

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

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

Агашков Кирило Сергійович

УДК 612.812:611.813.14

**ДИСЕРТАЦІЯ**

Клітинні й мережеві механізми обробки ноцицептивних сигналів у  
спинному мозку та їх генно-інженерне модулювання як засіб терапії

хронічного больового синдрому.

14.03.04 – Патологічна фізіологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

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

Науковий керівник: Войтенко Нана Володимирівна, доктор біологічних  
наук, професор

Київ – 2020

## АНОТАЦІЯ

*Агашков К.С.* Клітинні й мережеві механізми обробки ноцицептивних сигналів у спинному мозку та їх генно-інженерне модулювання як засіб терапії хронічного больового синдрому.. – Рукопис

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

Дисертація присвячена дослідженню функціонування мережі нейронів дорзального рогу спинного мозку та їх внеску в обробку та передачу ноцицептивного сигналу до супраспінальних структур. В роботі вперше була встановлена роль різних типів спіно-парабрахіальних нейронів (СПН) I-ої пластинки дорзального рогу в передачі специфічної ноцицептивної інформації та виявлено молекулярні та клітинні механізми, що лежать в основі цієї специфічності. В даному дослідженні також вперше було показано, що зміна або модулювання фенотипу нейронів дорзального рогу за допомогою генетичних модифікацій призводить до суттєвих змін у активності мережі цих нейронів. При периферичній нейропатії цілеспрямована зміна фенотипу нейронів призводила до повного зникнення нейропатичного болю.

Незважаючи на свою малочисельність, СПН I-ої пластинки спинного мозку відіграють ключову роль в обробці больових сигналів та є майже виключною групою клітин, що передають ці сигнали зі спинного до головного мозку. Хоча відповідь СПН на стимуляцію шкірного рецепторного поля інтенсивно вивчалася на протязі десятиліть, відсутність необхідних методів та підходів не дозволяла досліджувати механізми обробки вхідних аферентних сигналів цими нейронами в структурі нативних препаратів спинного мозку. Тому, в даній роботі, для визначення молекулярних та клітинних механізмів, які приймають участь у спряженні вхідних та

вихідних сигналів у СПН шурів, був використаний новий цілісний препарат спинного мозку, який дозволяє проводити досліди з непошкодженими клітинами та забезпечує цілісність мережевих зав'язків у дорзальному розі. Нами було встановлено, що більшість СПН отримують невелику кількість прямих ноцицептивних входів від С-волокон та генерують один потенціал дії у відповідь на супрамаксимальний аферентний стимул, таким чином виконують роль простого передавача сигналів від первинних аферентів. Однак, 69% всіх потенціалів дії, що індуковані аферентною стимуляцією у всій популяції СПН, походять від малої фракції (19%) нейронів. Ці нейрони отримують велику кількість прямих входів від Аδ та С-волокон, генерують потужні групи ПД у відповідь на стимуляцію первинних аферентів, та ефективно інтегрують локальну мережеву активність за допомогою NMDA-залежних механізмів. Ми встановили, що вони підсилюють та інтегрують ноцицептивний вхідний сигнал, кодуючи його інтенсивність шляхом збільшення кількості згенерованих ПД.

Локальні збуджуючі та гальмівні нейрони дорзального рогу спинного мозку приймають участь у спінальній обробці больових сигналів. Екзогенно-індукована зміна збуджуючого нейротрансмітерного фенотипу збуджуючих нейронів на гальмівний є чудовою можливістю для зміни балансу між збудженням та гальмуванням у мережі нейронів дорзального рогу в сторону гальмування. Такий підхід міг би суттєво знизити загальну активність мережі нейронів, що збільшується при розвитку нейропатичного болю. Однак, цей підхід ще не був випробуваний експериментально. В цій роботі ми використовували субпіальну доставку вірусних векторів в дорзальний ріг спинного мозку мишей. Ці вектори базуються на використанні аденоасоційованих вірусів (ААВ), які несуть гени глутаматдекарбоксилази (ГДК) та везикулярного транспортеру ГАМК. Таким чином, локальні збуджуючі нейрони, що були заражені даними вірусами, починали синтезувати та виділяти гальмівний медіатор ГАМК. В

результаті введення вірусних конструктів спостерігалось суттєве зменшення (в 2,5 рази) больової механочутливості контрольних мишей. На клітинному рівні, у нейронах дорзального рогу було показано загальне зменшення збуджуючої синаптичної активності, збільшення гальмівної синаптичної активності, зменшення мережевої активності та зменшення вірогідності виникнення потенціалів дії у відповідь на стимуляцію дорзальних корінців. Введення вірусних конструктів у спинний мозок мишей з пошкодженим сідничним нервом, призводило до повного зникнення нейропатичного болю при відсутності побічних ефектів.

Таким чином, в роботі були встановлені важливі клітинні механізми, що приймають участь у обробці ноцицептивних сигналів у дорзальному розі спинного мозку та апробовано новітній терапевтичний підхід, що може бути використаний в терапії хронічного болю.

**Ключові слова:** спинний мозок, проєкційні нейрони дорзального рогу, збуджуючі та гальмівні постсинаптичні струми, NMDA-рецептори, аденоасоційовані віруси, хронічний біль.

*Agashkov K.S. Cellular and network mechanisms of nociceptive signal processing in the spinal cord and genetically engineered modification as a novel tool for a treatment of neuropathic pain syndrome.. - Manuscript*

A dissertation submitted to acquire the degree of Candidate of Science in Medicine (PhD), specialty – 14.03.04 – Pathological Physiology – Bogomoletz Institute of Physiology NASU, Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to the study of the functioning of the neuronal networks of the dorsal horn of the spinal cord and their contribution to the processing and transmission of nociceptive signals to supraspinal structures. For the first time, the role of different types of spino-parabrachial neurons (SPN) of the lamina I in the transmission of specific nociceptive information was established and the molecular and cellular mechanisms underlying this specificity were identified. This study also

showed for the first time that alteration or modulation of the phenotype of the dorsal horn neurons by genetic modification leads to significant changes in the activity of the network of these neurons. With peripheral neuropathy, a purposeful change in the phenotype led to the complete disappearance of signs of neuropathic pain.

In spite of the small size of the population, lamina I SPN's play a key role in the processing of pain signals and is an almost exclusive group of cells that transmit nociceptive signals from the spinal cord to the brain. Although the response of SPN to the stimulation of the skin receptor field has been extensively studied for decades, the lack of necessary methods and approaches did not allow us to investigate the mechanisms of processing of afferent input by these neurons in the structure of native spinal cord preparations. Therefore, in this work, to identify the molecular and cellular mechanisms involved in the coupling of input and output signals in rat lamina I SPN, a novel whole spinal cord preparation was used, which allows experiments with intact cells and ensures the integrity of network connections in the dorsal corner. We found that most SPNs receive a small number of direct nociceptive inputs from C-fibers and generate one action potential in response to a saturating afferent stimulus, thus acting as a simple signal transmitter from the primary afferents. However, 69% of all action potentials induced by afferent stimulation in the entire population of SPN originate from a small fraction (19%) of neurons. These neurons receive a large number of direct inputs from A $\delta$  and C fibers, generate powerful bursts of AP's in response to stimulation of primary afferents, and effectively integrate local network activity through NMDA-dependent mechanisms. We have found that they amplify and integrate the nociceptive input signal, encoding its intensity by increasing the number of APs they generate.

Local excitatory and inhibitory neurons of the dorsal horn of the spinal cord are involved in the spinal processing of pain signals. The exogenously induced change of the excitatory neurotransmitter phenotype of excitatory neurons on the inhibitory is a great opportunity to change the balance between excitation and inhibition in the network of the dorsal horn neurons toward inhibition. Such an

approach could significantly reduce the overall activity of the neuronal network, which increases with the development of neuropathic pain. However, this approach has not yet been tested experimentally. In this work, we used subpial delivery of viral vectors to the dorsal horn of the spinal cord of mice. These vectors are based on the use of capsides of adeno-associated viruses (AAVs), which carry the genes glutamate decarboxylase (GAD65) and vesicular GABA transporter (VGAT). Thus, local excitatory neurons that were infected with these viruses began to synthesize and secrete the inhibitory GABA transmitter. As a result of the introduction of high concentrations of viral constructs, there was a significant (2.5-fold) decrease in the pain mechanosensitivity of control mice. At the cellular level, dorsal horn neurons showed a general decrease in excitatory synaptic activity, an increase in inhibitory synaptic activity, a decrease in network activity, and a decrease in the likelihood of evoked action potentials in response to stimulation of dorsal roots. The introduction of viral constructs at low concentration in the spinal cord of mice with damaged sciatic nerve, led to complete disappearance of neuropathic pain symptoms in the absence of side effects.

Thus, the paper identified important mechanisms involved in the processing of nociceptive signals in the dorsal spinal cord and tested a novel therapeutic approach that can be used in the treatment of chronic neuropathic pain.

Keywords: spinal cord, dorsal horn projection neurons, excitatory and inhibitory postsynaptic currents, NMDA receptors., Adeno-associated viruses

## **СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:**

**в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

**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)

Shevchuk DP, **Agashkov KS**, Bilan PV, Voitenko NV. (2017) *Spontaneous Synaptic Activity in Projection Neurons of Lamina I of the Isolated Rat Lumbar Spinal Cord: Effect of Peripheral Inflammation*. Neurophysiology, Vol. 49, No. 4, 301-304.

**які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

**Agashkov K.**, Krotov V., Krasniakova M., Shevchuk D., Safronov B., Voitenko V., Belan P. *Specific subpopulation of C-fiber-activated lamina I projection neurons with unique characteristics for acute nociceptive coding*, VII Конгрес Українського Товариства Нейронаук, 7-11 червня 2017, Київ, Україна

**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

**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

**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

**Agashkov K.**, Krotov V., Krasniakova M., Safronov B., Voitenko V., Belan P. *Encoding of acute nociception by specific population of lamina I projection neurons*, Neuroscience 2017, 11-15 November 2017, Washington DC, USA

Krotov V., **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

Voitenko N., **Agashkov K.**, Krotov V., Krasniakova M., Zabenko 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

**Агашков К.**, Кротов В., Тадогоро Т., Платошин О., Мерсала М., Білан, П. (2020). *Зміни активності нейронів спинного мозку викликані генною терапією*. XVIII ВСЕУКРАЇНСЬКА НАУКОВО-ПРАКТИЧНА КОНФЕРЕНЦІЯ СТУДЕНТІВ, АСПІРАНТІВ ТА МОЛОДИХ ВЧЕНИХ ТЕОРЕТИЧНІ І ПРИКЛАДНІ ПРОБЛЕМИ ФІЗИКИ, МАТЕМАТИКИ ТА ІНФОРМАТИКИ, 12–14.



## ЗМІСТ

<b>АНОТАЦІЯ.....</b>	<b>2</b>
<b>ЗМІСТ.....</b>	<b>9</b>
<b>СПИСОК СКОРОЧЕНЬ.....</b>	<b>13</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>14</b>
Актуальність проблеми .....	17
Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.....	17
Завдання дослідження .....	19
Наукова новизна .....	20
Теоретичне та практичне значення роботи.....	20
Особистий внесок здобувача.....	21
Апробація результатів дисертації.....	22
Публікації .....	23
Структура та обсяг дисертації.....	24
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>25</b>
1.1. Загальна характеристика проблеми болю.....	25
1.2 Роль глутаматергічної сигналізації СМ в передачі ноцицептивних сигналів.....	27
1.3 Роль гальмівної сигналізації СМ в ноцицептивній передачі	32
1.4. Нейропатичний біль.....	34
1.5. Центральні та периферичні механізми нейропатичного болю .....	35
1.6. Загальні відомості про організацію ДР СМ.....	37

1.7. Первинні аференти, які термінують в структурі ДР СМ. ....	39
1.8. Типи інтернейронів поверхневих пластинок ДР СМ. ....	40
1.9. Проекційні нейрони поверхневих пластинок ДР СМ. ....	42
1.10. Цільний препарат спинного мозку як метод для вивчення функціональної активності нейронів ДР СМ.....	44
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....</b>	<b>46</b>
2.1. Експериментальні тварини. ....	46
2.2. Метод фон Фрея для оцінювання механічної больової чутливості. ....	47
2.3. Підшоввий тест Харгрівса для оцінювання термічної больової чутливості. ....	48
2.4. Моделювання хронічного запального болю за допомогою ад'юванту Фройнда.....	50
2.5. Моделювання хронічного нейропатичного болю.....	51
2.6. Ретроградне мічення СПН ДР. ....	52
2.7. Методика субпіальних ін'єкцій .....	55
2.8. Метод отримання інтактного ex-vivo препарату спинного мозку. ....	56
2.9. Використання бічного світлодіодного освітлення для візуалізації клітин інтактного ex-vivo препарату спинного мозку. ....	57
2.10. Реєстрація іонних струмів з використанням методики «patch-clamp». ....	59
2.10.1. Загальні відомості. ....	59

2.10.2. Експериментальна конфігурація. ....	60
2.10.3. Стимуляція дорзальних корінців спинного мозку.....	61
2.11. Статистична обробка результатів дослідження. ....	63
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....</b>	<b>64</b>
3.1. Різниця аферентного входу та вихідного сигналу в проекційних нейронах пластинки I СМ.....	64
3.1.1. Різні типи проекційних нейронів пластинки I СМ.....	64
3.1.2. Залежність вихідного сигналу від інтенсивності ноцицептивного стимулу у різних типах СПН.....	66
3.1.3. Відмінності електричної активності СПН I-го та II-го типів при внутрішньоклітинній стимуляції.....	71
3.1.4 Різниця в аферентному вході СПН I-го та СПН II-го типу.	73
3.1.5. Інтеграція мережевої активності СПН i-го та II-го типів. ....	76
3.1.6 NMDA-рецептор залежна обробка ноцицептивних сигналів в СПН II-го типу.....	81
3.2 Обробка мережевого сигналу СПН пластинки I ДР СМ в умовах хронічного запального болю.....	83
3.3. Зміна функціонування нейронних мереж пластинки I ДР СМ та ноцицептивної поведінки мишей після субпіальної ін'єкції AAV9-GAD65 та AAV9-VGAT. ....	86
3.3.1 Підвищення больового порогу у мишей після субпіальної доставки AAV9-GAD65 та AAV9-VGAT.....	86
3.3.2. Зниження збудливості мережі пластики I ДР СМ після субпіальної доставки AAV9-GAD65 та AAV9-VGAT .....	89

<i>3.3.3. Зміни аферентного входу в умовах AAV9-UBI-GAD65 / VGAT індукованого фенотипу.....</i>	<i>93</i>
<i>3.3.4. Вивільнення ГАМК первинними аферентами в умовах AAV9-UBI-GAD65 / VGAT індукованого фенотипу.....</i>	<i>95</i>
<i>3.3.5. Зміна спонтанних ГАМК-залежних ГПСС в нейронах пластинки I ДР СМ в умовах AAV9-UBI-GAD65 / VGAT індукованого фенотипу.....</i>	<i>97</i>
<i>3.3.6. Вплив індукованого AAV9-UBI-GAD65 / VGAT фенотипу на генерацію ПД нейронами пластинки I.....</i>	<i>99</i>
<i>3.3.7. Використання AAV9-UBI-GAD65 / VGAT для терапії хронічного нейропатичного болю в моделі пошкодження периферичного нерва у мишей.....</i>	<i>103</i>

## **РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.** ..... 105

<b>4.1. Хронічний біль та центральна сенситизація.</b> Гіперзбудливість мережі ПП ДР як прояв центральної сенситизації. ....	105
<b>4.2. Аферентні входи до СПН пластинки I ДР СМ.....</b>	<b>107</b>
<b>4.3. Механізми обробки сигналу в різних типах СПН.....</b>	<b>108</b>
<b>4.4. Кодування ноцицептивного входу в СПН різних типів.....</b>	<b>109</b>
<b>4.5. Функціональне ролі СПН різних типів .....</b>	<b>111</b>
<b>4.6. Використання вірусних векторів як потенційний інструмент в лікуванні болю.....</b>	<b>112</b>

## **ВИСНОВКИ .....** 115

## **СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....** 117

## СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

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

ГАМК –  $\gamma$ -аміномасляна кислота

ГДК – глутаматдекарбоксилаза

ГПСС – гальмівний постсинаптичний струм

ААВ – аденоасоційований вірус

ПН – проєкційні нейрони

ДКГ – дорзально-корінцеві ганглії

ДР – дорзальний ріг

ЗПСС – збуджуючий постсинаптичний струм

сЗПСС – спонтанний збуджуючий постсинаптичний струм

сГПСС – спонтанний гальмівний постсинаптичний струм

NMDA – N-метил-D-аспартат

VGAT – везикулярний транспортер ГАМК

ПД – потенціал дії

ПНС – периферична нервова система

ПП ДР – поверхневі пластинки дорзального рогу

СМ – спинний мозок

СПН – спіно-парабрахіальні нейрони

ЦНС – центральна нервова система

GAD65 – глутаматдекарбоксилаза 65

VGLUT2 – везикулярний транспортер глутамату

## ВСТУП

Біль - це неприємне чуттєве та емоційне переживання, яке сприймається як сигнал про фактичне або можливе пошкодження тканин. Якщо гострий біль зберігається довше зазвичай очікуваного 6-12 тижневого інтервалу, достатнього для відновлення від хвороби чи травми, можна казати про перехід від гострого до хронічного болю. Патофізіологічні процеси цього переходу можуть бути викликані активними біологічними причинами, соціальними або психологічними факторами захворювання (Kucyi & Davis, 2015; Mason et al., 2018).

Біль можна класифікувати як ноцицептивний та нейропатичний, відмінності між цими видами болю впливають на план лікування. Фізіологія болю є складною, але в загальному уявлені больові подразники, що виникають на периферії, сприймаються спеціалізованими клітинами – первинними ноцицепторами, які вибірково реагують на діапазон різних подразників (наприклад, температуру, тиск, рН). Периферичний ноцицептивний сигнал надходить до дорзального рогу спинного мозку, де він модулюється, а потім проектується до різних структур центральної нервової системи (ЦНС), включаючи стовбур мозку, лімбічні, підкіркові, асоціативні та соматосенсорні області мозку. Біль - це динамічно пов'язана просторово-часова подія, що переживається за допомогою багато сегментарних (Kucyi & Davis, 2017) сигналів, що виникають як з периферії, так і з боку ЦНС.

Ноцицептивний біль викликається подразниками, які загрожують або є наслідком пошкодження тканин тіла. Ноцицептивний біль виникає після хірургічної та іншої гострої травматичної події і пов'язаний з багатьма станами що передбачає запальну, ішемічну, інфекційну або механічну / компресійну травму. Хронічний біль може виникати при постійній ноцицептивній сигналізації від порушень, які зберігаються, незважаючи на

лікування основної причини, наприклад, при дегенеративних, запальних та неопластичних захворюваннях.

Нейропатичний біль є результатом дезадаптаційної реакції на пошкодження або патологію соматосенсорної нервової системи і складається з центрального та / або периферичного порушення модуляції болю (Colloca et al., 2017). Нейропатичний біль може виникати за відсутності активного шкідливого подразника або як перебільшена реакція на незначний або помірний ноцицептивний стимул (Arendt-Nielsen & Yarnitsky, 2009; Olesen et al., 2012).

Основою всіх видів хронічного болю є центральна сенситизація, яка є підвищенням функціонального статусу нейронів та мереж ноцицептивних шляхів вздовж всієї нервової системи, викликаного підвищенням мембранної збудливості, синаптичної ефективності і/або зменшення гальмування (Latremoliere and Woolf, 2009). За сучасними уявленнями центральна сенситизація не пов'язана зі збільшенням збудливості окремих нейронів або змінами пасивних/активних параметрів мембрани (Müller et al., 2003; Balasubramanyan et al., 2006; Schoffnegger et al., 2006; Chen et al., 2009; Gassner et al., 2013; Chiu et al., 2016). Основною причиною центральної сенситизації є зміна балансу збудження та гальмування в ноцицептивній мережі поверхневих пластинок дорзального рогу спинного мозку. Зміни цього балансу є клітинно специфічними (Korach et al., 2015b, 2017), що, враховуючи гетерогенність клітин ПП ДР, значно ускладнює вивчення механізмів виникнення та підтримання хронічного болю.

Гетерогенні клітини ПП ДР – мережі, яка здійснює первинну обробку больових сигналів - можна розділити на два різновеликих типи. Переважна більшість нейронів цієї мережі є локальними, тобто мають короткі аксони, які рідко простягаються більше ніж на два сегменти СМ. Однак, невелика частина нейронів (менше 5%) мають довгі аксони, які досягають супраспінальних структур. Такі нейрони називаються проєкційними,

знаходяться переважно в першій пластинці СМ та термінують здебільшого в парабрахіальному ядрі заднього мозку. Спіно-парабрахіальні нейрони (СПН) пластинки І спинного мозку є основними клітинами, які передають ноцицептивну інформацію від СМ до супраспинальних структур. На жаль на сьогоднішній день наше розуміння принципів функціонування СПН навіть у фізіологічних умовах є недостатнім, що істотно погіршує загальне уявлення про виникнення та підтримання болю.

В даній роботі вперше були досліджені мережеві, клітинні та іонні механізми, які визначають специфічні характеристики вхідного та вихідного сигналу СПН у фізіологічних умовах. Це дало змогу зрозуміти принципи обробки та кодування ноцицептивної інформації цими клітинами та дозволило виявити їх гетерогенність. Також були досліджені зміни функціонування нейронної мережі пластинки І СМ після субпіального введення вірусних конструктів, які викликали гіперекспресію ГАМК-синтезуючого ферменту GAD65 та везикулярного ГАМК транспортеру VGAT, та були зроблені висновки щодо доцільності використання такого терапевтичного підходу для відновлення загального гальмівного тону мережі ПП ДР для терапії хронічного болю.

Дисертація складається з чотирьох розділів та завершується висновками.

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

В розділі II «Матеріали та методи досліджень» описані застосовані в роботі поведінкові досліді, які проводились над тваринами, методи отримання інтактного ex-vivo препарату спинного мозку та біофізичні методи дослідження викликаних та спонтанних постсинаптичних струмів та потенціалів дії у нейронах пластинки І дорзального рогу спинного мозку.



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

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

Робота закінчується списком процитованої літератури.

### **Актуальність проблеми**

Біль, як фізіологічний, так і патологічний, є важливою клінічною проблемою (Danilov et al., 2020; Goesling et al., 2018; Nylands-White et al., 2017; Schug et al., 2016). Принципи обробки больових сигналів за фізіологічних умов поки що недостатньо вивченими, а, отже, їх дослідження є важливою задачею для сучасної медицини. У формуванні відчуття болю беруть участь як нейрони периферичної нервової системи (ПНС), так і нейрони багатьох структур ЦНС. Первинна обробка больової інформації від рецепторного апарату тіла відбувається в дорзальному розі (ДР) спинного мозку (СМ). Серед великого різноманіття нервових клітин, які залучені в цей процес, можна окремо виділити так звані проєкційні нейрони (ПН), більшість з яких знаходиться у I пластини сірої речовини. Проєкційні нейрони пластини I СМ відіграють важливу роль в передачі ноцицептивних периферичних впливів від первинних аферентних волокон до супраспинальних центрів, відповідальних за формування відчуття болю. Висхідні гілки їх аксонів закінчуються в специфічних ядрах стовбуру мозку та таламусу (Al-Khater and Todd, 2009; Campos et al., 2018; Chiang et al., 2020; Gauriau and Bernard, 2002, 2004; Jansen and Giesler, 2015; Polgár et al., 2010; Todd, 2010a). Ці ядра в подальшому передають сигнал до ноцицептивних зон в мигдалеподібному тілі, гіпоталамусі та первинній соматосенсорній корі (Chiang et al., 2020; Gauriau and Bernard, 2002; Peirs and Seal, 2016;

Schweinhart and Bushnell, 2010). ПН пластини I дають початок аферентним шляхам передачі як емоційної, так і дискримінаційної складових болю.

Терміналі ПН пластини I локалізовані в латеральній парабрахіальній зоні довгастого мозку (Todd, 2010a), тобто ці клітини можна кваліфікувати як спіно-парабрахіальні нейрони (СПН). Електричні відповіді СПН на больову стимуляцію шкірних рецепторних полів широко вивчалась в умовах *in vivo* за допомогою позаклітинних відведень; це дало змогу виявити різні патерни такої активності (Allard, 2019; Andrew, 2009, 2010; Andrew and Craig, 2002; Bester et al., 2000). Проте, вказані роботи не були фокусовані на механізмах, які визначають різну специфіку характеристик вхідних та вихідних сигналів СПН. Крім того, досі було невідомим як СПН (головні генератори вихідного сигналу нейронної мережі СМ) кодують больові сигнали. Така інформація важлива для подальшого розуміння базисних фізіологічних механізмів ноцицепції та патогенезу больових синдромів.

Патологічний (хронічний) біль є однією з найпоширеніших причин звернень за медичною допомогою. Щонайменше 40% людей в розвинених країнах стикаються з проблемою хронічного болю (Breivik et al., 2013). Вказувалось, що у США кількість людей, які страждають у тій або іншій мірі від хронічного болю різного генезу, перевищує 20% (Dahlhamer et al., 2018). Хронічний біль знаходиться в першій десятці станів, які значно порушують якість життя пацієнтів (Vos et al., 2017). 60.4 % опитаних людей в Україні, відповідно до міжнародного діагностичного інтерв'ю CIDI 2.0 (n = 1720), стикались з хронічним болем (Xu et al., 2019) Таким чином, хронічний біль є дуже значною клінічною та соціальною проблемою. При цьому слід визначити, що розробка ефективних терапевтичних підходів до його лікування відбувається досить повільно.

Недостатня ефективність фармакотерапії хронічного болю підкреслює важливість пошуку та розробки нових підходів до терапії даного стану. В цьому аспекті може виявитись перспективною терапія з використанням

генної інженерії, оскільки при цьому можна орієнтуватися на конкретні тканинспецифічні механізми хронічного болю (Guedon et al., 2015). Одним з головних чинників розвитку та підтримання хронічного болю є зменшення загального гальмівного тону в ноцицептивних мережах загалом, та у нейронній мережі ДР СМ зокрема (Zeilhofer et al., 2012). З урахуванням сказаного, відновлення рівня гальмівного тону нейронних мереж ДР СМ за допомогою генної терапії може бути досить перспективним напрямком.

Отже, розкриття основних клітинних механізмів обробки ноцицептивних сигналів нейронами ДР СМ є високо актуальним в аспекті розробки терапевтичних підходів терапії хронічного болю.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційна робота виконана відповідно до загального плану науково-дослідних робіт відділу сенсорної сигналізації Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в рамках науково-дослідних робіт «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014 – 2018; номер державної реєстрації — 0113U007273); «Розробка новітніх знеболюючих засобів на основі інгібіторів кальційпроникних АМРА-рецепторів» (2015 – 2019; номер державної реєстрації – 0115U003632); «Біофізичні та молекулярно-генетичні механізми регуляції фізіологічних та патологічних процесів» (2017 – 2021; номер державної реєстрації – 0116U004470) та «Функціональні характеристики нейронів СМ та їх зміни при різноманітних патологіях та травмах» (2019 - 2023; номер державної реєстрації – 0118U007346).

### **Мета дослідження**

Мета даної роботи полягала у визначенні специфічних клітинних та мережевих механізмів обробки ноцицептивних сигналів в дорзальному розі (ДР) спинного мозку (СМ), а також у пошуку та обґрунтуванні новітнього генноінженерного підходу для терапії хронічного больового синдрому.

## **Завдання дослідження**

Згідно з цією метою були поставлені наступні завдання:

1. Виявити різні типи спіно-парабрахіальних нейронів (СПН) відповідно характеристикам їхньої імпульсної активності, викликаного стимуляцією первинних аферентів.
2. Встановити кількісні та якісні характеристики активності аферентних входів до СПН різних типів.
3. Оцінити вплив нейронної мережі (ДР) на активність СПН, викликану стимуляцією первинних аферентів.
4. Оцінити участь нейронної мережі у функціюванні проєкційних нейронів пластини І в умовах індукції хронічного болю.
5. Дослідити зміни функціонування нейронної мережі пластини І ДР СМ мишей після субпіальних уведень аденоасоційованих вірусних конструктів, що містять фермент глутаматдекарбоксилазу (AAV9-UBI-GAD65) та везикулярний транспортер ГАМК (AAV9-UBI-VGAT).
6. Дослідити ефективність субпіального введення AAV9-UBI-GAD65 і AAV9-UBI-VGAT на перебіг експериментального нейропатичного больового синдрому.

*Об'єкт досліджень:* Збуджуюча та гальмівна синаптична активність у мережі нейронів поверхневих пластин ДР; прояви хронічного больового синдрому, в експериментах на тваринах (щурах та мишах).

*Предмет досліджень:* Клітинні й мережеві механізми обробки ноцицептивних сигналів у СМ та їх зміни при хронічному больовому синдромі; новий підхід у терапії цього синдрому.

## **Наукова новизна**

В даній роботі вперше показано, що популяція СПН пластини І ДР СМ є гетерогенною, і різних клітинних типів що виконують принципово різну

фізіологічну роль в передачі ноцицептивних сигналів. Вперше виявлено, що різні типи СПН розрізняються за кількістю синаптичних входів від первинних аферентів. Встановлено, що більшість СПН є селективними детекторами больового сигналу, які генерують лише один ПД у відповідь на стимуляцію високопорогових первинних аферентів. В той же час лише 19% клітин усієї популяції СПН є інтеграторами активності локальних ноцицептивних мереж, робота яких залежить від процесів, пов'язаних зі збудженням NMDA-рецепторів. Ці нейрони підсилюють та інтегрують ноцицептивні сигнали, поступово кодуючи їх інтенсивність шляхом збільшення кількості ПД, що генеруються. Показано, що зміни збудливості СПН за рахунок посиленої активності ноцицептивних мереж ДР корелюють з больовою поведінкою тварин в моделі хронічного запального болю. Вперше доведено, що субпіальне введення вірусних конструктів AAV9-UBI-GAD65/VGAT ефективно збільшує гальмівний тону в нейронній мережі ДР СМ. Субпіальне введення AAV9-UBI-GAD65 і AAV9-UBI-VGAT забезпечує довготривалий антиноцицептивний ефект в моделі хронічного нейропатичного болю у мишей. Таким чином, в роботі вперше показано, що різні механізми обробки сигналів дозволяють нейронам СПН пластини I відігравати різні ролі в організації ноцицепції. Також в даній роботі вперше використано феномен перемикання збуджуючого фенотипу нейронів ДР СМ на переважно гальмівний за допомогою новітнього підходу, який базується на субпіальному введенні певних вірусних векторів. Це дає потенційну можливість розглядати використання перспективи даного підходу для терапії хронічного болю.

### **Теоретичне та практичне значення роботи**

Результати, отримані в роботі, мають як фундаментальне, так і практичне значення. Визначення принципів функціонування СПН пластини I ДР СМ дозволило виявити гетерогенність популяції цих нейронів та показати, що

переважна більшість СПН є детекторами больового сигналу, які отримують входи від первинних ноцицепторів та передають до супраспінальних структур поодинокі ПД, в той час як біля однієї п'ятої усієї популяції цих нейронів можуть кодувати інтенсивність больового стимулу кількістю генерованих ПД. Ці дані помітно покращують як наше розуміння механізмів кодування та інтеграції ноцицептивних сигналів на рівні СМ, так і загальне розуміння клітинних процесів, які лежать в основі формування стану фізіологічного болю.

Практична цінність даної роботи полягає у встановленні того факту, що субпіальне введення вірусних конструктів, які викликають гіперекспресію ГАМК-синтезуючого ферменту GAD65 та везикулярного транспортеру ГАМК VGAT, призводить до зменшення загальної збудливості мережі поверхневих пластин ДР завдяки збільшенню загального гальмівного тону. Результати поведінкових дослідів, які демонструють явне зниження больової чутливості, дозволяють обґрунтувати проведення преклінічних експериментальних досліджень можливості використання генно-інженерного підходу для терапії хронічного больового синдрому.

### **Особистий внесок здобувача**

Здобувачем були сформульовані задачі дослідження; разом зі співавторами були сплановані та розроблені експериментальні протоколи. Всі поведінкові тести, детекція збуджуючих та гальмівних синаптичних струмів, статистична обробка та узагальнення результатів проведені автором самостійно.

Аналіз кількісних результатів електрофізіологічних експериментів та оформлення публікацій були проведені разом із співавтором опублікованих робіт співробітником інституту ім. О. О. Богомольця НАН України кандидатом біологічних наук В.В. Кротовим.

Визначення мети дослідження, планування експериментальних робіт, обговорення результатів експериментів та формулювання висновків досліджень проводилося за участі наукового керівника доктора біологічних наук, професора Н.В. Войтенко, а також доктора біологічних наук професора П. В. Білана.

### **Апробація результатів дисертації**

Основні положення роботи доповідались на двох щорічних конференціях Американського товариства нейронаук (США, Вашингтон, 2017; Чикаго, 2019), на VI конгресі українського товариства нейронаук (Україна, Київ, 2014), на VIII міжнародному симпозіумі з експериментальної та клінічної нейробиології (Словаччина, Кошице, 2017), VII конгресі Українського товариства нейронаук (Україна, Київ, 2017), конференції Польського товариства нейронаук (Польща, Варшава, 2017), III Київському міжнародному симпозіумі з фізіології гладеньких м'язів, біофізики та фармакології (Україна, Київ, 2017), XI Форумі Федерації Європейських Товариств Нейронаук (Німеччина, Берлін, 2018), а також на семінарах сектора нейронаук Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

### **Публікації**

За матеріалами дисертації опубліковано 10 друкованих робіт: 2 статті у міжнародних наукових журналах (одна з яких входить до першого квартилю (Q1) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank) та 8 тез доповідей на наукових конференціях.

## **Структура та обсяг дисертації**

Дисертація складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, основної частини (огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу результатів та їх обговорення), висновків та списку використаних джерел (210 найменувань). Робота викладена на 146 сторінках машинописного тексту та проілюстрована 24 рисунками.



## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.

### 1.1. Загальна характеристика проблеми болю.

Біль за визначенням Міжнародної асоціації з вивчення болю (IASP) - це "неприємний сенсорний та емоційний досвід, пов'язаний з фактичним або потенційним пошкодженням тканин" (*International Association for the Study of Pain (IASP)*). Отже, біль має об'єктивний, фізіологічний, сенсорний аспекти, а також суб'єктивні, емоційні та психологічні компоненти. В медичній практиці біль розглядається як симптом того чи іншого захворювання.

Фізіологічна роль болю пов'язана із захистом організму від дії загрозливого фактору, формування захисної поведінки на етапі відновлення, створення емоційного забарвлення та утворення специфічної поведінки для уникнення небезпечної дії в майбутньому (Nishida & Ito, 2017; Schug et al., 2016).

Короткочасний вплив больового стимулу викликає активацію специфічних сенсорних клітин які далі передають сигнал до центрів, де проходить подальша обробка інформації з формуванням відчуття гострого болю та відповідною психоемоційною та поведінковою реакцією на больовий чинник. Як правило, такий біль є мимовільним і завершується при відсутності больового стимулу та відновленні організму (Bell, 2018; T. J. Price & Ray, 2019). Наявність довготривалого відчуття болю після того, як больовий чинник припинив свою дію або навіть без наявного больового чинника призводить до хронізації процесу та хронічного болю, що значного знижує якість життя, та розвитку вторинних ускладнень (T. J. Price & Ray, 2019).

