробив, його поштова адреса:** Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця, НАН України, м. Київ, вул. Богомольця, 4а, 01024.
3. **Прізвище, ім'я по батькові автора:** Краснякова Маргарита Свгенівна.
4. **Джерело інформації:** Krotov V, Agashkov K, Krasniakova M, Safronov B, Belan P, Voitenko N. (2022) Segmental and descending control of primary afferent input to the spinal lamina X. PAIN 2022 Jan 31; doi: 10.1097/j.pain.0000000000002597 (Q1).
5. **Назва установи, яка проводить впровадження:** Приватний заклад вищої освіти «Академія Добробут».
6. **Впроваджено:** в навчальний процес.
7. **Термін впровадження:** з листопада 2022 року по січень 2023 року.
8. **Результат впровадження:** стало відомим, що нейрони пластинки X регулюються пресинаптично на сегментарному рівні від гомо- і гетеросегментарних первинних аферентів та на супраспинальному рівні.
9. **Ефективність впровадження:** поглиблення знань про організацію спинного мозку і його функції.
10. **Зауваження та пропозиції організації, що впровадила розробку:** не має.

Відповідальний  
за впровадження



д.м.н., професор Дмитро ШКУРУПІЙ



## Додаток Б4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»  
Проректор ЗВО з науково-педагогічної  
та лікувальної роботи  
Вінницького національного  
медичного університету  
ім. М.І. Пирогова МОЗ України  
професор Василь ПОГОРІЛИЙ  
2023



### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: новітні дані про залучення нейронів X пластинки спинного мозку у регуляцію больової сигналізації шляхом пресинаптичного впливу від гомо- та гетеросегментарних первинних аферентів.
2. Заклад, що розробив, його поштова адреса: Вінницький національний університет ім. М.І. Пирогова, МОЗ України, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, 21018.
3. Прізвище, ім'я по батькові автора: Краснякова Маргарита Євгенівна.
4. Джерело інформації: Krotov V, Agashkov K, Krasniakova M, Safronov V, Belan P, Voitenko N. (2022) Segmental and descending control of primary afferent input to the spinal lamina X. PAIN 163(10):p 2014-2020, October 2022; doi: 10.1097/j.pain.0000000000002597 (Q1)
5. Назва установи, яка проводить впровадження: Вінницький національний університет ім. М.І. Пирогова, МОЗ України, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, 21018.
6. Впроваджено: в навчальний процес кафедри нормальної фізіології.
7. Термін впровадження: з листопада 2022 по лютий 2023 року.
8. Результат впровадження: Поглиблення знань про регуляцію больової сигналізації на сегментарному рівні, розширення уявлень про функції пластинок спинного мозку.
9. Ефективність впровадження: підвищення ефективності навчання з використанням прикладів сучасних нейрофізіологічних досліджень.
10. Зауваження та пропозиції організації, що впровадила розробку: не має.
11. Відповідальна за впровадження: доц. Оксана ОМЕЛЬЧЕНКО

Завідувач кафедри нормальної фізіології

професор *М. Йолтухівський* Михайло ЙОЛТУХІВСЬКИЙ