Традиційно відмінність між гострим та хронічним болем спирається на довільний проміжок часу від початку до відновлення; два маркери, що

найчастіше використовуються, це 3 місяці та 6 місяців з моменту появи болю (Bell, 2018; Dahlhamer et al., 2018; T. J. Price & Ray, 2019; Turk & Okifuji, 2002).

Міжнародна асоціація з вивчення болю визначає хронічний біль як біль, що не має біологічної цінності, що зберігається після нормального загоєння тканин. Хронічний біль може бути поділений на "ноцицептивний" (викликаний запаленням або пошкодженням тканин, та в результаті призводить до активації спеціалізованих больових датчиків -ноцицепторів), і "нейропатичний" (спричинений пошкодженням або збоєм в роботі нервової системи). Ноцицептивний біль може бути поділений на "поверхневий" і "глибокий", а глибокий біль - на "глибокий соматичний" і "вісцеральний". Нейропатичний біль поділяється на "периферичний" (походить з периферичної нервової системи) та "центральный" (походить з головного або спинного мозку) (Macrone & Otis, 2018; Zilliox, 2017).

Патологічний, а саме хронічний біль, є однією з найпоширеніших причин звернень за медичною допомогою; лише в США кількість людей, які страждають від хронічного болю різного генезу перевищує 20% (Dahlhamer et al., 2018). Хронічний біль знаходиться в топ 10 станів які значно порушують якість життя пацієнтів (Vos et al., 2017). Щонайменше 40% людей в розвинених країнах стикаються з проблемою хронічного болю (Breivik et al., 2013). 60.4 % відсотка з опитаних людей в Україні, відповідно до міжнародного діагностичного інтерв'ю CIDI 2.0, стикались з хронічним болем (n = 1720) (Xu et al., 2019)

Як результат, при хронічному болю використовуються препарати групи опіодів, що є препаратами групи резерву та призводять до тяжких побічних ефектів (Breivik et al., 2013; Dahlhamer et al., 2018; Dale & Stacey, 2016; Goesling et al., 2018; Hylands-White et al., 2017). На даний час не існує високо специфічних препаратів з мінімальними побічними діями для вирішення проблеми болю. Розуміння проблеми болю, детальне вивчення

механізмів розвитку та підтримки болю залежно від етіологічного чинника є ключовим фактором в розробці терапевтичних підходів для ефективного терапії хронічного болю.

## **1.2 Роль глутаматергічної сигналізації СМ в передачі ноцицептивних сигналів**

Спинний мозок - це перше місце ретрансляції ноцицептивної інформації від периферії до мозку. Сенсорні сигнали передаються з периферії первинними аферентними волокнами в ДР СМ, де ці аференти формують синапси з внутрішньою мережею СМ. Потім проєкційні нейрони передають цю інформацію у вищі центри, де відбувається обробка больових та не больових сигналів. Під час ноцицептивної передачі вихідний сигнал зі СМ залежить від різних механізмів, які можуть або збільшувати, або зменшувати активність нейронів СМ. Такі механізми включають складну мережеву взаємодію локальних збудливих та інгібуючих інтернейронів, активацію рецепторів N-метил-D-аспартату (NMDA-рецепторів) та низхідні впливи зі стовбура мозку, які можуть мати як гальмівний, так і збудливий характер. Після пошкодження нерва або запалення можуть відбуватися зміни збуджуючої та гальмівної синаптичної передачі, які модулюють загальну збудливість спинного мозку, призводячи до посиленої реакції нейронів дорзального рогу на вхідні аферентні сигнали та збільшення вихідного сигналу в головний мозок. Це явище відоме як центральна сенситизація (D'Mello & Dickenson, 2008; Deng et al., 2019; Ji et al., 2018).

Глутамат є основним збудливим нейромедіатором, виявлений у всій нервовій системі, і тому є необхідним для больової сигналізації. Усі первинні аференти, які закінчуються в ДР СМ, незалежно від того, малого вони чи великого діаметру, використовують цей нейромедіатор. Глутамат збуджує нейрони, призводячи до деполяризації постсинаптичної мембрани через активацію чотирьох окремих підкласів рецепторів іонотропних

AMPA-,NMDA- та кайнатних рецепторів а також сімейства метаботропних рецепторів пов'язаних з G-білком (mGluRs) (Sheean et al., 2008). Найбільше відомо про роль іонотропних рецепторів AMPA та NMDA у болю ((*No Title*), n.d.; Aiyer et al., 2018; Deng et al., 2019; Nachisuka et al., 2016; Hong et al., 2017; Ji et al., 2018; Zhuo, 2017).

Глутамат вивільняється з сенсорних аферентів у відповідь на гострі та більш стійкі ноцицептивні подразники, і саме швидка активація AMPA-рецепторів відповідає за встановлення початкової базової відповіді нейронів дорзального рогу спинного мозку на больові та тактильні подразники. Однак, якщо відбувається повторне та високочастотне стимулювання С-волокон, тоді відбувається посилення та подовження реакції нейронів дорзального рогу на наступні входи, так званий ефект “wind-up” (Nachisuka et al., 2018; Johnson et al., 2017; Turk & Okifuji, 2002). Ця посилена активність є результатом активації NMDA-рецепторів. Якщо до спинного мозку надходить короткочасний гострий або низькочастотний больовий або тактильний вхід, то активація NMDA-рецепторів неможлива, оскільки за нормальних фізіологічних умов іонний канал цього рецептора блокується іонами магнію ( $Mg^{2+}$ ). Цей унікальний  $Mg^{2+}$  блок каналу вимагає стійкої деполяризації мембрани для того, щоб її подолати і дати можливість рецепторному каналу відкритися. Ймовірно, що спільне вивільнення пептидергічних трансмітерів, таких як речовина P і CGRP (Calcitonin gene-related peptide) — «пептид, пов'язаний з геном кальцитоніну», які містяться у відповідних С-волокнах, є відповідальним за тривалу повільну деполяризацію нейронів і подальше зняття магнієвого блок у NMDA-рецепторів, призводячи до виникнення ефекту “wind-up” (Budai & Larson, 1996; Johnson et al., 2017; Khasabov et al., 2002; Zou et al., 2016). Антагоністи AMPA-рецепторів мало впливають на ефект “wind-up” (Aiyer et al., 2018; Hong et al., 2017; Johnson et al., 2017; D. D. Price et al., 1994), і вважається, що коротка деполяризація, викликана активацією цих рецепторів, не

призводить до зняття магнієвого блоку NMDA-рецепторів, на відміну від тривалої, повільна (кілька секундної) активація, спричиненої пептидами. Нестача пептидів у великих A $\beta$ -аферентних волокнах пояснює відсутність ефекту “wind-up” після дії низькопорогових подразників. Активація NMDA-рецепторів, очевидно, відіграє ключову роль у гіпералгезії та посиленні больової сигналізації, яка спостерігається при більш стійких больових станах, включаючи запалення та нейропатичні стани (Aiyer et al., 2018; Deng et al., 2019; D. D. Price et al., 1994; T. J. Price & Ray, 2019; Rygh et al., 2006).

Основним механізмом дії NMDA-рецепторів є великий вхід іонів кальцію (Ca<sup>2+</sup>) через плазматичну мембрану, який виникає при активації каналу. Потрапивши всередину клітини, Ca<sup>2+</sup> може активувати різні ефектори та активує внутрішньоклітинні каскадні Ca<sup>2+</sup> залежні зміни. Такі ефектори включають нейронний оксид азот синтазу, кальцій залежну кальмодулін кіназу (CaMKI / II) (Malinow et al., 1989), та ERK (Xia et al., 1996), які можуть сприяти механізмам пластичності, таке як довготривале потенціювання. Подібні механізми пластичності виникають після гострої високочастотної стимуляції C-волокон, пошкодження периферичного нерва та запалення, і можуть призвести до підвищеної збудливості та активності нейронів спинного рогу (Woolf, 1983). Це явище називається центральною сенситизацією, проявляється у пацієнтів як посилена реакція до больових подразників (гіпералгезії) та болю, що виникають внаслідок зазвичай неболючих тактильних подразників (аллодінія). Тому фармакологічна орієнтація на NMDA залежні процеси вивчається як перспективний напрямок для розробки нових анальгетиків.

Існує ряд антагоністів, що зв'язуються з різними регуляторними сайтами NMDA-рецептору, включаючи ліцензовані препарати (Aiyer et al., 2018), такі як кетамін - потужний блокатор каналів, та слабкіші агенти, такі як декстрометорфан та мемантин. Ці ліки показали антиноцицептивний ефект у ряді дослідів на тваринних моделях запалення та пошкодження

нервів; існують також і клінічні дані, які підтверджують цей ефект (D. D. Price et al., 1994; Sindrup & Jensen, 1999). В цілому ці дослідження свідчать про те, що, ймовірно, при пошкодженні тканин та нейропатичному болю аберрантна периферична активність помножується та посилюється за допомогою опосередкованих NMDA-рецепторами спінальних механізмів, а сам рецептор є критичним як для індукції, так і для підтримки болю. Таким чином, терапія, що заснована на модуляції NMDA-рецепторів після ініціюючого пошкодження, може бути ефективною.

Незважаючи на наявність хороших клінічних доказів ефективності засобів, що діють як антагоністи NMDA-рецептор-канального комплексу (Aiyer et al., 2018) (особливо кетаміну), лише деякі окремі пацієнти отримують гарне полегшення болю при травмах нервів, в більшості ж випадків не можливо досягти повного контролю над болем. Частково це пояснюється тим, що адекватному дозуванню перешкоджає вузьке терапевтичне вікно існуючих препаратів. Це багато в чому пов'язано з широким розповсюдженням та функціональністю NMDA-рецепторів, тобто введення антагоніста не лише вплине на патологічні зміни, але й порушить нормальну сигналізацію NMDA в центральній нервовій системі, і це пояснює, чому такі препарати зазвичай пов'язані з численними неминучими та неприйнятними побічними ефектами. Зрештою, широке використання антагоністів NMDA-рецепторів у лікуванні хронічного болю залежить від стратегій, що збільшують їх терапевтичне вікно щодо існуючих препаратів. Сюди можуть входити препарати, що діють на конкретні підтипи рецептора (антагоністи рецепторів NR2B є анальгетиками з кращим профілем побічної дії), лікарські засоби з різним рівнем блоку каналу, або, що більш практично, використання низьких доз блокаторів NMDA-рецепторів у поєднанні з іншими засобами (Aiyer et al., 2018; Chizh et al., 2001; Dale & Stacey, 2016; Deng et al., 2019; Hong et al., 2017; Hylands-White et al., 2017).

Останнім часом активна увага приділяється регуляції функціонування іонотропних глутаматних рецепторів АМРА-типу, які відіграють одну із ключових ролей у збуджувальній синаптичній передачі в ЦНС (Heine, Holcman, 2020; Choquet, 2018; Diering, Huganir, 2018; Bredt, Nicoll, 2003; Malinow, Malenka, 2002). Спинний мозок характеризується високим рівнем експресії АМРА-рецепторів; зокрема, нейрони ДР містять АМРА-рецептори, проникні для іонів  $Ca^{2+}$  (без GluR2 субодиниці у складі тетрамеру, що формує активний канал) та  $Ca^{2+}$ -непроникні (GluR2-вмісні) (Galan et al, 2004; Hartmann et al., 2004; Tong, MacDermott, 2006). Експериментальні дані свідчать, що спрямоване порушення експресії АМРА-рецепторів пригнічує пластичність і формування хронічного больового синдрому (Han et al., 2019; Lin et al., 2015; Peng et al., 2012; Hartmann et al., 2004). Було показано, що гіперекспресія цих рецепторів спричиняє центральну сенситизацію ДР СМ – специфічну форму пластичності, яка лежить в основі хронічного болю (Kohn et al., 2008; Korach & Voitenko, 2012; Latremoliere & Woolf, 2009). Зміни переміщення АМРА-рецепторів, викликані хронічним болем, були продемонстровані в інтернейронах ДР. Ці зміни були пов'язаними з двома механізмами – інтерналізацією GluR2-вмісних кальційнепроникних АМРА-рецепторів з синапсів між первинними аферентами та інтернейронами ДР (Katano et al., 2008; Park et al., 2009; Vikman et al., 2008) та одночасним вбудовуванням GluR1-вмісних кальційпроникних АМРА-рецепторів в екstrasинаптичні мембрани (Korach et al., 2011; Korach et al., 2013). Обидва механізми підвищують АМРА-рецептор-опосередковану кальцієву провідність вторинних сенсорних нейронів, викликаючи довготривалу гіперзбудливість центральних ноцицептивних мереж (Korach et al., 2015), а, отже, і кальцій-залежну хронізацію болю (Korach & Voitenko, 2012). Попередні дослідження нашої лабораторії показали, що інтратекальне введення залежних від активності антагоністів кальційпроникних АМРА-рецепторів

поліпшує гіперчутливість, спричинену периферичним запальним болем, не викликаючи при цьому помітних побічних ефектів. Цей факт дає ще одне підтвердження суттєвої ролі спинномозкових кальційпроникних AMPA-рецепторів у хронічному болю (Korach et al., 2016).

### **1.3 Роль гальмівної сигналізації СМ в ноцицептивній передачі**

Гамма-аміномасляна кислота (ГАМК) - основний гальмівний нейротрансмітер у ЦНС. ГАМК діє через рецептори ГАМК-А та ГАМК-В. Після зв'язування ГАМК рецептори ГАМК-А селективно відкриваються для надходження  $Cl^-$ , після чого відбувається гіперполяризація клітинної мембрани нейронів. Це спричиняє гальмівний вплив на нейрони, зменшуючи ймовірність генерації потенціалів дії (Johnston, 1996). На відміну від іонотропного рецептора ГАМК-А, ГАМК-В рецептори є метаботропними трансмембранними рецепторами, сполученими з G-білками. Активація рецепторів призводить до відокремлення окремих субодиниць G-білків, які можуть відкривати  $K^+$  канали, запобігаючи деполіризації клітинної мембрани та зменшуючи ймовірність генерації та передачі потенціалу дії. Крім того, рецептори ГАМК-В також можуть знижувати активність аденілатциклази та знижувати провідність клітини до  $Ca^{2+}$ . В спинному мозку велику роль також відіграє гліцин - ще один інгібіторний нейромедіатор, однією з функцій якого є модуляція ноцицепції. Дії гліцину опосередковується зв'язуванням з рецепторами гліцину (Glyr), які густо розподіляються в поверхневих шарах ДР СМ. Дія цих рецепторів аналогічна до ГАМК-А рецепторів (Brewer et al., 2018; Malcangio & Bower, 1996; Zeilhofer et al., 2019).

ГАМК-ергічні та гліцинергічні інтернейрони дорзального рогу спинного мозку зазвичай виконують функції пресинаптичних регуляторів ноцицептивного сигналу (Zeilhofer et al., 2012, 2019). Цей механізм може порушитись при патологічному больовому стані. У тваринних моделях



хронічного болю кількість ГАМК- та GAD- позитивних нейронів зменшується через апоптоз (Eaton et al., 1998). Таке зниження гальмування у дорзальному розі призводить до гіпералгезії. Дія рецепторів гліцину також може бути порушеною при хронічному болю. Простагландини, що виділяються при хронічних запальних станах, можуть погіршити функцію субодиниці Gly $\alpha$ 3 гліцинового рецептору через активацію рецепторів простагландину E2(EP2). Це явище опосередковується G білком і протеїнкіназою A (Cheng, 2010).

Функціонування інших інгібіторних систем, таких як  $\mu$  - та  $\delta$ -опіїдні рецептори,  $\alpha$ 2-адренергічний рецептори, пуринаергічні A1 рецептори, нейропептид Y1 та Y2 рецептори, каннабіноїдні рецептори CB1 та CB2, мускариновий M2 рецептори, рецептор ГАМК-B та соматостатин також може змінюватися при хронічному болю (В. К. Taylor, 2009; Zeilhofer et al., 2019).

В загальній практиці ГАМК-ергічні препарати застосовуються для терапії хронічного болю. Доведено, що бензодіазепіни, агоністи рецептора ГАМК-A та баклофен, агоніст рецепторів ГАМК B, мають аналгетичну дію. Крім того, агоністи адренорецепторів  $\alpha$ 2 (клонідин та тизанідин) можуть посилити ГАМК-ергічну та гліцинергічну антиноцицептивну дію та застосовуються при хронічних больових станах (Baba et al., 2000). Підвищення рівню ГАМК у ДР СМ за допомогою вірусних векторів простого герпесу що кодують глутаматдекарбоксилазу (GAD), також може бути потенційним в лікуванні хронічного болю (Wolfe et al., 2009). Інгібітори циклооксигенази 1 та 2 є потужними препаратами, що інгібують продукцію простагландинів під час запальних станів. Ці ліки можуть впливати на інгібіторну дію простагландинів на Gly $\alpha$ 3 та зберігати гліцинергічне гальмування в дорзальному розі.

#### **1.4. Нейропатичний біль.**

Нейропатичний біль викликається ураженням або захворюванням соматосенсорної системи, включаючи периферичні А $\beta$ , А $\delta$  і С волокна та центральні нейрони, і вражає 7–8% загальної популяції (D. Bouhassira, 2019; Didier Bouhassira et al., 2008; Torrance et al., 2006). Соматосенсорна система дозволяє сприймати дотик, тиск, біль, температуру, положення, рух і вібрацію. Соматосенсорні нерви розташовані в шкірі, м'язах, суглобах і фасціях та представлені як терморцептори, механорецептори, хеморецептори, прурітоцептори і ноцицептори, які посилають сигнали до спинного мозку та зрештою до мозку для подальшої обробки. Більшість сенсорної інформації обробляється в ядрах таламуса, яка потім спрямовується до кори головного мозку. Ураження або захворювання соматосенсорної нервової системи можуть призвести до зміненої і невпорядкованої передачі сенсорних сигналів у спинний та головний мозок. Поширені стани, пов'язані з нейропатичним болем, включають постгерпетичну невралгію, невралгію трійчастого нерва, больову радікулопатію, діабетичну нейропатію, ВІЛ-інфекцію, проказу, ампутацію, біль при пошкодженні периферичного нерва та інсульт (у вигляді центрального болю після інсульту). Зазвичай пацієнти відчують різний набір симптомів, таких як печіння та відчуття наче електричного струму, біль, що виникає внаслідок невольових стимулів (наприклад, легкого дотику); ці симптоми зберігаються і мають тенденцію до хронізації і менше реагують на знеболюючі препарати. Порушення сну, тривожність і депресія часто виникають і важко перебігають у пацієнтів з нейропатичним болем (D. Bouhassira, 2019).

## 1.5. Центральні та периферичні механізми нейропатичного болю

При периферичній нейропатії змінюються електричні властивості сенсорних волокон, що потім призводить до дисбалансу між збудженням та гальмуванням в ЦНС (Aiyer et al., 2018; D. Bouhassira, 2019; Hong et al., 2017; Zhuo, 2017)(Korach et al., 2015b, 2017). Первинні аференти, які приймають участь в передачі болю, а саме немієлінізовані С волокна та слабкомієлінізовані А $\delta$  волокна можуть стимулювати розвиток нейропатичного болю після впливу пошкоджуючих чинників через зміни щільності волокон та підвищення збудливості нейронів (White et al., 2007). При повторній або досить інтенсивній стимуляції спинномозкові та супраспинальні ноцицептивні шляхи можуть стати чутливими до повторюваних стимуляцій. За умов постійної ноцицептивної стимуляції, яка спостерігається при периферичній нейропатії, ця центральна сенситизація стає дезадаптивною (Deng et al., 2019; Ji et al., 2018; Maccone & Otis, 2018; Woolf et al., 1992). Міжнародна асоціація з вивчення болю визначає центральну сенситизацію як «посилену чутливість ноцицептивних нейронів у центральній нервовій системі на їх нормальний або підпороговий аферентний вхід». На рівні синапсів нейронів другого порядку ця підвищена чутливість може спричинити зміну в проникності кальцію, гіперекспресії рецепторів та зміну їх розташуванням синаптичній щілині (Woolf et al., 1992). Гіперактивація мікроглії запускає вивільнення медіаторів, асоційованих з болем, що також сприяє підтриманню хронічного больового стану (Ji et al., 2013). Зміни функціонування, які відбуваються у супраспинальних регіонах, призводять до дисбалансу між низхідною фасилітацією та гальмуванням, який є ще одним фактором постійного болю (Arkarian et al., 2004; Sugimoto et al., 1990). Дезадаптивна підкіркова та кортикальна пластичність також сприяє інтерпретації неноцицептивних

вхідних сигналів як больових (Arkarian et al., 2004), що сприяє розвитку хронічного больового стану.

Периферичні механізми, які ініціюють і підтримують стійке збудження аферентних нервових волокон при нейропатичному болю, були широко вивчені у гризунів (Colleoni & Sacerdote, 2010; Zou et al., 2016). У моделях травми сідничного нерва у гризунів посилений ектопічний електричний сигнал у мієлінізованих аксонах А волокон починається, як правило, протягом декількох годин після індукції травми, а згодом – на протязі від декількох днів до тижнів - з'являється в немієлінізованих аксонах С волокон (Latremoliere & Woolf, 2009). Повідомлялося про значну різноманітність зміни специфічності волокон, частоти, типу, часової шкали збільшення та / або стійкого ектопічного збудження та перехресної сенситизації серед волокон А та С на периферичному рівні та рівні тіл нейронів дорзально корінцевих гангліїв, що може бути пов'язане з типом враженого нерва, травми та видів / лінії піддослідних тварин. З декількох джерел відомо, що ці зміни в збудженні нервових волокон призводять до розвитку різних рефлекторних змін, які називають нейропатичною больовою поведінкою (Latremoliere & Woolf, 2009; Zou et al., 2016).

Через гіперезбудливість, яка виникає в нейронах ПНС, потенціалзалежні  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_V$ ) канали є первинними молекулярними мішенями, які опосередковують периферичні нейропатичні больові стани. Підвищена експресія, трафік та периферична орієнтація декількох ізоформ каналів  $\text{Na}_V$ , таких як  $\text{Na}_V1.3$  та  $\text{Na}_V1.6$  (на мієлінізованих аксонах) та  $\text{Na}_V1.7$  та  $\text{Na}_V1.8$  (на немієлінізованих аксонах), були показані в декількох нейропатичних моделях на гризунах (Eijkelkamp et al., 2012).

На відміну від  $\text{Na}_V$  каналів, потенціал залежні  $\text{K}^+$  канали ( $\text{K}_V$ ), двопорні  $\text{K}^+$  канали ( $\text{K}_{2P}$ ) і  $\text{Ca}^{2+}$ -активовані  $\text{K}^+$  ( $\text{K}_{Ca}$ ) складають переважну більшість реполяризуючих або регуляторних каналів у сенсорних нейронах (Tsantoulas & McMahon, 2014). Активація цих каналів призводить до

мембранної реполяризації, що веде до пригнічення електричного збудження. Зниження експресії білків  $K_v1.1$ ,  $K_v1.2$ ,  $K_v1.4$ ,  $K_v2.1$ ,  $K_v2.2$ ,  $K_v4.3$ ,  $K_v7.2$ ,  $K_v7.3$  та  $K_v9.1$ , а також ряду  $K_{2P}$ ,  $K_{Ca}$  та  $K_{ir} / K_{ATP}$  були показані в моделях нейропатичного болю на гризунах. Це призводить до зменшення  $K^+$  струмів, наслідком чого є гіперзбудження сенсорних волокон (Tsantoulas & McMahon, 2014).

Постійний розряд периферичних аферентних волокон, який супроводжується одночасним вивільненням збуджуючих амінокислот та нейропептидів, призводить до постсинаптичних змін у ноцицептивних нейронах другого порядку, яке виражається у збільшенні збудливості за рахунок фосфорилування рецепторів NMDA та AMPA. Ці зміни у нейронах другого порядку, ймовірно, відображаються посиленою сенсорною активністю нейронів таламусу, що підтверджується даними досліджень на тваринах (Patel & Dickenson, 2016) та людях (Peugon, 2016), а, отже, можуть пояснювати причину аллодінії. Підвищена збудливість також може бути спричинена втратою ГАМК-ергічних інгібіторних інтернейронів, що також може призвести до посилення збудження в нейронній мережі спинного мозку (Tsuda et al., 2013)

## **1.6. Загальні відомості про організацію ДР СМ.**

ДР СМ отримує сенсорний вхід від найрізноманітніших первинних аферентів, включаючи ноцицептори, прурітоцептори (сенсори зуду), терморцептори та низькопорогові механорецептори. Ці волокна термінують за високоорганізованою схемою в межах конкретних пластинок (Abraira & Ginty, 2013; Braz et al., 2014; Gutierrez-Mecinas et al., 2016; Erika Polgár et al., 2010). Рексед (Rexed, 1952) розділив сіру речовину СМ kota на ряд паралельних пластинок на основі варіацій розмірів та щільності розташування нейронів, і ця схема з тих пір застосовується до інших видів. Пластинка I і II (також відомі як маргінальна зона і субстанція желатиноза)

складають поверхню ДР і характеризуються наявністю численних дрібних нейронів. Пластинка II може бути поділена на зовнішню (IIo) та внутрішню (IIi) частини, при цьому остання має дещо меншу щільність нейронів. Первинні аференти розгалужуються в ДР впорядковано: ламінарна схема аксональних закінчень базується на основі діаметра та функції волокна, що відповідає соматотопічному розподілу, який визначає медіолатеральне та ростракаудальне розташування. Відомо, що тактильні A $\beta$  та волоскові аференти закінчуються в основному на пластинках III-VI з деяким розширенням на пластину IIi, точне розташування залежить від їх функції (Brown & Fyffe, 1981). Аференти A $\delta$  від волосяних фолікулів галузяться з обох боків межі між пластинками II / III, тоді як A $\delta$  ноцицептори закінчуються переважно на пластині I, де деякі дають гілки пластинам V та X (Light et al. 1981). Більш недавні дослідження виявили мієлінізовані ноцицептори зі швидкістю провідності в діапазоні A $\beta$  волокон, які закінчуються на пластинах I-V (Woodbury et al., 2008). Пептидергічні первинні аференти (до яких також належать частина C та деякі A $\delta$  ноцицептори (Lawson et al., 1997) закінчуються переважно в пластинах I та IIo, при цьому деякі волокна проникають глибше, тоді як більшість непептидергічних C волокон утворюють смугу, яка займає центральну частину пластинки II (Lorenzo et al., 2008).

Сенсорна інформація, яка поступає в СМ, обробляється складними синаптичними мережами перед передачею через проєкційні 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 (Abraira & Ginty, 2013)

## 1.7. Первинні аференти, які термінують в структурі ДР СМ.

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). Ці особливості взаємопов'язані, оскільки більшість мієлінізованих шкірних (Аβ) аферентів - це низькопорогові механорецептори, що реагують на дотик або рух волосся, тоді як більшість слабкомієлінізованих (Аδ) та немієлінізованих (С) волокон є ноцицепторами або терморецепторами.

Первинні аференти закінчуються за специфічною схемою розподілу, яка визначається їх функціональним класом. Взагалі, мієлінізовані низькопорогові механорецептивні аференти розгалуджуються у зоні, що проходить між пластинами ІІ-ІІІ, тоді як ноцицептивні та терморецептивні аференти Аδ та С іннервують пластину І та велику частину пластинки ІІ, за винятком її найвентральнішої частини (Agashkov K, Krotov V., et al., 2017). Недавні дослідження визначили групу специфічних холодкових С-аферентів, які закінчуються в пластинці І (Dhaka et al., 2007), а також два можливих кандидати для низькопорогових механорецептивних С волокон, які мають проєкції у пластину ІІ (Seal et al., 2009). Ноцицептивні С волокна можна розділити на дві основні нейрохімічні групи: ті, що містять нейропептиди, такі як речовина Р (Lawson et al., 1997), та ті, що їх не мають (Snider & McMahon, 1998). Ці дві групи мають характерні зони закінчення в межах поверхневих пластинок. Непептидергічні С волокна в основному пов'язані зі шкірою, де вони іннервують епідерміс (A. M. W. Taylor et al., 2009), тоді як пептидергічні волокна іннервують інші тканини, а також більш глибокі ділянки шкіри (Michael et al., 1997). Нещодавно було показано, що експресія

мембранного рецептора MrgprD (MAS related GPR family member D) визначає популяцію непептидергічних ноцицептивних волокон С у миші (Zylka, 2005). Вони мають аксони, які закінчуються периферично в епідермісі та центрально у вузькій смужі в межах пластинки II. Відмінності в їх периферичному та центральному розподілі свідчать про те, що пептидергічні та непептидергічні ноцицептивні С волокна відрізняються за своєю функцією. Цю точку зору підтверджує нещодавнє дослідження, в якому абляція аферентів MrgprD у дорослих мишей призводила до вибіркової втрати чутливості до шкідливих механічних (але не термічних) подразників (Cavanaugh et al., 2009; Han et al., 2013).

Всі первинні аференти використовують глутамат як головний нейротрансмітер, і, таким чином, мають збуджуючу дію на свої постсинаптичні мішені. Однак їх ультраструктурний вигляд та синаптичні композиції відрізняються. Непептидергічні С волокна та А $\delta$  аференти волосяних фолікулів, можуть утворювати центральні аксони двох різних типів синаптичних гломерул, в якому вони є пресинаптичними до декількох дендритів та постсинаптичними для аксо-аксональних синапсів (Ribeiro-Da-Silva & Coimbra, 1982). Центральні терміналі А $\beta$ -аферентів і А $\delta$ -ноцицепторів, як правило, утворюють більш прості синаптичні контакти, але теж мають аксо-аксональні синапси, а також є пресинаптичними в аксо-дендритних синапсах. Первинні ж пептидергічні аференти отримують мало аксо-аксональних синапсів (Pignatelli et al., 1989).

### **1.8. Типи інтернейронів поверхневих пластинок ДР СМ.**

Аферентна сенсорна інформація перед передачею через проєкційні нейрони до мозку обробляється складними синаптичними мережами ДР СМ. Основні компоненти цих регуляторних мереж - це локальні інтернейрони, яких надзвичайно багато, і, як вважають, вони складають



близько 99% нейронів дорзального рогу (Abraira & Ginty, 2013). Інтернейрони дорзального рогу можна розділити на два широкі функціональні класи: інгібіторні нейрони, які використовують ГАМК та / або гліцин як головний нейротрансмітер, і збудливі (глутаматергічні) нейрони (Spike et al., 2003; Yasaka et al., 2010; Zeilhofer et al., 2012). У щурів ГАМК присутній у ~ 25%, 30% та 40% нейронів пластинки I, II та III відповідно (E. Polgár et al., 2003). Гліцин присутній у високих рівнях у багатьох нейронах пластинки III та деяких нейронах пластинок I-II, але при імунологічному міченні в пластинках I- III сигнал значно обмежений за рахунок ГАМК-позитивних клітин (E. Polgár et al., 2003). Це говорить про те, що багато інгібіторних інтернейронів спільно вивільняють ГАМК та гліцин, тоді як інші вивільняють лише ГАМК. Аксони інгібіторних інтернейронів можуть бути ідентифіковані за допомогою антитіл проти везикулярного ГАМК-транспортера (VGAT, який також транспортує гліцин), глутаматдекарбоксилази (GAD, ГАМК-синтезуючий фермент) або нейронного транспортера гліцину (GlyT2). Вони виявляють щільне сплетіння інгібіторних аксонів у пластинках I-III, в основному походять від локальних інтернейронів. Інгібіторні інтернейрони можна поділити на специфічні класи, виходячи з експресії певних нейропептидів і білків (Braz et al., 2014; Todd, 2010a, 2017; Yasaka et al., 2010), і все більше свідчень про те, що ці нейрохімічні класи відповідають функціональним популяціям. Наприклад, вони відрізняються ламінарним розташуванням, що, ймовірно, відображає специфічні патерни первинного аферентного входу для кожного класу та їх відповіді на больові стимули (E. Polgár et al., 2003).

Немає надійних імуноцитохімічних клітинних маркерів для глутаматергічних нейронів, але ймовірно, що всі нейрони дорзального рогу, які не є імунореактивними до ГАМК або гліцину, є глутаматергічними. Їх аксони можна ідентифікувати за наявністю везикулярних транспортерів глутамату (VGLUTs) (E. Polgár et al., 2003). Значна кількість збудливих

інтернейронів у дорзальному розі експресують VGLUT2 (Yasaka et al., 2010). У пластинках I-III містяться численні бутони, що містять VGLUT2, більшість з яких походять від місцевих збудливих інтернейронів.

### **1.9. Проекційні нейрони поверхневих пластинок ДР СМ.**

Більшість проекційних нейронів спинного мозку сконцентровані в пластинці I, деякі розкидані по пластинкам III-VI, а дуже мала кількість розташована в пластинці II на поперековому рівні спинного мозку. Багато проекційних нейронів дорзального рогу, в тому числі у пластинці I, мають аксони, які перетинають середню лінію і рухаються ростральному напрямку в білій речовині з контралатеральної сторони, та закінчуються в різних ядрах стовбуру мозку та таламусі, утворюючи набір шляхів, які, як вважають, лежать в основі сприйняття болю та температури. За допомогою ретроградного маркування було досліджено: 1) кількість нейронів, мічених від кожної області мозку, 2) здатність окремих нейронів проектувати на більш ніж одну ділянку, 3) різні анатомічні та нейрохімічні особливості клітин (Almarestani et al., 2007; R Burstein et al., 1990; Hylden et al., 1989; D. Lima & Coimbra, 1988; D Lima et al., 1991; Spike et al., 2003; Todd et al., 2000). Антероградне мічення було використано для відображення закінчень цих висхідних проєкцій (Gauriau & Bernard, 2004a; Slugg & Light, 1994). Більшість проекційних нейронів спинного мозку мають тіла, які лежать у пластинці I, та проектують на різні зони, такі як: каудальний вентролатеральний мозок, який породжує низхідні проєкції до дорзального рогу і може інтегрувати ноцицептивну та серцево-судинні реакції (Deolinda Lima et al., 2002)); ядро солітарного тракту - область, яка також отримує кардіо-респіраторний вхід і відіграє роль у рефлексній тахікардії, що є результатом больової стимуляції (Boscan et al., 2002)); бічна парабрахіальна область (LPb), яка є основною мішенню для проекційних нейронів пластинки I у щурів; періакведукальна сіра речовина (PAG), яка бере участь

в організації подолання стресових сигналів (включаючи біль) і є одним із центральних сайтів аналгетичної дії (Heinricher et al., 2009). Ядра, які отримують вхід від проекційних нейронів поверхневих пластинок дорзального рогу, передають сигнал до таких ділянок переднього мозку, як мигдалина та гіпоталамус (Gauriau & Bernard, 2002). Завдяки цим зв'язкам спінопарабрахіальний шлях, ймовірно, бере участь у емоційних та вегетативних компонентах болю. Завдяки своїм проекціям на інші ділянки стовбура мозку (включаючи ростральну ділянку вентромедіального мозку), проекційні нейрони відіграють важливу роль у низхідній регуляції мереж дорзального рогу. Слід зазначити, що кілька таламічних ядер отримують прямі входи від проекційних нейронів поверхневих пластинок дорзального рогу. У щурів до них належать вентральне задньолатеральне ядро (яке реціпрокно зв'язано з первинною соматосенсорною корою), задня група, з'єднання якої досі погано зрозумілі (Gauriau & Bernard, 2004b) і заднє трикутне ядро, яке має проекції на другу соматосенсорну область та острівцеву кору (Gauriau & Bernard, 2004b). Існує велика колатералізація аксонів, при цьому деякі нейрони пластинки I дають проекції щонайменше до 3 мішеней (LPb, PAG та таламус (Al-Khater & Todd, 2009)). Кількісні дослідження за допомогою ретроградного мічення на щурах виявили, що у сегменті L4 проекційні нейрони складають ~5% нейронів пластинки I (Spike et al., 2003). З них 95% проектують в LPb, близько третини в PAG, чверть в ядро солітарного тракту і <5% в таламус. Враховуючи ділянки цих проекцій, ці шляхи, ймовірно, сприятимуть як сенсорно-дискримінаційним, так і афективно-мотиваційним аспектам болю (через соматосенсорну та острівцеву кору відповідно).

Проекційні нейрони пластинки I не є однорідною групою, і було кілька спроб їх класифікації. Вони ґрунтувались на фізіологічних властивостях (Andrew, 2009; Bester et al., 2000; Ran et al., 1998) та різних анатомічних ознаках (морфологія та експресія рецепторів) (Spike et al., 2003; Todd et al.,

2000). Електрофізіологічні дослідження на мавпах, котах та щурах *in vivo* показали, що більшість проєкційних нейронів пластинки I реагують на больові подразники, хоча деякі з них активуються при дії невеликих холодних стимулів (X. Zhang & Giesler, 2005).

Дендрити проєкційних нейронів пластинки I зазвичай залишаються в межах пластинки, і, виходячи з їх орієнтації та розгалуження, клітини були класифіковані на веретеноподібні, пірамідальні та мультиполярні типи (Almarestani et al., 2007).

Зв'язок між нейронами дорзального рогу реалізується дуже складними синаптичними мережами. Наприклад, цілком ймовірно, що більшість (якщо не всі) нейронів ДР отримують синаптичний вхід як від первинних аферентів, так і від збудливих та гальмівних інтернейронів. Однак конкретні типи та відносна сила цих входів відрізняються між популяціями нейронів. Наші знання про те, як організовані ці схеми, поки обмежені, але визначивши принаймні деякі групи нейронів, ми зараз в змозі дослідити ці мережі, в яких вони беруть участь.

### **1.10. Цільний препарат спинного мозку як метод для вивчення функціональної активності нейронів ДР СМ.**

Функціональні дослідження нейронних мереж потребують записів з візуально ідентифікованих нейронів у їх природному середовищі, що потребує проведення експериментів з тканиною значної товщини або з цілим мозком. За допомогою косої світлодіодної освітлення яке останнім часом застосовується для візуалізації немічених живих клітин в блоках нервової тканини, а також у цілому головному мозку та спинному мозку (Safronov et al., 2007), можна отримувати як зображення високої роздільної здатності поверхневих нейронних структур, таких як аксони та дендрити (синій світлодіод, 470 нм), так і зображенням глибоких клітин (інфрачервоний світлодіод, 940 нм). Ця вдосконалена методика

інфрачервоної світлодіодної візуалізації в інтактних препаратах відкриває широкі можливості для фізіологічних досліджень нейронів із повністю збереженими анатомічними структурами та синаптичними входами. Цей метод особливо корисний для візуально контрольованих записів з поверхневих нейронів з обширними дендритним та аксональним галуженням, які неможливо вивчити за допомогою тканинних зрізів.

Використовуючи цільний препарат спинного мозку та ретроградне мічення нейронів, ми змогли ідентифікувати проєкційні нейроні ДРСМ, які знаходяться переважно в першій пластинці СМ та термінують здебільшого в парабрахіальному ядрі заднього мозку. Беручи до уваги, що спіно-парабрахіальні нейрони пластинки І спинного мозку є основними клітинами, які передають ноцицептивну інформацію від СМ до супраспинальних структур, та все вищенаведене, нами були проведені експерименти, що описані у наступних частинах дисертації. Результати цих експериментів дозволили нам покращити наше розуміння принципів функціонування СПН у фізіологічних та патологічних умовах, та істотно вдосконалити загальне уявлення про виникнення та підтримання болю.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.

### 2.1. Експериментальні тварини.

Для даної роботи в експериментах використовували самців щурів лінії Вістар та мишей лінії FVB. Всі тварини утримувалися в віварії Інституту Фізіології ім. О. О. Богомольця 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.

Вік щурів, яких брали в експерименти становив 20-21 постнатальний день (P20- P21). В цьому віці щурам була проведена стереотаксична інтратекальна ін'єкція ретроградного барвника Fluoro-Gold (ФГ) в латеральне парабрахіальне ядро, для виявлення проєкційних СПН у дорзальному розі спинного мозку. Для дослідження активності СПН дорзального рогу тварин брали в електрофізіологічні дослідження у віці P24-P28.

Вік мишей яких брали в експерименти становив 8-9 тижнів. В цьому віці мишам була проведена: а) стереотаксична субпіальна ін'єкція в L3-L5 сегмент спинного мозку з вірусного конструкту AAV9-UBI-GFPб)

стереотаксична субпіальна ін'єкція в L3-L5 сегмент спинного мозку вірусних конструктів AAV9-UBI-GFP +AAV9-UBI-GAD65+AAV9-UBI-VGAT. Для дослідження активності в поверхневих пластинках дорзального рогу тварин брали в електрофізіологічні досліди через 2-5 тижнів.

## **2.2. Метод фон Фрея для оцінювання механічної больової чутливості.**

Для визначення больової чутливості у відповідь на механічний стимул використовували філаменти фон Фрея (Freu, 1896). Тварину розміщували у камеру 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. Вимірювали кількість характерних больових реакцій, а саме відсмикувань кінцівки, при досягненні 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.

В даній роботі для визначення порогів механічної чутливості використовували набір філаментів фон Фрея виробництва BioSeb (Франція). Схематичне зображення проведення тесту для визначення порогу механічної чутливості представлений на Рис. 2.1.



**Рис. 2.1. Оцінка порогів механічної чутливості методом філаментів фон Фрея.** (А). Зображення дослідження застосування методу філаментів фон Фрея. тварина розміщена в камері з сітчастою підлогою, до підошовної поверхні шкіри задньої кінцівки підводяться калібровані філаменти фон Фрея. (Б). Схематичне зображення лапи. Стрілкою позначена ділянка, поріг механічної чутливості якої визначається філаментами фон Фрея. Зображення запозичене з роботи (Ferrier et al., 2016).

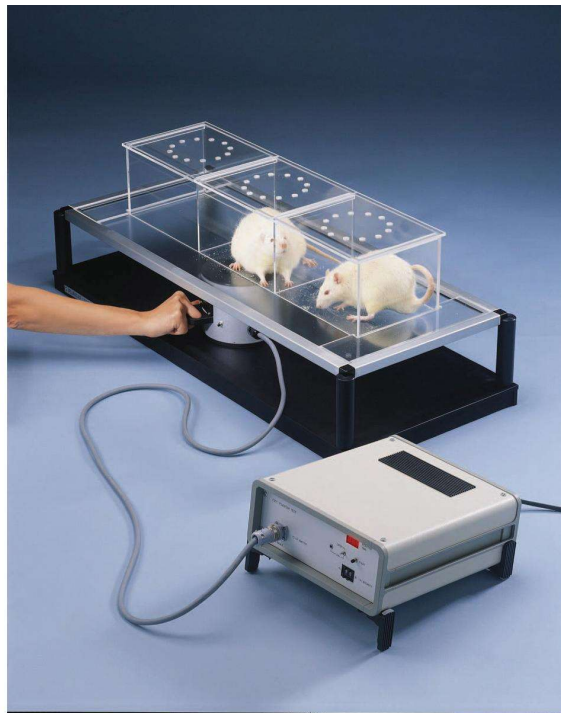
### **2.3. Підошовний тест Харгрівса для оцінювання термічної больової чутливості.**

Для визначення змін термічної больової чутливості при хронічному больовому синдромі у піддослідних тварин. Відповідні зміни периферичної больової чутливості на дію термічного подразника оцінювали методом Харгрівса (Hargreaves et al., 1988). 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 тварину розміщали в експериментальну камеру та давали час на адаптацію до



експериментальних умов Після того 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.

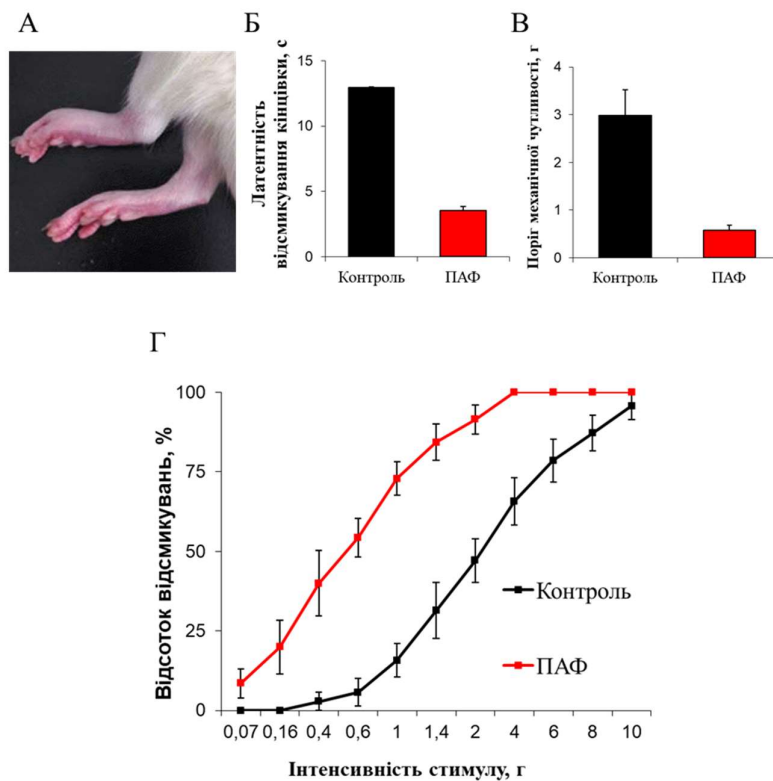
В даній роботі для підошовного тесту Харгрівса використовували обладнання Ugo Basile (Італія). Схематичне представлення вищезазначеного обладнання наводиться на (Рис. 2.2).



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

## 2.4. Моделювання хронічного запального болю за допомогою ад'юванту Фройнда.

Периферичне запалення задньої кінцівки щура викликано шляхом підшкірного введення 50 мкл ПАФ (CFA, Sigma, St.Louis, MO, USA), розведеного у 0,9% розчині NaCl (Натрію хлорид, розчин для інфузій, «Дарниця», Київ, Україна) у пропорції 1:1, як описано у статтях (Korach et al., 2015a, 2016). (Рис. 2.3).



**Рис. 2.3.** Зміни порогів больової чутливості щурів при периферичному запаленні індукованого введенням ПАФ. (А) Фотографія задніх кінцівок щура, якому була здійснена ін'єкція ПАФ у ліву лапу. (Б) Результати підшовного тесту Харгрівса в контрольних умовах і при периферичному запаленні. (В) Пороги механічної больової чутливості в контрольних умовах та при периферичному запаленні, визначені методом філаментів фон Фрея. (Г) Криві механічної чутливості в контрольних умовах і при периферичному запаленні. Зображення запозичені з роботи (Korach et al., 2015b)

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

У експериментах із хронічним запальним болем, що викликано ПАФ, використовували самців щурів лінії Вістар у віці 20-21 днів постнатального розвитку. У дослід тварин відбирали через добу після ін'єкції ПАФ. Умови утримання контрольних тварин, та тварин, у яких було викликане запалення були ідентичні. Незважаючи на те, що, тварини, з індукованим запаленням демонстрували анталгічну поведінку на ураженій кінцівці, але стабільно проявляли інші нормальні поведінкові реакції тобто споживання їжі, грумінг та дослідження території.

## **2.5. Моделювання хронічного нейропатичного болю.**

Для моделювання хронічного нейропатичного болю було проведено однібочна лігація сідничного нерва, яка була детально описана Зельтцером та колегами (Seltzer et al., 1990). Хірургічна процедура проводилась в асептичних умовах. Після проведення анестезії шляхом інтраперітонеального введення розчину кетаміну 65 мг/кг та ксилазину 10 мг/кг, хірургічну область голили та оброблювали розчином Betadine (Egis, Hungary). Під мікроскопом виконували розріз шкіри по латеральній поверхні стегна до 0,5 см, м'язи розводили тупим кінцем скальпелю та візуалізували сідничний нерв вище його трифуркації, після чого накладали лігатуру за допомогою шовкового шовного матеріалу 8-0. Після перев'язки сідничного нерва (травма периферичного нерва) хірургічну рану пошарово ушивали та обробляли розчином Betadine (Egis, Hungary). Тварини знаходились на термостатичному килимі (30 °C) впродовж всієї операції до моменту відновлення від анестезії. На 9 добу після операції проводили

визначення змін порогів больової термічної та механічної чутливості, а також оцінювали загальну поведінкову активність дослідних тварин.

## **2.6. Ретроградне мічення СПН ДР.**

Ретроградне мічення використовується для селективного маркування необхідних нейронів. Цей метод давно та широко використовується для дослідження головного та спинного мозку, зокрема для маркування проєкційних нейронів спинного мозку, проте ретроградні барвники можуть сильно відрізнятись.

На початку 1970-х років було виявлено, що глікопротеїн та фермент пероксидаза хрину (HRP) є ефективним ретроградним маркером, який потрапляє у нейрони неселективно шляхом пасивного ендоцитозу (Köbber et al., 2000; Kristensson & Olsson, 1971; LaVail & LaVail, 1972; Vercelli et al., 2000). HRP візуалізується, коли відбувається окислення хромогенних субстратів, таких як 3,3'-діамінобензидин та тетраметилбензидин, перекисом водню. Отримане фарбування обмежується сомою клітини та первинними дендритами (Köbber et al., 2000) і, власне, HRP демонструє порівняно низьку чутливість через неефективне поглинання нейронами на місці ін'єкції. Однак кон'югація HRP з рослинним лектиновим аглютиніновим зародком пшениці (WGA), який є самостійним нейронним трейсером, значно покращує як поглинання, так і транспортування всередині нейронів (Köbber et al., 2000; Staines et al., 1980). WGA зв'язується з N-ацетилглюкозаміном і сіаловою кислотою, зв'язаною з плазматичною мембраною, і швидко активно транспортується як в антероградному, так і в ретроградному напрямках, забезпечуючи більш широке (але не повне) маркування нейронів порівняно з HRP (Dumas et al., 1979; Levy et al., 2017; Schwab et al., 1978). Кон'югати WGA-HRP також здатні обмежувати транссинаптичні переміщення (Goshgarian & Buttry, 2014; Sillitoe, 2016), вносячи певну неоднозначність в інтерпретацію даних. В даний час WGA

доступний у складі кон'югата з флюорофором, виключаючи необхідність імуногістохімічної обробки для візуалізації.

Субодиниця В холероксину (СТб) була представлена як ретроградний маркер в 1977 р. (Stoeckel et al., 1977; Trojanowski et al., 1981; Vercelli et al., 2000). Пізніше були зроблені спроби підвищення чутливості HRP за допомогою кон'югатів СТб-HRP, які виявили, що кількість мічених нейронів та кількість мічених відростків були значно більшими для СТб-HRP ніж для вільної HRP. Це пов'язується з гангліозид (цукру) GM1-залежним захватом СТб, який є ефективнішим порівняно з неспецифічним ендцитозом HRP (Lanciego & Wouterlood, 2011; Trojanowski et al., 1981, 1982). Некон'югований СТб можна виявити за допомогою імуногістохімії, однак розвиток СТб-кон'югованих флюорофорів (Conte et al., 2009) або навіть магнітно непрозорі мітки, видимі для МРТ (Wu et al., 2011), розширили сферу застосування СТб. Сила флуоресцентного сигналу кон'югованих СТб, його швидке транспортування (2–7 днів), низька токсичність та простота застосування робить його придатним для ідентифікації нейронів для наступних електрофізіологічних записів *in vitro* (Bou Farah et al., 2016; Korim et al., 2014) або *in vivo* (Yamashita & Petersen, 2016), та пояснює використання СТб в якості одного з основних ретроградних маркерів (Parker et al., 2013; Zhao et al., 2017), незважаючи на те, що, як і більшість звичайних трейсерів, транспорт СТб певною мірою є двостороннім (Nosedá et al., 2010). Ще одним недоліком СТб є те, що пов'язані з ним флюорофори можуть зазнати значного зменшення сигналу при використанні спільно з гібридизацією *in situ*, і оскільки флюорофор перешкоджає зв'язуванню антитіл анти-СТб, загальний сигнал не може бути посилений анти-СТб антитілами, тому для подвійного маркування мРНК та СТб бажано використати некон'юговану форму.

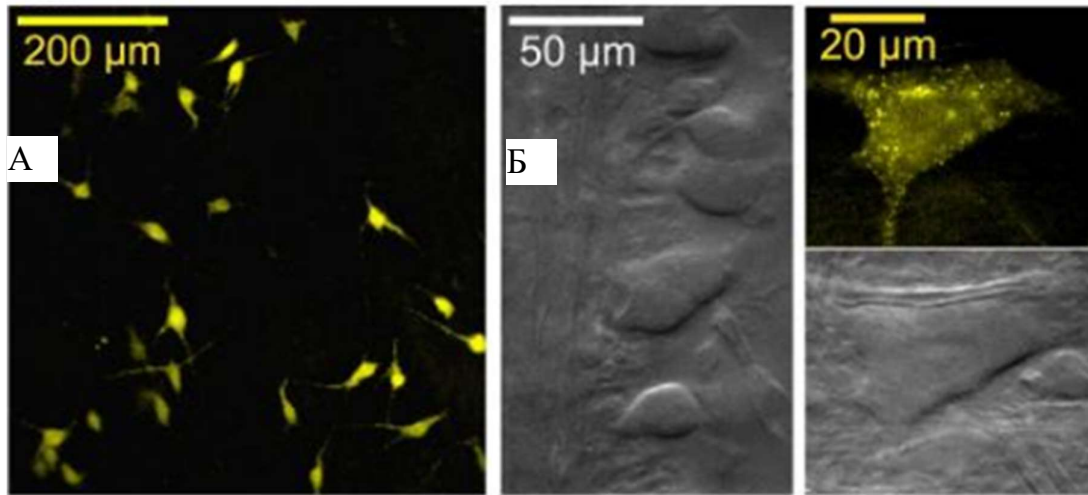
Широко застосовується і ряд неорганічних відстежувачів. Гідроксистилбамідин (FluoroGold) - неорганічна сполука, яку

безпосередньо видно за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Після поглинання нервовими терміналами шляхом ендцитозу рідкої фази, FluoroGold транспортується ретроградно до клітинних сом у везикулах і накопичується в цитоплазмі, де барвник можна виявити протягом кількох місяців після ін'єкції (Köbbert et al., 2000; Lanciego & Wouterlood, 2011). Інтенсивність сигналу, стійке до вигорання мічення досягнуте за допомогою FluoroGold, та наявність антитіл проти FluoroGold™ для подальшої ампліфікації призвели до того, що він став «золотим-стандартом» мічення, з яким порівнюються усі нові маркери (Lanciego & Wouterlood, 2011; Tervo et al., 2016).

Для ретроградного мічення ми використали фарбник aminostilbamidine (аналог Fluoro-Gold) який був стереотаксично ін'єктований в парабрахіальну зону заднього мозку, що дозволяє помітити більшість СПН пластинки I, які проєктують саме в цю область (Spike et al., 2003; Todd, 2010b). Так як індивідуальні нейрони можуть мати проєкції до декількох зон (Todd, 2010b), то популяція СПН мічена з парабрахіальної зони також містила ті нейрони які мали проєкції до інших регіонів такі як таламус та періакведукальна сіра речовина (Al-Khater & Todd, 2009; Spike et al., 2003).

Процедура ретроградного мічення за допомогою гідроксистилбамідину була наступною. Щури лінії Вістар (P20-21) були анестезовані інтраперітонеально 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. Гідроксистилбамідину (200-300 нл, 2%) 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, 2мм медіолатерально та 5,6 мм дорсовентрально (кут 30 °). Після видалення голки, на шкіру

накладалися шви та операційна рана оброблялася розчином Betadine (Egis, Hungary). Тварини знаходились на термостатичному килимі (30 °C) впродовж всієї операції до моменту відновлення від анестезії. За три чотири дні ретроградним транспортом барвник доставлявся до соматичних СПН, після чого тварин використовували для електрофізіологічних дослідів.



**Рис. 2.4** Різноманіття спінопарабрахіальних нейронів пластинки I спинного мозку. (А) конфокальні зображення (Z-стек, 30 мкм, з кроком 3 мкм) мічених Флуороголд поперекових СПН. (Б) (зліва) нейрони пластинки I у *ex-vivo* препараті спинного мозку з використанням косого інфрачервоного світлодіодного освітлення; (праворуч) епіфлюоресцентні та інфрачервоні-світлодіодні зображення ретроградно міченого СПН.

## 2.7. Методика субпіальних ін'єкцій

Субпіальні ін'єкції (СІ) проводили мишам у віці 8-9 тижнів. Всі хірургічні процедури проводилися в стерильних умовах. Введення в поперековий (L3 – L4) сегменти (Tadokoro et al., 2017). Миші були анестезовані інтраперітонеально розчином кетаміну 65 мг/кг та ксилазину 10 мг/кг., ділянка хірургічного втручання голилась та очищалася, розріз шкіри

робився на рівні хребців T8 – L4. Під мікроскопом було проведено дорзальну ламінектомію хребців L3 – L4, тверда мозкова оболонка розкривалась голкою 30-G. Потім м'яку мозкову оболонку проколювали за допомогою 36-G проникаючої голки з подальшим введенням тупої 36-G ін'єкційної голки, через яку вводилися вірусні конструкти AAV9- UBC-GFP, GAD65, та VGAT ( $5,3 \times 10^{12}$  гк/мл,  $1,5 \times 10^{12}$  гк/мл та  $3,3 \times 10^{12}$  гк/мл, відповідно; загальний об'єм 3,0 мл;) (University of California-San Diego (UCSD)). Ці голки були встановлені на трьохосьовому прецизійному маніпуляторі XYZ (SMM 100B, Narishige). Вірусні конструкти вводили в поперековий субпіальний простір використовуючи 5 - мкл шприц Гамільтон. Після доставки векторів голку видаляли, м'язи та шкіру закривали за допомогою Пролону 6/0. Тварини знаходились на термостатичному килимі (30 °C) впродовж всієї операції до моменту відновлення від анестезії. За два тижні досягалась достатня експресія для подальшого проведення електрофізіологічних досліджень.

## **2.8. Метод отримання інтактного *ex-vivo* препарату спинного мозку.**

Обробка сенсорної, і зокрема ноцицептивної, інформації в спинному мозку відбувається за рахунок тонкої взаємодії між всіма нейронними мережами (Todd, 2010a). Тому, щоб дослідити зміни активності СПН нам необхідно було вивчити їх роботу в максимально інтактному середовищі, тобто зі збереженою мережевою взаємодією. Таким потребам відповідають моделі *ex-vivo* препаратів описані у наступних роботах (Krotov et al., 2017a; Safronov et al., 2007; Szűcs et al., 2009) На відміну від інших препаратів, таких як тонкі зрізи спинного мозку, *ex-vivo* препарати дозволяють зберегти рострально-каудальну, так і медіолатеральну архітектонічну будову, а також роблять набагато простішим збереження аферентних волокон, тобто центральних аксонів ДКГ нейронів. Саме тому для дослідження СПН дорзального рогу ми використовували цей препарат.

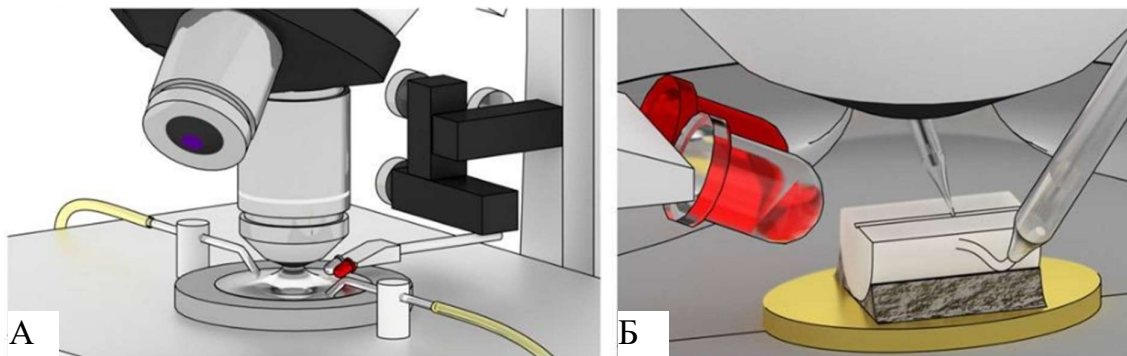


Щури (24-28 постнатальний день) та миші (9-11 постнатальні тижні) були вбиті шляхом декапітації, після чого їм було видалено хребет, який було поміщено в оксигенований розчин сахарози, що містив (у mM): 200 сахарози, 2 KCl, 1,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, 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). Спинний мозок було делікатно виділено зі збереженням дорзальних 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 цианоакрілового клею *ex-vivo* спинний мозок закріплювався до металевої пластинки. Після цього пластинка поміщалася в пластикову камеру, надруковану у 3D принтері. Експериментальна камера наповнювалася розчином бікарбонату Кребса, який містив (в mM) 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.

## **2.9. 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 500-600мкм. 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 (ІЧ) світлодіод (860 нм, ± 3 °, SFH4550, Osram). Світлодіод був прикріплений до мікроманіпулятора (Рис. 2.5 А), що дозволило регулювати кут (10–20 °) 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 дорзального корінця спинного мозку (Safronov et al., 2007; Szűcs et al., 2009).



**Рис. 2.5** Модель бічного освітлення за допомогою світлодіодів. Ілюстрації налаштування оптичної системи, що використовуються для візуалізації та функціональних досліджень в 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 (Krotov et al., 2017b)

## **2.10. Реєстрація іонних струмів з використанням методики «patch-clamp».**

### ***2.10.1. Загальні відомості.***

За допомогою методики «patch-clamp» у конфігурації «ціла клітина» проводилось визначення різних електрофізіологічних характеристик нейронів ДР СМ. Цей метод, який на є одним з найпоширеніших електрофізіологічним, був запропонований у 1976 році Е. Неєром і Б. Сакманом (Neher & Sakmann, 1976). 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 ( $1 \div 100 \text{ Г}\Omega$ ) 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.

### ***2.10.2. Експериментальна конфігурація.***

Нейрони пластинки I ДР візуалізували за допомогою мікроскопу Olympus BX50WI (Olympus, Японії) 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 Borosilcate glass with filament (зовнішній діаметр – 1,5 мм, внутрішній діаметр – 0,86 мм, довжина – 10 см) виробництва Sutter instrument (Сполучені Штати). Піпетки мали діаметр кінчика 1-2 мкм, а їх опір складав 3-4 МΩ при заповненні внутрішньоклітинним розчином наступного складу (у ммоль/л): калійглюконат – 133, NaCl – 5, MgCl<sub>2</sub> – 0,5, Mg-АТФ – 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.

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.

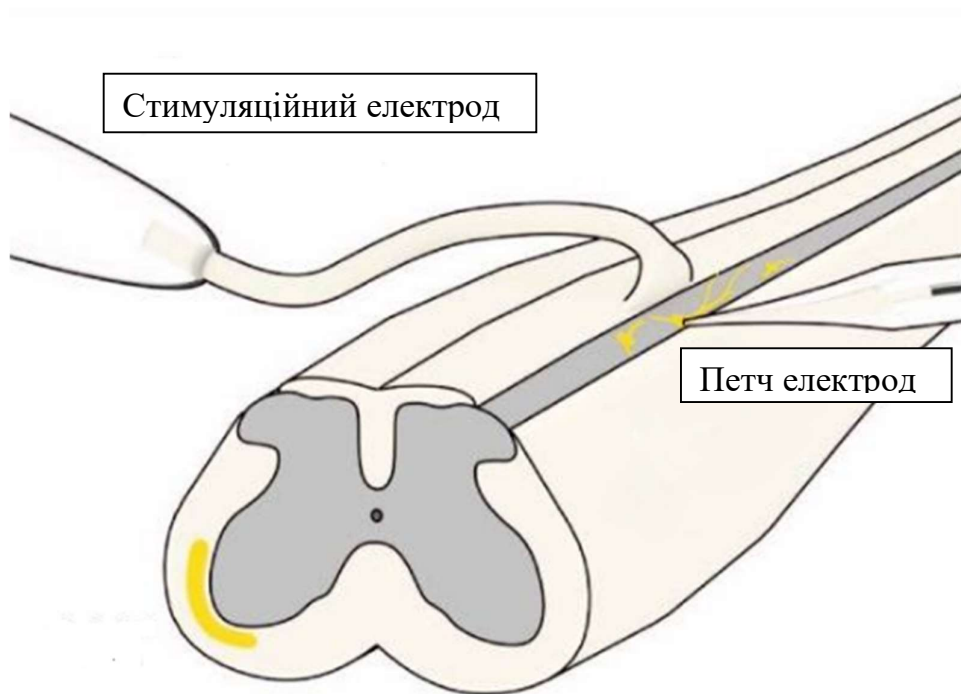
Електричні записи від мічених СПН пластинки I поперекового сегменту L4-L5 проводились в режимі «ціла клітина» при кімнатній температурі (20-24°C) в оксигенованному розчині штучної спинномозкової рідини що містить (у mM): NaCl 125, KCl 2,5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 26 and glucose 10 (pH 7,4, 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>). Отриманий сигнал фільтрувався на 2,6 kHz, використовуючи підсилювач MultiClamp 700B (Molecular Devices, CA, USA); оцифрування проводилось на 10 kHz 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 IC-0.

### ***2.10.3. Стимуляція дорзальних корінців спинного мозку***

Стимулювання дорзальних корінців За допомогою стимуляційного електроду з використанням стимулятора ISO-Flex (AMPI, Israel) (Krotov et al., 2017b; Vitor Pinto et al., 2008) проводилось для того, щоб активувати A $\beta$ -та A $\delta$ -волокна використовувався 50 мкс імпульс з наростаючою амплітудою (10-100 мкА), для активації всіх волокон, в тому числі високопорогових A $\delta$ -та C-аферентів, використовувався імпульс 1 мс (30-140 мкА) (Рис. 2.6). Для того щоб запобігти феномену “wind-up”, який спостерігається в СПН (Nachisuka et al., 2018), 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 (Luz et al., 2010; Vitor Pinto et al., 2010). Вимірювання швидкості проведення по волокнам підраховувалась шляхом ділення довжини проведення на час проведення. Довжина включала

довжину корінця від збуджуючого електроду до зони входу дорзального корінця та до встановленого електроду всередині СМ. Спинномозковий шлях вимірювався за допомогою відеозображень та вираховувався як сума rostroкаудальної та медіолатеральної відстані між тілом клітини та відповідною зоною входу дорзального 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 СМ, ретроградно мічені СПН пластинки I ДР СМ, стимуляційний електрод, петч – електрод.

Волокна, що передають моносинаптичний сигнал до СПН пластинки I, були класифіковані відповідно до критеріїв розробленими у (Fernandes et al., 2016). Якщо волокна активувалися імпульсом тривалістю 50 мкс імпульсом 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 високопорогові А $\delta$ -волокна (Krotov et al., 2019); для спрощення А $\delta$ - та високопорогові 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 (НП-С) аферентів.

### **2.11. 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 Фішера.

Різницю порівнюваних величин вважали достовірною, якщо ймовірність нульової гіпотези була меншою, ніж 5 % ( $p < 0,05$ ). Після результатів наводили також значення числа експериментів (n), яке дорівнювало кількості клітин у електрофізіологічних або поведінкових досліджах.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

### 3.1. Різниця аферентного входу та вихідного сигналу в проєкційних нейронах пластинки I СМ.

#### 3.1.1. Різні типи проєкційних нейронів пластинки I СМ.

Для patch-clamp вимірювань СПН пластинки I були візуалізовані шляхом використання комбінації флуоресцентного зображення та техніки бічного інфрачервоного світлодіодного освітлення

В залежності від генерації ПД у відповідь на стимуляцію дорзального корінця супрамаксимальним стимулом (1 мс, 140 мкА, 0,1 Гц) СПН були поділені на три типи (Рис. 3.1 ).

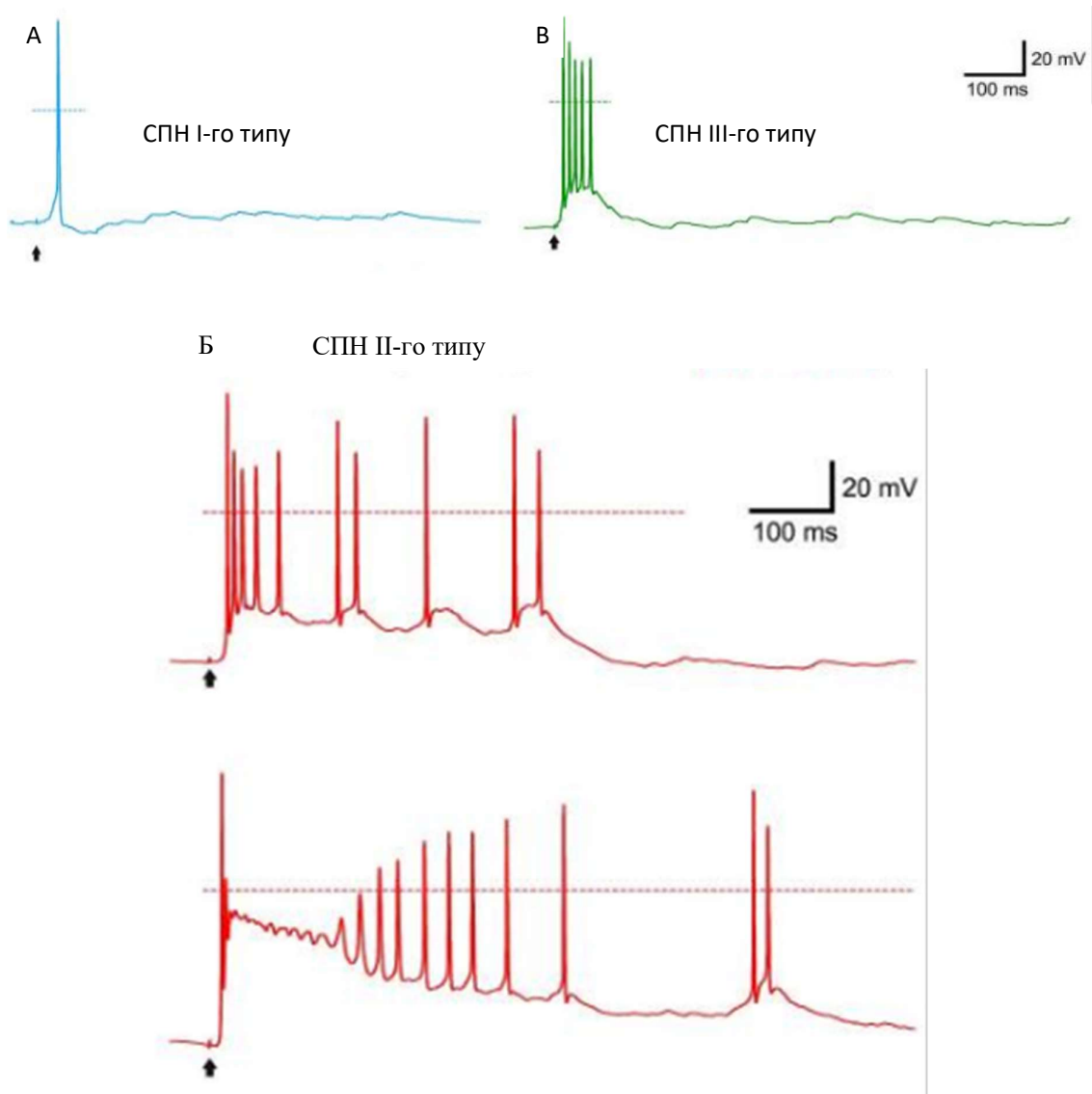
Найбільша група ( $n = 36$ ) складалася з нейронів, які генерували в середньому один потенціал дії. Такі нейрони можна охарактеризувати як нейрони з низьким рівнем ПД-активності, викликану стимуляцією первинних аферентів. Надалі ці нейрони називатимуться СПН I-го типу.

Другий тип СПН ( $n = 11$ ) принципово відрізнявся від першого, генеруючи від десяти до двадцяти ПД. Ці клітини можна охарактеризувати як нейрони з високим рівнем ПД-активності, викликану стимуляцією первинних аферентів (надалі СПН II-го типу).

Останній тип СПН складався з клітин ( $n = 11$ ), які можна охарактеризувати як нейрони з проміжним рівнем ПД-активності, викликану стимуляцією первинних аферентів (надалі СПН III-го типу). Такі нейрони генерували від трьох до шести ПД у відповідь на супрамаксимальну стимуляцію дорзального корінця (Agashkov et al., 2019).

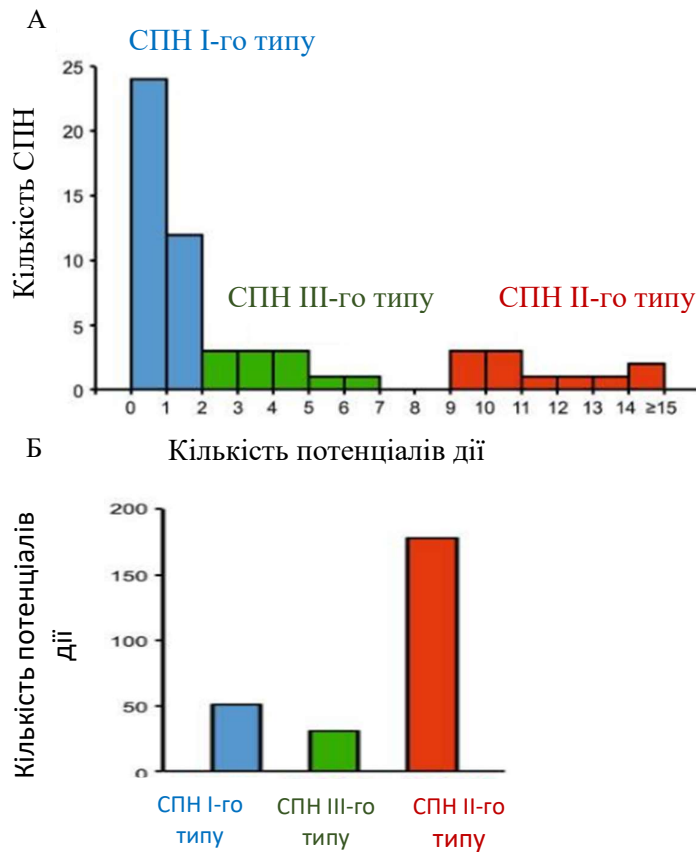
Після підрахунку загальної кількості потенціалів дії ми встановили, що СПН II-го типу, які представляють собою лише 19% популяції СПН, генерують 69% всієї вихідної ПД-активності (Рис. 3.2).





**Рис. 3.1** Приклади відповідей на супрамаксимальну стимуляцію (1 мс, 140 мкА) дорзального корінця СМ. (А) СПН I-го типу. (Б) СПН II-го типу (В) СПН III-го типу. Час стимуляції зазначено стрілкою.

Таким чином, можна стверджувати, що популяція СПН є гетерогенною. СПН проявляють різні вихідні характеристики, а тому, ймовірно, відіграють різну роль в передачі ноцицептивного сигналу (Agashkov K et al. 2017a)



**Рис. 3.2** Характеристики генерації викликаних потенціалів дії в різних групах СПН. (А) Загальна кількість потенціалів дії, що викликається в популяціях СПН I-го, -II-го- та -III-го типів, при супрамаксимальній стимуляції дорзального корінця. (Б) Розподіл СПН за кількістю потенціалів дії, викликаних стимуляцією дорзального корінця.

### 3.1.2. Залежність вихідного сигналу від інтенсивності ноцицептивного стимулу у різних типах СПН.

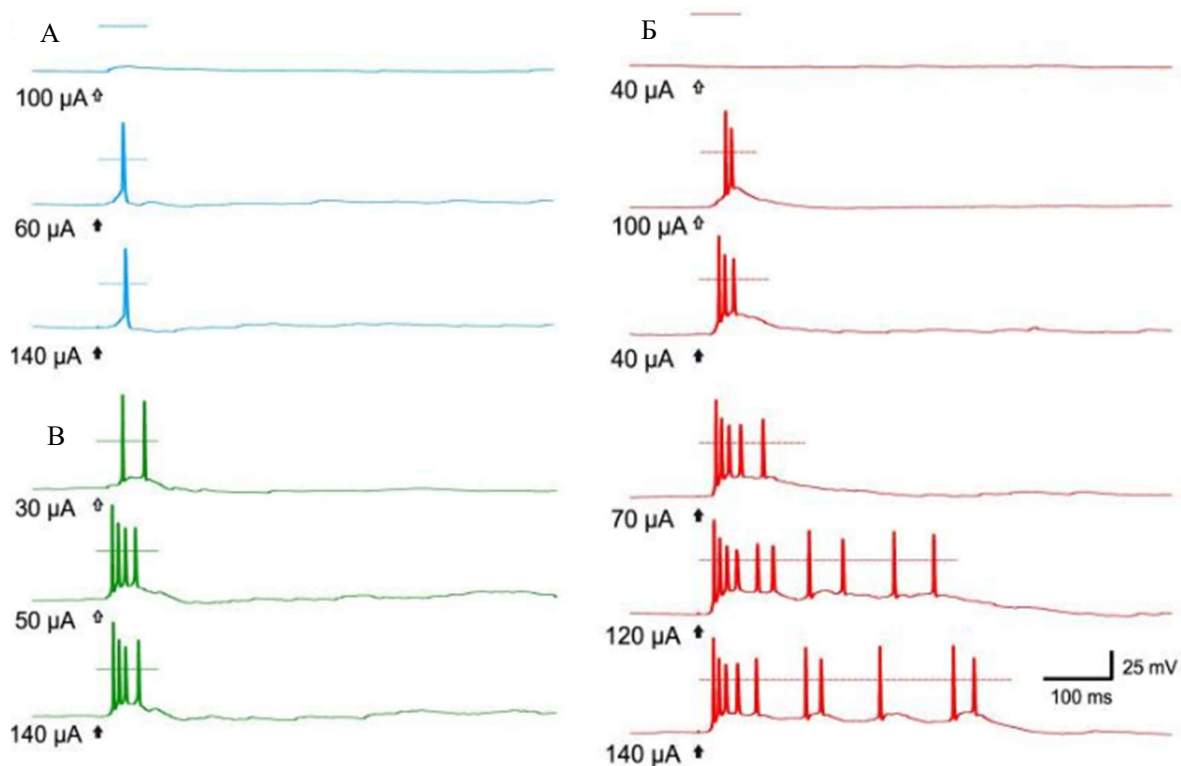
Для визначення залежності між інтенсивністю стимуляції та характером вихідного сигналу були використані наступні протоколи електрофізіологічних стимуляцій: для активації А-волокон довжина стимулу була 50 мкс, а інтенсивність стимуляції поступово зростала (від 0 - 140 мА з кроком 10 мА); для активації С-волокон довжина стимулу складала 1мс, з тією ж самою інтенсивністю. Залежність між інтенсивністю

стимуляції та характером вихідного сигналу була виражена в кількості згенерованих ПД в залежності від сили та тривалості струму, які змінювалися таким чином, щоб поступово активувати Аδ-, а потім С-волокна.

СПН I-го типу мали порогові значення в ноцицептивному діапазоні С-волокон (1 мс, 30-70  $\mu$ А) та не генерували більше одного, рідше двох, ПД навіть на супрамаксимальний стимул ( $1,15 \pm 0,04$  ПД, n = 36; Рис. 3.3). Таким чином СПН I-го типу відповідали на одиничний високопороговий аферентний стимул по принципу «все або нічого».

СПН II-го типу починали генерувати ПД при ноцицептивній стимуляції Аδ-діапазону (50 мкс, 60-70 мкА; 5 з 11 нейронів); кількість згенерованих ними ПД в подальшому зростала у відповідь на стимуляцію в діапазоні С-волокон (Рис. 3.3). Таким чином, СПН II-го типу відтворювали характеристики нейронів, котрі обробляють ноцицептивний сигнал в широкому діапазоні кодування.

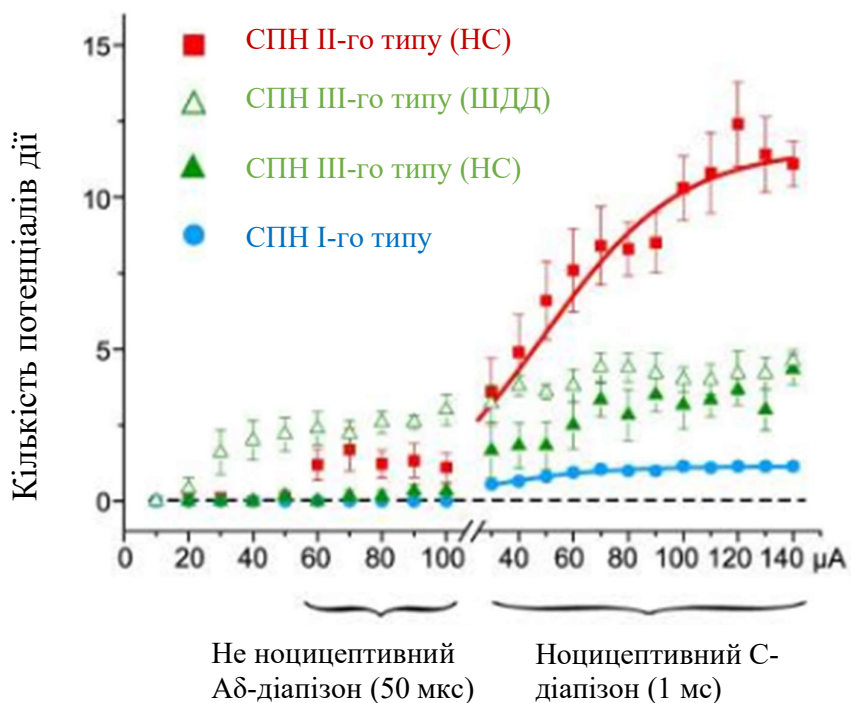
На відміну від перших двох типів СПН III-го типу не були винятково ноцицептивно-специфічними, а мали гетерогенні характеристики входу-виходу. Більшість цих нейронів починали давати відповідь у вигляді одиничних ПД або короткої групи ПД у відповідь на не больовий ( $\leq 50$  мкА, 50 мкс; 5 з 11 клітин) або больовий ( $\geq 50$  мкА, 50 мкс; 3 з 11 клітин) стимул в діапазоні Аδ-волокон. Чотири з цих нейронів генерували коротку пачку потенціалів дії у відповідь на Аδ стимуляцію, та їх відповідь суттєво не змінювалась зі збільшенням інтенсивності до С-діапазону. Це означає, що ці нейрони вибірково обробляють інформацію від Аδ аферентів. (Рис. 3.3). Інші нейрони цієї групи (n=7), відповідали на не больові стимуляції Аδ діапазону, та демонстрували поступове збільшення кількості ПД у відповідь на стимуляцію в діапазоні С-волокон ( $4,4 \pm 0,4$  ПД при супрамаксимальному стимулі 150 мкА, 1 мс).



**Рис. 3.3** Зміни характеристик вихідного сигналу в залежності від інтенсивності стимулу. (А) Відповідь на аферентну стимуляцію дорзального корінця в групі СПН I-го типу. (Б) СПН II-го типу. (В) СПН III-го типу. Сила імпульсу вказана біля відповідного запису; пусті та заповнені стрілки означають стимуляції 50 мкс та 1 мс відповідно.

Таким чином деякі СПН III-го типу ( $n=5$ ) мали властивості нейронів широкого динамічного діапазону (Andrew, 2010), в той час коли інші ( $n=6$ ) були схожі на ноцицептивно-специфічні нейрони (Andrew, 2009; Bester et al., 2000). Зважаючи на різноманітність характеристик входу-виходу, детальний аналіз СПН III-го типу не проводився.

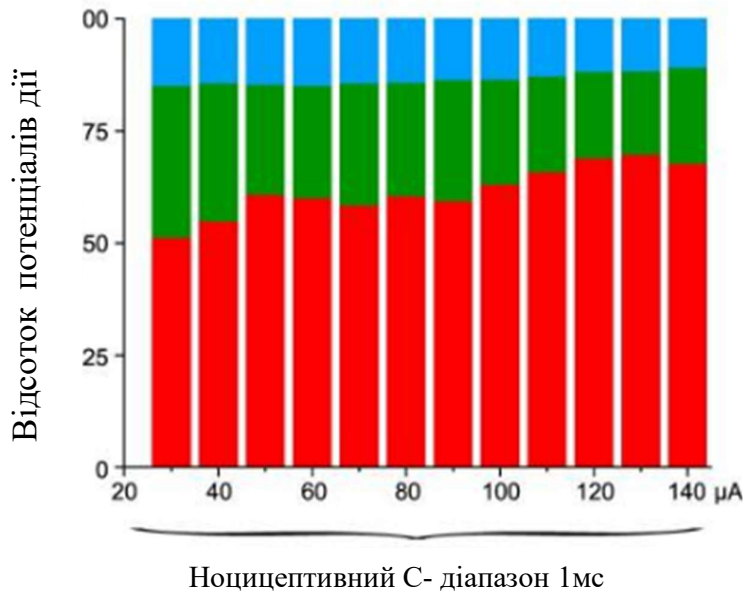
Функціональна різниця між групами СПН I-го типу та СПН II-го типу стала більш очевидною при порівнянні графіків їх характеристик відповідей на аферентну стимуляцію (Рис. 3.4).



**Рис. 3.4** Характеристики різних популяцій СПН у відповідь на стимуляцію дорзального корінця. Кожна точка являє собою середню кількість ПД, що викликаються в кожному типі нейрона при заданій інтенсивності стимуляції дорзального корінця (ШДД, широкий динамічний діапазон СПН III-го типу; НС, ноцицептивно-специфічні СПН – III-го типу).

Для СПН I-го типу залежність була простою та в діапазоні С- волокон добре описувалася функцією Больтцмана ( $R^2 = 0.99$ ), досягаючи насичення при значенні близькому до значення одного ПД ( $1,15 \pm 0,04$ , t-критерій = 28,02,  $p < 0,001$ ; Рис. 3.5). Таким чином, СПН I-го типу, швидше за все, виконують роль простих передавачів ноцицептивного входу з С- волокон до супраспінальних структур. Характеристики СПН II-го типу в першу чергу показують локальне насичення в діапазоні Аδ- волокон в межах (70-100 мкА), за яким слідує наростання в ноцицептивному С- діапазоні (Рис. 3.5).

Це збільшення також добре апроксимується за допомогою функції Больцмана ( $R^2 = 0,98$ ) та виходить на насичення при  $11,6 \pm 0,7$  ПД ( $t$ -критерій = 16,99,  $p < 0,001$ ).



**Рис. 3.5 Відносний внесок в загальну кількість потенціалів дії.** Відносний внесок різних популяцій СПН в загальну кількість потенціалів дії, що генеруються всією сукупністю СПН, в діапазоні C-волокон (1 мс). СПН I-го типу – синій колір, СПН II-го типу – червоний колір, СПН III-го типу – зелений колір.

Таким чином, СПН II-го типу можуть підсилювати ноцицептивний вхід з  $A\delta$ - волокон, генеруючи коротку групу ПД, та конвертувати силу входу з C- волокон в збільшення кількості ПД. Ці дані визначають різну функціональну роль СПН. З фізіологічної точки зору СПН I-го типу передають сигнал з ноцицептивних C- волокон, в той час як СПН II-го типу підсилюють вхід з  $A\delta$ - волокон та кодують силу входу з C- волокон (Agashkov. K et al. 2017a).

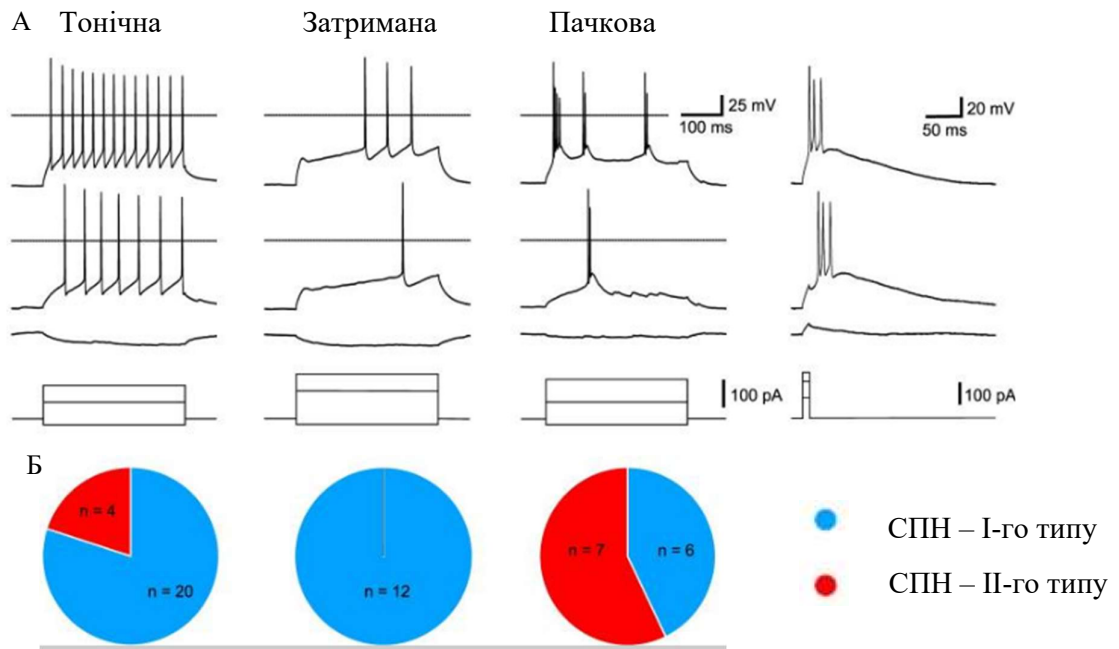
Таким чином, було встановлено, що внесок СПН II-го типу ( $n = 11$ ) до загальної кількості ПД, які генеруються усією популяцією СПН ( $n = 58$ ) в

діапазоні С- волокон був більший за 50% (Рис. 3.5), підтверджуючи важливість цієї малої групи нейронів для ноцицептивної передачі. Цікаво, що внесок СПН II-го типу у загальний вихідний сигнал поступово збільшувався при збільшенні сили стимулу у ноцицептивному С-діапазоні (нахил кривої,  $1,44 \pm 0,19\%$  на 10 мкА,  $R^2 = 0,86$ ; Рис. 3.5).

В подальших експериментах ми дослідили механізми, які лежать в основі різниці в генераціях ПД СПН I-го типу та СПН II-го типу.

### ***3.1.3. Відмінності електричної активності СПН I-го та II-го типів при внутрішньоклітинній стимуляції.***

Для визначення відмінностей електричної активності СПН I-го та II-го типів були визначені їх пасивні параметри та відповіді на ін'єкцію струму через «петч піпетку». Протокол був наступний: клітина знаходилась в конфігурації «ціла клітина», ін'єкцію струму проводили через «петч піпетку» тривалістю 500 мс; сила першого стимулу складала -25 пА наступні стимули були +25 пА. Потенціали спокою мембрани та вхідні опори суттєво не відрізнялися в СПН I-го типу ( $-58 \pm 1$  мВ and  $0,73 \pm 0,08$  G $\Omega$ , n = 36) та СПН II-го типу ( $-59 \pm 1$  мВ, n = 11, p = 0,48; та  $0,73 \pm 0,20$  G $\Omega$ , n = 11, p = 0,1). Однак, ємність мембрани була значно більшою у СПН II-го типу, ніж у СПН I-го типу ( $93 \pm 13$  пФ проти  $63 \pm 5$  пФ, p < 0,05). СПН I-го типу генерували тонічний (n = 20), затриманий (n = 12) і пачковий (два та більше ПД, n = 6) патерни ПД у відповідь на ін'єкцію струму через петч-піпетку, тоді як СПН II-го типу генерували лише тонічний (n = 4) і пачковий патерни (n = 7; Рис. 3.6). В нейронах з пачковим патерном генерації пачки ПД від двох до чотирьох ПД також викликалися за принципом «все або нічого» за допомогою коротких ін'єкцій струму (Рис. 3.6) або спонтанної синаптичної активності (не показано).



**Рис. 3.6** Патерни генерації ПД у відповідь на ін'єкцію струму через петч піпетку в СПН I-го та СПН II-го типу. (А) Типи активності клітин при ін'єкції в клітину струму (тривалість стимулу 500 мс) У СПН з пачковою активністю пачки ПД також були викликані за типом «все або нічого» з короткою (10 мс) з тривалістю стимулу (праворуч). (В) діаграми, що показують кількість СПН I-го та СПН II-го типу серед тонічних, СПН з затриманим та СПН з пачковим патернами електричної активності у відповідь на внутрішньоклітинну стимуляцію.

Статистичні тести виявили значну різницю в патернах генерації ПД між СПН I-го та II-го типів ( $p < 0,01$ , точний тест Фішера). СПН II-го типу мали значно більшу частку нейронів з пачковим патерном генерації ПД (3,8 раз,  $p < 0,01$ , точний тест Фішера з поправкою Бонферонні). Ці нейрони також генерували пачки ПД і у відповідь на аферентні стимули.

Таким чином, відмінність у електричній активності у відповідь на внутрішньоклітинну стимуляцію являє собою один із механізмів, що



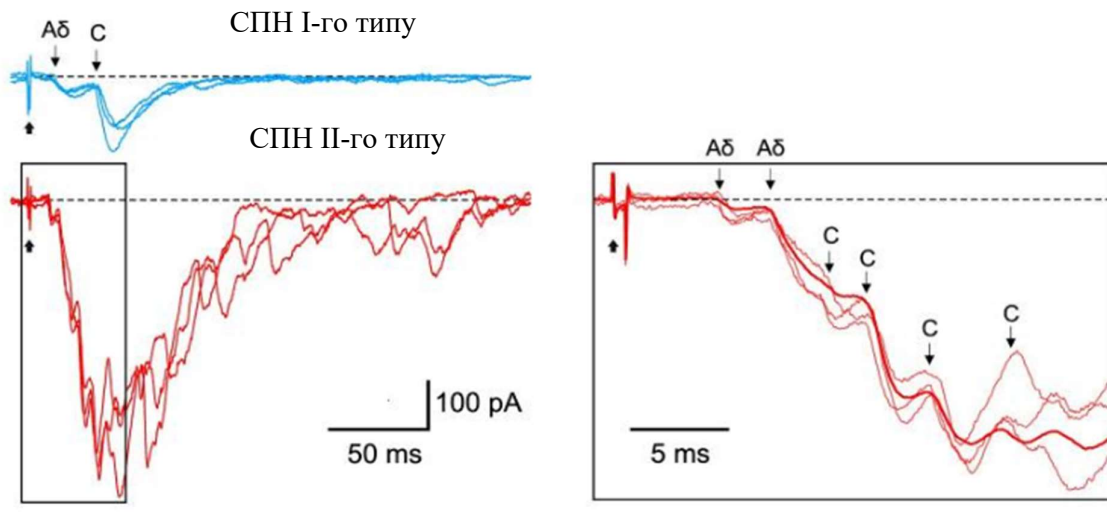
відповідає за більшу кількість ПД, що викликаються в СПН II-го типу, за рахунок первинної аферентної стимуляції. Крім того, властивість генерувати пачки ПД на слабкий стимул по принципу «все або нічого» дозволяє СПН II-го типу підсилювати ноцицептивний Аδ-вхід (Agashkov, Krotov., et al., 2017b).

### ***3.1.4 Різниця в аферентному вході СПН I-го та СПН II-го типу.***

Для встановлення кількості аферентних входів були проведені записи в режимі фіксації потенціалу при потенціалі на мембрані – 70 мВ, та при супрамаксимальній стимуляції дорзального корінця (1мс , 140 мА). Критерієм моносинаптичності було коливання латентності аферентного входу не більше ніж 1 мс. Тип волокон визначався шляхом визначення швидкості проведення, відповідно Аδ більше 0,5 мс та С менше 0,5 мс.

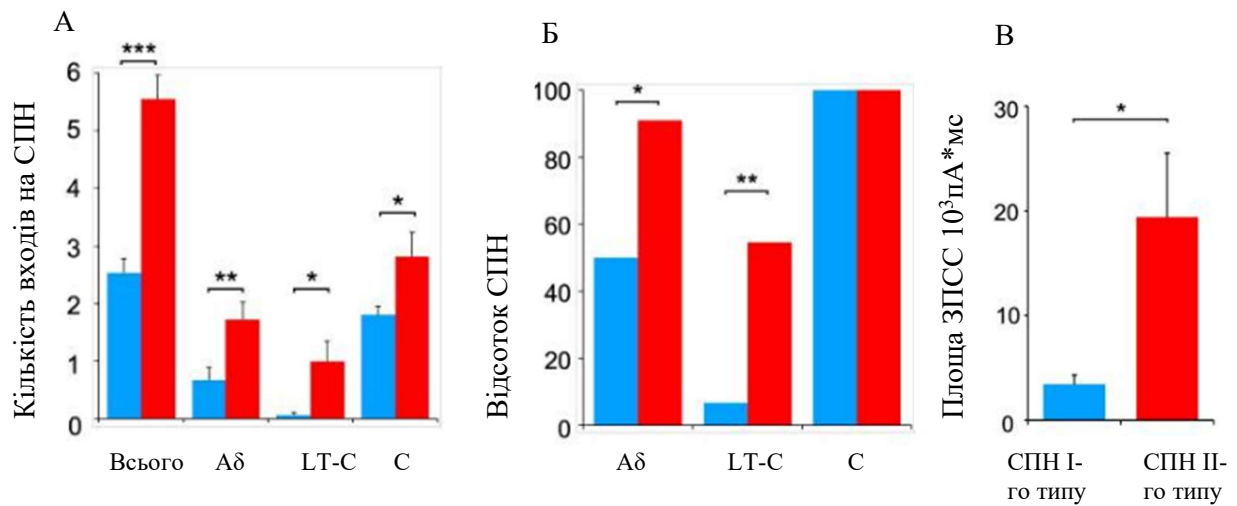
Аналіз СПН, які пройшли усі експериментальні протоколи (СПН I-го типу, n = 30; СПН II-го типу, n = 11), виявив чітку різницю в організації їх аферентного входу. Кількість усіх моносинаптичних входів на нейрони в популяції СПН II-го типу була в 2,2 рази більшою, ніж у СПН I-го типу ( $p < 0,001$ ; Рис. 3.7 та 3.8). СПН II-го типу отримували більшу кількість прямих входів від Аδ- (в 2,6 рази,  $p < 0,01$ ), низькопорогових С- (у 5,1 рази,  $p < 0,05$ ), а також від високопорогових С-волокон (1,6 разів,  $p < 0,05$ ; Рис. 3.8 ).

Ми також виявили значну різницю у відносній кількості СПН, які отримують кожен тип входів (Рис. 3.8 Б). Хоча всі СПН у нашому випадку безпосередньо мали моносинаптичні контакти від С-волокон, значно більший відсоток СПН II-го типу отримували моносинаптичні входи від Аδ-волокон (90,9% проти 46,7% для СПН I-го типу,  $p < 0,05$ , точний тест Фішера).



**Рис. 3.7** Моносинаптичні аферентні входи до СПН ДР СМ. Моносинаптичні ЗПСС (позначені стрілками), опосередковані Аδ та С аферентами у СПН I-го та СПН II-го типу. Виділено три окремі записи, накладені із середнім значенням від усіх 14 записів. Група СПН II-го типу отримує більший інтегральний вхід з більш численними моносинаптичними компонентами. Потенціал утримування, -70 мВ. Стимуляція корінця, 1 мс, 140 мкА.

Крім того, більше половини СПН II-го типу (54,5%) отримувало щонайменше один вхід від низькопорогових С-волокон, тоді як СПН I-го типу майже не демонстрували таких входів (6,7%,  $p < 0,01$ , точний тест Фішера). Для оцінки сили первинних аферентних (як моно-, так і полісинаптичних) входів ми проаналізували основні компоненти ЗПСС. При супрамаксимальній стимуляції С-волокон входи в СПН II-го типу були в 5,5 разів сильніші, ніж в СПН I-го типу (Рис. 3.8 В;  $p < 0,05$ ). Оскільки різниця в силі була значно більшою, ніж середня кількість прямих входів на нейрон (у 2,2 рази), можна припустити, що СПН II-го типу також отримали більш сильний полісинаптичний вхід.



**Рис. 3.8** Характеристики аферентних входів в СПН I-го та II-го типів. (А) гістограма, що показує середню кількість прямих входів на СПН I-го типу (синій) та СПН II-го типу (червоний). (Б) відсоток СПН I-го типу (синій) та СПН II-го типу (червоний), які отримують прямі аферентні входи Aδ, C волокна та низькопорогові C (LT-C) волокна. (В) сила первинного аферентного входу, обчислена інтегралом викликаних ЗПСС. Позначки відповідають \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

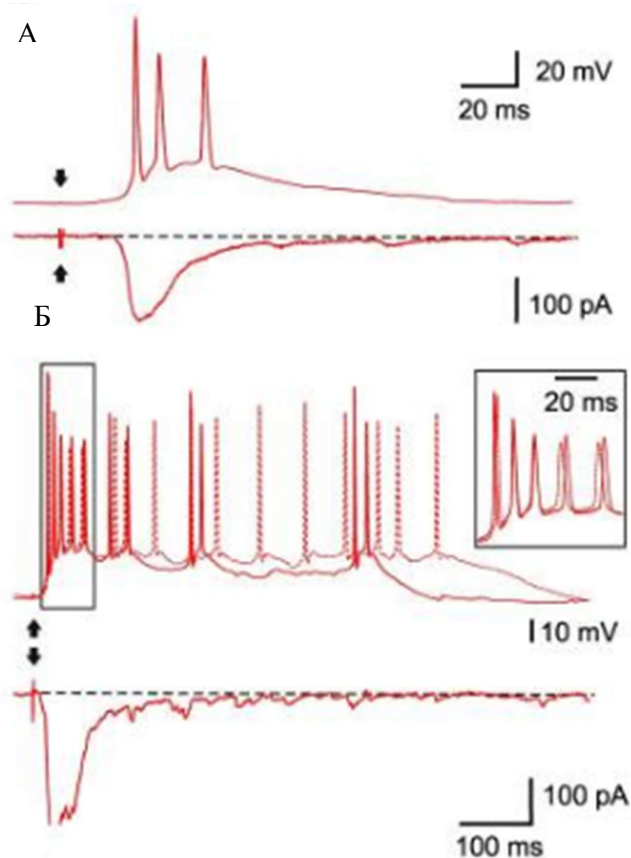
Таким чином, СПН II-го типу отримують більшу кількість прямих входів від ноцицептивних волокон, а їх загальний постсинаптичний струм, викликаний стимуляцією дорзальних корінців є значно сильнішим, ніж у СПН I-го типу. Крім того, більша кількість Aδ входів і поширеність притаманного нейронам групового патерну ПД-активності є двома факторами, що лежать в основі здатності СПН II-го типу розряджатися в ноцицептивному діапазоні Aδ-волокон, в якому СПН I-го типу не створюють ПД (Krotov, Agashkov., et al., 2018). Крім того, поєднання сильного аферентного входу та групового патерну може пояснити початкову генерацію ПД в СПН II-го типу на стимуляцію C-волокон.

### ***3.1.5. Інтеграція мережевої активності СПН I-го та II-го типів.***

На відміну від СПН I-го типу, СПН II-го типу продовжували генерувати ЗПСС протягом сотень мілісекунд після приходу аферентного стимулу. У наступних експериментах ми вивчали клітинні та мережеві механізми, що лежать в основі пізньої електричної активності, яка спостерігається вже після завершення основної компоненти аферентного входу. При слабких надпорогових стимулах (10-30 мкА вище порогового значення) моно- та полісинаптичні ЗПСС в СПН II-го типу викликали початкову генерацію декількох ПД, що нагадує характерний патерн ПД-генерації цих нейронів (Рис. 3.9).

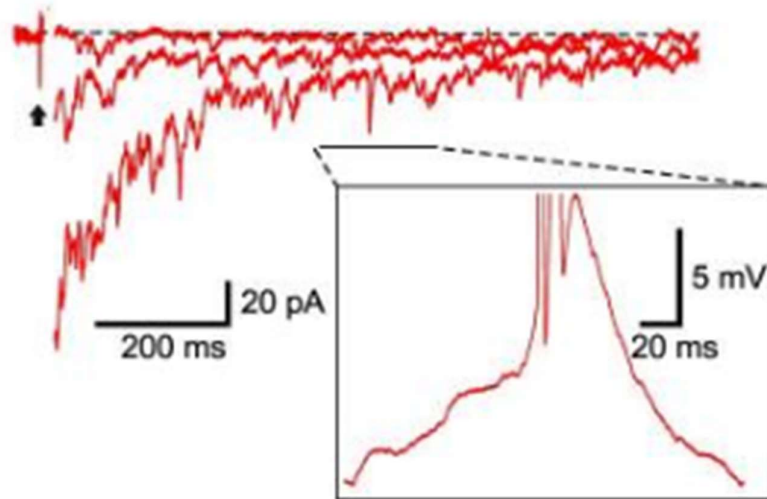
При сильніших стимуляціях початкова генерація ПД (Рис. 3.9, вставка) супроводжувалась платопотенціалом та супутньою пізньою фазою генерації ПД (Рис. 3.9, режим фіксованого струму, запис), яка продовжувалась після припинення основного компонента аферентного входу (Рис. 3.9). Кількісний аналіз показав, що пізня фаза генерації ПД робить значний внесок у загальний вихідний сигнал СПН II-го типу ( $7,6 \pm 2,0$  проти  $5,2 \pm 1,5$  ПД, початкова проти пізньої фази генерації ПД при супрамаксимальній аферентній стимуляції).

Дослідження струмів в режимі фіксації потенціалу виявило появу невеликого (5-50 pA) повільно спадаючого (від сотень мілісекунд до секунд) вхідного струму та численних спонтанних ЗПСС (сЗПСС) (Рис. 3.10). У СПН II-го типу, що мають вхідний опір  $0,73 \pm 0,20$  ГОм, цей повільно спадаючий струм був достатнім для створення платопотенціалу, який міг деполаризувати клітину на 20 мВ (Рис. 3.10).



**Рис. 3.9** Характеристики відповідей СПН II-го типу в залежності від сили стимулу. *А) Відповідь СПН II-го типу на слабку стимуляцію (50 мкс, 70 мкА) дорзального корінця, що викликає початковий ЗПСС з декількома ПД. Б) Відповідь СПН II-го типу на сильну стимуляцію (1 мс, 140 мкА) викликає початковий ЗПСС з подальшим платопотенціалом та пізньою електричною активністю. Дві накладені записи демонструють, що ПД в початковій фазі є фіксованими за часом (вставка), тоді як ПД пізньої фази випадковим чином утворюються під час платопотенціалу. Цікаво, що електрична активність тривала і після того, як основний компонент аферентного входу припинився (запис в режимі фіксації потенціалу).*

Під час платопотенціалу сЗПСС викликали випадкові ПД (Рис. 3.10, вставка), чого майже не траплялося при потенціалі спокою ( $6,4 \text{ с}^{-1}$  під час плато проти  $0,4 \text{ с}^{-1}$  при мембранному потенціалі спокою,  $p < 0,001$ ).

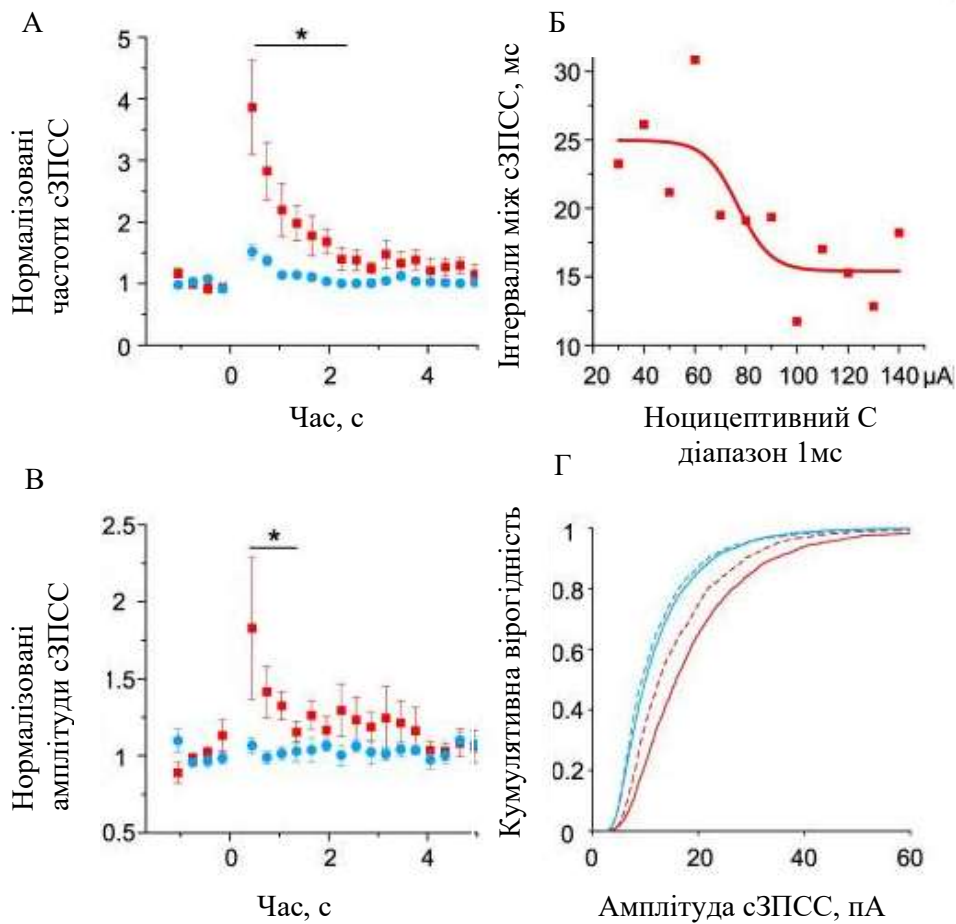


**Рис. 3.10** Характеристика повільно спадаючого вхідного струму  
*Записи в режимі фіксації потенціалу при збільшені сили стимулу виявили появу повільно спадаючого вхідного струму та численні сЗПСС. Дорсальний корінець стимулювався силою струму, що збільшувалася (20 мкА, 40 мкА та 80 мкА, 1 мс.) Вставка - ПД, зареєстрований від того самого нейрону в режимі фіксації струму, викликаний сумарним сЗПСС під час платопотенціалу. Часовий інтервал позначено лінією.*

Щоб краще зрозуміти внесок спонтанних подій у фазі пізньої генерації ПД, ми проаналізували події у часовій рамки від 0,3 с до 5,0 с після стимуляції дорсального корінця, тобто вже після завершення моносинаптичного та основного компоненту полісинаптичного аферентного входу. У СПН II-го типу частота сЗПСС на початку вказаного часового вікна зростає у  $3,9 \pm 0,8$  рази ( $n = 7$ ,  $p < 0,05$ ) і повертається до базового рівня протягом 2 с (Рис. 3.11 А). Цей ефект був специфічним для СПН II-го типу, оскільки в СПН I-го типу він був незначним.

Середні інтервали між подіями в СПН II-го типу зменшувалися з інтенсивністю стимуляції ( $R^2 = 0,66$  для функції Больцмана, нижня межа:  $24,95 \pm 2,22$  мс,  $t$ -значення = 11,24,  $p < 0,001$ ; верхня межа:  $15,41 \pm 1,77$  мс,  $t$ -

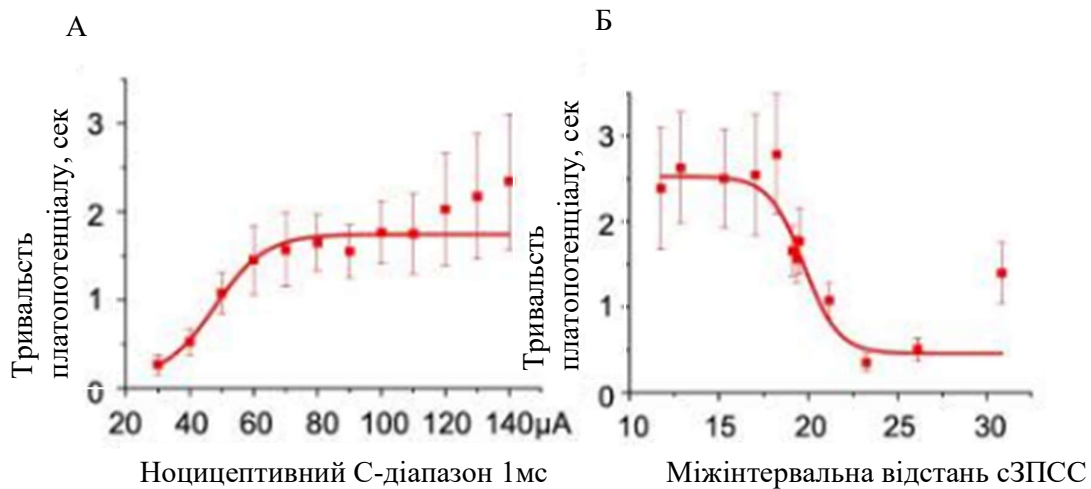
значення = 8,72,  $p < 0,001$ ; Рис. 3.11 Б), що вказує на поступову активізацію внутрішніх нейронних мереж, орієнтованих на цю популяцію СПН.



**Рис. 3.11** Зміни сЗПСС в різних групах СПН. (А) зміни частоти сЗПСС у СПН I-го типу (синій) та СПН II-го типу (червоний) після стимуляції дорзального корінця при супрамаксимальній стимуляції С-волокон. (Б) інтервал між сЗПСС у СПН II-го типу, залежно від сили стимуляції дорзального корінця. (В) розподіл у часі амплітуд сЗПСС у СПН I-го типу (синій) та СПН II-го типу (червоний) після стимуляції корінця. (Г), тимчасове збільшення амплітуди сЗПСС в СПН II-го типу, але не в СПН I-го типу, протягом перших 0,9 с після стимуляції.

Крім того, ми спостерігали тимчасове збільшення амплітуди сЗПСС в СПН II-го типу, але не в СПН I-го типу, протягом першої секунди часового

діапазону, що вказує на ПД-залежну дію цього механізму збільшення (Рис. 3.11 В - Г). Це вказувало на те, що специфічне збільшення частоти сЗПСС з високою амплітудою, викликане ревербераційною мережевою активністю, сприяло індукції пізньої фази ПД-активності в СПН II-го типу (Рис. 3.9 ). Такі спостереження означають, що СПН II-го типу інтегрують активність специфічних нейронних мереж дорзального рогу, що відповідають за їх пізню фазу викликаної ПД-генерації в цих нейронах.



**Рис. 3.12** Зміни тривалості платопотенціалу та збільшення інтервалів сЗПСС у відповідь на стимуляцію дорзального корінця в групі СПН II-го типу.

(А) Тривалість платопотенціалу в залежності від сили стимулу. (В) Відношення між часом платопотенціалу та міжінтервальним проміжком сЗПСС.

Ці дані також свідчать про те, що зростання спонтанної мережевої активності синхронізоване з генеруванням власного платопотенціалу для збільшення активності у СПН II-го типу. По-перше, платопотенціал та збільшення частоти й амплітуди сЗПСС відбувалися в подібні часові рамки (Рис. 3.11 А, в та 3.12 А). По-друге, тривалість платопотенціалу також збільшувалась із силою стимуляції ( $R^2 = 0,98$  для функції Больцмана; верхня

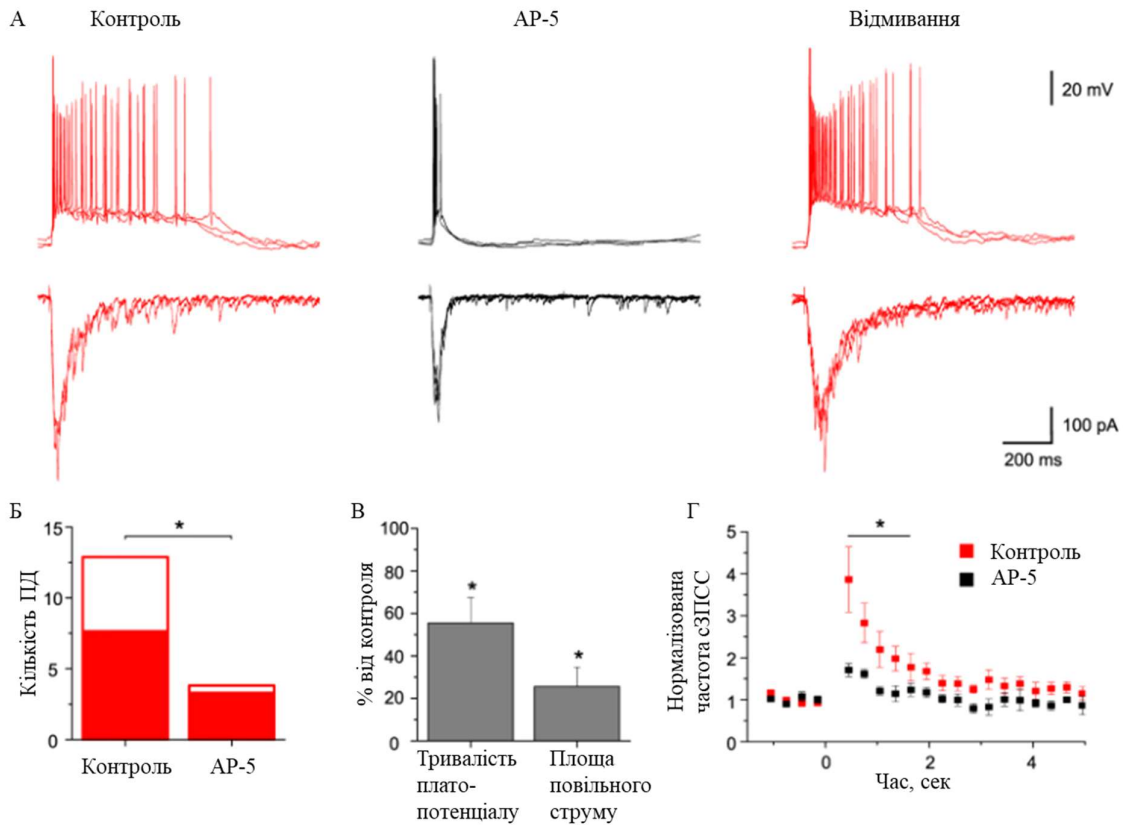


межа:  $1,74 \pm 0,08$  с,  $t$ -значення = 22,68,  $p < 0,001$ ; Рис. 3.12 А). По-третє, збільшення тривалості платопотенціалу корелює зі зменшенням інтервалів між подіями спонтанної активності (коефіцієнт кореляції Спірмена,  $-0,81$ ,  $p < 0,001$ ; Рис. 3.12 Б).

Таким чином, платопотенціал створював "вікно" для різкого (16-кратного) збільшення ймовірності виникнення спонтанних подій до досягнення порогу виникнення потенціалу дії. Таким чином, пізня фаза генерації ПД зумовлюється платопотенціалом та активізацією локальної нейронної мережі (Agashkov et al., 2019). Ці фактори посилюються з інтенсивністю стимуляції, що призводить до збільшення ймовірності виникнення ПД.

### ***3.1.6 NMDA-рецептор залежна обробка ноцицептивних сигналів в СПН II-го типу***

NMDA-рецептори експресуються в синапсах між первинними аферентами та нейронами дорзального рогу, а також відіграють важливу роль у полісинаптичному вході до цих нейронів (Dahlhaus et al., 2005; Deng et al., 2019). Щоб вивчити, чи залежить обробка сигналу в СПН II-го типу від рецепторів NMDA, ми проаналізували ефекти їх специфічного блокатора AP-5. Застосування блокатора оборотно пригнічувало пізню фазу генерації ПД ( $0,5 \pm 0,5$  ПД в AP-5 проти  $5,2 \pm 1,5$  ПД в контролі,  $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ; Рис. 3.13), тоді як початкові групи ПД зазнали меншого впливу ( $3,3 \pm 1,5$  ПД в AP-5 проти  $7,6 \pm 2,0$  ПД у контролі,  $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ; Рис. 3.13). У той же час ми спостерігали значне зменшення платопотенціалу (до  $55 \pm 12\%$ ,  $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ) та пригнічення повільно спадаючого струму, який опосередковує це плато (до  $25 \pm 9\%$ ,  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ; Рис. 3.13). Крім того, індуковане стимулюванням збільшення частоти сЗПСС було пригнічене блокатором NMDA-рецепторів ( $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ; Рис. 3.13) через інгібування локальної нейронної мережі, орієнтованої на СПН II-го типу.



**Рис. 3.13** Вплив блокатора рецепторів NMDA на збудливість СПН II-го типу. (А) AP-5 у концентрації 40 мкМ оборотно пригнічував пізню фазу генерації ПД в СПН I-го типу. Зверніть увагу на скорочення платопотенціалу та гальмування повільно спадаючого вхідного струму. (Б) Вплив AP-5 на кількість ПД, згенерованих під час початкової фази (заповнена кольором частина стовпчика) та під час пізньої фази (незаповнена кольором частина стовпчика); (В) Ефект AP-5 на тривалість платопотенціалу та величина повільно спадаючого вхідного струму (обчислена як площа); (Г) Зміна частот сЗПСС, викликаних стимуляцією дорзального корінця.

Таким чином можна зробити висновок, що процеси, які залежать від NMDA-рецепторів, вносять значний вклад в пізню фазу генерації ПД та

відіграють велику роль у обробці сигналу СПН II-го типу (Agashkov, Krotov et al., 2017b).

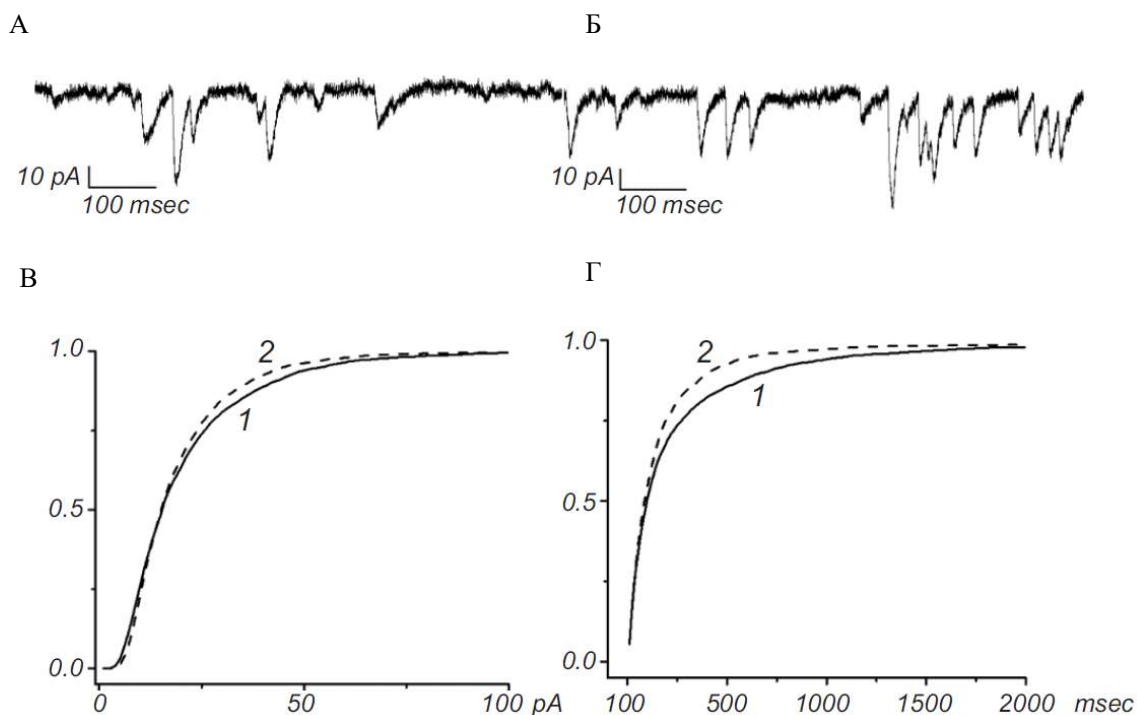
### **3.2 Обробка мережевого сигналу СПН пластинки I ДР СМ в умовах хронічного запального болю**

Для визначення змін в обробці мережевого сигналу СПН пластинки I ДР СМ була використана модель хронічного запального болю у щурів. Запалення викликали шляхом підшкірної ін'єкції 100 мкл суспензії ПАФ (СФА, "Sigma", США; олійно-сольова емульсія 1:1) у праву задню кінцівку щура. Електрофізіологічні дослідження проводили через добу після ін'єкцій ПАФ. Розвиток запалення та ноцицептивної гіперчутливості підтверджували поведінковим тестом Харгрівса та тестуванням з використанням філаментів фон Фрея (див. розділ «Матеріали та методи»).

Записи сЗПСС в СПН пластинки I ДР СМ були проведені у контрольних тваринах (кількість клітин  $n=9$ ; загальна кількість аналізованих сЗПСС  $n=2547$ ) та у тварин з індукованим хронічним запальним болем (кількість клітин  $n=9$ ; загальна кількість аналізованих сЗПСС  $n=2700$ , Рис. 3.14 А, Б).

Амплітуда сЗПСС в обох групах характеризувалася досить високою варіабельністю. Відповідні розподіли в обох групах були різко правоасиметричними. Вони включали в себе значну кількість низьких амплітуд (до 25–30 пА); істотно менша кількість струмів характеризувалася значно вищими амплітудами (Рис. 3.14). У зв'язку з тим, що такі розподіли в обох групах вірогідно відрізнялися від нормального, були розраховані медіанні значення амплітуд спонтанних струмів. Ці величини характеризувалися широкою дисперсією (крайні значення розрізнялися більше ніж на порядок). У контрольній групі середнє значення медіан розподілу амплітуд складало  $15,40 \pm 1,94$ , а в групі з індукованим периферичним запаленням –  $16,55 \pm 1,93$  пА. Отже, середні значення медіан

амплітуд струмів були дуже близькими одне до одного (згідно з *t*-тестом для незалежних вибірок різниця невірогідна –  $p = 0.68$ ).



**Рис. 3.14** Характеристики спонтанних збуджуючих постсинаптичних струмів у проєкційних нейронах пластинки I. Репрезентативні записи сЗПСС у контролі (А) та за наявності периферичного хронічного запалення (Б) Кумулятивна вірогідність для загального розподілу амплітуд (В) Кумулятивна вірогідність для загального розподілу міжінтервальних інтервалів (Г) Позначення «1» та «2» - контрольна група та група тварин з індукованим хронічним запальним боєм відповідно.

Амплітуда сЗПСС в обох групах характеризувалася досить високою варіабельністю. Відповідні розподіли в обох групах були різко правоасиметричними. Вони включали в себе значну кількість низьких амплітуд (до 25–30 пА); істотно менша кількість струмів характеризувалася значно вищими амплітудами (Рис. 3.14 А-Б). У зв'язку з тим, що такі

розподіли в обох групах вірогідно відрізнялися від нормального, були розраховані медіанні значення амплітуд спонтанних струмів. Ці величини характеризувалися широкою дисперсією (крайні значення розрізнялися більше ніж на порядок). У контрольній групі середнє значення медіан розподілу амплітуд складало  $15,40 \pm 1,94$ , а в групі з індукованим периферичним запаленням –  $16,55 \pm 1,93$  пА. Отже, середні значення медіан амплітуд струмів були дуже близькими одне до одного (згідно з t-тестом для незалежних вибірок різниця невірогідна –  $p = 0,68$ ). Розподіли інтервалів між аналізованими синаптичними подіями в обох групах були різко правоасиметричними, і їх форма наближалася до такої у розподілу Пуассона (Рис. 3.14 А-Б). Середні значення медіан таких розподілів у контрольній групі та групі із запаленням дорівнювали  $141,18 \pm 40,70$  та  $95,85 \pm 17,23$  мс відповідно. Іншими словами, усереднені медіани розподілів інтервалів між сЗПСС у щурів із запаленням тканин стопи були майже в півтора разу меншими, ніж у контрольних тварин, а частота спонтанних синаптичних подій – відповідно значно вищою. Ця переконлива різниця, проте, виявилася статистично невірогідною ( $p = 0,17$ ). Очевидною причиною подібної ситуації були велика дисперсія вимірюваних значень і обмежена кількість проаналізованих вибірок. (Krotov, Agashkov et al., 2018; Shevchuk et al., 2017).

Отже, частота сЗПСС у СПН пластинки I ДР СМ в ізольованому препараті поперекового відділу СМ щура в разі розвитку хронічного периферичного запалення значно перевищує відповідну величину, виміряну в контрольних тваринах. Очевидно, що в умовах хронічного запалення істотно змінюється загальний фоновий збуджуючий тон нейронної мережі ДР СМ, що призводить до більшої збудливості СПН пластинки I ДР СМ. Кінцевим ефектом таких змін буде полегшення передачі ноцицептивної інформації до супраспінальних структур. Така гіперзбудливість нейронних мереж дорзального рогу взагалі та проєкційних нейронів пластинки I

зокрема може забезпечувати помітний внесок у розвиток гіпералгезії при хронічних больових станах і полегшувати генерацію емоції болю.

### **3.3. Зміна функціонування нейронних мереж пластинки I ДР СМ та ноцицептивної поведінки мишей після субпіальної ін'єкції AAV9-GAD65 та AAV9-VGAT.**

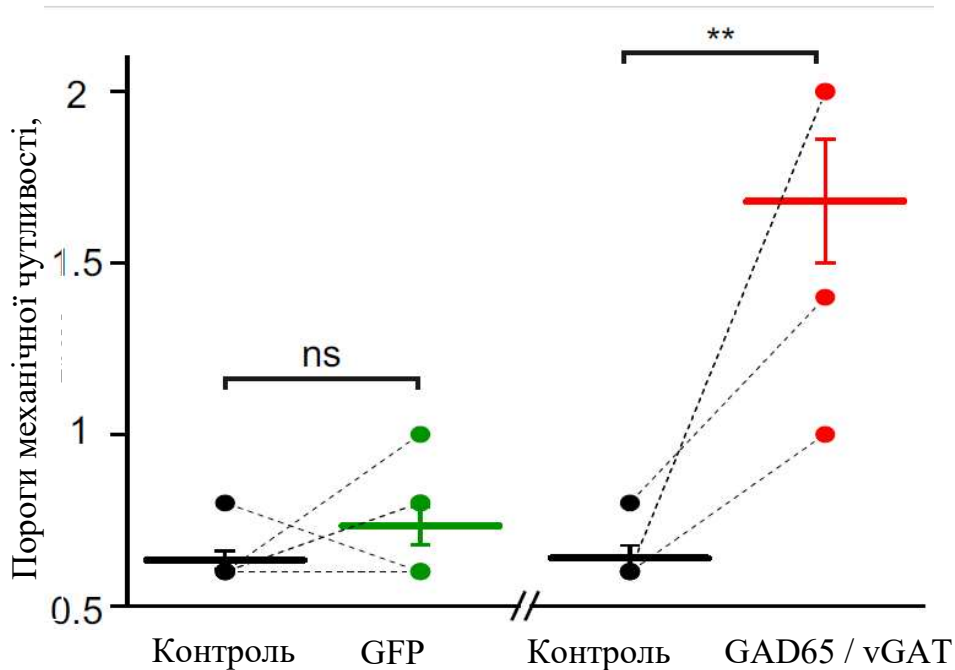
В наслідок пошкодження ПНС чи ЦНС в задньому розі спинного мозку виникають зміни у функціонуванні нейронних мереж, а саме відбувається переключення їх роботи в бік збудження. Ці зміни виникають за рахунок (1) гіперактивації первинних аферентів, масивному викиді глутамату та сенситизації AMPA та NMDA рецепторів, (2) дизінгібування як локальних гальмівних інтернейронів, так і низхідних терміналей, а також (3) надмірної активації глії. Все це призводить до формування центральної сенситизації, тобто збільшення загального вихідного сигналу зі спинного мозку до супраспінальних структур.

Враховуючи вищезазначене, ми спробували збільшити гальмівний тон в нейронних мережах спинного мозку за рахунок гіперрегуляції ГАМК. Для цього було досліджено відповідні зміни в нейронній мережі дорзального рогу в умовах індукованого гальмівного фенотипу викликаного субпіальним введенням вірусних конструктів що містять фермент глутаматдекарбоксилазу GAD65 та везикулярний ГАМК транспортер VGAT .

#### **3.3.1 Підвищення больового порогу у мишей після субпіальної доставки AAV9-GAD65 та AAV9-VGAT.**

Для того, щоб зрозуміти, як доставка вірусних конструктів співвідноситься з ноцицептивною поведінкою, ми оцінили механічну чутливість тварин. Парне тестування філаментами фон Фрея проводили за

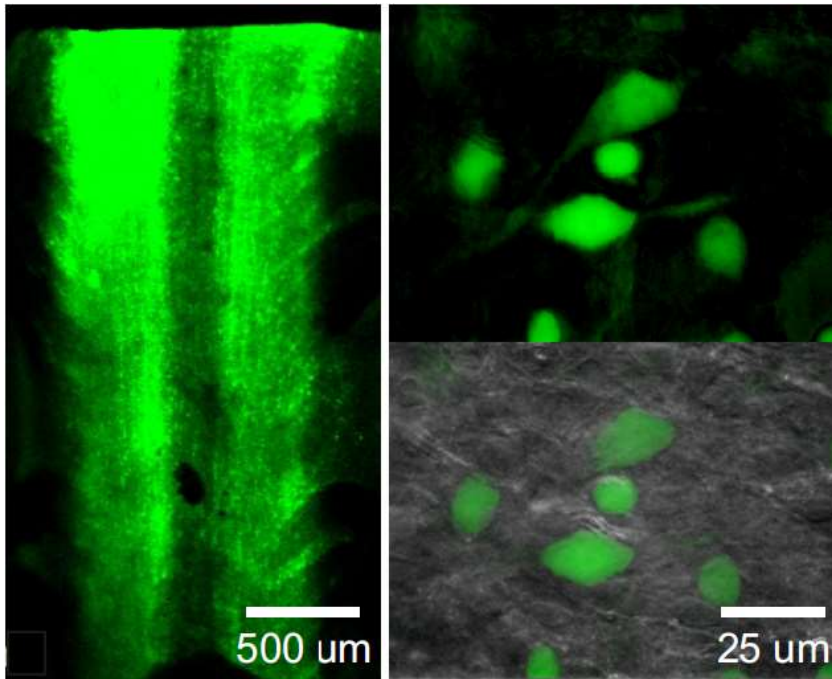
добу перед субпіальними ін'єкціями та за добу до електрофізіологічних експериментів.



**Рис. 3.15** Результати поведінкового тестування філаментами фон Фрея.

Зліва: механічні пороги окремих мишей до і після GFP-інфекції ( $n = 6$ , деякі точки та лінії перекриваються). Праворуч: механічні пороги окремих мишей до та після GFP / GAD65 / VGAT-інфекції ( $n = 5$ , деякі точки та лінії перекриваються).

Самці мишей лінії FVB були розділені на дві групи: перша група псевдооперована, яким субпіально ввели AAV9-UBC-GFP ( $1,6 \times 10^{13}$  гк/мл; 3,0  $\mu$ л;  $n = 6$ ); друга група тварин субпіально отримала AAV9- UBC-GFP, GAD65, та VGAT ( $5,3 \times 10^{12}$  гк/мл,  $1,5 \times 10^{12}$  гк/мл та  $3,3 \times 10^{12}$  гк/мл, відповідно; загальний об'єм 3,0 мл;  $n = 6$ ).



**Рис. 3.16** Експресія вірусних конструктів в інтактному препараті спинного мозку. Репрезентативні зображення препарату *ex-vivo* спинного мозку, інфікованого GFP / GAD65 / VGAT. Зліва: епіфлюоресцентне зображення *ex vivo* препарату спинного мозку з низьким збільшенням (4X), що показує двосторонню експресію GFP після субпіальної ін'єкції відповідних вірусних конструкцій. Праворуч: репрезентативні зображення на великому збільшенні (60X) GFP-позитивних нейронів, які бралися для *patch-clamp* експериментів. В горі: епіфлюоресцентне зображення, знизу: накладені зображення отримане за допомогою косого світлодіодного освітлення та епіфлюоресцентне зображення відповідних нейронів).

Через 2 тижні з моменту ін'єкції результати показали, що GFP / GAD65 / VGAT-інфекція призвела до збільшення в 2,5 рази ноцицептивних механічних порогів ( $0,64 \pm 0,03$  г до проти  $1,68 \pm 0,18$  г після ін'єкції GFP / GAD65 / VGAT,  $n = 5$ ,  $p < 0,01$ , парний t-тест, Рис. 3.15).

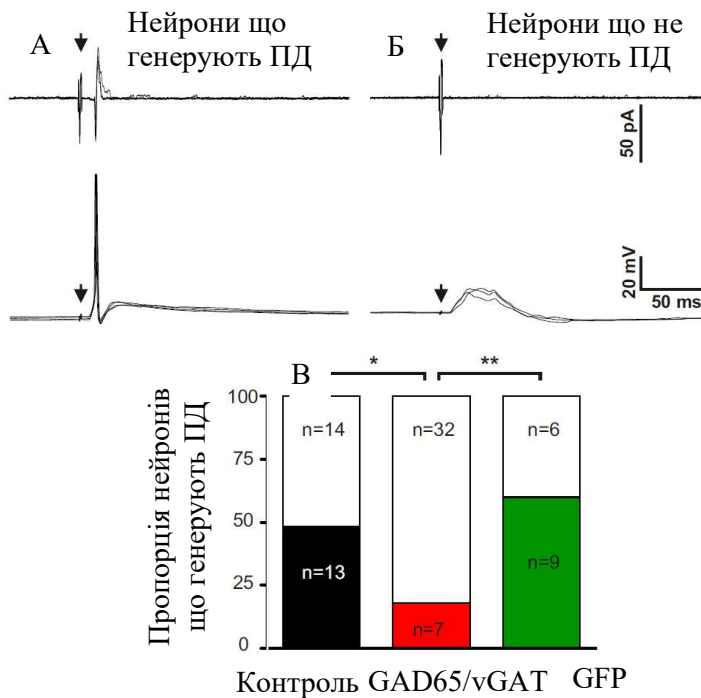
У той же час не виявлено значущої різниці після GFP-інфекції ( $n = 6$ ,  $p = 0,3$ , парний t-тест, Рис. 3.15). Обидві групи мишей, як GFP-інфіковані ( $p = 0,5$ ,



дані не показані), так і GFP / GAD65 / VGAT інфіковані ( $p = 0,5$ , дані не показані) показали майже однакові механічні пороги для лівих і правих задніх кінцівок, що вказує на те, що а) субпіальна ін'єкція не дає нейропатичних змін; б) ін'єкції вірусних конструкцій спричиняють стійке інфікування обох половин спинного мозку, що також можна чітко спостерігати на конфокальних та епіфлуоресцентних знімках *ex-vivo* препаратів спинного мозку (Рис. 3.16, зліва).

### **3.3.2. Зниження збудливості мережі пластики I ДР СМ після субпіальної доставки AAV9-GAD65 та AAV9-VGAT**

Надмірне вивільнення ГАМК внаслідок гіперекспресії GAD65 / VGAT може потенційно зменшити частоту генерації ПД у поверхневих нейронах спинного рогу у відповідь на ноцицептивні подразники, таким чином призводячи до зниження больового порогу, яке ми спостерігали у поведінкових тестах. В наступних експериментах ми вивчили збудливість нейронних мереж дорзального рогу, які відповідають за обробку ноцицептивних сигналів. Для цих цілей ми використовували гостро ізольований інтактний препарат спинного мозку миші. Тварини були поділені на три групи: перша це інтактні тварини; в другій групі тваринам субпіально ввели AAV9-UBC-GFP ( $1,6 \times 10^{13}$  гк/мл; 3,0 мл;  $n = 6$ ); третя група тварин отримала комбінацію з AAV9-UBC-GFP, GAD65, та VGAT ( $5,3 \times 10^{12}$  гк/мл,  $1,5 \times 10^{12}$  гк/мл та  $3,3 \times 10^{12}$  гк/мл, відповідно; загальний об'єм 3,0 мл;  $n = 6$ ). Через 2-3 тижні тварини були вбиті шляхом декапітації, та гостро ізольований препарат спинного мозку з дорзальними корінцями був використаний для проведення електрофізіологічних дослідів.



**Рис. 3.17 Викликані відповіді нейронів спинного мозку пластинки I при супрамаксимальній стимуляції дорзального корінця (1 мс, 150 мкА).** (А), Репрезентативні записи викликаних відповідей, отриманих від контрольних мишей, (Б) інфікованих GFP / GAD65 / VGAT, нейрони що генерують ПД та, нейрони що не генерують ПД, записаних у режимі Cell-attached (верхній ряд) та в конфігурації «ціла клітина» у режимі фіксації струмів (нижній ряд) Стрілки вказують на артефакти стимуляції. (В), Пропорція нейронів, що генерують ПД (заповнені стовпчики) та нейронів, які не генерують ПД (пусті стовпчики) у контрольних, GFP / GAD65 / VGAT-інфікованих та GFP-інфікованих мишей.

Ми провели електрофізіологічні записи з GFP позитивних нейронів пластинки I (Рис. 3.16, справа) мишей, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT, щоб перевірити, чи зменшення механічної чутливості у цих тварин поєднувалося зі зниженням збудливості нейронів та мереж дорзального рогу. Реєстрації в режимі cell-attached нейронів у *ex-vivo* препараті спинного мозку виявили меншу частоту генерації потенціалів дії, спричинених

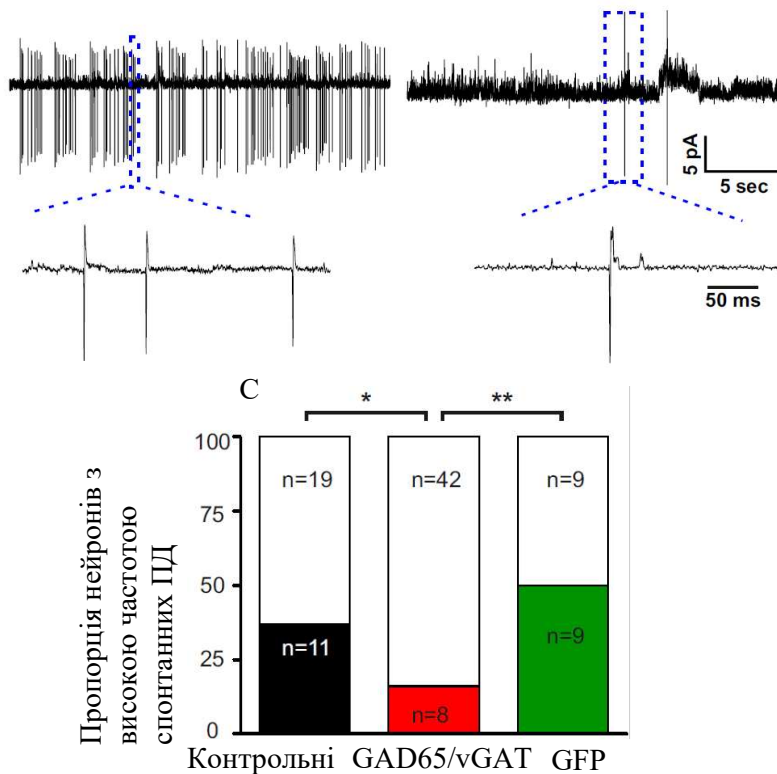
стимуляцією дорзальних корінців. Супрамаксимальні стимули (1 мс, 150 мкА), які активують усі первинні аференти, включаючи ноцицептивні А $\delta$  і С-волокна, продукували щонайменше один АР (Рис. 3.17 А, зліва) в 48% клітин у контрольних тварин і 60% клітин з GFP -інфікованих мишей ( $p = 0,5$ , точний тест Фішера, Рис. 3.17 В).

Однак, та ж сама стимуляція спричинювала генерацію ПД лише у 18% клітин мишей, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT ( $p < 0,05$  у порівнянні з контрольними,  $p < 0,01$  у порівнянні з GFP-інфікованими, точний тест Фішера, Рис. 3.17 В), а у решти нейронів у відповідь на цю стимуляцію не було взагалі викликаних потенціалів дії (Рис. 3.17 Б, верхній ряд).

Подальші записи в конфігурації «ціла клітина» у режимі фіксації струму показали, що кожен нейрон у всіх трьох експериментальних групах реагував на первинну аферентну стимуляцію, генеруючи збудливі постсинаптичні потенціали (ЗПСП) (Рис. 3.17 Б, нижній ряд). Однак, відповіді в клітинах, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT, здебільшого були допороговими (Рис. 3.17, нижній ряд) і не викликали генерації ПД. GFP / GAD65 / VGAT-інфекція також зменшувала спонтанну генерацію ПД порівняно з контрольними та GFP-інфікованими мишами (Рис. 3.18 А). Зокрема, частка нейронів із високою частотою генерації потенціалів дії ( $> 0,3$  Гц) у мишей, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT, була майже втричі нижчою порівняно з контрольними та GFP інфікованими тваринами (16% проти 37% ( $p = 0,056$ ) та 50% ( $p < 0,01$ ) для контрольних та GFP-інфікованих мишей, відповідно, точний тест Фішера, Рис. 3.18 В).

А Нейрони з високою частотою генерації ПД ( $> 0,3$  Гц)

Б Нейрони з низькою частотою генерації ПД ( $< 0,3$  Гц)



**Рис. 3.18** Характеристики спонтанної генерації ПД. (А-Б) Репрезентативні записи від нейронів з високою частотою генерації ПД (ліворуч, GFP-інфіковані миші) та з низькою частотою генерації ПД (праворуч, GFP/GAD65/VGAT інфіковані миші), зареєстровані у конфігурації cell-attached (В) Пропорції нейронів з високою частотою генерації ПД (заповнені стовпчики) та нейронів з низькою частотою генерації ПД (порожні стовпчики) у контрольних, GFP / GAD65 / VGAT-інфікованих та GFP-інфікованих мишей. \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ ; n позначає кількість проаналізованих клітин.

Таким чином, гіперекспресія GAD65 / VGAT знижує як викликану, так і спонтанну активність, зменшуючи загальну збудливість мереж пластинки I ДР СМ, в кінцевому рахунку зменшуючи больову механічну чутливість.

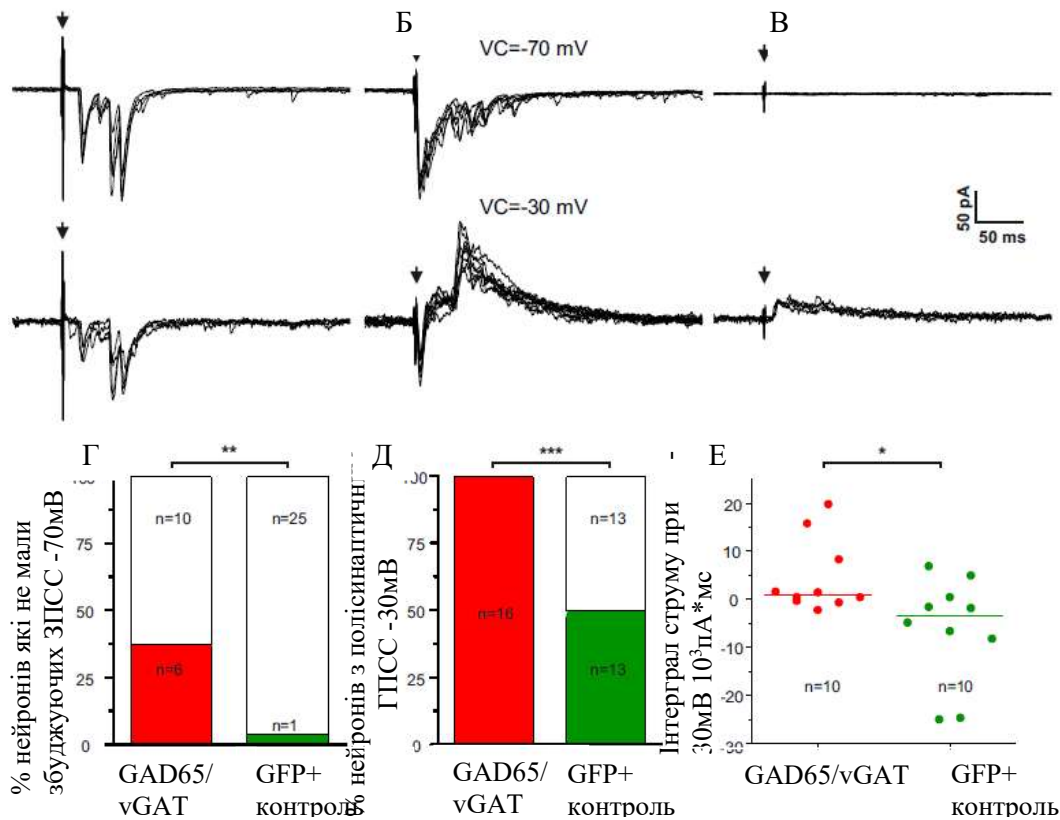
### ***3.3.3. Зміни аферентного входу в умовах AAV9-UBI-GAD65 / VGAT індукованого фенотипу***

Для того, щоб дослідити, які механізми відповідають за знижену збудливість нейронних мереж дорзального рогу у мишей, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT, були зроблені записи в режимі фіксації потенціалу. Спочатку проводилася реєстрація постсинаптичних струмів, викликаних стимуляцією дорзальних корінців, при потенціалі мембрани -70 мВ (Рис. 3.19, вгорі).

Враховуючи склад експериментальних розчинів, електрорушійна сила для аніонів хлору при -70 мВ була низькою, отже, гальмівна полісинаптична складова викликаних постсинаптичних струмів була незначною і можна було зареєструвати лише викликані збуджуючі постсинаптичні струми (ЗПСС).

У цих умовах практично у всіх нейронів мишей, інфікованих GFP та контрольних тварин, були виявлені ЗПСС у відповідь на супрамаксимальну стимуляцію дорзальних корінців (25 з 26 клітин, Рис. 19 А). В той же час, викликані ЗПСС були відсутніми у 37% нейронів від тварин, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT (6 з 16 нейронів,  $p < 0,01$ , точний тест Фішера, Рис. 19 Г), демонструючи зменшену збуджуючу синаптичну передачу від первинного аферентів. Збільшена частка нейронів, які не мають викликаних ЗПСС, в нейронах інфікованих GFP / GAD65 / VGAT, може бути спричинена посиленням пресинаптичного гальмування.

Щоб з'ясувати, чи інфікування GFP / GAD65 / VGAT спричиняло зміни постсинаптичного гальмування, викликаного первинною аферентною стимуляцією, були проведені записи при фіксації потенціалу на -30 мВ (Рис. 19 А). В цих умовах електрорушійні сили для іонів хлору та іонів натрію/калію були приблизно однаковими, що дозволяло спостерігати як збуджуючі, так і гальмівні компоненти викликаного



**Рис. 3.19** Зміни в пре- та постсинаптичному гальмуванні

Репрезентативні записи викликаних постсинаптичних струмів у відповідь на супрамаксимальні стимуляції дорзальних корінців (1 мс, 150 мкА) від нейронів мишей, інфікованих GFP (А) та GFP / GAD65 / VGAT (Б-В). Викликані постсинаптичні струми в нейронах пластинки ІДР СМ, записані в конфігурації «ціла клітина» в режимі фіксації напруги на -70 мВ (верхній ряд) і -30 мВ (нижній ряд). Стрілки вказують на артефакти стимуляції. Гістограми, що демонструють значні відмінності в пре- та постсинаптичному гальмуванні (Г-Е) у GFP / GAD65 / VGAT-інфікованих тваринах (червоні стовпчики) порівняно з контрольними / GFP-інфікованими мишами (зелені стовпчики). (Г) Частка нейронів, в яких не було ЗПСС (забарвлені стовпчики) проти нейронів, які демонстрували (порожні стовпчики) викликані ЗПСС у відповідь на супрамаксимальну стимуляцію дорзального корінця (потенціал фіксації -70 мВ). (Д) Частка нейронів, які мали (забарвлені) проти нейронів, в яких були відсутні

*(порожніх) гальмівні полісинаптичні струми на супрамаксимальну стимуляцію дорзального корінця при потенціалі -30 мВ. (Е). Інтегралі значення викликаних постсинаптичних струмів у GFP / GAD65 / VGAT-інфікованих (червоних) та контрольних / GFP-інфікованих (зелених) мишей. Точки представляють інтегралі струмів окремих клітин; лінії вказують медіанні значення.*

постсинаптичного струму. Як і очікувалося, такі експерименти виявили значне зростання постсинаптичного гальмування. У препаратах спинного мозку від контрольних та GFP-інфікованих тварин супрамаксимальні стимуляції дорзального корінця індукували інгібіторний компонент постсинаптичного струму у половині нейронів, тоді як у препаратах, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT, усі досліджені клітини демонстрували постсинаптичне гальмування ( $p < 0,001$ , Точний тест Фішера, Рис. 19 Д). Вихідні гальмівні постсинаптичні струми були настільки потужними, що загальний інтеграл викликаних постсинаптичних відповідей став позитивним; середнє інтегральне значення складало  $-3290 \text{ pA} \cdot \text{ms}$  у контрольних / GFP-мишей та  $+992 \text{ pA} \cdot \text{ms}$  у тварин, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT ( $p < 0,05$ , тест Манна-Вітні, Рис. 19 Е). Таким чином, гіперекспресія GAD65 / VGAT посилювала постсинаптичне гальмування в нейронних мережах пластинки I ДР СМ.

#### ***3.3.4. Вивільнення ГАМК первинними аферентами в умовах AAV9-UBI-GAD65 / VGAT індукованного фенотипу***

Оскільки віруси потенційно могли заразити нейрони ДКГ через їх центральні терміналі, були зроблені дослідження, які б могли визначити, чи відбувається вивільнення ГАМК з центральних терміналей первинних аферентів мишей, інфікованих GAD65 / VGAT, Якщо глутамат і ГАМК разом вивільняються з первинних аферентів при стимуляції дорзального

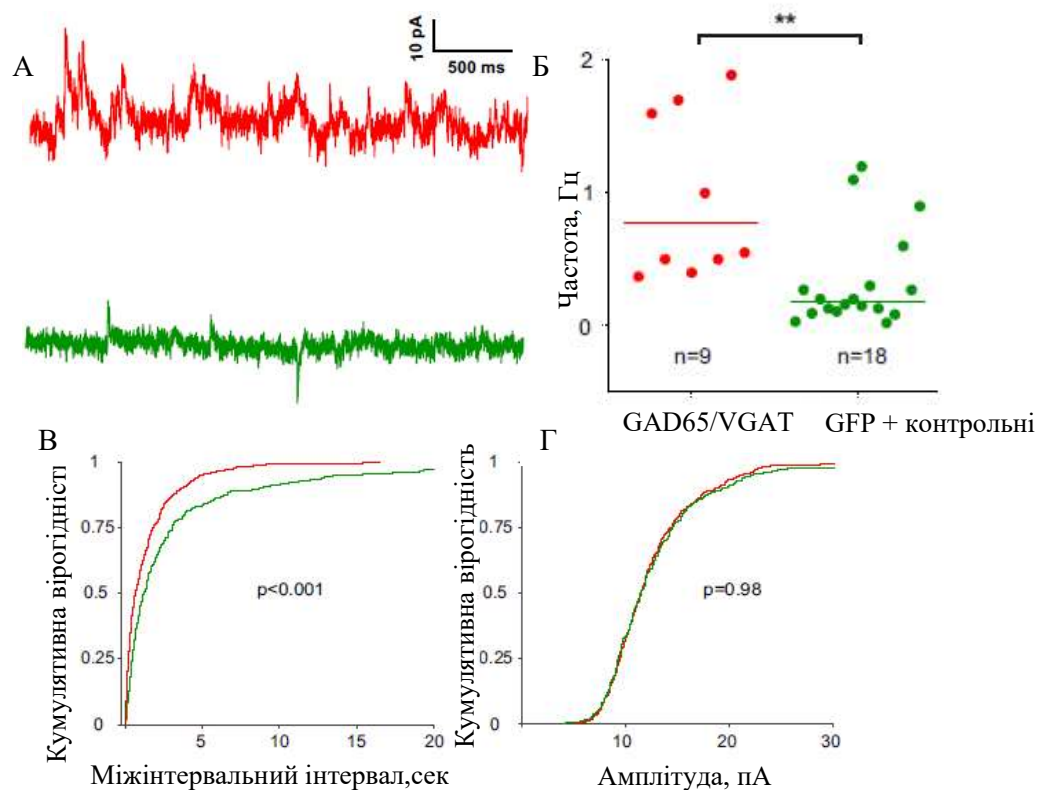
корінця, то викликані гальмівні постсинаптичні струми (ГПСС) матимуть такі самі латентності як і моносинаптичні ЗПСС. Таким чином, ми систематично шукали нейрони, які мали викликані ЗПСС (записи проводилися при 0 мВ) з малою варіацією відповідей на стимуляцію дорзального корінця; після цього потенціал змінювався до -70 мВ, проводилася реєстрація викликаних ЗПСС. У цих експериментах нам не вдалося виявити співпадіння латентностей ЗПСС та ГПСС (n = 5, дані не показані). Подальше застосування інгібітора АМРА-рецепторів CNQX блокувало як ЗПСС, так і ГПСС (n = 3, дані не показані), підтверджуючи, що викликані ГПСС були полі-, а не моносинаптичними. Існує можливість того, що вивільнення ГАМК відбувається, проте вивільнена ГАМК не може досягти постсинаптичних ГАМК-А рецепторів, розташованих на нейронах пластинки I ДР СМ. За такого сценарію вивільнена ГАМК може потенційно сприяти пресинаптичному аутоінгібуванню вивільнення глутамату з терміналей первинних аферентів, зокрема ноцицепторів.

Імуноцитохімічні результати демонструють стійку експресію GAD65 та VGAT в синаптичних терміналях збуджуючих нейронів та в гліальних клітинах ДР СМ. Цей факт разом із гіперекспресією названих білків у ГАМК-ергічних нейронах ДР СМ можуть потенційно призвести до збільшення вивільнення ГАМК у позаклітинний простір та підвищення рівня позаклітинного ГАМК в дорзальному розі. В свою чергу, це може призвести до тонічної активації ГАМК-А рецепторів, що призводить до появи тонічного ГАМК-індукованого струму, і супутнього зниження збудливості нейронних мереж дорзального рогу. З метою перевірки наявності тонічного ГАМК-індукованого струму нейрони контрольних та GAD65 / VGAT-інфікованих мишей утримували при потенціалі -45 мВ, а струми реєстрували до та після застосування габазину (1 мкМ), селективного конкурентного блокатору ГАМК-А рецепторів. Застосування даного блокатора не змінювало базової лінії струму в жодній групі клітин (n



= 3 для контрольних ( $p = 0,45$ ) та  $n = 4$  ( $p = 0,5$ ) для GAD65 / VGAT інфікованих мишей, відповідно), що свідчить про відсутність підвищення тонічного гальмування при гіперекспресії GAD65 та VGAT у дорзальному розі спинного мозку.

### 3.3.5. Зміна спонтанних ГАМК-залежних ГПСС в нейронах пластинки I ДР СМ в умовах AAV9-UBI-GAD65 / VGAT індукованого фенотипу



**Рис. 3.20** Характеристика змін сГПСС в поверхневих нейронах пластинки I. (А) Спонтанні гальмівні ГАМК-індуковані постсинаптичні струми (сГПСС) у GFP / GAD65 / VGAT-інфікованих (червоні записи) та контрольних / GFP-інфікованих (зелені записи) мишах. (Б) Частота сГПСС у GFP / GAD65 / VGAT-інфікованих (червоні точки) та контрольних / GFP-інфікованих (зелені точки) мишах. Точки представляють медіанні значення частоти в окремих клітинах; лінії вказують медіанні значення по вибірках. \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ ;  $n$  відноситься до кількості

*аналізованих клітин Кумулятивні гістограми, що показують (В) зменшені інтервали між подіями сЗПСС (зліва) та (Г) незмінні амплітуди сЗПСС (справа) у мишей, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT; p вказує значення тесту Колмогорова-Смірнова.*

Посилена експресія GAD65 та VGAT у спинному мозку може бути асоційована із збільшенням синаптичного гальмуючого ГАМК-ергічного впливу, що проявляється у більш високій частоті та/або амплітуді спонтанних ГАМК-індукованих ГПСС.

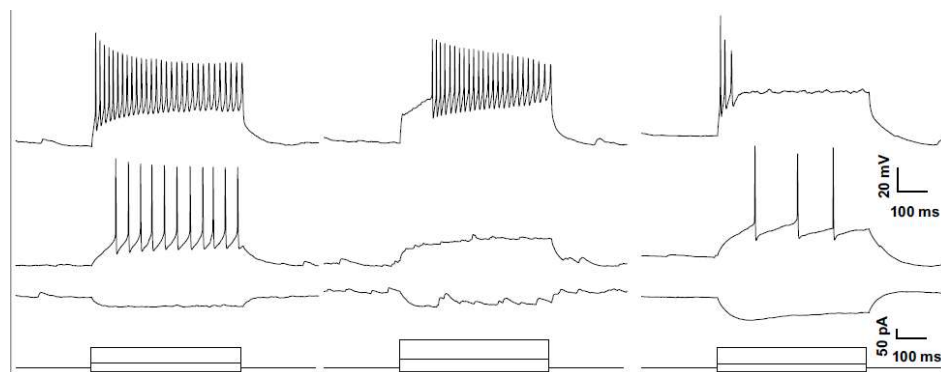
Записи при -30 мВ в присутності стрихніну, доданого для блокування інгібіторної гліцинергічної активності (Рис. 20 А), показали зменшення інтервалів між подіями спонтанних інгібуючих ГАМК-індуковані постсинаптичних струмів у тварин, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT ( $p < 0,001$  Тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 20 Б), що вказує на значне збільшення середньої частоти спонтанних ГПСС (0,18 Гц у контрольних / GFP інфікованих тварин проти 0,78 Гц у мишей, інфікованих GFP / GAD65 / VGAT,  $p < 0,01$  Манна-Вітні тест, Рис. 20 Г ).

У той же час, амплітуди спонтанних ГПСС суттєво не змінювались ( $p = 0,98$ , тест Колмогорова-Смірнова, Рис. 20 В), що дозволяє припустити, що GAD / VGAT-інфекція навряд чи впливає на постсинаптичні іонотропні ГАМК-А рецептори.

В цілому ці результати говорять про те, що посилення експресії GAD65 та VGAT призводить до збільшення кількості або швидшого заповнення пресинаптичних ГАМК везикул, які містять ГАМК, що в свою чергу призводить до збільшення частоти вивільнення синаптичних везикул у ГАМК-ергічних синапсах нейронів пластинки I ДР СМ.

### 3.3.6. Вплив індукованого AAV9-UBI-GAD65 / VGAT фенотипу на генерацію ПД нейронами пластинки I

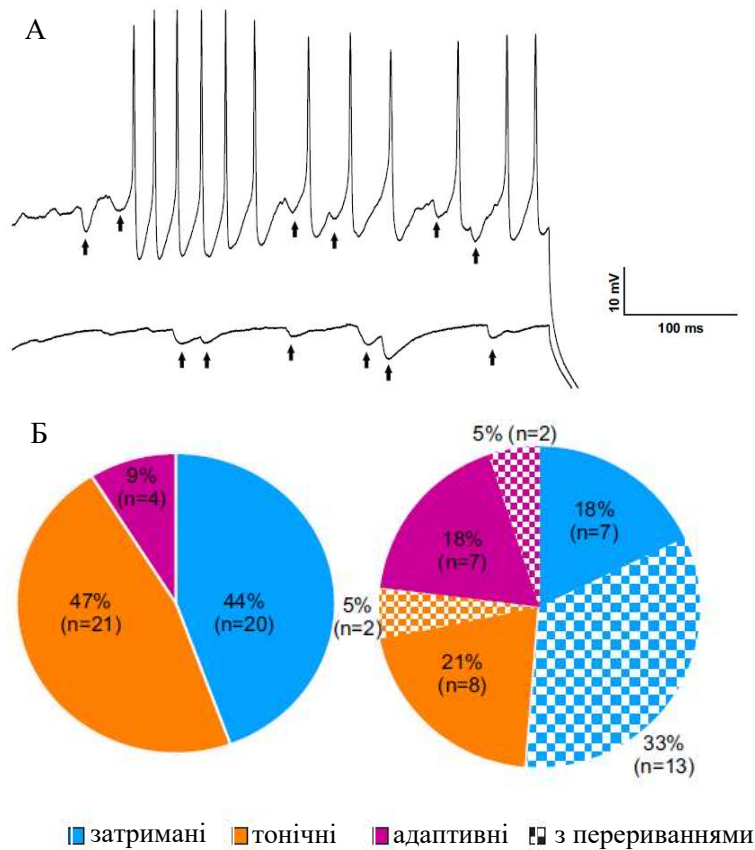
Окрім експериментів, описаних вище, було також досліджено чи може підвищення загального гальмівного тону в ДР СМ, викликане гіперекспресією GAD65 / VGAT, впливати на генерацію ПД викликаних внутрішньоклітинною стимуляцією. Для визначення відмінностей електричної активності були визначені їх відповіді на ін'єкцію струму через «петч піпетку». Протокол був наступний, клітина знаходилась в конфігурації «ціла клітина» ін'єкцію струму проводили через «петч піпетку» та тривала 500 мс, сила першого стимулу складала -25 пА наступні стимули були +25 пА. Незважаючи на те, що в нейронах контрольних/GFP та GAD65/VGAT-інфікованих тварин спостерігалися тонічні, затримані та адаптаційні форми внутрішньої електричної активності (Рис. 21), розподіл між ними значно відрізнявся між цими експериментальними групами.



**Рис. 3.21 Патерни генерації ПД нейронами пластинки I.** Приклади різних типів генерації ПД нейронами пластинки I в *ex-vivo* препаратах спинного мозку у відповідь на прямокутні імпульси струму (500 мс, 20 пА), що подаються через петч-піпетку. Репрезентативні приклади

тонічного (лівий стовпчик), затриманого (середній стовпчик) та адаптивного (правий стовпчик) типів відповідей.

Частка нейронів із затриманим, тонічним та адаптаційним типами генерації ПД у контрольних / GFP інфікованих мишей була 44%, 47% та 9%, відповідно. Вона змінювалась до 51%, 26% та 23% у тварин, інфікованих GAD65 / VGAT ( $p < 0,05$ , Точний тест Фішера, Рис. 22).



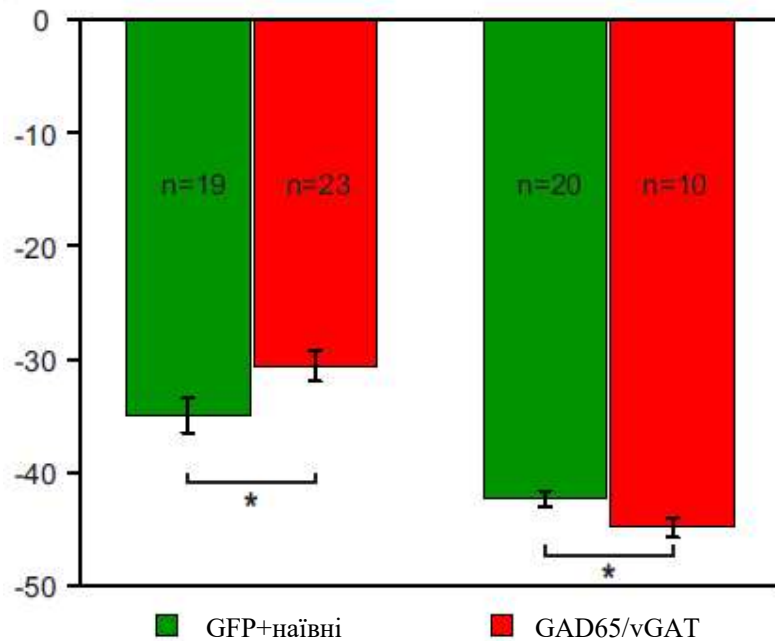
**Рис. 3.22 Розподіл характерних патернів генерації ПД.** (А) репрезентативний приклад типу патерну генерації ПД з перериванням, який спостерігався лише у мишей, заражених GFP / GAD65 / VGAT. Показано записи у відповідь на допорогову (нижня крива) та порогову (верхня крива) стимуляцію. Стрілки вказують на спонтанні гіперполяризуючі інгібіторні постсинаптичні потенціали. (Б) Зміни типів генерації ПД у контрольних / GFP-інфікованих (ліворуч) та GFP / GAD65 /

*VGAT-інфікованих (праворуч) мишей. Двокольорове позначення відповідає нейронам, в яких патерн переривався через спонтанні ГПСП.*

Зважаючи на те, що затриманий патерн активні в основному є рисою збуджуючих нейронів, а тонічний патерн активні переважно відповідає популяції гальмівних клітин (Punnakkal et al., 2014), наші данні вказують на зміну популяції нейронів у бік інгібіторного фенотипу. Ще одним спостереженням було те, що в багатьох випадках патерни ПД-генерації в нейронах від GAD65/VGAT-мишей переривались через спонтанні ГПСП ( $p < 0,001$  порівняно з контрольними / GFP-інфікованими мишами, точний тест Фішера, Рис. 22.). Переривання були індуковані спонтанними інгібуючими постсинаптичними потенціалами, які були більш розпізнаванні при деполяризаційному мембранному потенціалі вище  $-50$  мВ (Рис. 22). Велика кількість цих потенціалів у нейронах від GAD65 / VGAT-мишей відображає більш ніж у 4 рази більшу частоту спонтанних ГПСС, яка спостерігалася у цій групі тварин (Рис. 22). Ці дані свідчать на підтримку зменшення генерації потенціалів дії через підвищення рівня спонтанного синаптичного гальмування, спричиненого GAD65 / VGAT. Таким чином, спонтанний синаптичний інгібуючий струм у поверхневих нейронах дорзального рогу мишей GAD65 / VGAT був достатньо високим, щоб пригнічувати генерацію потенціалів дії під час виникнення групи потенціалів дії, тим самим зменшуючи збудливість локальних нейронних мереж дорзального рогу спинного мозку.

Ми проаналізували збудливість окремих нейронів, оцінивши пороговий потенціал, при якому генерувався перший потенціал дії. Інфекція GAD65 / VGAT змінювала пороги генерації ПД клітино специфічним способом. Виявлено, що у нейронів із затриманим типом генерації ПД пороги ставали вищими ( $-30,5 \pm 1,4$  мВ проти  $-35,0 \pm 1,6$  мВ у контрольних / GFP інфікованих мишей,  $p < 0,05$ , непарного t-тесту, Рис. 30), тоді як у

тонічних нейронах пороги ставали нижчими ( $-45,0 \pm 0,8$  мВ проти  $-42,0 \pm 0,7$  мВ у наївних / GFP інфікованих мишей,  $p < 0,05$ , непарний t-тест, Рис. 30).

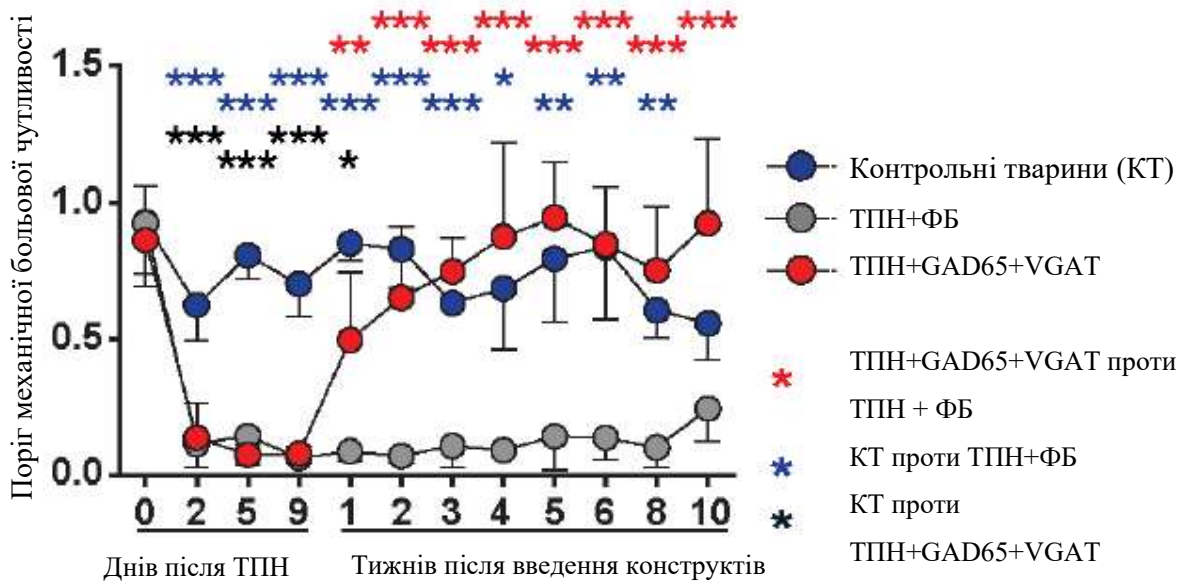


**Рис. 3.23** Характеристика порогів генерації ПД. Відмінність порогів ПД у нейронах з затриманим (зліва) та тонічним (справа) типами генерації у контрольних / GFP-інфікованих (зелені стовпчики) та GFP / GAD65 / VGAT-інфікованих (червоні стовпчики) мишах. \* -  $p < 0,05$ ; n - кількість проаналізованих клітин.

Такі зміни збудливості можуть самі по собі призводити до зниження збудливості ноцицептивних нейронних мереж, оскільки нейрони з затриманим патерном генерування ПД, в основному, є збудливими, а тонічні - здебільшого інгібіторними (Punnakkal et al., 2014).

### 3.3.7. Використання AAV9-UBI-GAD65 / VGAT для терапії хронічного нейропатичного болю в моделі пошкодження периферичного нерва у мишей

Щоб викликати нейропатичний біль, у дорослих мишей сідничний нерв частково перев'язували (травма периферичного нерва (ТПН)), використовуючи шовний матеріал пролін (6,0). Після накладання лігатури на сідничний нерв наявність хронічного болю визначали за допомогою тестів фон Фрея.



**Рис. 3.24** Зміни порогів больової механічної чутливості. Аналіз змін порогів больової механічної методом фон Фрей чутливості та потенційний антиноцицептивний ефект субпіальної доставки AAV9-UBI-GAD65 + AAV9-UBI-VGAT у ДР СМ. \* -  $p < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ . Прогресивна поява терапевтичного ефекту корелює з часом трансгенної експресії, та триває як мінімум 10 тижнів після введення вірусних конструктів.

Через 9 днів після перев'язки сідничного нерва тваринам, у яких спостерігалася підвищена больова чутливість, проводили іпсилатеральну субпіальну ін'єкцію суміші AAV9-UBI-GAD65 + AAV9-UBI-VGAT (співвідношення 1:1, 0,5 мкл; 1,1 мкл;  $1,1 \times 10^{12}$  гк/мл і  $2,5 \times 10^{12}$  гк/мл відповідно) або ін'єкцію фосфатного буферу (ФБ) у тому же об'ємі.

На 7-10 добу після проведення ін'єкцій AAV9-UBI-GAD65 + AAV9-UBI-VGAT було показано, що відбулась нормалізація больових порогів механічної чутливості порівняно із псевдооперованими тваринами, (Рис. 3.24).

Цей ефект зберігався протягом тривалого часу і все ще був присутній через 13 місяців після введення вірусних конструктів. Аналіз рухових характеристик за допомогою тесту «відкрите поле» показали значне зменшення загальної дистанції ходу у тварин з нейропатичним болем, які отримували в якості лікування фосфатний буфер, порівняно з контрольними тваринами; показники ж моторної функції у тварин, яким субпіально вводили AAV9-UBI-GAD65 + AAV9-UBI-VGAT, були схожі на ті, які демонстрували контрольні тварини без проявів нейропатичного хронічного болю.

Ці дані демонструють, що іпсилатеральна доставка генів GAD65 / VGAT селективно у дорзальний ріг СМ шляхом субпіальної доставки є високоефективним для терапії больових проявів в моделі хронічного нейропатичного болю у мишей. Часовий проміжок полегшення больового синдрому відповідає часу експресії білків, які кодуються вірусними векторами, та має довготривалий ефект.



## **РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.**

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

На відміну від гострого болю, який виконує важливу фізіологічну роль, сигналізуючи про наявне або потенційне пошкодження тканин, хронічний біль є патологічним. Незалежно від свого походження постійний біль не зникає навіть після усунення причин, викликаючи хронічні больові синдроми. Приблизно 30 відсотків пацієнтів розвинених країн повідомляють про помірний або сильний біль, що зберігається довше шести місяців (Dahlhamer et al., 2018). Кількість людей, які страждають від хронічного болю різного генезу перевищує 20% лише в США (Dahlhamer et al., 2018). Хронічний біль знаходиться в топ 10 станів які значно порушують якість життя пацієнтів (Vos et al., 2017). Щонайменше 40% людей в розвинених країнах стикаються з проблемою хронічного болю (Breivik et al., 2013). 60.4 % відсотка з опитаних людей в Україні, відповідно до міжнародного діагностичного інтерв'ю CIDI 2,0, стикались з хронічним болем (n = 1720) (Xu et al., 2019) Таким чином, хронічний біль є значною клінічною та соціальною проблемою, проте розробка нових ефективних терапевтичних методів боротьби з цією проблемою відбувається повільно.

Низька ефективність в розробці новітніх лікувальних засобів при хронічному болю насамперед пов'язана з недостатнім розумінням механізмів його виникнення як за фізіологічних умов, так і при патологічних станах. Саме це суттєво сповільнює розробку та впровадження ефективних засобів усунення постійного болю.

Основою хронічного болю є центральна сенситизація, яка за визначенням є підвищенням функціонального статусу нейронів та мереж ноцицептивних шляхів вздовж всієї нервової системи, викликаного підвищенням мембранної збудливості, синаптичної ефективності і/або

зменшення гальмування (Latremoliere & Woolf, 2009). В пластинці I дорзального рогу, частині спинного мозку, яка грає одну з основних ролей в обробці ноцицептивної інформації, проявом центральної сенситизації є гіперзбудливість нейронних мереж. Ця гіперзбудливість викликана зменшенням загального гальмівного тону в нейронній мережі ДР, і тим самим призводить до підвищення загального збуджуючого тону при хронічному болю. В даній роботі було продемонстровані основні механізми інтеграції роботи локальних нейронних мереж та передачі ноцицептивної інформації до супраспінальних структур; Визначено загальне збільшення частоти ЗПСС в СПН I ДР СМ при дії ноцицептивного стимулу в фізіологічних умовах так і зміни нейронних мереж при індукованому хронічному запальному болю. Це зміни можуть бути пов'язані як зі змінами, що викликають підвищену активність інтернейронів спинного мозку на больові та небольові стимули (Gwak et al., 2007; Hao et al., 2004), так і зі змінами потенціал-керованих натрієвих каналів (Hains et al., 2003; Lampert et al., 2006), які підвищують збудливість нейронів ДКГ та призводять до збільшеного викиду глутамату з їх центральних терміналей. Збільшення збуджуючого тону в нейронній мережі ПП ДР СМ також спостерігалось і при нейропатичному хронічному болю, викликаному травмою периферичного нерву (Balasubramanyan et al., 2006; Chen et al., 2009; Fukushima et al., 2011; Inquimbert et al., 2012; Yan & Weng, 2013), і вважається, що ці зміни і призводить до розвитку та підтримання хронічного болю (Sandkühler, 2007; Scholz & Woolf, 2007; Tsuda et al., 2005).

Таким чином можна зробити висновок, що скоріш за все хронічний біль розвивається наступним чином. Периферичне запалення або травма периферичного нерва викликають підвищення генерації груп ПД нейронами ДКГ (Н. Liu et al., 1997; Xie et al., 2005). За рахунок чого збільшується викид глутамату з первинних аферентних терміналей цих нейронів та виникає збільшення збуджуючого тону в нейронній мережі ПП ДР СМ, яке

підтримується не тільки за рахунок пресинаптичних, але й за рахунок постсинаптичних змін.

#### **4.2. Аферентні входи до СПН пластинки I ДР СМ**

Сучасний погляд на обробку сигналу в СПН пластинки I, в основному, базується на записах від нейронів *in vitro* з тонких зрізів спинного мозку. Ці дослідження показують, що тільки менша частина СПН пластинки I отримує прямий вхід від Аδ- та С аферентів (9% та 32% СПН відповідно (Ruscheweyh et al., 2004)). Більш недавні роботи також припускають, що кілька класів ноцицепторів не збуджують СПН безпосередньо, але роблять це за допомогою активації конкретних популяцій інтернейронів спинного рогу (Duan et al., 2014, 2018). В цій роботі використовувався препарат, в якому збережено як центральні терміналі первинних аферентів, так і дендритну структуру нейронів спинного мозку (Fernandes et al., 2016; Nachisuka et al., 2016; Li & Vasseri, 2017; Luz et al., 2014), щоб здійснити детальний аналіз аферентного вхідного сигналу до СПН пластинки I. У наших експериментах усі нейрони отримували моносинаптичні входи від С-волокон, і приблизно половина з них додатково мала прямий вхід від Аδ-волокон. Такий значний вхід до СПН від ноцицептивних волокон узгоджується з імуноцитохімічними дослідженнями, що демонструють велику кількість прямих контактів, утворених Аδ- та С аферентами з сомою та проксимальними дендритами СПН пластинки I (Baseer et al., 2014; E. Polgár et al., 2010; Todd et al., 2002). З функціональної точки зору ці надпорогові входи Аδ / С-волокон дозволяють СПН безпосередньо (без попередньої обробки мережею локальних інтернейронів) передавати інформацію про потенційно шкідливі подразники.

Відповіді супраспінальних проєкційних нейронів на одиничні черезшкірні стимуляції були вивчені з використанням позаклітинних *in vivo* записів від щурів та котів (Allard, 2019; Andrew, 2009; Andrew & Craig, 2002; Bester et al., 2000). Ці експерименти ідентифікували ранні та пізні фази генерації ПД, які були охарактеризовані як опосередковані периферичними А $\delta$ - та С-волоконми відповідно. Хоча ранні та пізні фази генерації ПД спостерігалися також у наших експериментах, детальний аналіз електрофізіологічних записів синаптичного входу, що лежить в основі потенційного виходу, передбачає інше пояснення. Рання фаза генерація ПД індексується моносинаптичними входами від А $\delta$ - і С-волокон, що посилюються за рахунок внутрішніх електричних властивостей, притаманних цим нейронам. На відміну від цього, пізня фаза генерації ПД в СПН II-го типу, що триває протягом секунд після одноразової стимуляції, викликається активністю локальних нейронних мереж.

### **4.3. Механізми обробки сигналу в різних типах СПН**

Механізми обробки сигналів в СПН I-го та II-го типу принципово відрізняються. СПН I-го типу отримують прямий вхід з декількох С- і А $\delta$ -волокон і генерують вихідний сигнал, що складається головним чином з одного ПД. Цікаво, що моносинаптичний вхід від А $\delta$ -волокон в цих нейронах завжди був допороговим. Крім того, ці клітини слабо задіяні в інтеграції роботи локальних нейронних мереж, оскільки навіть часті подразники викликають лише незначне збільшення їх спонтанних ЗПСС, що не викликає додаткових ПД. Порівняно з СПН I-го типу, СПН II-го типу отримують більш численні і сильніші моносинаптичні входи з А $\delta$ - і С-волокон. Ці входи, посилені внутрішніми електричними властивостями, відповідають за ранню фазу генерації ПД. Це посилення є особливо важливим для перетворення А $\delta$ -ноцицептивного входу в коротку «групу» ПД. Крім того, більш сильний вхід і більша частота активності лежать в

основі поступового збільшення кількості ПД на початку діапазону активації ноцицептивних С-волокон.

Пізня фаза генерації ПД, що спостерігається в СПН II-го типу, спричиняється повільним деполяризуючим струмом, залежним від NMDA-рецепторів та тривалою мережевою активністю. Повільний струм генерує платопотенціал, що призводить до генерації ПД мережевою активністю. І тривалість платопотенціалу, і спричинена на його фоні мережева активність, збільшуються із збільшенням сили стимуляції С-волокон. Таким чином, платопотенціал створює часове вікно, в якому збільшення мережевої активності може кодуватися кількістю ПД на пізній фазі. Як показують наші дані, ця мережева активність генерується конкретною нейронною мережею, орієнтованою на СПН II-го типу, а не СПН I-го типу. Така активність може бути опосередкована як поверхневими, так і глибокими інтернейронами дорзального рогу, які спрацьовують подібним чином у відповідь на аферентну стимуляцію С-волокон. (Fernandes et al., 2016, 2018).

#### **4.4. Кодування ноцицептивного входу в СПН різних типів**

СПН пластинки I можна розділити щонайменше на дві окремі групи, СПН I-го та II-го типів. СПН I-го типу, що представляють більшість СПН, генерують один ПД у відповідь на стимуляцію одного надпорогового стимулу С-діапазону. 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* (Woolf & Fitzgerald, 1986). Ці властивості можуть бути важливими для кодування локації больового подразника. Відповідно до цього, на вихідний сигнал СПН I-го типу суттєво не впливає активація локальних нейронних мереж., викликана аферентним входом. Таким чином, СПН I-го типу є

хорошими кандидатами на роль передавачів інформації про розташування шкідливого подразника.

Навпаки, СПН 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 СПН II-го типу можуть плавно кодувати інтенсивність больового подразника. У широкому діапазоні стимуляцій сила ноцицептивного входу перетворюється на кількість ПД. Деякі СПН II-го типу також використовують коротку групу ПД для передачі інформації про активацію Ad ноцицептивного входу. Загальне значення СПН 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 ПД від СПН II-го типу кодують різні аспекти ноцицептивного входу. Рання фаза генерації ПД, безпосередньо викликана аферентним стимулом, поступово збільшується при підсиленні інтенсивності стимуляції дорзального корінця в діапазоні C-волокон (від 2 до 8 ПД). Таким чином, ранній компонент кодує кількісний аспект моно- та полісинаптичного аферентного входу. На відміну від цього, пізня фаза генерації ПД відображає викликану стимуляцією тривалу активацію нейронних мереж дорзального рогу спинного мозку. Ця активність викликана потужним аферентним входом до цієї конкретної мережі. Таким чином, пізня фаза генерації ПД, ймовірно, кодує загальну кількість ноцицептивних C-волокон, що іннервують цю мережу. Часові структури ранніх та пізніх фаз генерації ПД також різні. Перші ПД здебільшого фіксовані у часі, мають високу частоту і утворюються протягом 200 мс після стимуляції, тоді як пізні ПД не є фіксованими в часі, мають меншу частоту і генеруються на протязі секунд після стимуляції. Таким чином, СПН II-го типу, що мають ранні та пізні фази генерації ПД, можуть

використовувати різні часові рамки для кодування і передачі різних аспектів ноцицептивної інформації через один і той самий висхідний аксон.

#### **4.5. Функціональне ролі СПН різних типів**

Наші результати також можуть свідчити про різні функціональні ролі СПН I-го СПН II-го типів. Ці нейрони, в основному, проєктують в парабрахіальну область, яка, в свою чергу, має контакти з мигдалевидним тілом, ділянкою, яка бере участь в обробці емоційного аспекту болю (Gauriau & Bernard, 2002; Peirs & Seal, 2016; Schweinhardt & Bushnell, 2010). Емоційну складову можна закодувати двома способами. По-перше, окремі СПН II-го типу генерують зростаючу кількість ПД у широкому діапазоні больових стимулів. По-друге, через те, що рецепторні поля парабрахіальних нейронів значно більші, ніж поля СПН пластинки I, існує конвергенційний вплив парабрахіальних нейронів. У цьому випадку сигнали від СПН I-го типу, що спрямовані на одну парабрахіальну мішень, також можуть кодувати силу емоційного компонента болю. Однак окремі СПН I-го типу навряд чи можуть кодувати емоційний компонент болю.

З іншого боку, окремі нейрони пластинки I проєктуються на більш ніж одну супраспінальну область (Al-Khater et al., 2008; Al-Khater & Todd, 2009; Todd, 2010b), тож СПН, які термінують у парабрахіальній області, також можуть проєктувати і на таламус (Al-Khater et al., 2008; Al-Khater & Todd, 2009; Rami Burstein et al., 1990; Gauriau & Bernard, 2004a; Spike et al., 2003). Спіноталамічний шлях, що входить в первинну соматосенсорну кору, бере участь в обробці різних аспектів болю (Spike et al., 2003). В умовах диференційної обробки СПН I-го типу можуть локалізувати стимул, тоді як СПН II-го типу можуть кодувати його силу.

Таким чином, дві групи СПН, 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 СПН 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.

#### **4.6. Використання вірусних векторів як потенційний інструмент в лікуванні болю.**

Ми продемонстрували, що субпіальна ін'єкція в дорзальний ріг СМ комбінації GAD65 та VGAT-кодуючих векторів (AAB) є дуже потужною для пригнічення гіперзбудливості локальних нейронних мереж ДР СМ. Гіперекспресія GAD65 і VGAT, обмежена іпсилатеральною стороною дорзального рогу в поперекових сегментах, в яких проводилась ін'єкція, не давала побічних ефектів, таких як моторна слабкість або втрата нормального відчуття, у контрольних мишей.

За фізіологічних умов, для ефективного везикулярного вивільнення ГАМК та гліцину у синаптичну щілину необхідна функціональна система синтезу-вивільнення ГАМК, яка опосередкована головним чином GAD65 та VGAT (везикулярним інгібіторним транспортером амінокислот). Електрофізіологічні реєстрації від нейронів спинного мозку нокаутних VGAT<sup>-/-</sup> мишей, показують повну втрату спонтанних інгібіторних постсинаптичних струмів та значне зниження ймовірності синаптичного везикулярного релізу ГАМК та гліцину (K. Saito et al., 2010; Wojcik et al., 2006). Ці дані демонструють, що шляхом екзогенної доставки інгібіторної машинерії в збуджуючі ноцицептивні нейрони можна досягти функціонального перемикання вже сформованої збуджуючої ноцицептивної системи на інгібіторну. Також, не було виявлено



компенсаторного ендогенного механізму, який би призводив до реверсії цього спричиненого векторами ефекту.

Перемикання фенотипу нейронів потенційно може мати суттєвий вплив на терапію нейропатичного болю різної етіології. Добре відомо, що ноцицептивний аферентний вхід (при болі, спричиненому травмою периферичного нерва, запаленням або спінальною травмою) призводить до активації спінальної мікроглії, астроцитів та регіональних моноцитів, які безпосередньо сприяють ініціації та / або підтримці нейропатичного больового стану (Calvo et al., 2011; Hains & Waxman, 2006; Shibata et al., 2011; Stuesse et al., 2000). Механізм цього ефекту пов'язаний зі збільшенням позаклітинного вивільнення декількох нейромодуляторів, таких як прозапальні цитокіни IL-1 $\beta$ , IL-6 та TNF- $\alpha$  (T. Liu et al., 2012; Peng et al., 2016; Stokes et al., 2013; Svensson et al., 2003; J. M. Zhang & An, 2007) та простагландини PGE2 (O. Saito et al., 2010; Schäfers et al., 2004; Yang et al., 1996). Це призводить до посилення збудливості спінальної ноцицептивної нейронної мережі після периферичної стимуляції. Таким чином, технологія «фенотипічного перемикання нейронів» у спінальних ноцицептивних нейронах може представляти універсальну стратегію терапії нейропатичного болю, індукованого та / або підтримуваного різними патофізіологічними механізмами.

В роботі продемонстровано, що субпіальна доставка генів GAD65 та VGAT є високоефективною для забезпечення індукованого переключення нейротрансмітерного фенотипу від збудливого до інгібіторного в ноцицептивних нейронах дорзального рогу. Це призводить до глибоких змін функціонування нейронної мережі ДР СМ, сприяючи як пре- і постсинаптичному гальмуванню, такі клітини специфічно впливає на збудливість нейронів. Ці зміни призводять до зниження вірогідності виникнення ПД та зниження загального збудливого тону нейронної мережі ДР СМ, який відповідає за обробку ноцицептивної інформації. Такий ефект

може бути особливо корисним при хронічних больових станах, які характеризуються зниженим або неефективним гальмуванням, яке у важких випадках травми СМ може бути посилене підвищенням збудливості нейронів.

Відсутність виявлених побічних ефектів, таких як седация або моторна слабкість припускають, що цей метод, який дозволяє доставляти вектори у вибрані спінальні сегменти, може представляти новий підхід для терапії нейропатичного болю.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі відповідно до поставлених цілей і завдань були визначені специфічні механізми обробки ноцицептивних сигналів в нейронах дорзального рогу (ДР) спинного мозку (СМ) та запропонована перспективна стратегія терапії хронічного болю.

1. По кількості генерованих потенціалів дії (ПД) що виникають у відповідь на супрамаксимальну стимуляцію первинних аферентів вивчені спіно-парабрахіальні нейрони (СПН) пластини I розділяються на три типи. Перший та другий типи СПН є ноцицептивноспецифічними. У відповідь на ноцицептивну стимуляцію різної інтенсивності більшість СПН I-го типу генерують лише поодинокі ПД і є, таким чином, детекторами больового сигналу в СМ. В той же час СПН II-го типу генерують більшу кількість ПД при збільшенні інтенсивності ноцицептивного стимулу кодуючи таким чином його силу. СПН III-го типу не є ноцицептивноспецифічними.

2. Ноцицептивні СПН I-го та II-го типів розрізняються за патерном аферентних входів, який вони отримують. СПН II-го типу отримують більше моносинаптичних входів (насамперед від С-волокон), ніж СПН I-го типу; у них генерується значно більший інтегральний струм через мембрану у відповідь на супрамаксимальну стимуляцію первинних аферентів.

3. На відміну від СПН I-го типу, СПН II-го типу інтегрують викликану стимуляцією первинних аферентів мережеву активність за рахунок виникнення тривалої деполяризації їх плазматичної мембрани. Цей процес є NMDA-рецептор залежним.

4. Хронічний біль зумовлює більшу амплітуду та частоту спонтанних збуджуючих постсинаптичних струмів у СПН, що може призводити до посилення передачі ноцицептивних сигналів від СМ до супраспинальних структур.

5. Посилена експресія ферменту глутаматдекарбоксилази та везикулярного ГАМК транспортеру у збуджуючих нейронах ДР за допомогою субпіальних ін'єкцій відповідних вірусних конструктів, тобто в використанні генноінженерного підходу, призводить до збільшення гальмівного тону ноцицептивної мережі ДР СМ, та зменшує вірогідність генерації ПД у відповідь на ноцицептивний стимул.

6. Субпіальна доставка генів GAD65 та VGAT забезпечує виражений довготривалий антиноцицептивний ефект у тварин з моделлю експериментального хронічного болю завдяки збільшенню загального гальмівного тону в мережі пластини I СМ. Таким чином, це може бути потенційним терапевтичним підходом до терапії больових синдромів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Abaira, V. E., & Ginty, D. D. (2013). The sensory neurons of touch. In *Neuron* (Vol. 79, Issue 4, pp. 618–639).  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.051>
2. Agashkov, K., Krotov, V., Krasniakova, M., Safronov, B., Voitenko, V., & Belan, P. (2017a). Encoding of acute nociception by specific population of lamina I projection neurons. *Neuroscience* 2017.
3. Agashkov, K., Krotov, V., Krasniakova, M., Safronov, B., Voitenko, V., & Belan, P. (2017b). 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*.
4. Agashkov, K., Krotov, V., Krasniakova, M., Shevchuk, D., Andrianov, Y., Zabenko, Y., Safronov, B. V., Voitenko, N., & Belan, P. (2019). Distinct mechanisms of signal processing by lamina I spino-parabrachial neurons. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55462-7>
5. Agashkov, K., Krotov, V., Krasniakova, M., Shevchuk, D., Safronov, B., Voitenko, V., & Belan, P. (2017). 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*.
6. Aiyer, R., Mehta, N., Gungor, S., & Gulati, A. (2018). A Systematic Review of NMDA Receptor Antagonists for Treatment of Neuropathic Pain in Clinical Practice. In *Clinical Journal of Pain* (Vol. 34, Issue 5, pp. 450–467). Lippincott Williams and Wilkins.  
<https://doi.org/10.1097/AJP.0000000000000547>

7. Al-Khater, K. M., Kerr, R., & Todd, A. J. (2008). 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*, *511*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1002/cne.21811>
8. Al-Khater, K. M., & Todd, A. J. (2009). 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*, *515*(6), 629–646. <https://doi.org/10.1002/cne.22081>
9. Allard, J. (2019). Physiological properties of the lamina I spinoparabrachial neurons in the mouse. *Journal of Physiology*, *597*(7), 2097–2113. <https://doi.org/10.1113/JP277447>
10. Almarestani, L., Waters, S. M., Krause, J. E., Bennett, G. J., & Ribeiro-Da-Silva, A. (2007). Morphological characterization of spinal cord dorsal horn lamina I neurons projecting to the parabrachial nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *504*(3), 287–297. <https://doi.org/10.1002/cne.21410>
11. Andrew, D. (2009). Sensitization of lamina I spinoparabrachial neurons parallels heat hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Journal of Physiology*, *587*(9), 2005–2017. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.170290>
12. Andrew, D. (2010). Quantitative characterization of low-threshold mechanoreceptor inputs to lamina I spinoparabrachial neurons in the rat. *Journal of Physiology*, *588*(1), 117–124. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.181511>
13. Andrew, D., & Craig, A. D. (2002). Quantitative responses of spinothalamic lamina I neurones to graded mechanical stimulation in the cat. In *Journal of Physiology* (Vol. 545, Issue 3, pp. 913–931). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.027342>
14. Apkarian, A. V., Sosa, Y., Sonty, S., Levy, R. M., Harden, R. N., Parrish,

- T. B., & Gitelman, D. R. (2004). Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. *Journal of Neuroscience*, 24(46), 10410–10415.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2541-04.2004>
15. Arendt-Nielsen, L., & Yarnitsky, D. (2009). Experimental and Clinical Applications of Quantitative Sensory Testing Applied to Skin, Muscles and Viscera. In *Journal of Pain* (Vol. 10, Issue 6, pp. 556–572).  
<https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.02.002>
16. Baba, H., Doubell, T. P., Moore, K. A., & Woolf, C. J. (2000). Silent NMDA receptor-mediated synapses are developmentally regulated in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 83(2), 955–962. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.2.955>
17. Balasubramanian, S., Stemkowski, P. L., Stebbing, M. J., & Smith, P. A. (2006). Sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons. *Journal of Neurophysiology*, 96(2), 579–590.  
<https://doi.org/10.1152/jn.00087.2006>
18. Baseer, N., Al-Baloushi, A. S., Watanabe, M., Shehab, S. A. S., & Todd, A. J. (2014). Selective innervation of NK1 receptor-lacking lamina I spinoparabrachial neurons by presumed nonpeptidergic Ad nociceptors in the rat. *Pain*, 155(11), 2291–2300.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.08.023>
19. Bell, A. (2018). The neurobiology of acute pain. In *Veterinary Journal* (Vol. 237, pp. 55–62). Bailliere Tindall Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.05.004>
20. Bester, H., Chapman, V., Besson, J. M., & Bernard, J. F. (2000). Physiological properties of the lamina I spinoparabrachial neurons in the rat. *Journal of Neurophysiology*, 83(4), 2239–2259.  
<https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.4.2239>

21. Boscan, P., Pickering, A. E., & Paton, J. F. R. (2002). The nucleus of the solitary tract: An integrating station for nociceptive and cardiorespiratory afferents. *Experimental Physiology*, *87*(2), 259–266.  
<https://doi.org/10.1113/eph8702353>
22. Bou Farah, L., Bowman, B. R., Bokinić, P., Karim, S., Le, S., Goodchild, A. K., & McMullan, S. (2016). Somatostatin in the rat rostral ventrolateral medulla: Origins and mechanism of action. *Journal of Comparative Neurology*, *524*(2), 323–342.  
<https://doi.org/10.1002/cne.23846>
23. Bouhassira, D. (2019). Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology. In *Revue Neurologique* (Vol. 175, Issues 1–2, pp. 16–25). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.09.016>
24. Bouhassira, Didier, Lantéri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B., & Touboul, C. (2008). Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*, *136*(3), 380–387.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.013>
25. Braz, J., Solorzano, C., Wang, X., & Basbaum, A. (2014). Transmitting Pain and Itch Messages: A Contemporary View of the Spinal Cord Circuits that Generate Gate Control. In *Neuron* (Vol. 82, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.018>
26. Breivik, H., Eisenberg, E., & O'Brien, T. (2013). 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*, *13*(1).  
<https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-1229>
27. Brewer, A. L., Liu, S., Buhler, A. V., Shirachi, D. Y., & Quock, R. M. (2018). Role of spinal GABA receptors in the acute antinociceptive response of mice to hyperbaric oxygen. *Brain Research*, *1699*, 107–116.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.08.002>



28. Brown, A. G., & Fyffe, R. E. (1981). Form and function of dorsal horn neurones with axons ascending the dorsal columns in cat. *The Journal of Physiology*, *321*(1), 31–47.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1981.sp013970>
29. Budai, D., & Larson, A. A. (1996). Role of substance P in the modulation of C-fiber-evoked responses of spinal dorsal horn neurons. *Brain Research*, *710*(1–2), 197–203. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01384-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01384-9)
30. Burstein, R., Dado, R. J., & Giesler, G. J. (1990). The cells of origin of the spinothalamic tract of the rat: a quantitative reexamination. *Brain Research*, *511*(2), 329–337. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90179-f](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90179-f)
31. Burstein, Rami, Dado, R. J., & Giesler, G. J. (1990). The cells of origin of the spinothalamic tract of the rat: a quantitative reexamination. *Brain Research*, *511*(2), 329–337. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90179-f](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90179-f)
32. Calvo, M., Zhu, N., Grist, J., Ma, Z., Loeb, J. A., & Bennett, D. L. H. (2011). Following nerve injury neuregulin-1 drives microglial proliferation and neuropathic pain via the MEK/ERK pathway. *GLIA*, *59*(4), 554–568. <https://doi.org/10.1002/glia.21124>
33. Campos, C. A., Bowen, A. J., Roman, C. W., & Palmiter, R. D. (2018). Encoding of danger by parabrachial CGRP neurons. *Nature*, *555*(7698), 617–620. <https://doi.org/10.1038/nature25511>
34. Cavanaugh, D. J., Lee, H., Lo, L., Shields, S. D., Zylka, M. J., Basbaum, A. I., & Anderson, D. J. (2009). Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(22), 9075–9080.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0901507106>

35. Chen, Y., Balasubramanian, S., Lai, A. Y., Todd, K. G., & Smith, P. A. (2009). Effects of sciatic nerve axotomy on excitatory synaptic transmission in rat substantia gelatinosa. *Journal of Neurophysiology*, *102*(6), 3203–3215. <https://doi.org/10.1152/jn.00296.2009>
36. Cheng, H. T. (2010). Spinal cord mechanisms of chronic pain and clinical implications. In *Current Pain and Headache Reports* (Vol. 14, Issue 3, pp. 213–220). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1007/s11916-010-0111-0>
37. Chiang, M. C., Nguyen, E. K., Canto-Bustos, M., Papale, A. E., Oswald, A.-M. M., & Ross, S. E. (2020). Divergent Neural Pathways Emanating from the Lateral Parabrachial Nucleus Mediate Distinct Components of the Pain Response. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.03.014>
38. Chizh, B. A., Headley, P. M., & Tzschentke, T. M. (2001). NMDA receptor antagonists as analgesics: focus on the NR2B subtype. *Trends in Pharmacological Sciences*, *22*(12), 636–642. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)01863-0](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)01863-0)
39. Colleoni, M., & Sacerdote, P. (2010). Murine models of human neuropathic pain. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1802, Issue 10, pp. 924–933). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.10.012>
40. Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A. H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N. B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D. L., Dworkin, R. H., & Raja, S. N. (2017). Neuropathic pain. *Nature Reviews. Disease Primers*, *3*, 17002. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>
41. Conte, W. L., Kamishina, H., & Reep, R. L. (2009). Multiple neuroanatomical tract-tracing using fluorescent Alexa Fluor conjugates of cholera toxin subunit B in rats. *Nature Protocols*, *4*(8), 1157–1166. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.93>

42. D’Mello, R., & Dickenson, A. H. (2008). Spinal cord mechanisms of pain. *British Journal of Anaesthesia*, *101*(1), 8–16.  
<https://doi.org/10.1093/bja/aen088>
43. Dahlhamer, J. M., Lucas, J., Zelaya, C., Nahin, R., Mackey, S., Debar, L., Kerns, R., Von Korff, M., Porter, L., & Helmick, C. (2018). Prevalence of chronic pain and high-impact chronic pain among adults — United States, 2016. In *Morbidity and Mortality Weekly Report* (Vol. 67, Issue 36, pp. 1001–1006). Department of Health and Human Services.  
<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6736a2>
44. Dahlhaus, A., Ruscheweyh, R., & Sandkühler, J. (2005). Synaptic input of rat spinal lamina I projection and unidentified neurones in vitro. *Journal of Physiology*, *566*(2), 355–368.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.088567>
45. Dale, R., & Stacey, B. (2016). Multimodal Treatment of Chronic Pain. In *Medical Clinics of North America* (Vol. 100, Issue 1, pp. 55–64). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2015.08.012>
46. Danilov, A., Danilov, A., Barulin, A., Kurushina, O., & Latysheva, N. (2020). Interdisciplinary approach to chronic pain management. *Postgraduate Medicine*, 00325481.2020.1757305.  
<https://doi.org/10.1080/00325481.2020.1757305>
47. Deng, M., Chen, S. R., & Pan, H. L. (2019). Presynaptic NMDA receptors control nociceptive transmission at the spinal cord level in neuropathic pain. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 76, Issue 10, pp. 1889–1899). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03047-y>
48. Dhaka, A., Murray, A. N., Mathur, J., Earley, T. J., Petrus, M. J., & Patapoutian, A. (2007). TRPM8 Is Required for Cold Sensation in Mice. *Neuron*, *54*(3), 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.02.024>
49. Duan, B., Cheng, L., Bourane, S., Britz, O., Padilla, C., Garcia-

- Campmany, L., Krashes, M., Knowlton, W., Velasquez, T., Ren, X., Ross, S. E., Lowell, B. B., Wang, Y., Goulding, M., & Ma, Q. (2014). Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. *Cell*, *159*(6), 1417–1432. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.003>
50. Duan, B., Cheng, L., & Ma, Q. (2018). Spinal Circuits Transmitting Mechanical Pain and Itch. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 34, Issue 1, pp. 186–193). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0136-z>
51. Dumas, M., Schwab, M. E., & Thoenen, H. (1979). Retrograde axonal transport of specific macromolecules as a tool for characterizing nerve terminal membranes. *Journal of Neurobiology*, *10*(2), 179–197. <https://doi.org/10.1002/neu.480100207>
52. Eaton, M. J., Plunkett, J. A., Karmally, S., Martinez, M. A., & Montanez, K. (1998). Changes in GAD- and GABA- immunoreactivity in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury and promotion of recovery by lumbar transplant of immortalized serotonergic precursors. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *16*(1), 57–72. [https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(98\)00062-3](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(98)00062-3)
53. Eijkelkamp, N., Linley, J. E., Baker, M. D., Minett, M. S., Cregg, R., Werdehausen, R., Rugiero, F., & Wood, J. N. (2012). Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels. *Brain : A Journal of Neurology*, *135*(Pt 9), 2585–2612. <https://doi.org/10.1093/brain/aws225>
54. Fernandes, E. C., Luz, L. L., Mytakhir, O., Lukoyanov, N. V., Szucs, P., & Safronov, B. V. (2016). Diverse firing properties and A $\beta$ -, A $\delta$ -, and C-afferent inputs of small local circuit neurons in spinal lamina I. *Pain*, *157*(2), 475–487. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000394>
55. Fernandes, E. C., Santos, I. C., Kokai, E., Luz, L. L., Szucs, P., & Safronov, B. V. (2018). Low- and high-threshold primary afferent inputs to spinal lamina III antenna-type neurons. *Pain*, *159*(11), 2214–2222. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001320>

56. Ferrier, J., Marchand, F., & Balayssac, D. (2016). Assessment of Mechanical Allodynia in Rats Using the Electronic Von Frey Test. *BIO-PROTOCOL*, 6(18). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1933>
57. Frey, M. von. (1896). *Untersuchungen über die sinnesfunctionen der menschlichen haut: 1. abhandlung: Druckempfindung und schmerz*.
58. Fukushima, T., Takasusuki, T., Tomitori, H., & Hori, Y. (2011). Possible involvement of syntaxin 1A downregulation in the late phase of allodynia induced by peripheral nerve injury. *Neuroscience*, 175, 344–357. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.11.049>
59. Gauriau, C., & Bernard, J. F. (2002). Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Experimental Physiology*, 87(2), 251–258. <https://doi.org/10.1113/eph8702357>
60. Gauriau, C., & Bernard, J. F. (2004a). A Comparative Reappraisal of Projections from the Superficial Laminae of the Dorsal Horn in the Rat: The Forebrain. *Journal of Comparative Neurology*, 468(1), 24–56. <https://doi.org/10.1002/cne.10873>
61. Gauriau, C., & Bernard, J. F. (2004b). Posterior Triangular Thalamic Neurons Convey Nociceptive Messages to the Secondary Somatosensory and Insular Cortices in the Rat. *Journal of Neuroscience*, 24(3), 752–761. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3272-03.2004>
62. Goesling, J., Lin, L. A., & Clauw, D. J. (2018). Psychiatry and Pain Management: at the Intersection of Chronic Pain and Mental Health. *Current Psychiatry Reports*, 20(2), 12. <https://doi.org/10.1007/s11920-018-0872-4>
63. Goshgarian, H. G., & Buttry, J. L. (2014). The pattern and extent of retrograde transsynaptic transport of WGA-Alexa 488 in the phrenic motor system is dependent upon the site of application. *Journal of Neuroscience Methods*, 222, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.11.003>

64. Guedon, J. M. G., Wu, S., Zheng, X., Churchill, C. C., Glorioso, J. C., Liu, C. H., Liu, S., Vulchanova, L., Bekker, A., Tao, Y. X., Kinchington, P. R., Goins, W. F., Fairbanks, C. A., & Hao, S. (2015). Current gene therapy using viral vectors for chronic pain. *Molecular Pain*, *11*(1).  
<https://doi.org/10.1186/s12990-015-0018-1>
65. Gutierrez-Mecinas, M., Kuehn, E. D., Abreira, V. E., Polgár, E., Watanabe, M., & Todd, A. J. (2016). Immunostaining for Homer reveals the majority of excitatory synapses in laminae I-III of the mouse spinal dorsal horn. *Neuroscience*, *329*.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.05.009>
66. Gwak, Y. S., Kang, J., Leem, J. W., & Hulsebosch, C. E. (2007). Spinal AMPA receptor inhibition attenuates mechanical allodynia and neuronal hyperexcitability following spinal cord injury in rats. *Journal of Neuroscience Research*, *85*(11), 2352–2359.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.21379>
67. Hachisuka, J., Baumbauer, K. M., Omori, Y., Snyder, L. M., Koerber, H. R., & Ross, S. E. (2016). Semi-intact ex vivo approach to investigate spinal somatosensory circuits. *eLife*, *5*.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.22866>
68. Hachisuka, J., Omori, Y., Chiang, M. C., Gold, M. S., Richard Koerber, H., & Ross, S. E. (2018). Wind-up in lamina I spinoparabrachial neurons: A role for reverberatory circuits. *Pain*, *159*(8), 1484–1493.  
<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001229>
69. Hains, B. C., Klein, J. P., Saab, C. Y., Craner, M. J., Black, J. A., & Waxman, S. G. (2003). Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(26), 8881–8892.

70. Hains, B. C., & Waxman, S. G. (2006). Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, *26*(16), 4308–4317.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0003-06.2006>
71. Han, L., Ma, C., Liu, Q., Weng, H. J., Cui, Y., Tang, Z., Kim, Y., Nie, H., Qu, L., Patel, K. N., Li, Z., McNeil, B., He, S., Guan, Y., Xiao, B., Lamotte, R. H., & Dong, X. (2013). A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch. *Nature Neuroscience*, *16*(2), 174–182.  
<https://doi.org/10.1038/nn.3289>
72. Hao, J.-X., Kupers, R. C., & Xu, X.-J. (2004). Response characteristics of spinal cord dorsal horn neurons in chronic allodynic rats after spinal cord injury. *Journal of Neurophysiology*, *92*(3), 1391–1399.  
<https://doi.org/10.1152/jn.00121.2004>
73. Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., & Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, *32*(1), 77–88. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90026-7)
74. Heinricher, M. M., Tavares, I., Leith, J. L., & Lumb, B. M. (2009). Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. In *Brain Research Reviews* (Vol. 60, Issue 1, pp. 214–225). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.009>
75. Hong, B., Yao, L. L., Ni, L., Wang, L., & Hu, X. Y. (2017). Antinociceptive effect of botulinum toxin A involves alterations in AMPA receptor expression and glutamate release in spinal dorsal horn neurons. *Neuroscience*, *357*, 197–207.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.06.004>
76. Hylands-White, N., Duarte, R. V., & Raphael, J. H. (2017). An overview of treatment approaches for chronic pain management. In *Rheumatology International* (Vol. 37, Issue 1, pp. 29–42). Springer Verlag.

<https://doi.org/10.1007/s00296-016-3481-8>

77. Hylden, J. L. K., Anton, F., & Nahin, R. L. (1989). Spinal lamina I projection neurons in the rat: Collateral innervation of parabrachial area and thalamus. *Neuroscience*, *28*(1), 27–37. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90229-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90229-7)
78. Inquimbert, P., Bartels, K., Babaniyi, O. B., Barrett, L. B., Tegeder, I., & Scholz, J. (2012). Peripheral nerve injury produces a sustained shift in the balance between glutamate release and uptake in the dorsal horn of the spinal cord. *Pain*, *153*(12), 2422–2431. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.08.011>
79. *International Association for the Study of Pain (IASP)*. (n.d.). Retrieved April 24, 2020, from <https://www.iasp-pain.org/>
80. Jansen, N. A., & Giesler, G. J. (2015). Response characteristics of pruriceptive and nociceptive trigeminoparabrachial tract neurons in the rat. *Journal of Neurophysiology*, *113*(1), 58–70. <https://doi.org/10.1152/jn.00596.2014>
81. Ji, R. R., Berta, T., & Nedergaard, M. (2013). Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy? *Pain*, *154*(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.06.022>
82. Ji, R. R., Nackley, A., Huh, Y., Terrando, N., & Maixner, W. (2018). Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain. *Anesthesiology*, *129*(2), 343–366. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002130>
83. Johnson, M. D., Frigon, A., Hurteau, M. F., Cain, C., & Heckman, C. J. (2017). Reflex wind-up in early chronic spinal injury: Plasticity of motor outputs. *Journal of Neurophysiology*, *117*(5), 2065–2074. <https://doi.org/10.1152/jn.00981.2016>
84. Johnston, G. A. R. (1996). GABAA receptor pharmacology. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 69, Issue 3, pp. 173–198). Elsevier



- Inc. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)02043-8)
85. Khasabov, S. G., Rogers, S. D., Ghilardi, J. R., Peters, C. M., Mantyh, P. W., & Simone, D. A. (2002). Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. *Journal of Neuroscience*, 22(20), 9086–9098.  
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-20-09086.2002>
86. Köbbert, C., Apps, R., Bechmann, I., Lanciego, J. L., Mey, J., & Thanos, S. (2000). Current concepts in neuroanatomical tracing. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 62, Issue 4, pp. 327–351).  
[https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00019-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00019-8)
87. Kopach, O., Krotov, V., Belan, P., & Voitenko, N. (2015a). Inflammatory-induced changes in synaptic drive and postsynaptic AMPARs in lamina II dorsal horn neurons are cell-type specific. *Pain*, 156(3), 428–438. <https://doi.org/10.1097/01.j.pain.0000460318.65734.00>
88. Kopach, O., Krotov, V., Belan, P., & Voitenko, N. (2015b). Inflammatory-induced changes in synaptic drive and postsynaptic AMPARs in lamina II dorsal horn neurons are cell-type specific. *PAIN*, 156(3), 428–438. <https://doi.org/10.1097/01.j.pain.0000460318.65734.00>
89. Kopach, O., Krotov, V., Goncharenko, J., & Voitenko, N. (2016). Inhibition of Spinal Ca(2+)-Permeable AMPA Receptors with Dicationic Compounds Alleviates Persistent Inflammatory Pain without Adverse Effects. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 50.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00050>
90. Kopach, O., Medvediev, V., Krotov, V., Borisyuk, A., Tsymbaliuk, V., & Voitenko, N. (2017). Opposite, bidirectional shifts in excitation and inhibition in specific types of dorsal horn interneurons are associated with spasticity and pain post-SCI. *Scientific Reports*, 7(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-06049-7>
91. Korim, W. S., Farah, L. B., McMullan, S., & Verberne, A. J. M. (2014).

- Orexinergic activation of medullary premotor neurons modulates the adrenal sympathoexcitation to hypothalamic glucoprivation. *Diabetes*, 63(6), 1895–1906. <https://doi.org/10.2337/db13-1073>
92. Kristensson, K., & Olsson, Y. (1971). Retrograde axonal transport of protein. *Brain Research*, 29(2), 363–365. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90044-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90044-8)
93. Krotov, V., Agashkov, K., Krasniakova, M., Safronov, B., Voitenko, V., & Belan, P. (2018). Lamina I projection neuron outputs in physiological and neuropathic pain conditions. *11th FENS Forum for Neuroscience, 7-11 July 2018, Berlin, Germany*.
94. Krotov, V., Agashkov, K., Krasniakova, M., Zabenko, Y., Safronov, B., Voitenko, V., & Belan, P. (2018). Spinal lamina I projection neurons play distinct roles in nociception. *Society for Neuroscience Meeting 2018, 3-7 November 2018, San Diego, USA*.
95. Krotov, V., Tokhtamysh, A., Kopach, O., Dromaretsky, A., Sheremet, Y., Belan, P., & Voitenko, N. (2017a). Functional Characterization of Lamina X Neurons in ex-Vivo Spinal Cord Preparation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 342. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00342>
96. Krotov, V., Tokhtamysh, A., Kopach, O., Dromaretsky, A., Sheremet, Y., Belan, P., & Voitenko, N. (2017b). Functional characterization of lamina X neurons in ex-vivo spinal cord preparation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00342>
97. Krotov, V., Tokhtamysh, A., Safronov, B. V., Belan, P., & Voitenko, N. (2019). High-threshold primary afferent supply of spinal lamina X neurons. *Pain*, 160(9), 1982–1988. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001586>
98. Kucyi, A., & Davis, K. D. (2015). The dynamic pain connectome. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 38, Issue 2, pp. 86–95). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.11.006>

99. Kucyi, A., & Davis, K. D. (2017). The Neural Code for Pain: From Single-Cell Electrophysiology to the Dynamic Pain Connectome. *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 23(4), 397–414. <https://doi.org/10.1177/1073858416667716>
100. Lampert, A., Hains, B. C., & Waxman, S. G. (2006). Upregulation of persistent and ramp sodium current in dorsal horn neurons after spinal cord injury. *Experimental Brain Research*, 174(4), 660–666. <https://doi.org/10.1007/s00221-006-0511-x>
101. Lanciego, J. L., & Wouterlood, F. G. (2011). A half century of experimental neuroanatomical tracing. In *Journal of Chemical Neuroanatomy* (Vol. 42, Issue 3, pp. 157–183). <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.07.001>
102. Latremoliere, A., & Woolf, C. J. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society*, 10(9), 895–926. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.06.012>
103. LaVail, J. H., & LaVail, M. M. (1972). Retrograde axonal transport in the central nervous system. *Science*, 176(4042), 1416–1417. <https://doi.org/10.1126/science.176.4042.1416>
104. Lawson, S. N., Crepps, B. A., & Perl, E. R. (1997). Relationship of substance P to afferent characteristics of dorsal root ganglion neurones in guinea-pig. *Journal of Physiology*, 505(1), 177–191. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.00177.x>
105. Levy, S. L., White, J. J., Lackey, E. P., Schwartz, L., & Sillitoe, R. V. (2017). WGA-alexa conjugates for axonal tracing. *Current Protocols in Neuroscience*, 2017, 1.28.1-1.28.24. <https://doi.org/10.1002/cpns.28>
106. Li, J., & Baccei, M. L. (2017). Functional organization of cutaneous and muscle afferent synapses onto immature spinal lamina I projection neurons. *Journal of Neuroscience*, 37(6), 1505–1517.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3164-16.2016>

107. Lima, D., & Coimbra, A. (1988). The spinothalamic system of the rat: Structural types of retrogradely labelled neurons in the marginal zone (lamina I). *Neuroscience*, 27(1), 215–230. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90232-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90232-1)
108. Lima, D., Mendes-Ribeiro, J. A., & Coimbra, A. (1991). The spino-latero-reticular system of the rat: projections from the superficial dorsal horn and structural characterization of marginal neurons involved. *Neuroscience*, 45(1), 137–152. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90110-a](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90110-a)
109. Lima, Deolinda, Albino-Teixeira, A., & Tavares, I. (2002). The caudal medullary ventrolateral reticular formation in nociceptive-cardiovascular integration. An experimental study in the rat. *Experimental Physiology*, 87(2), 267–274. <https://doi.org/10.1113/eph8702354>
110. Liu, H., Mantyh, P. W., & Basbaum, A. I. (1997). NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature*, 386(6626), 721–724. <https://doi.org/10.1038/386721a0>
111. Liu, T., Gao, Y. J., & Ji, R. R. (2012). Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 28, Issue 2, pp. 131–144). <https://doi.org/10.1007/s12264-012-1219-5>
112. Lorenzo, L.-E., Ramien, M., St Louis, M., De Koninck, Y., & Ribeiro-da-Silva, A. (2008). Postnatal changes in the Rexed lamination and markers of nociceptive afferents in the superficial dorsal horn of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 508(4), 592–604. <https://doi.org/10.1002/cne.21691>
113. Luz, L. L., Szucs, P., Pinho, R., & Safronov, B. V. (2010). Monosynaptic excitatory inputs to spinal lamina I anterolateral-tract-projecting neurons from neighbouring lamina I neurons. *Journal of Physiology*, 588(22), 4489–4505.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.197012>

114. Luz, L. L., Szucs, P., & Safronov, B. V. (2014). Peripherally driven low-threshold inhibitory inputs to lamina I local-circuit and projection neurones: A new circuit for gating pain responses. *Journal of Physiology*, 592(7), 1519–1534. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.269472>
115. Macone, A., & Otis, J. A. D. (2018). Neuropathic Pain. *Seminars in Neurology*, 38(6), 644–653. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1673679>
116. Malcangio, M., & Bowery, N. G. (1996). GABA and its receptors in the spinal cord. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 17, Issue 12, pp. 457–462). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(96\)01013-9](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(96)01013-9)
117. Malinow, R., Schulman, H., & Tsien, R. W. (1989). Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science*, 245(4920), 862–866. <https://doi.org/10.1126/science.2549638>
118. Mason, K. J., O'Neill, T. W., Lunt, M., Jones, A. K. P., & McBeth, J. (2018). Psychosocial factors partially mediate the relationship between mechanical hyperalgesia and self-reported pain. *Scandinavian Journal of Pain*, 18(1), 59–69. <https://doi.org/10.1515/sjpain-2017-0109>
119. Michael, G. J., Averill, S., Nitkunan, A., Rattray, M., Bennett, D. L. H., Van, Q., & Priestley, J. V. (1997). 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*, 17(21), 8476–8490. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-21-08476.1997>
120. Neher, E., & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554), 799–802.
121. Nishida, K., & Ito, S. (2017). Developmental origin of long-range neurons in the superficial dorsal spinal cord. *European Journal of*

- Neuroscience*, 46(10), 2608–2619. <https://doi.org/10.1111/ejn.13736>
122. Nosedá, R., Kainz, V., Jakubowski, M., Gooley, J. J., Saper, C. B., Digre, K., & Burstein, R. (2010). A neural mechanism for exacerbation of headache by light. *Nature Neuroscience*, 13(2), 239–245. <https://doi.org/10.1038/nn.2475>
123. Olesen, A. E., Andresen, T., Staahl, C., & Drewes, A. M. (2012). Human experimental pain models for assessing the therapeutic efficacy of analgesic drugs. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 722–779. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005447>
124. Parker, L. M., Kumar, N. N., Lonergan, T., McMullan, S., & Goodchild, A. K. (2013). Distribution and neurochemical characterization of neurons in the rat ventrolateral medulla activated by glucoprivation. *Brain Structure and Function*, 220(1), 117–134. <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0642-3>
125. Patel, R., & Dickenson, A. H. (2016). Neuronal hyperexcitability in the ventral posterior thalamus of neuropathic rats: Modality selective effects of pregabalin. *Journal of Neurophysiology*, 116(1), 159–170. <https://doi.org/10.1152/jn.00237.2016>
126. Peirs, C., & Seal, R. P. (2016). Neural circuits for pain: Recent advances and current views. In *Science* (Vol. 354, Issue 6312, pp. 578–584). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8933>
127. Peng, J., Gu, N., Zhou, L., B Eyo, U., Murugan, M., Gan, W. B., & Wu, L. J. (2016). Microglia and monocytes synergistically promote the transition from acute to chronic pain after nerve injury. *Nature Communications*, 7, 12029. <https://doi.org/10.1038/ncomms12029>
128. Peyron, R. (2016). Functional brain imaging: What has it brought to our understanding of neuropathic pain? A special focus on allodynic pain mechanisms. *Pain*, 157, S67–S71.

<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000387>

129. Pignatelli, D., Ribeiro-da-Silva, A., & Coimbra, A. (1989). Postnatal maturation of primary afferent terminations in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. An electron microscopic study. *Brain Research*, *491*(1), 33–44. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90085-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90085-1)
130. Pinto, Vitor, Szûcs, P., Derkach, V. A., & Safronov, B. V. (2008). Monosynaptic convergence of C- and A $\delta$ -afferent fibres from different segmental dorsal roots on to single substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *Journal of Physiology*, *586*(17), 4165–4177. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.154898>
131. Pinto, Vítor, Szucs, P., Lima, D., & Safronov, B. V. (2010). Multisegmental A $\delta$ - and C-fiber input to neurons in lamina I and the lateral spinal nucleus. *Journal of Neuroscience*, *30*(6), 2384–2395. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3445-09.2010>
132. Polgár, E., Al Ghamdi, K. S., & Todd, A. J. (2010). Two populations of neurokinin 1 receptor-expressing projection neurons in lamina I of the rat spinal cord that differ in AMPA receptor subunit composition and density of excitatory synaptic input. *Neuroscience*, *167*(4), 1192–1204. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.028>
133. Polgár, E., Hughes, D. I., Riddell, J. S., Maxwell, D. J., Puskár, Z., & Todd, A. J. (2003). Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain*, *104*(1–2), 229–239. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(03\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(03)00011-3)
134. Polgár, Erika, Wright, L. L., & Todd, A. J. (2010). A quantitative study of brainstem projections from lamina I neurons in the cervical and lumbar enlargement of the rat. *Brain Research*, *1308*, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.10.041>
135. Price, D. D., Mao, J., Frenk, H., & Mayer, D. J. (1994). The N-

- methyl-d-aspartate receptor antagonist dextromethorphan selectively reduces temporal summation of second pain in man. *Pain*, 59(2), 165–174. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)90069-8)
136. Price, T. J., & Ray, P. R. (2019). Recent advances toward understanding the mysteries of the acute to chronic pain transition. In *Current Opinion in Physiology* (Vol. 11, pp. 42–50). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.05.015>
137. Punnakkal, P., von Schoultz, C., Haenraets, K., Wildner, H., & Zeilhofer, H. U. (2014). Morphological, biophysical and synaptic properties of glutamatergic neurons of the mouse spinal dorsal horn. *Journal of Physiology*, 592(4), 759–776. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.264937>
138. Ran, Z. S., Zhang, E. T., & Craig, A. D. (1998). Nociceptive and thermoreceptive lamina I neurons are anatomically distinct. *Nature Neuroscience*, 1(3), 218–225. <https://doi.org/10.1038/665>
139. Rexed, B. (1952). The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 96(3), 415–495. <https://doi.org/10.1002/cne.900960303>
140. Ribeiro-Da-Silva, A., & Coimbra, A. (1982). Two types of synaptic glomeruli and their distribution in laminae I–III of the rat spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*, 209(2), 176–186. <https://doi.org/10.1002/cne.902090205>
141. Ruscheweyh, R., Ikeda, H., Heinke, B., & Sandkühler, J. (2004). Distinctive membrane and discharge properties of rat spinal lamina I projection neurones in vitro. In *Journal of Physiology* (Vol. 555, Issue 2, pp. 527–543). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.054049>
142. Rygh, L. J., Suzuki, R., Rahman, W., Wong, Y., Vonsy, J. L., Sandhu, H., Webber, M., Hunt, S., & Dickenson, A. H. (2006). Local and descending circuits regulate long-term potentiation and zif268 expression



- in spinal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 24(3), 761–772. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04968.x>
143. Safronov, B. V., Pinto, V., & Derkach, V. A. (2007). High-resolution single-cell imaging for functional studies in the whole brain and spinal cord and thick tissue blocks using light-emitting diode illumination. *Journal of Neuroscience Methods*, 164(2), 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.05.010>
144. Saito, K., Kakizaki, T., Hayashi, R., Nishimaru, H., Furukawa, T., Nakazato, Y., Takamori, S., Ebihara, S., Uematsu, M., Mishina, M., Miyazaki, J. I., Yokoyama, M., Konishi, S., Inoue, K., Fukuda, A., Fukumoto, M., Nakamura, K., Obata, K., & Yanagawa, Y. (2010). The physiological roles of vesicular GABA transporter during embryonic development: A study using knockout mice. *Molecular Brain*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/1756-6606-3-40>
145. Saito, O., Svensson, C. I., Buczynski, M. W., Wegner, K., Hua, X. Y., Codeluppi, S., Schaloske, R. H., Deems, R. A., Dennis, E. A., & Yaksh, T. L. (2010). Spinal glial TLR4-mediated nociception and production of prostaglandin E 2 and TNF. *British Journal of Pharmacology*, 160(7), 1754–1764. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00811.x>
146. Sandkühler, J. (2007). Understanding LTP in pain pathways. *Molecular Pain*, 3, 9. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-3-9>
147. Schäfers, M., Marziniak, M., Sorkin, L. S., Yaksh, T. L., & Sommer, C. (2004). Cyclooxygenase inhibition in nerve-injury- and TNF-induced hyperalgesia in the rat. *Experimental Neurology*, 185(1), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.09.015>
148. Scholz, J., & Woolf, C. J. (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1361–1368. <https://doi.org/10.1038/nn1992>

149. Schug, S. A., Palmer, G. M., Scott, D. A., Halliwell, R., & Trinca, J. (2016). Acute pain management: Scientific evidence, fourth edition, 2015. *Medical Journal of Australia*, 204(8), 315-317.e1.  
<https://doi.org/10.5694/mja16.00133>
150. Schwab, M. E., Javoy-Agid, F., & Agid, Y. (1978). Labeled wheat germ agglutinin (WGA) as a new, highly sensitive retrograde tracer in the rat brain hippocampal system. *Brain Research*, 152(1), 145–150.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90140-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90140-3)
151. Schweinhardt, P., & Bushnell, M. C. (2010). Pain imaging in health and disease - How far have we come? In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 120, Issue 11, pp. 3788–3797). <https://doi.org/10.1172/JCI43498>
152. Seal, R. P., Wang, X., Guan, Y., Raja, S. N., Woodbury, C. J., Basbaum, A. I., & Edwards, R. H. (2009). Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature*, 462(7273), 651–655. <https://doi.org/10.1038/nature08505>
153. Seltzer, Z., Dubner, R., & Shir, Y. (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, 43(2), 205–218. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(90\)91074-S](https://doi.org/10.1016/0304-3959(90)91074-S)
154. Sheean et al., 2013. (2008). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
155. Shevchuk, D. P., Agashkov, K. S., Bilan, P. V., & Voitenko, N. V. (2017). Spontaneous Synaptic Activity in Projection Neurons of Lamina I of the Isolated Rat Lumbar Spinal Cord: Effect of Peripheral Inflammation. *Neurophysiology*, 49(4), 301–304.  
<https://doi.org/10.1007/s11062-017-9686-y>
156. Shibata, K., Sugawara, T., Fujishita, K., Shinozaki, Y., Matsukawa, T., Suzuki, T., & Koizumi, S. (2011). The astrocyte-targeted therapy by

- Bushi for the neuropathic pain in mice. *PLoS ONE*, 6(8), e23510.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023510>
157. Sillitoe, R. V. (2016). Mossy Fibers Terminate Directly Within Purkinje Cell Zones During Mouse Development. *Cerebellum*, 15(1), 14–17. <https://doi.org/10.1007/s12311-015-0712-6>
158. Sindrup, S. H., & Jensen, T. S. (1999). Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: An update and effect related to mechanism of drug action. In *Pain* (Vol. 83, Issue 3, pp. 389–400). [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(99\)00154-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(99)00154-2)
159. Slugg, R. M., & Light, A. R. (1994). Spinal cord and trigeminal projections to the pontine parabrachial region in the rat as demonstrated with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Journal of Comparative Neurology*, 339(1), 49–61. <https://doi.org/10.1002/cne.903390106>
160. Snider, W. D., & McMahon, S. B. (1998). Tackling pain at the source: New ideas about nociceptors. In *Neuron* (Vol. 20, Issue 4, pp. 629–632). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81003-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81003-X)
161. Spike, R. C., Puskár, Z., Andrew, D., & Todd, A. J. (2003). A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, 18(9), 2433–2448. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02981.x>
162. Staines, W. A., Kimura, H., Fibiger, H. C., & McGeer, E. G. (1980). Peroxidase-labeled lectin as a neuroanatomical tracer: evaluation in a CNS pathway. *Brain Research*, 197(2), 485–490. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)91133-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)91133-6)
163. Stoeckel, K., Schwab, M., & Thoenen, H. (1977). Role of gangliosides in the uptake and retrograde axonal transport of cholera and tetanus toxin as compared to nerve growth factor and wheat germ agglutinin. *Brain Research*, 132(2), 273–285. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90421-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90421-8)

164. Stokes, J. A., Corr, M., & Yaksh, T. L. (2013). Spinal Toll-like receptor signaling and nociceptive processing: Regulatory balance between TIRAP and TRIF cascades mediated by TNF and IFN $\beta$ . *Pain*, *154*(5), 733–742. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.01.012>
165. Stuesse, S. L., Cruce, W. L. R., Lovell, J. A., McBurney, D. L., & Crisp, T. (2000). Microglial proliferation in the spinal cord of aged rats with a sciatic nerve injury. *Neuroscience Letters*, *287*(2), 121–124. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01142-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01142-3)
166. Sugimoto, T., Bennett, G. J., & Kajander, K. C. (1990). Transsynaptic degeneration in the superficial dorsal horn after sciatic nerve injury: effects of a chronic constriction injury, transection, and strychnine. *Pain*, *42*(2), 205–213. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(90\)91164-e](https://doi.org/10.1016/0304-3959(90)91164-e)
167. Svensson, C. I., Marsala, M., Westerlund, A., Calcutt, N. A., Campana, W. M., Freshwater, J. D., Catalano, R., Feng, Y., Protter, A. A., Scott, B., & Yaksh, T. L. (2003). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia is a critical link in inflammation-induced spinal pain processing. *Journal of Neurochemistry*, *86*(6), 1534–1544. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01969.x>
168. Szűcs, P., Pinto, V., Safronov, B. V., Szucs, P., Pinto, V., & Safronov, B. V. (2009). Advanced technique of infrared LED imaging of unstained cells and intracellular structures in isolated spinal cord, brainstem, ganglia and cerebellum. *Journal of Neuroscience Methods*, *177*(2), 369–380. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.10.024>
169. Tadokoro, T., Miyano-hara, A., Navarro, M., Kamizato, K., Juhas, S., Juhasova, J., Marsala, S., Platoshyn, O., Curtis, E., Gabel, B., Ciacci, J., Lukacova, N., Bimbova, K., & Marsala, M. (2017). Subpial adeno-associated virus 9 (AAV9) vector delivery in adult mice. *Journal of Visualized Experiments*, *2017*(125). <https://doi.org/10.3791/55770>

170. Taylor, A. M. W., Peleshok, J. C., & Ribeiro-Da-Silva, A. (2009). Distribution of P2X3-immunoreactive fibers in hairy and glabrous skin of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *514*(6), 555–566. <https://doi.org/10.1002/cne.22048>
171. Taylor, B. K. (2009). Spinal inhibitory neurotransmission in neuropathic pain. In *Current Pain and Headache Reports* (Vol. 13, Issue 3, pp. 208–214). <https://doi.org/10.1007/s11916-009-0035-8>
172. Tervo, D. G. R., Hwang, B. Y., Viswanathan, S., Gaj, T., Lavzin, M., Ritola, K. D., Lindo, S., Michael, S., Kuleshova, E., Ojala, D., Huang, C. C., Gerfen, C. R., Schiller, J., Dudman, J. T., Hantman, A. W., Looger, L. L., Schaffer, D. V., & Karpova, A. Y. (2016). A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons. *Neuron*, *92*(2), 372–382. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.021>
173. Todd, A. J. (2010a). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews. Neuroscience*, *11*(12), 823–836. <https://doi.org/10.1038/nrn2947>
174. Todd, A. J. (2010b). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(12), 823–836. <https://doi.org/10.1038/nrn2947>
175. Todd, A. J. (2017). Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn. In *Molecular Pain* (Vol. 13, p. 1744806917693003). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1744806917693003>
176. Todd, A. J., McGill, M. M., & Shehab, S. A. S. (2000). 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*, *12*(2), 689–700. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00950.x>
177. Todd, A. J., Puskár, Z., Spike, R. C., Hughes, C., Watt, C., &

- Forrest, L. (2002). 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*, 22(10), 4103–4113. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-10-04103.2002>
178. Torrance, N., Smith, B. H., Bennett, M. I., & Lee, A. J. (2006). The Epidemiology of Chronic Pain of Predominantly Neuropathic Origin. Results From a General Population Survey. *Journal of Pain*, 7(4), 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2005.11.008>
179. Trojanowski, J. Q., Gonatas, J. O., & Gonatas, N. K. (1981). Conjugates of horseradish peroxidase (HRP) with cholera toxin and wheat germ agglutinin are superior to free HRP as orthogradely transported markers. *Brain Research*, 223(2), 381–385. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)91151-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)91151-3)
180. Trojanowski, J. Q., Gonatas, J. O., & Gonatas, N. K. (1982). Horseradish peroxidase (HRP) conjugates of cholera toxin and lectins are more sensitive retrogradely transported markers than free HRP. *Brain Research*, 231(1), 33–50. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90005-1)
181. Tsantoulas, C., & McMahon, S. B. (2014). Opening paths to novel analgesics: The role of potassium channels in chronic pain. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 37, Issue 3, pp. 146–158). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.12.002>
182. Tsuda, M., Beggs, S., Salter, M. W., & Inoue, K. (2013). Microglia and intractable chronic pain. *GLIA*, 61(1), 55–61. <https://doi.org/10.1002/glia.22379>
183. Tsuda, M., Inoue, K., & Salter, M. W. (2005). Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in “small” glia. *Trends in Neurosciences*, 28(2), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.12.002>
184. Turk, D. C., & Okifuji, A. (2002). Psychological factors in chronic

- pain: Evolution and revolution. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 70(3), 678–690. <https://doi.org/10.1037//0022-006x.70.3.678>
185. Vercelli, A., Repici, M., Garbossa, D., & Grimaldi, A. (2000). Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. In *Brain Research Bulletin* (Vol. 51, Issue 1, pp. 11–28). [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00229-4](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00229-4)
186. Vos, T., Abajobir, A. A., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abate, K. H., Abd-Allah, F., Abdulle, A. M., Abebo, T. A., Abera, S. F., Aboyans, V., Abu-Raddad, L. J., Ackerman, I. N., Adamu, A. A., Adetokunboh, O., Afarideh, M., Afshin, A., Agarwal, S. K., Aggarwal, R., Agrawal, A., ... Murray, C. J. L. (2017). 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*, 390(10100), 1211–1259. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2)
187. White, F. A., Jung, H., & Miller, R. J. (2007). Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 104, Issue 51, pp. 20151–20158). <https://doi.org/10.1073/pnas.0709250104>
188. Wojcik, S. M., Katsurabayashi, S., Guillemin, I., Friauf, E., Rosenmund, C., Brose, N., & Rhee, J. S. (2006). A Shared Vesicular Carrier Allows Synaptic Corelease of GABA and Glycine. *Neuron*, 50(4), 575–587. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.04.016>
189. Wolfe, D., Wechuck, J., Krisky, D., Mata, M., & Fink, D. J. (2009). A clinical trial of gene therapy for chronic pain. *Pain Medicine*, 10(7), 1325–1330. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2009.00720.x>
190. Woodbury, C. J., Kullmann, F. A., McIlwrath, S. L., & Koerber, H. R. (2008). Identity of myelinated cutaneous sensory neurons projecting to nociceptive laminae following nerve injury in adult mice. *Journal of*

*Comparative Neurology*, 508(3), 500–509.

<https://doi.org/10.1002/cne.21693>

191. Woolf, C. J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature*, 306(5944), 686–688.  
<https://doi.org/10.1038/306686a0>
192. Woolf, C. J., & Fitzgerald, M. (1986). 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*, 251(4), 517–531.  
<https://doi.org/10.1002/cne.902510407>
193. Woolf, C. J., Shortland, P., & Coggeshall, R. E. (1992). Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*, 355(6355), 75–78. <https://doi.org/10.1038/355075a0>
194. Wu, C. W. H., Vasalatiy, O., Liu, N., Wu, H., Cheal, S., Chen, D. Y., Koretsky, A. P., Griffiths, G. L., Tootell, R. B. H., & Ungerleider, L. G. (2011). Development of a MR-Visible Compound for Tracing Neuroanatomical Connections In Vivo. *Neuron*, 70(2), 229–243.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.010>
195. Xia, Z., Dudek, H., Miranti, C. K., & Greenberg, M. E. (1996). Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *Journal of Neuroscience*, 16(17), 5425–5436. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-17-05425.1996>
196. Xie, W., Strong, J. A., Meij, J. T. A., Zhang, J.-M., & Yu, L. (2005). Neuropathic pain: early spontaneous afferent activity is the trigger. *Pain*, 116(3), 243–256. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.04.017>
197. Xu, A., Hilton, E., Arkema, R., Tittle, N. L., & Helming, L. M. (2019). Epidemiology of chronic pain in Ukraine: Findings from the world mental health survey. *PLoS ONE*, 14(10).



<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224084>

198. Yamashita, T., & Petersen, C. C. H. (2016). Target-specific membrane potential dynamics of neocortical projection neurons during goal-directed behavior. *ELife*, 5(JUN2016).  
<https://doi.org/10.7554/eLife.15798>
199. Yan, X., & Weng, H.-R. (2013). 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(42), 30544–30557. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.495465>
200. Yang, L. C., Marsala, M., & Yaksh, T. L. (1996). Characterization of time course of spinal amino acids, citrulline and PGE2 release after carrageenan/kaolin-induced knee joint inflammation: A chronic microdialysis study. *Pain*, 67(2–3), 345–354.  
[https://doi.org/10.1016/0304-3959\(96\)03106-5](https://doi.org/10.1016/0304-3959(96)03106-5)
201. Yasaka, T., Tiong, S. Y. X., Hughes, D. I., Riddell, J. S., & Todd, A. J. (2010). Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain*, 151(2), 475–488.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.08.008>
202. Zeilhofer, H. U., Neumann, E., & Munro, G. (2019). Spinal GABAA receptors for pain control: back to the future? In *British Journal of Anaesthesia* (Vol. 123, Issue 2, pp. e176–e179). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.01.030>
203. Zeilhofer, H. U., Wildner, H., & Yévenes, G. E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. In *Physiological Reviews* (Vol. 92, Issue 1, pp. 193–235).  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2010>
204. Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain.

- In *International Anesthesiology Clinics* (Vol. 45, Issue 2, pp. 27–37).  
<https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>
205. Zhang, X., & Giesler, G. J. (2005). Response characteristics of spinothalamic tract neurons that project to the posterior thalamus in rats. *Journal of Neurophysiology*, *93*(5), 2552–2564.  
<https://doi.org/10.1152/jn.01237.2004>
206. Zhao, Z., Wang, L., Gao, W., Hu, F., Zhang, J., Ren, Y., Lin, R., Feng, Q., Cheng, M., Ju, D., Chi, Q., Wang, D., Song, S., Luo, M., & Zhan, C. (2017). A Central Catecholaminergic Circuit Controls Blood Glucose Levels during Stress. *Neuron*, *95*(1), 138-152.e5.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.031>
207. Zhuo, M. (2017). Ionotropic glutamate receptors contribute to pain transmission and chronic pain. In *Neuropharmacology* (Vol. 112, pp. 228–234). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.014>
208. Zilliox, L. A. (2017). Neuropathic Pain. In *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology* (Vol. 23, Issue 2, pp. 512–532). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000462>
209. Zou, Y., Xu, F., Tang, Z., Zhong, T., Cao, J., Guo, Q., & Huang, C. (2016). 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. *Molecular Pain*, *12*. <https://doi.org/10.1177/1744806916681566>
210. Zylka, M. J. (2005). Nonpeptidergic circuits feel your pain. In *Neuron* (Vol. 47, Issue 6, pp. 771–772). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.003>